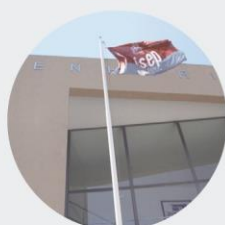




## Regeneração de compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

RUI ALBERTO CORREIA BELOTO

Julho de 2019



# Regeneração de compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

RUI ALBERTO CORREIA BELOTO

junho de 2019

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## **Agradecimentos**

A presente dissertação só foi possível graças à oportunidade de estágio concedida pela Corticeira Amorim. Quero agradecer por todo o apoio ao longo destes nove meses por parte de todos os colaboradores e pelas condições disponibilizadas para a realização do estágio.

Agradeço ao meu orientador da Amorim & Irmãos, ao professor doutor Miguel Cabral, pela partilha de conhecimentos, pelas críticas que me incentivaram sempre a fazer melhor, pelo interesse e paciência durante estes nove meses da realização do estágio.

Agradeço à minha orientadora do ISEP, a professora doutora Cristina Delarue-Matos, pelo interesse, disponibilidade e dedicação durante a realização da presente dissertação.

Ao José Pedro Machado, pela confiança depositada ao longo destes nove meses e por me proporcionar um novo “*mindset*” que fez de mim um melhor profissional. Obrigado também, pelo acompanhamento e dedicação na transferência de conhecimentos.

Ao doutor Paulo Lopes, agradeço o conhecimento transmitido e a dedicação ao acompanhamento no meu percurso.

A toda a equipa do I&D, à Eng. Ana Malheiro, à Salomé Reis, à Andreia Oliveira, à Gloria Espinheira, à Joaquina Laranjeira, à Catarina Pereira, à Patrícia Pinho, pela integração, pelos conhecimentos, pela companhia, pelo interesse, pelo ambiente de trabalho e por toda a ajuda, um muito obrigado por tudo.

Ao Wilson e Nádia por me integrarem na empresa e por serem os melhores companheiros.

Aos meus pais, por todo o apoio, confiança e por nunca desistirem de mim, mesmo nos momentos mais difíceis da vida.

Por fim, à Beatriz, por me acompanhar sempre, por ser o meu porto seguro e a minha âncora, por tudo aquilo que sabes, obrigado.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## Resumo

A indústria corticeira enfrenta um problema grave desde a década de 90, a contaminação das rolhas por 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Este composto contamina a rolha e a sua transmissão para os vinhos confere um sabor e aroma a mofo inibindo as particularidades gustativas dos mesmos. A maneira como essa transmissão ocorre vai ser alvo de estudo na presente dissertação, especificamente, qual a capacidade do TCA migrar da rolha para o vinho.

O TCA faz parte de uma família de compostos em que nem todos são prejudiciais, alguns compostos fenólicos são benéficos e atuam como antioxidantes protegendo o vinho da oxidação. No entanto, essa capacidade é destruída pela reação dos mesmos com o peróxido de hidrogénio proveniente do processo industrial lavagem. Na presente dissertação também vamos estudar um método eficaz de regenerar os compostos fenólicos oxidados.

Para determinar a capacidade migratória de TCA foram efetuados vários estudos com variações no tipo de rolha, local e/ou quantidade de contaminação. Para o estudo de migração natural contaminaram-se as rolhas a três profundidades diferentes, onde se determinou que ocorre migração nas contaminações mais profundas para o vinho mas, nas contaminações menos profundas mantem-se incapaz de migrar para o vinho.

Para as rolhas de champanhe variaram-se as contaminações entre os discos de cortiça natural interior e exterior e, o corpo da rolha feito de granulado. Os resultados foram conclusivos e demonstraram que existe migração dos discos contaminados para o vinho. As contaminações nos corpos foram incapazes de contaminar os vinhos. Este resultado repetiu-se quando foi feito um estudo às capacidades migratórias das rolhas de champanhe variando apenas a contaminação dos corpos.

No estudo da regeneração de compostos fenólicos, através do método de análise FRAP, DPPH e Folin-Ciocalteu, observou-se que com um tratamento de 24 horas de solução de dióxido de enxofre os compostos fenólicos das rolhas retornam ao seu estado redutor. Isto traduz-se no aumento da capacidade antioxidante.

**Palavras-chave:** migração, rolha de champanhe, rolha natural, TCA, cortiça, quinonas, antioxidante, regeneração

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## **Abstract**

The cork industry has faced a serious problem since the 1990s, the contamination of corks by 2,4,6-trichloroanisole (TCA). This compound contaminates the cork and its transmission to the wines confers a taste and scent of mold, inhibiting the gustatory peculiarities of the wines. The manner in which this transmission takes place will be the subject of study in the present dissertation, specifically, the capacity of the TCA to migrate from the cork to the wine.

TCA is part of a family of compounds in which not all are harmful, some phenolic compounds are beneficial and act as antioxidants protecting wine from oxidation. However, this capacity is destroyed by the reaction of the same with the hydrogen peroxide from the industrial washing process. In the present dissertation we will also study an effective method of regenerating the oxidized phenolic compounds.

To determine the migratory capacity of TCA, several studies were carried out with variations in the type of cork, local and / or amount of contamination. For the study of natural migration the corks were contaminated at three different depths, where it was determined that migration occurs in the deeper contaminations but, in the shallower contaminations, it remains unable to migrate to the wine.

For the champagne corks the contaminations between the inner and outer natural cork disks and the body of the cork made of granulate were varied. The results were conclusive and showed that there is migration of contaminated disks to the wine. The contaminations in the bodies were unable to contaminate the wines. This result was repeated when a study of the migratory capacities of champagne corks was done, varying only the contamination of the bodies.

In the study of the regeneration of phenolic compounds, through the FRAP, DPPH and Folin-Ciocalteu analysis, it was observed that with a 24 hour treatment of sulfur dioxide solution the stoppers recover the phenolic compounds to their reducing state. This translates into increased antioxidant capacity.

Key words: migration, champagne cork, natural cork, TCA, cork, quinones, antioxidant, regeneration

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## Índice

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Enquadramento e introdução ao estudo	1
1.2. A cortiça e a rolha	2
1.3. Tricloroanisol e outros compostos fenólicos	4
1.4. Interação entre vinho e rolha	5
1.5. Organização da dissertação	6
1.6. Contributos do trabalho	7
<b>2. Estado da arte</b>	<b>8</b>
<b>3. Migração de TCA em rolhas naturais, bartop e de champanhe</b>	<b>11</b>
3.1. Migração de d5-TCA em rolhas naturais	11
3.1.1. Metodologia	11
3.1.2. Resultados e discussão	14
3.1.3. Conclusão	22
3.2. Migração de d5-TCA em rolhas bartop	23
3.2.1. Metodologia	23
3.2.2. Resultados e discussão	25
3.2.3. Conclusão	30
3.3. Migração de TCA em rolhas de champanhe I	30
3.3.1. Metodologia	30
3.3.2. Resultados e discussão	31
3.3.3. Conclusão	36
3.4. Migração de TCA em rolhas de champanhe II	36
3.4.1. Metodologia	36
3.4.2. Resultados e discussão	37
3.4.3. Conclusão	40
<b>4. Regeneração de compostos fenólicos oxidados (quinonas) para a sua forma redutora</b>	<b>41</b>
4.1. Objetivo	41
4.2. Metodologia	41
4.3. Resultados e discussão	42
4.4. Conclusão	46

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

<b>5. Conclusões gerais .....</b>	<b>47</b>
<b>6. Avaliação do trabalho realizado .....</b>	<b>48</b>
6.1. <i>Objectivos realizados .....</i>	48
6.2. <i>Outros trabalhos realizados.....</i>	48
6.3. <i>Possíveis trabalhos futuros .....</i>	49
<b>Anexo 1 – Procedimento de análise por SPME-GC-MS .....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 2 - Dados para o ensaio de migração de TCA em rolhas de champanhe I .....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 3 - Dados para o ensaio de regeneração de compostos fenólicos oxidados.....</b>	<b>604</b>

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## Índice de figuras

Figura 1. Volume de vendas em 2018 por localização geográfica [3].	2
Figura 2. Demonstração do aspeto visual de rolhas de cortiça naturais de qualidade flor [4].	3
Figura 3. Diferenças entre os tipos de rolhas de champanhe [9].	4
Figura 4. Haloanisóis prejudiciais ao aroma e sabor dos vinhos.	5
Figura 5. Representação teórica do possível mecanismo de formação da quinona [32].	10
Figura 6. Demonstração do aspeto visual dos topos das rolhas seleccionadas.	12
Figura 7. Seringa com a qual foi efetuada a contaminação.	12
Figura 8. Contaminação da rolha com solução de d5-TCA utilizando uma seringa.	13
Figura 9. Corte das rolhas em duas secções, superior contaminada e inferior não contaminada.	13
Figura 10. Análise visual das rolhas aos 12 meses após extração, a marca preta indica a posição do corte a 34 mm.	17
Figura 11. Exemplo da análise visual das rolhas, aos 24 meses, após extração.	19
Figura 12. Corte das rolhas em duas secções, superior contaminada (na esquerda) e inferior não contaminada (na direita).	24
Figura 13. Exemplo da absorção de líquido pela rolha que atinge a secção contaminada. Partes castanhas da rolha representam locais humidificados.	29
Figura 14. Divisão das rolhas conforme local de contaminação e concentração da contaminação.	31
Figura 15. Exemplo da condição visual após abertura da garrafa. Disco de espelho (centro) com colapso da estrutura.	35
Figura 16. Exemplo da condição visual da rolha onde é possível observar absorção de líquido no disco de espelho.	35
Figura 17. Capacidade antioxidante para rolhas nature e clean 0 sem tratamento e, capacidade para as rolhas nature com diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> no tratamento, em mg/L de ácido gálico equivalente.	43

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

**Figura 18. Resultados do método FRAP em concentrações equivalentes de Trolox. ....44**

**Figura 19. Equivalentes de trolox para cada ensaio com tratamento e sem tratamento. ....45**

## Índice de tabelas

Tabela 1. Resultados, aos 12 meses, de d5-TCA (SPME-GC-MS) da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	15
Tabela 2. Média e desvio padrão, aos 12 meses, de d5-TCA (SPME-GC-MS) da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. 16	
Tabela 3. Resultados das análises visuais das rolhas 24 meses após engarrafamento.....	18
Tabela 4. Resultados, 24 meses após engarrafamento, de d5-TCA em SPME-GC-MS da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.....	20
Tabela 5. Média e desvios padrão, 24 meses após engarrafamento, de d5-TCA em SPME-GC-MS da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	21
Tabela 6. Resultados da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40% e 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	25
Tabela 7. Média e desvio padrão da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40 e a 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	26
Tabela 8. Resultados da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40% e 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	28
Tabela 9. Média e desvio padrão da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40 e a 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	28
Tabela 10. Concentração de TCA no corpo e vinho. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	33
Tabela 11. Média e desvio padrão da concentração de TCA no corpo e vinho. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	34
Tabela 12. Concentração de TCA. Repetição da análise aos discos do grupo 2. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....	34

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

<b>Tabela 13. Concentrações de TCA no corpo, disco(s) e vinho em ng/L. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....</b>	<b>38</b>
<b>Tabela 14. Média e desvio padrão das concentrações de TCA no corpo, disco(s) e vinho em ng/L. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L. ....</b>	<b>39</b>
<b>Tabela 15. Resultados médios da análise ao dióxido de enxofre das soluções. ....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela A.1.1. Preparação das amostras da reta de calibração para gama de baixa concentração.....</b>	<b>55</b>
Bookmark not defined.	Error!
<b>Tabela A.1.2. Preparação das amostras da reta de calibração para gama de alta concentração... ..</b>	<b>Error!</b>
Bookmark not defined.	Error!
<b>Tabela A.2 .1 – Dados para concentração de TCA nos discos antes da colagem organizados por grupos de concentração e numerados.....</b>	<b>56</b>
<b>Tabela A.2 .2. – Dados para os resultados da concentração de TCA após 6 meses de engarrafamento. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela A.2 .3. – Dados para os resultados da concentração de TCA após 12 meses de engarrafamento. ....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela A.3 .1. – Resultados obtidos no método de Folin-Ciocalteu com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre. ....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela A.3 .2 – Resultados obtidos pelo método de FRAP com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre. ....</b>	<b>60</b>
<b>Tabela A.3 .3. – Resultados obtidos pelo método de DPPH com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre. ....</b>	<b>61</b>

## Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

A&I	Amorim & Irmãos, S.A.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
D5-TBA	2,4,6-tribromoanisol-deuterado
D5-TCA	2,4,6-Tricloroanisol-deuterado
ECD	Detetor de captura de eletrões
FRAP	Capacidade redutora férrica de plasma
GC	Cromatografia gasosa
I&D	Departamento de investigação e desenvolvimento
MS	Espetroscopia de massa
ND	Não detetável
PCA	Pentacloroanisol
RCT	Rolha de champanhe e Twin Top®
SPME	Microextração em fase sólida
TBA	2,4,6-tribromoanisol
TCA	2,4,6-tricloroanisol
1D	Um disco
2D	Dois discos

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento e introdução ao estudo

A Corticeira Amorim tem uma forte cultura de inovação da qual fazem parte teses de mestrado, projetos de investigação e estudos científicos que contribuem para o desenvolvimento de novas tecnologias no mercado da cortiça e derivados. O departamento de investigação e desenvolvimento (I&D) é um pilar estratégico da empresa que permite à Corticeira Amorim continuar na vanguarda da inovação no setor da cortiça [1].

A presente dissertação apresenta o trabalho desenvolvido ao longo do estágio curricular no departamento de I&D da Amorim & Irmãos (A&I), no qual foram essencialmente desenvolvidos estudos ligados ao (à):

- i) Aprofundamento do conhecimento na maneira como 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) migra da rolha para o vinho.
- ii) Regeneração de compostos fenólicos oxidados pelos produtos de lavação para a sua forma redutora original.

Para além dos estudos sobre TCA, o I&D procura constantemente acrescentar valor à cortiça e aos seus produtos. A melhoria de processos industriais pela validação dos mesmos em contexto laboratorial é uma realidade contínua do dia a dia do I&D [1, 2].

Apresentação da empresa:

A Corticeira Amorim S.G.P.S., S.A. é a “*holding*” do maior grupo de empresas produtoras e transformadoras de cortiça a nível mundial. É a empresa líder encontrando-se em mais de cem

países e territórios, com 12 unidades industriais de matéria prima e 23 unidades de transformação de cortiça [3].

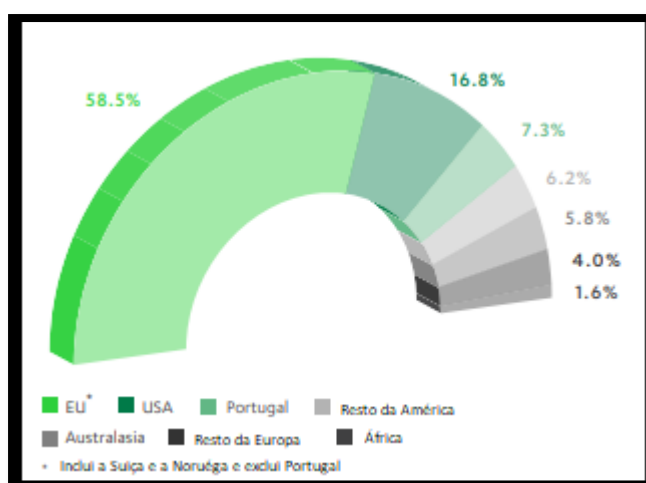


Figura 1. Volume de vendas em 2018 por localização geográfica [3].

A corticeira atua em várias áreas de negócio, mas o principal produto é a rolha de cortiça com 70% das vendas [3]. Ao todo são vendidas cerca de 5,4 bilhões de rolhas anualmente [3] (Figura 1).

A Corticeira Amorim está constantemente à procura de novas tecnologias e produtos para acrescentar valor à cortiça. Ao todo, o investimento em investigação e desenvolvimento totaliza o montante de 7,5 milhões de euros anuais [1]. É no I&D que são realizados grande parte dos estudos. O I&D é responsável por assegurar a qualidade dos produtos e prestar auxílio às restantes unidades do grupo com uma capacidade analítica de deteção de TCA na ordem das 1000 amostras diárias.

Os temas da presente dissertação são elaborados na unidade I&D e fazem parte de um conjunto de estudos dos quais se pretende aprofundar o conhecimento e encontrar soluções para problemas do mercado e problemas produtivos.

## 1.2. A cortiça e a rolha

A cortiça é a casca de sobreiro, representa uma matéria-prima natural com características muito particulares, é totalmente biodegradável, renovável e reciclável [4]. A sua composição tem como base a suberina, que confere a elasticidade ao material, a lenhina, composto que contribui para a capacidade isolante térmica e acústica, e, polissacarídeos que definem a textura da cortiça [5].

O descortiçamento do sobreiro é o ato de obtenção de cortiça [6,7]. O crescimento do sobreiro é influenciado por condições muito específicas de solo e temperatura o que implica que apenas uma zona limitada do planeta tem as condições necessárias para o seu crescimento [6,7,8]. Até ao primeiro descortiçamento são necessários 25 anos de crescimento do sobreiro, além disso, o descortiçamento de um sobreiro só pode ser feito de 9 em 9 anos, de forma a que a espessura da cortiça seja a necessária para a produção de rolhas.

O período de vida de um sobreiro é cerca de 200 anos, o que permite uma média de 15 descortiçamentos [7]. A cortiça extraída é enviada para as unidades de produção e transformação para se fazerem vários tipos de rolhas e outros produtos.

A produção de rolhas tem que acomodar as várias qualidades e especificações das diferentes rolhas comercializadas. De uma maneira geral, as rolhas produzidas podem ser divididas entre 2 grandes grupos, rolhas naturais e rolhas técnicas [9]. Na presente dissertação foram utilizadas rolhas naturais e rolhas de champanhe (rolhas técnicas) para realizar os ensaios.

As rolhas naturais produzidas são divididas por classificação de tamanho e qualidade [9]. A qualidade é medida através de ensaios físico-mecânicos que controlam por exemplo, a densidade, humidade, força de tração, entre outros [9]. O tamanho das rolhas varia entre 54x24 mm e 33x21 mm [9]. No entanto, umas das características mais importantes é o padrão visual da rolha. As rolhas naturais são classificadas segundo critérios visuais como a quantidade de imperfeições na rolha e o tamanho dos poros (lenticelas) da superfície [9]. A figura 2 demonstra o aspeto visual das rolhas de alta qualidade, nomeadamente flor.



Figura 2. Demonstração do aspeto visual de rolhas de cortiça naturais de qualidade flor [4].

A classificação comercial designada segundo um critério visual é, por ordem do mais perfeito para o mais imperfeito, flor, extra, superior e 1ª a 5ª classe [9].

As rolhas de champanhe são comercializadas em 3 formatos diferentes, rolhas de dois discos, rolhas de um disco e rolhas sem discos [9] (figura 3).



Figura 3. Diferenças entre os tipos de rolhas de champanhe [9].

As rolhas são constituídas por um corpo aglomerado de cortiça, obtido por aglomeração de grânulos de cortiça com 3-7 mm ao qual são colados discos de cortiça natural [9]. A grande maioria das rolhas de Champanhe tem 2 discos colados, embora haja uma tendência em alguns países da Europa, a usarem rolhas apenas com 1 disco essencialmente por razões económicas. Para vinhos espumosos de qualidade inferior poderão ser usadas rolhas com apenas o corpo aglomerado, sem discos.

Os discos de cortiça natural têm o propósito de conferir uma maior qualidade à rolha, melhor apresentação e uma melhor relação organolética com o vinho [9]. O corpo aglomerado tem uma densidade elevada apropriada para vedar a garrafa e suportar as condições de pressão características dos vinhos espumantes/espumosos [9].

### 1.3. Tricloroanisol e outros compostos fenólicos

O fenol é sintetizado por extração de alcatrão de carvão, a sua formação ocorre pela transformação de grandes quantidades de cumeno presentes nas plantas usadas na produção de alcatrão [11]. O fenol é utilizado em diferentes ramos da indústria e na produção de alquilfenóis, xilenóis, resinas fenólicas e outros compostos [11].

Os clorofenóis são um subgrupo de compostos químicos da família dos fenóis nos quais ocorre adição de cloros por intermédio da enzima peroxidase [12]. Os clorofenóis são fungicidas, pelo que a forma que os fungos têm de não morrer na presença destes compostos é produzirem um enzima, a clorofenol-metil transferase, que é capaz de metoxilar o grupo álcool, originando o anisol respetivo. A formação dos cloroanisóis remove a toxicidade mas intensifica a inibição de odores e conseqüentemente destrói as características organoléticas dos vinhos [13,14,15].

O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) faz parte de um grupo de haloanisóis que destroem os aromas dos vinhos proporcionando um aroma a mofo [16]. De todos os haloanisóis, os representados na figura 4 são os que mais contribuem para a alteração sensorial e organolética dos vinhos[16].

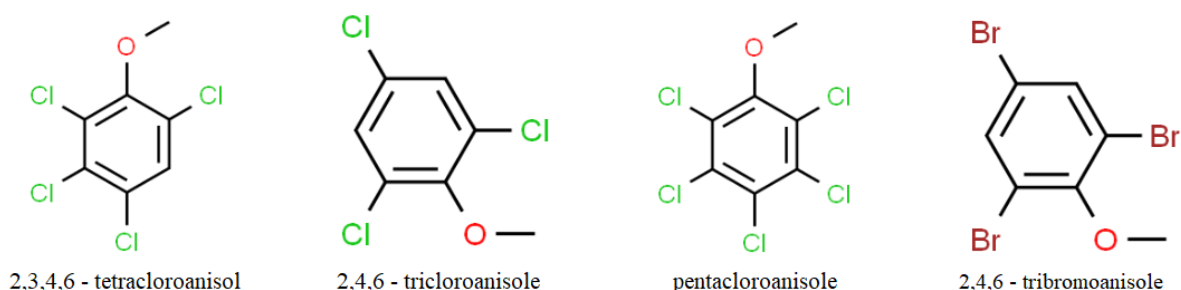


Figura 4. Haloanisóis prejudiciais ao aroma e sabor dos vinhos.

TCA é o principal responsável pelo “sabor a rolha” devido ao seu baixo limiar de deteção sensorial. O limite de perceção olfativa do TCA é de 0,8 ng/L, o que faz com que não seja detetável com métodos convencionais de análise [16,17]. Apesar dos esforços da indústria e dos métodos de análise desenvolvidos ao longo dos anos, TCA continua a ser um problema significativo e preocupante para a qualidade dos vinhos engarrafados.

#### 1.4. Interação entre vinho e rolha

A principal função da rolha de cortiça é assegurar a vedação do líquido no interior da garrafa garantindo as suas qualidades organoléticas [19]. No entanto, a rolha de cortiça apresenta benefícios, quando comparada com os vedantes de plástico ou de metal. O vinho muitas vezes é posto em contacto com madeira de forma a enriquecer em compostos fenólicos. Em garrafa, na zona de contacto com a rolha de cortiça, também ocorre extração dos compostos fenólicos da cortiça para o vinho ao longo do tempo. Para além da capacidade antioxidante proporcionada pelos compostos fenólicos (como o ácido gálgico por exemplo), a presença de flavonóides na rolha intensifica as particularidades de um vinho ao nível olfativo e gustativo [20,21]..

A permeabilidade da rolha permite que, nos primeiros meses de engarrafamento, ocorra alguma transmissão de oxigénio para o interior da garrafa o que, ajuda a maturar gradualmente o vinho [19]. É importante que a maturação seja gradual uma vez que, se a concentração de oxigénio for muito elevada ou muito baixa o vinho vai sofrer alterações de aroma, nomeadamente fenómenos de oxidação ou de redução [19]. Os benefícios enumerados são importantes para a relação entre o vinho e a rolha, no entanto, a etapa do processo produtivo da rolha denominada por lavação, afeta as condições naturais da rolha.

O processo de lavação, que consiste em tratar as rolhas com uma solução à base de peróxido de hidrogénio é um dos tratamentos necessários para desinfetar, despoear e higienizar as rolhas assegurando um aspeto visual mais agradável e preparando-as para o acabamento final [22]. O lavação com peróxido de hidrogénio vai estabilizar a rolha ao nível organolético tornando-a menos reativa, no entanto, dá origem à formação de quinonas a partir dos compostos fenólicos existentes na cortiça [22,23]. Estas são muito reativas aos compostos nucleófilos interferindo no envelhecimento do vinho [23]. As quinonas, na presença de sulfitos, fazem a adsorção de tióis, originando perda de aromas do vinho [23].

### **1.5. Organização da dissertação**

A dissertação está dividida em 6 capítulos. O primeiro capítulo introduz as temáticas em estudo ao aprofundar o contexto em que os estudos foram realizados. Após uma breve apresentação da empresa, os temas da cortiça e da rolha introduzidos, contextualizaram-se os estudos sobre os compostos relevantes na interação do vinho com a cortiça.

No capítulo dois, aprofundou-se a metodologia utilizada, assim como, a contextualização dos conhecimentos previamente obtidos relevantes ao estudo. Foi feita uma revisão bibliográfica dos estudos realizados até à data.

O capítulo três e quatro são dedicados à realização experimental dos estudos assim como às metodologias utilizadas e respetiva análise de resultados.

O capítulo cinco apresenta as conclusões obtidas e o capítulo seis faz uma avaliação do trabalho realizado focada nas possibilidades de melhoria.

## **1.6. Contributos do trabalho**

Os resultados e conclusões obtidos neste trabalho fornecem à Corticeira Amorim e ao I&D um conhecimento aprofundado das temáticas abordadas. Após este contributo, existe uma melhor capacidade de melhoria e resolução de futuros problemas.

O conhecimento que existia sobre a migração de TCA era limitado, com a presente dissertação foi possível perceber o fenómeno da migração a partir do interior contaminado de rolhas naturais. Nas rolhas técnicas, de champanhe, os estudos permitem observar o que acontece quando apenas existe contaminação nos discos ou no corpo da rolha.

O conhecimento obtido na presente dissertação, era inexistente, visto que, nunca tinham sido realizados estudos com estas condições de operação.

O mesmo acontece para os estudos da regeneração de compostos fenólicos oxidados, onde o conhecimento era limitado e os estudos realizados permitem desenvolver novos métodos de lavagem das rolhas.

## 2. Estado da arte

A contaminação do vinho por haloanisóis e halofenóis é um problema que continua a afetar a indústria vinícola [10]. TCA, sendo o principal responsável por este problema, é caracterizado por alta volatilidade e por um limite de perceção sensorial muito baixo, da ordem dos 0,8 ng/l [24]. O processo de contaminação dos vinhos é complexo e apesar da contaminação ser atribuída às rolhas de cortiça, outros estudos indicam que TCA pode ter outras origens que não a rolha de cortiça, nomeadamente transferência a partir de estruturas de madeira contaminada, ambiente da cave, etc.[24]. Como o problema do TCA provoca milhões de euros em danos à indústria vitivinícola e corticeira, estudos foram realizados com o objetivo de detetar o TCA e de aprofundar o conhecimento sobre os seus mecanismos de transmissão a partir das rolhas para o vinho.

A análise de TCA requer um método com alta sensibilidade e precisão, para isso, estudos indicam que a cromatografia em fase gasosa (GC) é o melhor método, especialmente quando acoplada a espectrometria de massa (MS) ou a deteção por captura de eletrões (ECD) [24]. Devido à estrutura complexa da rolha é necessário um processo de preparação antecedente à análise cromatográfica, designado por maceração, que consiste em mergulhar as rolhas em solução modelo de vinho durante 24 horas de forma a que o TCA libertado pela rolha atinga o equilíbrio na solução de maceração. Dado que esta forma de analisar TCA é usada pela indústria da cortiça e do vinho, foi necessária a sua normalização, o que aconteceu com a publicação da Norma ISO 20752:2014(E) [24]. O procedimento consiste em macerar as rolhas com a solução modelo de vinho a 12% (vol/vol) de forma a mimetizar o grau alcoólico médio do vinho [25,26]. As rolhas estão em maceração 24 horas à temperatura ambiente [25,26], sendo analisada uma alíquota do macerado por microextração em fase sólida acoplado a GC-MS ou GC-ECD [25,26].

O TCA que é extraído da rolha para a solução é apenas uma parte do TCA que existe na totalidade da rolha, denominado por TCA extraível e que está na sua superfície [27]. O TCA extraível varia com o poder de extração da solução, estudos comprovam que, quanto maior for a percentagem de álcool na solução maior a concentração de TCA removido da rolha [24,27,28]. O objetivo de analisar o TCA extraível é perceber a quantidade de TCA que migra para a solução e por isso, em garrafa, para o vinho.

Para além da migração de TCA da rolha de cortiça para o vinho, esta tese aborda a regeneração de compostos fenólicos oxidados pelos produtos de lavagem das rolhas de cortiça, para a sua forma redutora original.

Vários estudos foram realizados para perceber quais os componentes bioativos presentes na rolha, com destaque para os compostos fenólicos. Os compostos bioativos extrativos estão presentes nas paredes das células da cortiça e podem influenciar na cor do vinho, sabor, adstringência e acidez [20]. A oxidação dos vinhos é um aspeto muito importante e tem no centro da sua origem vários compostos como, por exemplo, os flavanóides [20]. Fernandes *et al.* [20] utilizaram duas metodologias diferentes para avaliar a atividade antioxidante, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil e a capacidade redutora férrica de plasma (FRAP).

O método DPPH baseia-se na redução dos radicais livres do DPPH por espécies antioxidantes presentes em solução. O radical livre tem uma cor roxa forte, na presença de compostos capazes de doar um eletrão ou um hidrogénio torna-se incolor. Esta mudança de cor que é medida por espectrofotometria [29]. como método FRAP baseia-se na redução de ferro (II) a ferro (III) que, quando na presença de um meio com o pH baixo, forma um composto complexado com coloração [30]. Ambas os métodos têm como base as reações de oxidação-redução e ambas dependem da mudança de cor da solução. A absorvância das soluções é medida usando um espectrofotómetro UV/Vis [29,30].

Em Azevedo *et al.* foi comprovada a capacidade antiradical de alguns compostos da cortiça, no entanto, devido à grande variedade de compostos bioativos e de reações simultâneas não existe uma conclusão sobre os compostos que conferem a capacidade antioxidante [19].

A interação entre o vinho e o oxigénio é provocada pela reação entre o oxigénio e o Fe (II) presente no vinho. Essa reação produz peróxido de hidrogénio e Fe (III) que possibilitam a capacidade de reação com polifenóis, reação que tem como produto final as quinonas [31]. As quinonas são compostos abundantes na reação de oxidação de vinho e representam um problema devido à sua alta reatividade com compostos nucleófilos [23]. A figura 5 representa o possível mecanismo de oxidação do vinho e de formação de quinonas.

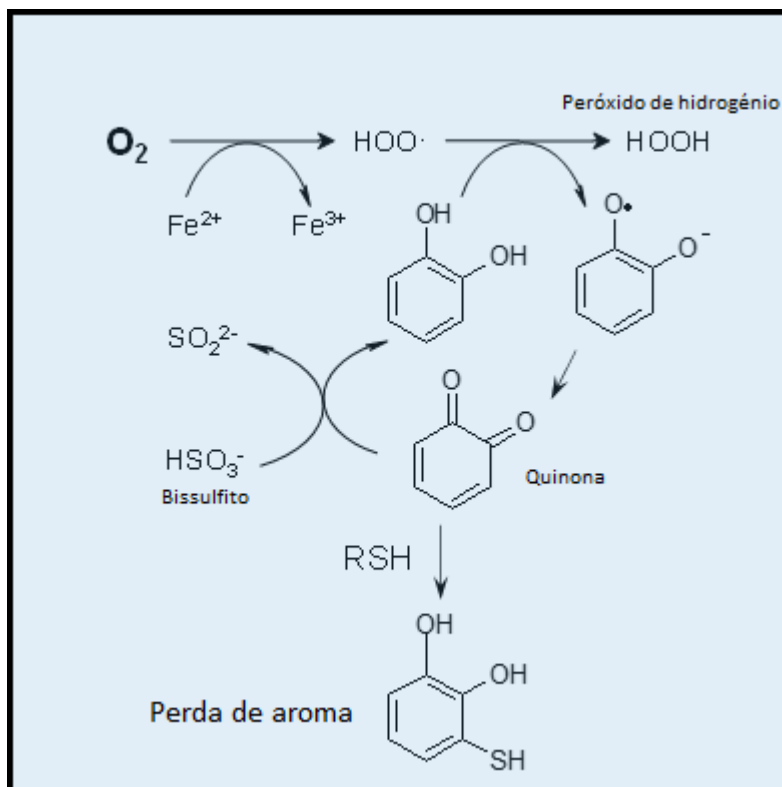


Figura 5. Representação teórica do possível mecanismo de formação da quinona [32].

A reação de oxidação é muito problemática em vinhos que têm uma maior tendência para oxidar, como é o caso dos vinhos brancos. [32]. Como exemplificado pelo mecanismo, figura 5, a reação da quinona com um composto nucleófilo adquire, como possíveis produtos de reação, vários compostos que interferem nas qualidades organolépticas do vinho. Contudo, é de observar que a existência de dióxido de enxofre provoca reversão da formação de quinonas [32]. Apesar da reação de dióxido de enxofre com as quinonas reverter o processo e originar o catecol, Danilewicz especifica que existe a possibilidade dos compostos nucleófilos competirem com o dióxido de enxofre na reação com as quinonas [31].

A formação de quinonas é auxiliada pela redução do ferro e pela existência de peróxido de hidrogênio [31]. Para além das quinonas formadas no vinho, as rolhas de cortiça, fruto da sua lavagem com peróxido de hidrogênio, vão também ter quinonas que podem migrar para o vinho potenciando a concentração destes compostos na bebida.

A reversão da reação de formação da quinona é o segundo tema de estudo na presente dissertação, com ensaios de tratamento de rolhas após lavagem com dióxido de enxofre, ensaios esses que são analisados por espectrofotometria através dos métodos DPPH e FRAP.

### **3. Migração de TCA em rolhas naturais, bartop e de champanhe**

Neste capítulo é feita a descrição experimental e a discussão dos resultados dos estudos de migração de TCA em rolhas naturais (naturais e bartop) e rolhas técnicas (champanhe). Os resultados foram obtidos por micro extração em fase sólida em conjunto com cromatografia gasosa – espectrometria em massa no equipamento “Shimadzu-QP2010 plus NCL”. A gama de trabalho do método utilizado só consegue detetar com exatidão as amostras de contaminação entre 0 e 200 ng/L assim, com valores superiores a 200 ng/L obtêm-se os mesmos estimados por interpolação (anexo 1).

#### **3.1. Migração de d5-TCA em rolhas naturais**

O objetivo deste estudo é determinar se existe migração de TCA das rolhas de cortiça para o vinho. Para se conseguir este objetivo recorreu-se à contaminação artificial das rolhas com TCA marcado com deutério (D5- TCA) de forma a que a eventual migração encontrada, não seja confundida com a migração de TCA nativo eventualmente existente na cortiça.

O estudo foi iniciado no I&D em Novembro de 2016 e foi realizado o ensaio correspondente ao ponto de análise número três, 24 meses após engarrafamento. Os ensaios são realizados a cada 12 meses, a partir do ponto de análise um, que é imediatamente após o engarrafamento, e tem uma duração máxima de 72 meses.

##### **3.1.1. Metodologia**

###### **Procedimento experimental:**

A rolha de cortiça utilizada é uma rolha de cortiça natural de calibre 38x24 mm de classe extra. Para armazenamento das soluções utilizaram-se garrafas com  $370 \pm 5$  mL e a solução modelo de vinho tinha um teor alcoólico de 12%, pH 3,2 e ácido tartárico na concentração de 5 g/L. Para contaminar as rolhas com precisão usou-se uma seringa de cromatografia de 10  $\mu$ L e uma agulha para auxiliar a abertura do canal na rolha.

A solução contaminada tinha uma concentração de 200 mg/L, foram injetados 5  $\mu$ L de solução o que corresponde a 1000 ng de d5-TCA. Para o ponto de análise inicial foi necessário uma estufa para aquecer as amostras.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

Para o estudo realizou-se uma seleção das rolhas que tinham um topo liso, sem lenticelas, para garantir a inoculação da contaminação dentro da rolha. A figura 6 exemplifica o aspeto dos topos das rolhas selecionadas.

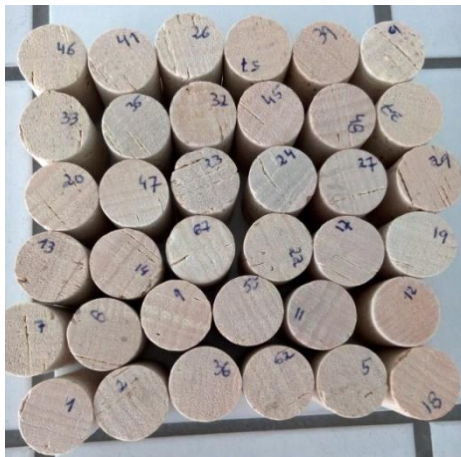


Figura 6. Demonstração do aspeto visual dos topos das rolhas selecionadas.

Após a escolha das rolhas foi feito o engarrafamento com  $370 \pm 5$  mL da solução modelo de vinho. De seguida, as contaminações das rolhas foram feitas à profundidade de 10 mm, 19 mm e 29 mm do topo das rolhas. Como a estrutura da rolha é densa e não queremos comprometer a sua integridade usou-se uma seringa para fazer as injeções de contaminante. Na figura 7 está representada a seringa com a qual se efetuou a contaminação.



Figura 7. Seringa com a qual foi efetuada a contaminação.

O agente contaminante é preparado por adição de d5-TCA na concentração de 100 ppm . O solvente utilizado na diluição foi o etanol a 96% de pureza.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

De seguida, injetou-se 5  $\mu$ L da solução na rolha, como mostra a figura 8.



Figura 8. Contaminação da rolha com solução de d5-TCA utilizando uma seringa.

Após a injeção do contaminante foi injetado ar comprimido na rolha, através da seringa, para garantir a presença do mesmo. As garrafas foram armazenadas até ao momento de análise.

Durante os momentos de análise seleccionaram-se 5 garrafas de cada profundidade de contaminação e uma garrafa com uma rolha sem contaminação (branco). Após a seleção extraíram-se as rolhas com um saca-rolhas de pinças e foram feitos cortes transversais em 2 secções conforme apresentado na figura 9.



Figura 9. Corte das rolhas em duas secções, superior contaminada e inferior não contaminada.

Os cortes foram efetuados nas rolhas a 15 mm, 24 mm e 34 mm do topo, para as contaminações a 10 mm, 19 mm e 29 mm, respetivamente. A secção superior corresponde à secção contaminada e a inferior à não contaminada e ambas as secções foram analisadas.

### **Análise das amostras:**

A rolha e a solução modelo de vinho foram analisadas sem repetição considerando-se o conjunto de ambos uma amostra. As amostras foram analisadas de acordo com a norma ISO 20752:2014 (E) [25]. As secções cortadas foram colocadas a macerar em solução hidroalcoólica com 12% de etanol durante  $24 \pm 2$  horas. Após a maceração pipetaram-se  $10 \pm 0.1$  mL de solução de maceração para um tubo de cromatografia de 20 mL, contendo  $\pm 3$  g de NaCl.

Para identificação do pico cromatográfico adicionou-se  $100 \pm 0.1$   $\mu$ L de padrão interno d5-TBA. O método utilizado para detetar a concentração de d5-TCA foi o SPME-GC-MS (anexo 1).

Na presente dissertação foi feita uma discussão dos resultados obtidos anteriormente mas, apenas foi realizado o ponto de análise aos 24 meses após o engarrafamento.

### **3.1.2. Resultados e discussão**

No ponto de análise, 12 meses após o engarrafamento, foram abertas 16 garrafas, 1 branco sem contaminação de d5-TCA e 5 amostras com contaminações de d5-TCA a 10 mm, a 19 mm e a 29 mm. Os resultados da análise de d5-TCA das duas secções e da solução modelo de vinho encontram-se na tabela 1 e 2.

**Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.**

Tabela 1. Resultados, aos 12 meses, de d5-TCA (SPME-GC-MS) da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação (mm)	d5-TCA secção superior (ng/L)	d5-TCA secção inferior (ng/L)	d5-TCA Solução (ng/L)
Branco	-	ND	ND	ND
1	10	344	ND	ND
2	10	899	ND	ND
3	10	1191	ND	ND
4	10	638	ND	ND
5	10	279	ND	ND
6	19	39	ND	ND
7	19	146	ND	ND
8	19	525	ND	ND
9	19	136	ND	ND
10	19	214	ND	ND
12	29	384	104	93
13	29	215	54	11
14	29	499	63	26
15	29	292	9	11
16	29	148	25	11

**Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.**

Tabela 2. Média e desvio padrão, aos 12 meses, de d5-TCA (SPME-GC-MS) da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação (mm)	Média e desvio padrão da secção superior (ng/L)	Média e desvio padrão da secção inferior (ng/L)	Média e desvio padrão da solução (ng/L)
Branco	-	-	-	-
1	10	670 ± 382	ND	ND
2	10			
3	10			
4	10			
5	10			
6	19	212 ± 186	ND	ND
7	19			
8	19			
9	19			
10	19			
12	29	308 ± 139	51 ± 37	30 ± 35
13	29			
14	29			
15	29			
16	29			

Os resultados de d5-TCA na secção superior das rolhas contaminadas foram todos positivos o que demonstra a eficácia da metodologia de inoculação do contaminante.

No que diz respeito à secção inferior e à solução modelo de vinho, os resultados de d5-TCA nas rolhas contaminadas a 10 mm e a 19 mm foram não detetáveis (ND, inferior ou igual a 0,49 ng/L), contudo nas rolhas contaminadas a 29 mm os resultados foram todos positivos. A migração de d5-TCA da secção superior para a secção inferior e para a solução modelo de vinho nas rolhas contaminadas a 29 mm parece estar relacionada com a absorção de líquido pela rolha verificada por análise visual, figura 10, que se verificou ser de aproximadamente 25 mm.



Figura 10. Análise visual das rolhas aos 12 meses após extração, a marca preta indica a posição do corte a 34 mm.

A absorção do líquido pela rolha até 25 mm faz com que o líquido fique em contacto com a secção contaminada (29 mm) assim, a solução modelo de vinho fica contaminada e provoca, por consequência, a contaminação da secção inferior.

Ponto de análise, 24 meses após engarrafamento, repetiu-se a abertura de 16 garrafas, uma correspondente à amostra em branco sem contaminação de d5-TCA e as restantes são divididas em 5 garrafas correspondentes às contaminações de d5-TCA a 10 mm, 19 mm e 29 mm de profundidade respetivamente. Na análise visual, verificou-se que as rolhas apresentavam níveis de absorção significativos (tabela 3).

Tabela 3. Resultados das análises visuais das rolhas 24 meses após engarrafamento.

Amostra	Contaminação (mm)	Absorção* na parte superior	Absorção* na parte inferior
Branco	-	-	-
1	10	Não	Sim
2	10	Não	Sim
3	10	Não	Sim
4	10	Sim	Sim
5	10	Não	Sim
6	19	Não	Sim
7	19	Sim	Sim
8	19	Não	Sim
9	19	Não	Sim
10	19	Sim	Sim
12	29	Sim	Sim
13	29	Sim	Sim
14	29	Sim	Sim
15	29	Sim	Sim
16	29	Sim	Sim

\*Entende-se por absorção a presença de líquido a partir do meio da rolha para cima (superior) ou para baixo (inferior).

Os resultados indicam que existe absorção em todas as rolhas na parte inferior. Na parte superior ocorreu absorção em cerca de 50% das rolhas. Curiosamente, em todas as rolhas contaminadas a 29 mm de profundidade foi observada absorção de líquido na parte superior e na parte inferior. A figura 11 exemplifica a análise visual feita que evidência a absorção de líquido na rolha.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.



Figura 11. Exemplo da análise visual das rolhas, aos 24 meses, após extração.

A absorção dá-se por difusão através das células de cortiça e por migração de líquido através das lenticelas, o que justifica o aumento gradual da absorção ao longo do tempo. Isto é comprovado, na medida em que aos 12 meses, se observou uma menor quantidade absorvida de líquido do que aos 24 meses.

A quantificação de d5- TCA nas soluções modelo de vinho e nas secções superior e inferior das rolhas está presente na tabela 4 e 5.

**Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.**

Tabela 4. Resultados, 24 meses após engarrafamento, de d5-TCA em SPME-GC-MS da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm)	d5-TCA na solução modelo (ng/L)	TCA total na secção superior da rolha (ng/L)	TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)
Branco	-	ND	ND	ND
17	10	ND	260	ND
18	10	ND	537	ND
19	10	ND	5	62
20	10	ND	378	310
21	10	ND	152	156
23	19	ND	374	9
24	19	ND	1341	2
25	19	ND	209	ND
26	19	ND	2	ND
27	19	ND	76	5
28	29	37	403	45
29	29	ND	368	ND
30	29	3	225	9
31	29	ND	ND	ND
32	29	4	373	17

**Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.**

Tabela 5. Média e desvios padrão, 24 meses após engarrafamento, de d5-TCA em SPME-GC-MS da solução modelo de vinho e das respetivas rolhas nas secções superior e inferior. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm)	Média e desvio padrão de d5-TCA na solução modelo (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção superior da rolha (ng/L)
Branco	-	-	-	-
17	10	ND	266 ± 204	176 ± 125
18	10			
19	10			
20	10			
21	10			
23	19	ND	400 ± 544	5 ± 4
24	19			
25	19			
26	19			
27	19			
28	29	15 ± 19	344 ± 80	24 ± 19
29	29			
30	29			
31	29			
32	29			

As soluções modelo de vinho não apresentaram contaminação com d5-TCA quando vedadas com rolhas contaminadas a 10 e 19 mm de comprimento respetivamente. Apenas as soluções modelo de vinho vedadas com rolhas contaminadas a 29 mm apresentaram contaminação.

A contaminação da solução parece acontecer, mais uma vez, através da humidificação da secção contaminada. Esta humidificação faz com que ocorra difusão do d5-TCA para a solução através da capilaridade da rolha.

Na amostra 31 não foi encontrado qualquer vestígio de d5-TCA, quer na secção superior quer na inferior da rolha. É provável que algum problema tenha ocorrido durante a injeção da contaminação, quer por bloqueio do canal da seringa ou na compressão com ar comprimido.

A contaminação das amostras 19, 26 e 31 não parece ter sido bem-sucedida dado que apresentam valores vestigiais de d5-TCA na secção superior, secção supostamente muito contaminada.

A amostra 29 não apresentou contaminação na solução modelo de vinho e na secção inferior da rolha embora estivesse humidificada até à secção contaminada.

Três das quatro rolhas contaminadas a 19 mm apresentaram d5-TCA na secção inferior das respectivas rolhas com uma média de  $5 \pm 3,5$  ng/L o que indica que ocorreu migração da secção superior para a inferior. No entanto, na solução modelo de vinho o resultado da análise de d5-TCA foi ND em todas estas amostras. O d5-TCA presente na secção inferior foi provocado pela transmissão do contaminante através do líquido absorvido. A solução modelo de vinho humidifica totalmente a secção contaminada (superior) que por consequência acaba por provocar a migração para a secção inferior. Estes resultados são diferentes dos obtidos a 12 meses, onde a 19 mm a secção inferior não fora ainda contaminada, e por isso é expectável que o tempo de armazenamento seja uma variável que leva a este fenómeno evolutivo, para além da capilaridade.

Nas contaminações a 10 mm todas as soluções modelo de vinho permaneceram sem contaminação. Na secção inferior das amostras 17 e 18 não se verificou a presença de d5-TCA, mas nas amostras 20 e 21 verificou-se a presença de contaminação. Porém, os valores obtidos são elevados.

Ao contrário do verificado a 12 meses, aos 24 meses algumas rolhas apresentaram d5-TCA nas secções inferiores das contaminações a 10 mm e 19 mm. Tendo em conta estes resultados e o estado de humidificação destas rolhas é expectável que este fenómeno evolua de forma proporcional no próximo ponto de análise, aos 36 meses.

### **3.1.3. Conclusão**

No ponto de análise aos 24 meses de engarrafamento conclui-se que as rolhas com d5-TCA apresentaram, a 10 mm, 19 mm e 29 mm de profundidade, contaminação variável. Ao contrário do que acontece aos 12 meses, a contaminação da secção inferior está presente a 10 mm e a 19

mm de profundidade, quer pela humidificação da zona contaminada, quer pelo efeito de capilaridade, ou muito provavelmente pela conjugação destes dois efeitos.

Nas rolhas contaminadas a 29 mm de profundidade verificou-se contaminação da solução e da secção inferior, tal como aconteceu aos 12 meses.

Conclui-se ainda que, não é necessário a solução modelo de vinho entrar em contacto direto com a secção contaminada. A humidificação da rolha parece ser responsável por movimentar o d5-TCA na própria rolha, sendo essa migração potenciada pela existência de canais/capilaridades nas rolhas.

### **3.2. Migração de d5-TCA em rolhas bartop**

O objetivo deste estudo é determinar se existe migração de d5-TCA através da rolha bartop para uma solução modelo de vinho. É usada uma solução com teores alcoólicos elevados dado que o uso destas rolhas é para bebidas espirituosas. O estudo foi iniciado no I&D em novembro de 2016 e foi realizado um ensaio correspondente ao ponto de análise número três, 36 meses após engarrafamento. Os ensaios são realizados a cada 12 meses, a partir do ponto de análise um que é imediatamente após o engarrafamento, e tem uma duração máxima de 60 meses.

#### **3.2.1. Metodologia**

##### **Procedimento experimental:**

As rolhas de cortiças utilizadas são bartop natural superior de calibre 27x19,5 mm. Para armazenamento das soluções utilizou-se garrafas com  $370 \pm 5$  mL. As soluções modelo de vinho tinham um teor alcoólico de 40% (vol/vol.) e 65% (vol/vol.), pH 3,2 e 3% ácido acético. Para contaminar com precisão a rolha usou-se uma seringa de cromatografia de 10  $\mu$ L e uma agulha para auxiliar a abertura do canal na rolha.

A solução contaminada tinha uma concentração de 200 mg/L, foi injetado 5  $\mu$ L de solução o que corresponde a 1000 ng de d5-TCA.

Começou-se por fazer o engarrafamento com  $370 \pm 5$  mL da solução modelo de vinho. As contaminações foram feitas às profundidades de 10 mm e 19 mm. O resto do procedimento foi semelhante ao que foi feito para a migração de d5-TCA em rolhas naturais.

Colocaram-se as marcações na seringa com as distâncias mencionadas. Injetou-se o agente contaminante, uma solução de d5-TCA, preparada da mesma maneira que no ensaio anterior.

Após a contaminação foi injetado ar comprimido na rolha, através da seringa, para garantir a presença do contaminante. As garrafas foram posteriormente armazenadas até ao momento de análise.

No momento de análise, extraíram-se as rolhas com um saca-rolhas de pinças e foram feitos cortes transversais em 2 secções conforme apresentado na figura 12.



Figura 12. Corte das rolhas em duas secções, superior contaminada (na esquerda) e inferior não contaminada (na direita).

A secção superior corresponde à secção contaminada e a inferior à não contaminada. Os cortes foram efetuados a 15 mm e 24 mm, correspondentes às secções de contaminação a 10 mm e 19 mm, respetivamente.

Após o corte para análise visual cortaram-se as secções da rolha em pedaços pequenos para efetuar a maceração.

#### **Análise das amostras:**

A análise das amostras foi efetuada de acordo com a norma ISO 20752:2014 (E) [25]. As secções cortadas foram colocadas a macerar em solução hidroalcoólica 12% de etanol durante  $24 \pm 2$  horas. Após a maceração pipetaram-se  $10 \pm 0.1$  mL de solução de maceração para um tubo de cromatografia de 20 mL, contendo  $\pm 3$  g de NaCl. Como as soluções modelo de vinho têm teores alcoólicos diferentes de 12%, é necessário efetuar uma diluição para respeitar o procedimento da norma. Adicionou-se a um tubo de cromatografia  $3 \pm 0.1$  mL da solução de 40% de teor alcoólico em  $7 \pm 0.1$  mL de solução modelo de vinho a 12%. Para a solução a 65% de teor alcoólico foi necessário pipetar  $1.8 \pm 0.1$  mL de solução a 65% e  $8.2 \pm 0.1$  mL de solução a 12%. Para identificação do pico cromatográfico adicionou-se  $100 \pm 0.1$   $\mu$ L de padrão

interno, d5-TBA. O método utilizado para detetar a concentração de d5-TCA foi o SPME-GC-MS.

Na presente dissertação foi feita uma discussão dos resultados obtidos anteriormente mas, apenas foi realizado o ponto de análise aos 24 meses após o engarrafamento.

### 3.2.2. Resultados e discussão

No ponto de análise 12 meses após o engarrafamento, foram abertas 16 garrafas e 4 brancos sem contaminação de d5-TCA. Das 16 garrafas abriram-se 3 para cada solução modelo de vinho e profundidade de contaminação 10 mm e 19 mm respetivamente.

Os resultados da análise de d5-TCA e respetiva média e desvio padrão, nas duas secções e na solução modelo de vinho a 40% e a 65% de teor alcoólico, encontram-se na tabela 6 e 7.

Tabela 6. Resultados da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40% e 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm) / teor alcoólico (%)	d5-TCA na solução modelo (ng/L)	TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)	TCA total na secção superior da rolha (ng/L)
Branco	-	ND	ND	ND
1	10 / 40	748	23	348
2	10 / 40	246	5	208
3	10 / 40	814	15	363
4	19 / 40	713	5	227
5	19 / 40	622	5	238
6	19 / 40	60	5	240
7	10 / 65	183	1	42
8	10 / 65	867	4	238
9	10 / 65	1922	3	302
10	19 / 65	2469	4	53
11	19 / 65	2476	4	55
12	19 / 65	1026	3	91

Tabela 7. Média e desvio padrão da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40 e a 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm) / teor alcoólico (%)	Média e desvio padrão de d5-TCA na solução modelo (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção superior da rolha (ng/L)
Branco	-	-	-	-
1	10 / 40	603 ± 311	14 ± 9	306 ± 85
2	10 / 40			
3	10 / 40			
4	19 / 40	465 ± 354	5 ± 1	235 ± 7
5	19 / 40			
6	19 / 40			
7	10 / 65	991 ± 876	3 ± 2	194 ± 135
8	10 / 65			
9	10 / 65			
10	19 / 65	1990 ± 835	4 ± 1	66 ± 21
11	19 / 65			
12	19 / 65			

Os resultados a 10 mm apresentam contaminação na secção superior (secção pré-contaminada) tal como esperado. A secção inferior também apresenta resultados positivos, mas com menor concentração de d5-TCA. A solução modelo de vinho apresenta valores muito elevados de d5-TCA, os valores são superiores aos valores da secção contaminada.

A 19 mm de profundidade confirmou-se a contaminação da secção superior. Em dois de três resultados a solução modelo de vinho ficou altamente contaminada com valores superiores a 200 ng/L.

Os resultados a 10 mm apresentam contaminação na secção superior e na solução modelo de vinho, uma vez mais com concentrações muito elevadas, superiores a 200 ng/L em todas menos uma amostra. O mesmo acontece para a profundidade de contaminação de 19 mm com exceção de três amostras na secção superior.

Devido à alta concentração na solução modelo de vinho era de esperar que a secção inferior apresentasse uma contaminação semelhante. No entanto, a contaminação da secção inferior é muito inferior ao que era expectável visto que 10 das 12 amostras têm uma concentração inferior a 10 ng/L.

Esta concentração elevada não é proveniente de migração gradual influenciada pelo tempo mas sim por um defeito no momento de inoculação. É provável que, ao injetar o sopro de ar comprimido, o d5-TCA tenha sido projetado para o interior da garrafa e para a solução modelo de vinho.

Uma vez que, a concentração da secção inferior é muito baixa é possível que a contaminação da solução tenha ocorrido por arrastamento de d5-TCA a partir das laterais na interface rolha/garrafa. Como o engarrafamento foi feito manualmente e como as rolhas têm um tamanho reduzido é possível que a capacidade vedante tenha sido afetada.

No ponto de análise 12 meses após o engarrafamento, foram abertas 16 garrafas e 4 brancos sem contaminação de d5-TCA. Das 16 garrafas abriram-se 3 para cada solução modelo de vinho e profundidade de contaminação 10 mm e 19 mm respetivamente.

Os resultados da análise de d5-TCA e respetiva média e desvio padrão, nas duas secções e na solução modelo de vinho a 40% e a 65% de teor alcoólico, encontram-se na tabela 8 e 9.

Tabela 8. Resultados da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40% e 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm) / teor alcoólico (%)	d5-TCA na solução modelo (ng/L)	TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)	TCA total na secção superior da rolha (ng/L)
Branco	-	ND	ND	ND
1	10 / 40	180	3	67
2	10 / 40	139	21	96
3	10 / 40	178	4	109
4	19 / 40	391	1	19
5	19 / 40	79	ND	72
6	19 / 40	105	ND	52
7	10 / 65	502	5	88
8	10 / 65	580	6	76
9	10 / 65	96	1	145
10	19 / 65	400	ND	56
11	19 / 65	53	ND	ND
12	19 / 65	82	ND	4

Tabela 9. Média e desvio padrão da concentração de d5-TCA nas amostras com solução modelo de vinho a 40 e a 65% teor alcoólico. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Amostra	Contaminação da rolha em profundidade (mm) / teor alcoólico (%)	Média e desvio padrão de d5-TCA na solução modelo (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção inferior da rolha (ng/L)	Média e desvio padrão de TCA total na secção superior da rolha (ng/L)
Branco	-	-	-	-
1	10 / 40	166 ± 23	9 ± 5	91 ± 22
2	10 / 40			
3	10 / 40			
4	19 / 40	192 ± 173	1 ± n/a	48 ± 27
5	19 / 40			
6	19 / 40			
7	10 / 65	393 ± 260	4 ± 3	103 ± 37
8	10 / 65			
9	10 / 65			
10	19 / 65	178 ± 123	ND	30 ± 26
11	19 / 65			
12	19 / 65			

Os valores médios de d5-TCA para a secção superior indicam que a contaminação foi bem-sucedida. Para a profundidade de 10 mm ocorreu migração de d5-TCA para a solução modelo de vinho. A concentração na solução é superior a 100 ng/L e superior à concentração verificada na secção contaminada. Porém, a contaminação da secção inferior, é inferior a 10 ng/L.

Para a profundidade de 19 mm existe contaminação na solução modelo de vinho e na secção contaminada. Os valores da contaminação na secção superior são ligeiramente inferiores, abaixo dos 50 ng/L, aos valores verificados a 10 mm. Apesar da contaminação se manter na solução modelo de vinho a secção inferior não ficou contaminada.

O que se observa é que não é possível afirmar que existe uma maior afinidade de d5-TCA com o etanol, no caso específico deste estudo, visto que os valores a 19 mm de profundidade para 65% teor alcoólico são inferiores aos valores para 40% e 19 mm de profundidade.

A migração de d5-TCA não ocorre por propagação ao longo da rolha, visto que as concentrações da secção inferior são baixas, inferiores a 10 ng/L, em todas as amostras, e, são não detetáveis para a profundidade de 19 mm.

Através da figura 13 é possível observar um exemplo da absorção de líquido pela rolha.



Figura 13. Exemplo da absorção de líquido pela rolha que atinge a secção contaminada. Partes castanhas da rolha representam locais humidificados.

De facto, com o fenómeno da absorção era expectável que a contaminação fosse transmitida pelo líquido, mas não foi isso que se verificou.

### **3.2.3. Conclusão**

Foi detetada migração de d5-TCA para a solução no entanto, os valores de concentração de d5-TCA na solução são muito elevados face aos valores obtidos na secção contaminada.

Os valores da concentração da secção inferior permitem concluir que a migração não ocorreu pelo interior da rolha.

### **3.3. Migração de TCA em rolhas de champanhe I**

O objetivo deste estudo é determinar se existe ou não migração de TCA, ao longo do tempo, através da rolha de champanhe para o vinho. Neste estudo, é importante verificar o que acontece quando temos contaminações em diferentes locais da rolha, com diferentes intensidades de contaminação. O estudo foi iniciado no I&D em maio de 2017 e foi realizado o ensaio correspondente ao ponto de análise número três, 24 meses após engarrafamento. Os ensaios são realizados 6 meses, 12 meses e 24 meses, após o engarrafamento.

#### **3.3.1. Metodologia**

##### **Procedimento experimental:**

As rolhas de cortiça utilizadas são rolhas de champanhe de dois discos. O corpo da rolha é constituído por granulado de cortiça colado entre si com cola de poliuretano e os discos são discos de cortiça natural extra. Ao todo foram necessários 123 corpos, 246 discos e 123 garrafas.

A partir de discos de um lote contaminado, foram feitas análises de TCA com vista a agrupar os discos por teor de contaminação. O primeiro grupo “nd”, o segundo 0,5 - 5 ng/L e o terceiro > 5 ng/L.

Repetiu-se o procedimento para os corpos, selecionando os corpos com concentrações de TCA inferiores a 2 ng/L e entre 2 e 10 ng/L.

Após a escolha dos corpos, fez-se o acabamento da rolha ao colar ambos os discos e o corpo e retificou-se a rolha em 4 mm de raio para atingir o tamanho normal de uma rolha de champanhe de dois discos.

A figura 14 indica como foi feita a divisão dos discos e corpos na construção das rolhas e apresenta a divisão por grupos (1, 2, 3a, 3b, 4a e 4b) de rolhas que foram engarrafadas.

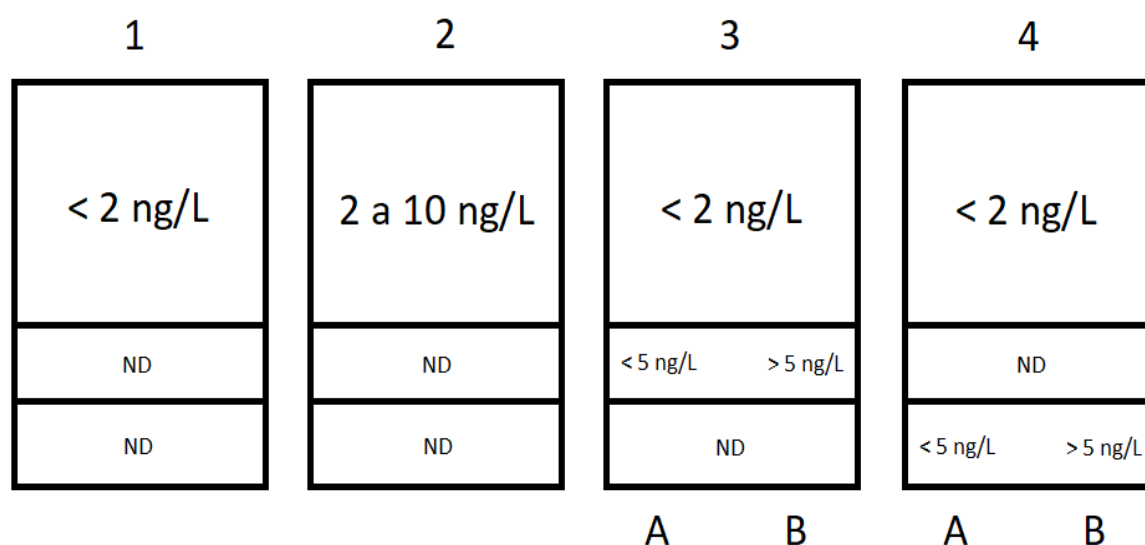


Figura 14. Divisão das rolhas conforme local de contaminação e concentração da contaminação.

De seguida, foi feito o engarrafamento de acordo com a divisão estabelecida.

### Análise das amostras:

A análise às amostras foi efetuada de acordo com a norma ISO 20752:2014 (E) [25]. As rolhas foram cortadas separando o corpo dos discos e foram colocadas separadamente a macerar em solução hidroalcoólica com 12% de etanol durante  $24 \pm 2$  horas. Após a maceração pipetaram-se  $10 \pm 0.1$  mL de solução de maceração para um tubo de cromatografia de 20 mL, contendo  $\pm 3$  g de NaCl. Fez-se a mesma pipetagem para o vinho. Para identificação do pico cromatográfico adicionou-se  $100 \pm 0.1$   $\mu$ L de padrão interno (d5-TCA). O método utilizado para detetar a concentração de TCA foi o SPME-GC-MS.

Na presente dissertação foi feita uma discussão dos resultados obtidos anteriormente mas, apenas foi realizado o ponto de análise aos 24 meses após o engarrafamento.

### 3.3.2. Resultados e discussão

No momento de seleção dos discos em gamas de concentração de TCA foi feita uma análise aos mesmos para determinar qual a sua concentração. A análise da concentração de TCA do disco interno e do disco de espelho está no anexo 2.

No ponto de análise, 6 meses após o engarrafamento, foram abertas 30 garrafas, 5 para cada grupo. Os resultados estão na tabela A.1.2 em anexo, uma vez que já tinham sido realizadas pelo laboratório.

Nos corpos e nos vinhos, as rolhas do grupo 1 apresentaram-se ND. É expectável que os discos tenham contaminação não detetável visto que foram previamente analisados como não detetáveis. Os valores das concentrações dos corpos do grupo 1 têm uma grande variabilidade.

No grupo 2 um corpo apresentou uma ligeira contaminação, 0,8 ng/L, mas o vinho manteve o resultado não detetável.

No grupo 3a ocorreu ligeira migração em 2 das 5 amostras. Como o corpo apresentou valores não detetáveis é esperado que a migração tenha ocorrido a partir do disco do interior. No grupo 3b a migração intensificou-se e gerou 3 amostras contaminadas. Este aumento na contaminação é provocado por migração do disco de interior com concentração superior a 5 ng/L.

No grupo 4a ocorreu migração em 2 de 5 amostras. Os vinhos contaminados corresponderam aos discos de espelho de maior contaminação do grupo de 5 amostras. É provável que a contaminação tenha ocorrido por migração em contacto com o disco de espelho. No grupo 4b todos os vinhos apresentaram contaminação. Possivelmente o mesmo que aconteceu no grupo 4a também aconteceu no grupo 4b.

No ponto de análise aos 12 meses (resultados em anexo), após engarrafamento, voltaram a repetir-se os acontecimentos dos 6 meses. Os resultados estão em tabela nos anexos para consulta. No grupo 1 e no grupo 2 os resultados dos vinhos são todos ND.

No grupo 3a voltou a acontecer contaminação do vinho em 3 de 5 amostras provenientes da migração de TCA a partir do disco interno. No grupo 3b ocorreu migração para o vinho em todas as amostras. Com o tempo, a humidificação da rolha aumenta e o contacto do líquido com a contaminação no disco interno também ajuda a provocar este aumento da contaminação do vinho.

No grupo 4a e 4b apenas 1 amostra em 10 teve concentração de TCA não detetável, todas as outras amostras são positivas indicando que o contacto superficial com discos de espelho contaminados provoca migração ao final de 12 meses.

Na presente dissertação apenas foi realizado o ponto de análise aos 24 meses. Os resultados estão apresentados na tabela 10 e 11.

Tabela 10. Concentração de TCA no corpo e vinho. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Grupo	nº rolha	Concentração de TCA corpo (ng/L)	Concentração de TCA vinho (ng/L)
1	6	ND	ND
	11	ND	ND
	20	ND	ND
	21	ND	ND
	22	ND	ND
	23	ND	ND
2	28	ND	ND
	33	2	1
	36	1	4
	40	2	1
	43	2	10
3	55	3	4
	58	ND	1
	61	1	1
	62	4	3
	63	ND	1
3B	74	2	3
	79	3	7
	80	2	11
	81	4	12
	82	2	2
4ª	91	1	23
	92	2	8
	93	1	11
	95	2	45
	103	1	4
4B	111	6	109
	115	6	179
	116	6	103
	117	1	23
	120	2	14

Tabela 11. Média e desvio padrão da concentração de TCA no corpo e vinho. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Grupo	Média e desvio padrão da concentração de TCA corpo (ng/L)	Média e desvio padrão da concentração de TCA vinho (ng/L)
1	ND	ND
2	2 ± 1	4 ± 1
3A	2 ± 1	2 ± 1
3B	2 ± 1	7 ± 4
4A	1 ± 1	18 ± 15
4B	4 ± 2	85 ± 61

No grupo 1 não existe migração de TCA para o vinho. No grupo 2 foi detetado TCA no vinho em 4 de 5 amostras. As concentrações de 2 das 4 amostras são altas o que não era esperado tendo em conta que a contaminação no corpo é baixa e que supostamente os discos são ND. Numa reanálise, nova extração de TCA, obtiveram-se os valores indicados na tabela 8 para a concentração de TCA do disco interno e disco de espelho.

Tabela 12. Concentração de TCA. Repetição da análise aos discos do grupo 2. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Grupo	nº rolha	Concentração de TCA no disco interno (ng/L)	Concentração de TCA no espelho (ng/L)
2	28	0,6	ND
	33	1,5	0,8
	36	2,2	2,1
	40	3,1	2,0
	43	3,4	6,6

Os resultados da reanálise comprovam que discos que anteriormente eram ND agora estão contaminados. Uma explicação possível para este fenómeno é que o TCA interno pode ter ficado exposto depois da retificação da rolha.

O grupo 3a, 3b, 4a e 4b apresentam contaminação no vinho fruto da migração de TCA pelos discos contaminados. A migração ocorreu por contacto superficial do vinho com os discos e

por migração interna através do líquido absorvido pelos discos. As figuras 15 e 16 indicam dois exemplos do estado das rolhas após a abertura da garrafa.



Figura 15. Exemplo da condição visual após abertura da garrafa. Disco de espelho (centro) com colapso da estrutura.



Figura 16. Exemplo da condição visual da rolha onde é possível observar absorção de líquido no disco de espelho.

A figura 15 é um exemplo dos possíveis motivos para existir migração para o vinho. O colapso da estrutura dos discos é um problema causado pela falta de suberina na cortiça e excesso de lignina que diminui a capacidade que a rolha tem em aguentar as tensões internas da cortiça. Como as garrafas de champanhe estão sujeitas a uma alta pressão interna, o disco não aguenta as pressões e colapsa criando espaços nas suas laterais com os quais o vinho entra em contacto. Este fenómeno pode dar origem a migrações laterais.

A figura 16 ilustra o fenómeno da absorção de líquido pela rolha que tem um aumento gradual com o tempo. Visto que a absorção atingiu o disco interno o contacto entre o líquido e o disco provoca migração.

### **3.3.3. Conclusão**

Existe migração de TCA através dos discos contaminados para o vinho mas não existiu migração através dos corpos contaminados até aos 24 meses.

A migração ocorre quando existe uma solução líquida a atuar como mecanismo de transporte.

O colapso e a retificação dos discos são possíveis causas de contaminação por migração superficial de contacto com o vinho.

## **3.4. Migração de TCA em rolhas de champanhe II**

O objetivo deste estudo é determinar se existe ou não migração de TCA, ao longo do tempo, através da rolha de champanhe para o vinho. Com este estudo pretende-se especificar as condições que afetam a migração, especificamente, ao tentar perceber se ocorre migração através do corpo da rolha para o vinho. O estudo foi iniciado no I&D em Junho de 2018 e foi realizado o ensaio correspondente ao ponto de análise de 6 meses após engarrafamento.

### **3.4.1. Metodologia**

#### **Procedimento experimental:**

As rolhas de cortiça utilizadas são rolhas de champanhe de um (1D) e dois discos (2D). O corpo da rolha é constituído por granulado de cortiça colado entre si com cola de poliuretano e os discos são discos de cortiça natural extra. Ao todo foram necessários 120 corpos, 180 discos e 120 garrafas.

No início foram analisados vários discos para perceber qual a concentração de TCA em cada um. Depois de analisados fez-se uma seleção de discos com TCA não detetável.

Repetiu-se o procedimento para os corpos, selecionando os que tinham concentrações de TCA inferiores a 2 ng/L (corpos com tratamento), entre 2 e 10 ng/L (corpos sem tratamento) e com TCA superior a 10 ng/L (corpos altamente contaminados).

A nomenclatura, dos corpos, utilizada nos grupos de rolhas foi a seguinte:

- TCA < 2 ng/L – STO1 e 2D1

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

- $2 < \text{TCA} < 10 \text{ ng/L}$  – STO2 e 2D2
- $\text{TCA} > 10 \text{ ng/L}$  – STO3 e 2D3

Após seleção fez-se o acabamento das rolhas colando ambos os discos, ou um disco no caso das rolhas 1D, e o corpo após o que foi feita a retificação em 4 mm para atingir o tamanho normal de uma rolha de champanhe de dois discos.

#### **Análise das amostras:**

A análise às amostras foi efetuada de acordo com a norma ISO 20752:2014 (E) [25]. As rolhas foram cortadas separando o corpo dos discos e foram colocadas separadamente a macerar em solução hidroalcolólica com 12% de etanol durante  $24 \pm 2$  horas. Após a maceração pipetaram-se  $10 \pm 0.1 \text{ mL}$  de solução de maceração para um tubo de cromatografia de 20 mL, contendo  $\pm 3 \text{ g}$  de NaCl. Fez-se a mesma pipetagem para o vinho. Para identificação do pico cromatográfico adicionou-se  $100 \pm 0.1 \mu\text{L}$  de padrão interno, d5-TCA. O método utilizado para detetar a concentração de TCA foi o SPME-GC-MS.

#### **3.4.2. Resultados e discussão**

Para o primeiro ponto de análise os resultados para as concentrações obtidas estão indicados na tabela 13 e 14.

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

Tabela 13. Concentrações de TCA no corpo, disco(s) e vinho em ng/L. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Grupo	nº rolha	Concentração de TCA no corpo (ng/L)	Concentração de TCA no disco (ng/L)	Concentração de TCA no vinho (ng/L)
STO 1	1	2	ND	ND
	2	1	ND	ND
	3	1	ND	ND
	4	1	ND	ND
	5	2	ND	ND
STO 2	6	3	ND	ND
	7	1	ND	ND
	8	1	ND	ND
	9	3	ND	ND
	10	4	ND	ND
STO 3	11	21	1	ND
	12	4	ND	ND
	13	4	ND	ND
	14	4	ND	ND
	15	7	ND	ND
2D 1	16	ND	ND	ND
	17	1	ND	ND
	18	ND	ND	ND
	19	1	ND	ND
	20	2	ND	ND
2D 2	21	1	ND	ND
	22	2	ND	ND
	23	1	ND	ND
	24	1	ND	ND
	25	35	ND	ND
2D 3	26	6	ND	ND
	27	2	ND	ND
	28	5	ND	ND
	29	4	ND	ND
	30	6	ND	ND

Tabela 14. Média e desvio padrão das concentrações de TCA no corpo, disco(s) e vinho em ng/L. Resultados obtidos na gama de trabalho de 0 a 200 ng/L.

Grupo	Média e desvio padrão da concentração de TCA no corpo (ng/L)	Média e desvio padrão da concentração de TCA no disco (ng/L)	Média e desvio padrão da concentração de TCA no vinho (ng/L)
STO 1	2 ± 1	ND	ND
STO 2	2 ± 1	ND	ND
STO 3	8 ± 7	ND	ND
2D 1	1 ± 1	ND	ND
2D 2	8 ± 7	ND	ND
2D 3	5 ± 2	ND	ND

O grupo STO1, STO2 e STO3 representam as rolhas de champanhe 1D e correspondem a corpos com tratamento, sem tratamento e muito contaminados, respetivamente. O grupo 2D1, 2D2 e 2D3 representam as rolhas de champanhe 2D e correspondem a corpos com tratamento, sem tratamento e muito contaminados, respetivamente.

Os resultados indicam que não ocorreu migração de TCA do corpo para o vinho ou para o(s) disco(s) com exceção da rolha 11 do grupo STO3 que apresenta contaminação no disco. Esta contaminação única está provavelmente associada ao facto do corpo ter uma concentração de TCA alta, acima de 20 ng/L, e existe a probabilidade do corpo estar a causar contaminação cruzada para o disco.

No grupo STO1 a concentração de TCA dos corpos é concordante com o que era esperado. No grupo STO2 o mesmo acontece, com exceção das amostras 7 e 8 que ficam um pouco abaixo do mínimo estabelecido de 2 ng/L. No grupo STO3 os corpos apresentam concentrações inferiores a 10 ng/L em 4 das 5 amostras.

No grupo 2D1 as concentrações estão dentro dos valores exigidos, no entanto, em 2D2 4 das 5 amostras apresentam contaminação inferior a 2 ng/L. Para 2D3 todas as amostras ficam abaixo de 10 ng/L.

Apesar de não existir migração, até ao momento, existe uma diferença nas concentrações esperadas dos corpos. Essa diferença é explicada pelo facto dos valores de TCA em granulado serem diferentes dos valores de TCA no corpo final. No entanto, a retificação das rolhas pode ter exposto algum TCA interno nos corpos ou removido algum TCA da superfície.

### **3.4.3. Conclusão**

Não existe migração de TCA para o vinho. A retificação das rolhas pode ter exposto algum TCA interno nos corpos.

Tendo em conta os resultados conhecidos até ao momento, é expectável que, com o tempo, a migração comece a evoluir por causa da evolução da quantidade de absorção de líquido pela rolha.

## **4. Regeneração de compostos fenólicos oxidados (quinonas) para a sua forma redutora**

### **4.1. Objetivo**

O objetivo deste estudo é perceber a influência dos compostos fenólicos oxidados na capacidade antioxidante da rolha e encontrar um método eficaz de tratamento de rolhas que seja capaz de reverter a oxidação das quinonas formadas durante o processo de lavação.

### **4.2. Metodologia**

#### **Procedimento experimental:**

As rolhas utilizadas no estudo foram rolhas naturais de calibre 49x26 mm e classe extra. Para os ensaios foram necessárias rolhas com dois tipos de lavação diferentes, Clean 0 e Nature. Para a preparação dos ensaios utilizou-se um balão volumétrico de 2 L  $\pm$  0,6 mL e vários frascos de 250 mL e 500 mL. Na preparação das soluções para o tratamento utilizou-se ácido cítrico com 99% pureza, hidróxido de sódio para a correção de pH e ácido sulfuroso com concentração 60 g/L de SO<sub>2</sub>.

Solução de ácido cítrico: foram pesados em balança analítica 5g de ácido cítrico p.a., que foram transferidos para balão volumétrico de 1 L, tendo este volume sido preenchido com água desionizada. O pH foi corrigido para 2-2,5 pela adição de solução aquosa de NaOH 50% (v/v) através da monitorização com um eletrodo.

Soluções de SO<sub>2</sub>: foram preparadas 4 soluções de SO<sub>2</sub> nas concentrações de 500, 1000, 2000 e 4000 mg/L. Para a solução de 500 mg/L pipetou-se 2,1  $\pm$  0,1 mL da solução concentrada de ácido sulfuroso para um balão volumétrico de 250  $\pm$  0,5 mL e fez-se o volume com a solução de ácido cítrico acima referida. Repetiu-se o procedimento alterando apenas a quantidade de ácido sulfuroso pipetado para 4,2  $\pm$  0,1 mL, 8,3  $\pm$  0,1 mL e 16,7  $\pm$  0,1 mL, para a preparação das soluções de SO<sub>2</sub> nas concentrações de 1000, 2000 e 4000 mg/L, respetivamente. Seguidamente a concentração das soluções de SO<sub>2</sub> foi confirmada em laboratório externo. Tendo em conta os resultados da análise à concentração de SO<sub>2</sub> determinou-se que era necessário pipetar 10,5  $\pm$  0,1 mL, 21,0  $\pm$  0,1 mL, 41,9  $\pm$  0,1 mL e 83,9  $\pm$  0,1 mL da solução concentrada de ácido sulfuroso para atingir as concentrações pretendidas de 500, 1000, 2000 e 4000 mg/L, respetivamente.

Tratamento das rolhas com as soluções previamente preparadas de SO<sub>2</sub>: foram colocadas 4 rolhas tratadas Nature em cada um de 4 frascos de 250 mL e perfez-se o volume com as soluções de SO<sub>2</sub> com as concentrações de 500, 1000, 2000 e 4000 mg/L previamente preparadas. Adicionalmente, para dois outros frascos foram colocadas 4 rolhas Nature e 4 rolhas Clean 0 das quais apenas foi adicionada a solução base de ácido cítrico. Como brancos foram usados 4 frascos de 250 mL com cada uma das soluções de SO<sub>2</sub> de concentração 500, 1000, 2000 e 4000 mg/L e ainda um frasco de 250 mL com apenas solução base de ácido cítrico. Após 24 horas, foram retiradas as rolhas dos frascos e colocadas em macerações de solução de ácido cítrico durante mais 24 horas. Estas amostras foram analisadas, num laboratório externo, quanto ao conteúdo fenólico usando o método de Folin-Ciocalteu (TPC para teor de fenólicos totais) e capacidade antioxidante pelos métodos FRAPe DPPH.

### 4.3. Resultados e discussão

A tabela 15 apresenta os resultados da análise ao SO<sub>2</sub> nas soluções iniciais, obtidos em laboratório externo. Estes resultados demonstraram a necessidade de adição de ácido sulfuroso concentrado. Foi calculada a diferença da concentração e fez-se o ajuste descrito no subcapítulo anterior.

Tabela 15. Resultados médios da análise ao dióxido de enxofre das soluções.

Concentração teórica da solução de SO <sub>2</sub> (mg/L)	Concentração real de SO <sub>2</sub> (mg/L)
500	329 ± 1
1000	767 ± 15
2000	1570 ± 45
4000	3228 ± 107

Parece evidente a perda de concentração de SO<sub>2</sub> provocada pela reação com o oxigénio. A reação ocorre rapidamente para atingir o estado de equilíbrio e estabiliza nas concentrações obtidas. No entanto, com o tempo, é provável que a concentração continue a baixar conforme as variações de temperatura e/ou da qualidade do ar a que estão expostas. Essa pequena alteração que pode ocorrer é desprezada pelo facto que, para o estudo presente na dissertação, a concentração só tem que se manter nos valores estipulados durante as 24 horas de tratamento.

Os resultados da capacidade antioxidante das amostras com diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$  e os das rolhas apenas maceradas em solução de ácido cítrico foram obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu (análise efetuada em laboratório externo) (figura 17).

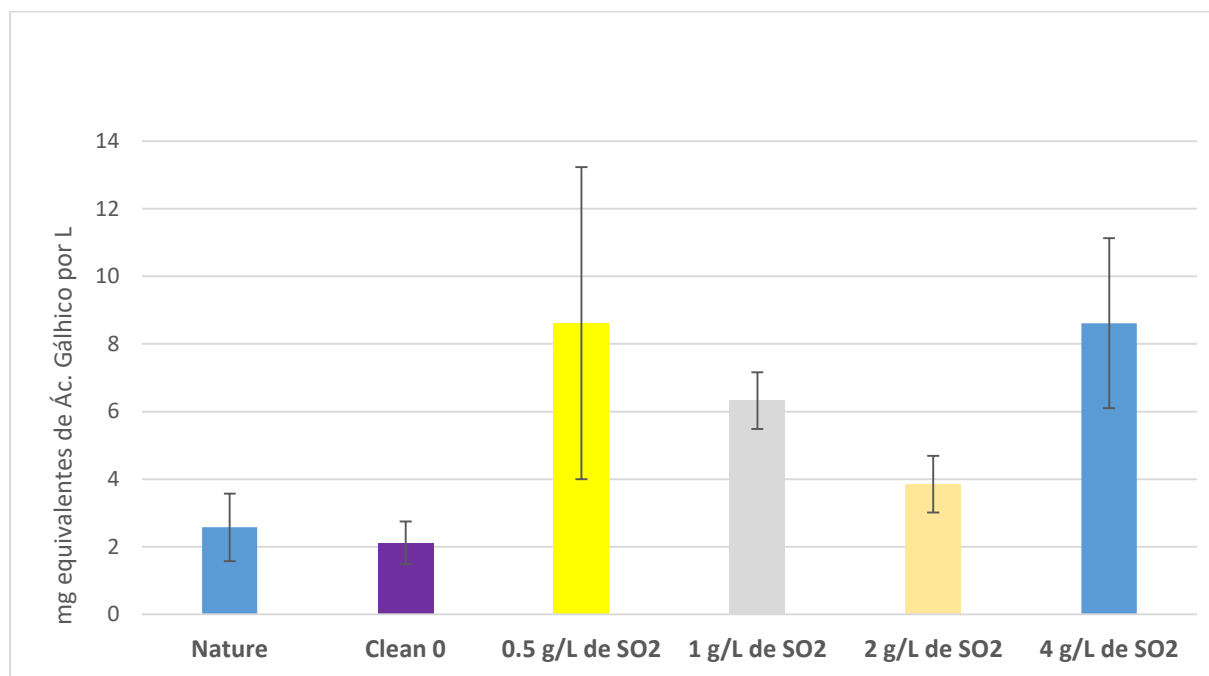


Figura 17. Teor de fenólicos totais, expresso em mg equivalente ácido gálico /L , para as rolhas Nature e Clean 0 sem tratamento e para as rolhas Nature com diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$  no tratamento. O desvio padrão está associado a quatro réplicas por amostra.

O reagente de Folin-Ciocalteu utilizado no método para determinar o teor de compostos fenólicos, vai reagir com qualquer substância redutora, podendo dar a indicação da capacidade total redutora de uma solução. No entanto, como a solução poderá não ser somente constituída por compostos fenólicos, os valores obtidos poderão estar sujeitos a interferências.

Pela figura 17 é possível observar que o teor de fenólicos totais das rolhas sem tratamento é semelhante para os dois tipos de lavação. Existe uma diferença significativa entre as rolhas sem tratamento e as rolhas tratadas. Isso significa que, apesar de não sabermos exatamente o efeito do tratamento nas quinonas, é possível concluir que o tratamento aumenta o teor de fenólicos totais, o que poderá corresponder a um aumento da capacidade antioxidante das rolhas.

Não há uma correlação entre o teor de fenólicos totais, e consequentemente do poder redutor das rolhas e o tratamento com concentrações crescentes de solução de  $\text{SO}_2$ . Isto pode dever-se não só à presença de interferências, mas também à grande instabilidade do  $\text{SO}_2$  em função da temperatura e do contacto com o ar.

A determinação da capacidade redutora pelo método FRAP contraria o que foi observado anteriormente, figura 18.

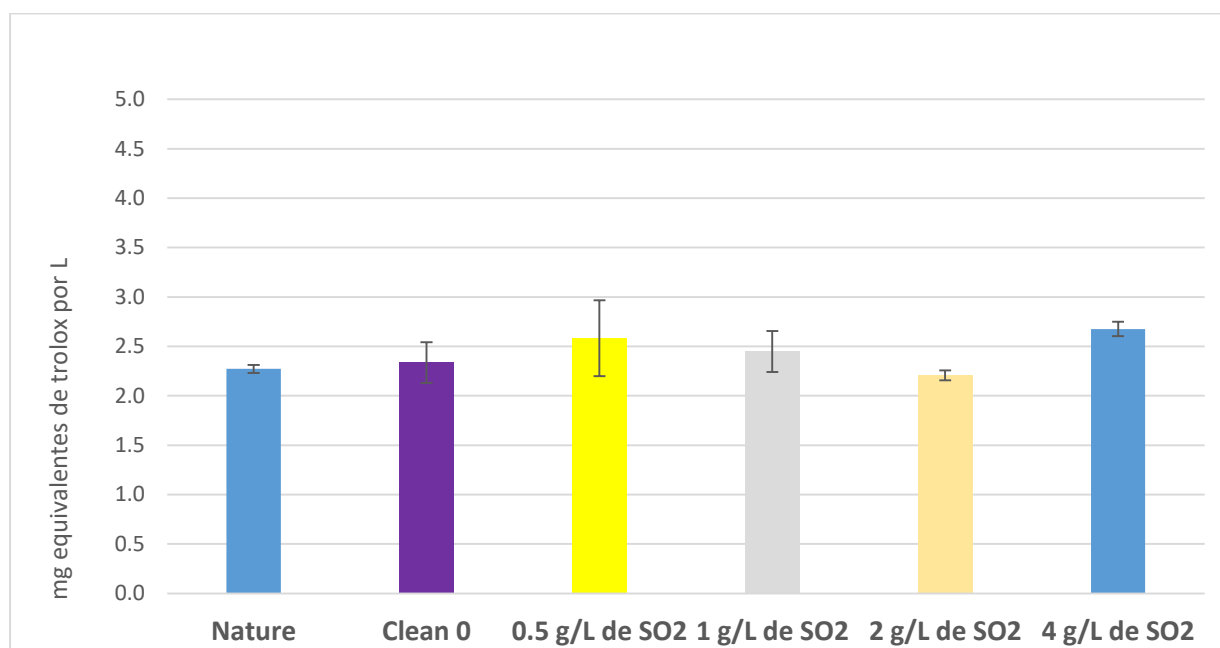


Figura 18. Resultados do método FRAP expresso em mg equivalente Trolox/L, para as rolhas Nature e Clean 0 sem tratamento e para as rolhas Nature com diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> no tratamento. O desvio padrão está associado a quatro réplicas por amostra..

Os resultados obtidos pelo método FRAP evidenciam que não existe grande diferença entre as rolhas tratadas e não tratadas. No entanto, em comparação com as rolhas não tratadas, as soluções das rolhas com tratamento apresentam valores ligeiramente superiores de capacidade redutora em todas as concentrações com a exceção da solução 2 g/L SO<sub>2</sub>. Como a diferença não é significativa em nenhuma das amostras, poderá considerar-se que a extração de compostos redutores das rolhas para a solução é idêntica em todo o tipo de tratamentos testados.

A atividade antiradicalar dos compostos extraídos, das rolhas para as soluções, foi analisada através do método DPPH. Os valores representados em equivalentes de Trolox indicam a capacidade antiradicalar dos ensaios efetuados para as rolhas com tratamento e sem tratamento, figura 19.

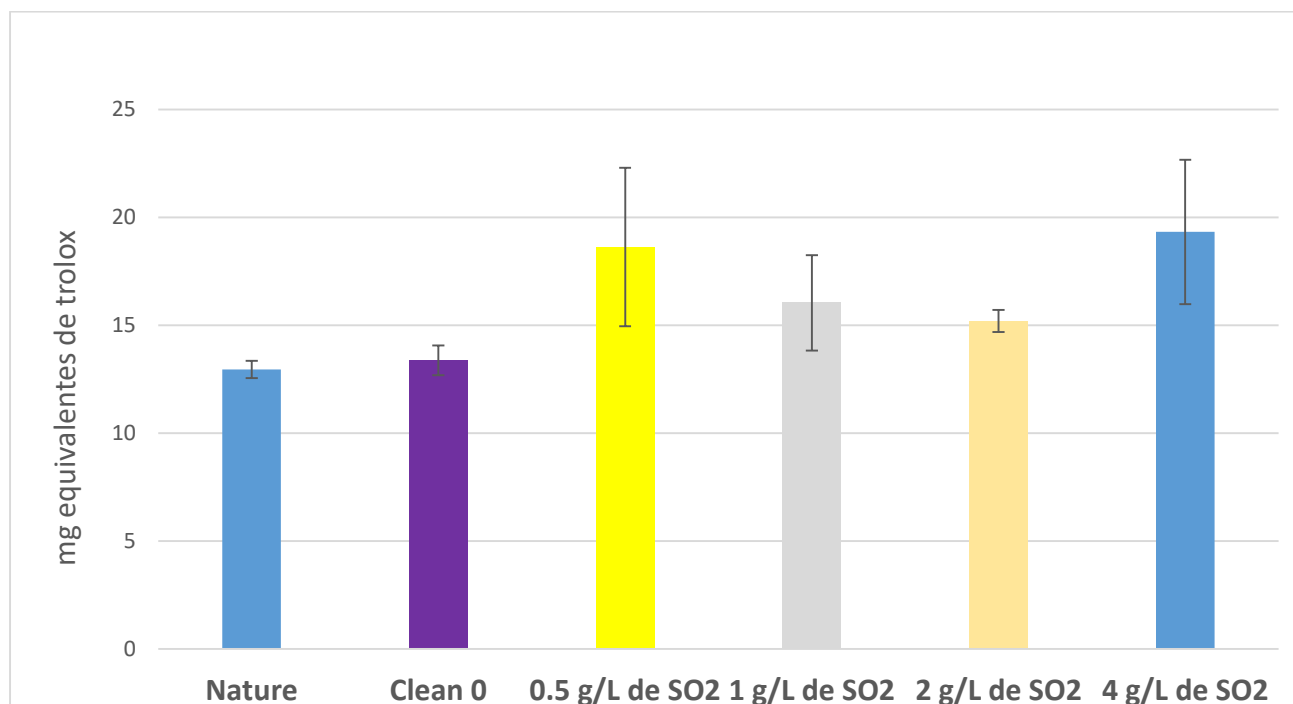


Figura 19. Resultados DPPH expresso em mg equivalente trolox /L , para as rolhas Nature e Clean 0 sem tratamento e para as rolhas Nature com diferentes concentrações de SO<sub>2</sub> no tratamento. O desvio padrão está associado a quatro réplicas por amostra.

Os resultados obtidos indicam um aumento na capacidade antiradicalar para as rolhas com tratamento. As rolhas sem tratamento têm uma capacidade antiradicalar menor. Esta diferença poderá ser explicada pela regeneração dos compostos fenólicos através do tratamento testado.

Apesar de não ser claro o que influencia essa regeneração verificou-se com o método do Folin-Ciocalteu que nas rolhas tratadas há mais polifenóis, no método FRAP, que determina a capacidade redutora, não houve diferenças significativas entre as amostras e no método DPPH, que mede a capacidade de reduzir radicais, a diferença entre rolhas tratadas e não tratadas é pouco significativa, além disso em todos os ensaios os desvios associados às medições são muito grandes o que leva a dúvida acerca das conclusões possíveis de aferir.

O tratamento das rolhas com solução de dióxido de enxofre de concentração 0.5 g/L é o tratamento mais eficaz para a regeneração dos compostos fenólicos e o mais rentável a nível económico visto que, é preferível usar menos dióxido de enxofre para obter os mesmo resultados, como é o caso com as amostras a 4 g/L.

#### **4.4. Conclusão**

Apesar de não serem notórias diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos três métodos aplicados, as rolhas com tratamento de dióxido de enxofre apresentam uma maior capacidade antioxidante quando comparadas com rolhas sem tratamento. O tratamento com solução de dióxido de enxofre de concentração 0.5 g/L foi o tratamento que se revelou mais eficaz em restaurar a capacidade antioxidante das rolhas, no entanto, devido à incerteza associada aos resultados é necessário aprofundar o estudo e realizar mais amostras para uma conclusão definitiva.

## 5. Conclusões gerais

O estudo à migração de TCA nas rolhas naturais demonstrou que existe migração e que a mesma é beneficiada pelo tempo de armazenamento. Além disso, não é necessário a solução modelo de vinho entrar em contacto direto com a secção contaminada visto que, a humidificação da rolha parece ser responsável por movimentar o d5-TCA na própria rolha, sendo essa migração potenciada pela existência de canais/capilaridades nas rolhas.

Quanto às rolhas técnicas de champanhe, referentes ao primeiro estudo, verificou-se que existiu migração de TCA através dos discos contaminados para o vinho mas não existiu migração através dos corpos contaminados até aos 24 meses. O colapso e a retificação dos discos são possíveis causas de contaminação por migração superficial de contacto com o vinho. No segundo estudo, não existiu migração de TCA para o vinho até ao momento.

Relativamente à regeneração de compostos fenólicos oxidados, verificou-se que as rolhas com tratamento de dióxido de enxofre apresentam uma maior capacidade antioxidante quando comparadas com rolhas sem tratamento, e apesar de não se obterem diferenças significativas o tratamento foi mais eficaz usando a solução de dióxido de enxofre de concentração 0.5 g/L.

## **6. Avaliação do trabalho realizado**

### **6.1. Objectivos realizados**

O objetivo em comum para os estudos da migração de TCA foi perceber se ocorre migração do interior da rolha para o vinho. A alteração nos parâmetros experimentais de cada um dos estudos contribuiu para o objetivo comum de perceber como acontece esta transmissão de contaminante.

Ao longo destes nove meses de trabalho foi possível detetar a migração do interior da rolha para a solução modelo de vinho. No entanto, uma avaliação global deste fenómeno só pode ser atingida após estarem concluídos os pontos de análise dos estudos efetuados.

O outro objetivo desta dissertação consistiu em perceber a influência dos compostos fenólicos oxidados na capacidade antioxidante da rolha e encontrar um método eficaz de tratamento de rolhas que fosse capaz de reverter a oxidação das quinonas formadas durante o processo de lavação.

Com os resultados obtidos foi possível perceber a influência dos compostos fenólicos oxidados pela comparação entre os diferentes ensaios, onde efetivamente existe uma diferença significativa entre amostras sem tratamento e com tratamento.

No entanto, os resultados, apesar de conclusivos, não são suficientes para o desenvolvimento de um método de tratamento das rolhas, sendo necessário um maior conhecimento e um maior número de ensaios e dados para comprovar a metodologia.

### **6.2. Outros trabalhos realizados**

Durante os nove meses de estágio realizados no I&D foram acompanhados e elaborados outros trabalhos relacionados com projetos de desenvolvimento interno.

Um dos trabalhos realizados foi o controlo de TCA que é feito diariamente no I&D, com um volume de 1000 amostras por dia. O trabalho necessitou que fossem preparadas as amostras e os cromatógrafos de acordo com a metodologia interna e/ou seguindo as normas estabelecidas para SPME-GC, quer por ECD, quer por MS.

Existiu ainda, a oportunidade de cooperar em projetos de erradicação de TCA, por exemplo, o projeto de erradicação da FeyeCon, fornecendo apoio laboratorial, quer por intermédio de ensaios de granulometria, quer por análise de cromatografia gasosa.

Outro trabalho realizado ocorreu no âmbito do projeto de migração de oxigénio através da cortiça onde foram feitas análises semanais por colorimetria e medição de percentagem de oxigénio através do equipamento “Presense oxygen sensor”.

### **6.3. Possíveis trabalhos futuros**

No futuro seria importante continuar a trabalhar no desenvolvimento de um método eficaz para a regeneração dos compostos fenólicos oxidados. Para isso, seria importante continuar a variar as concentrações das soluções de dióxido de enxofre até se atingir valores ótimos de regeneração. Após a criação do método seria fundamental aplicar à escala industrial um protótipo da metodologia desenvolvida para perceber se os conceitos obtidos se aplicam nessa escala.

Quanto à migração de TCA seria importante continuar os estudos que estão a decorrer atualmente para perceber a influência do tempo no fenómeno da migração e continuar a desenvolver novos estudos com novos cenários de contaminação das rolhas.

Apreciação final:

A realização do estágio e da presente dissertação contribuiu para o desenvolvimento do conhecimento do fenómeno da migração nas rolhas e possibilitou a confirmação do processo regenerativo dos compostos fenólicos oxidados.

A nível profissional, possibilitou uma grande aprendizagem para o mundo de trabalho e o desempenho de funções base fundamentais a qualquer profissional. O trabalho desenvolvido foi desafiante e possibilitou a oportunidade de colocar em prática grande parte dos conhecimentos desenvolvidos ao longo destes cinco anos curriculares.

## Bibliografia

- [1] Amorim “Liderança Global - I&D+INOVAÇÃO”, 2015. <https://www.amorim.com/lideranca-global/i&d-inovacao/> (acedido em 21 de abril de 2019).
- [2] Juanola, R, Subir, D, Salvadà, V, Garcia Regueiro, JA, Anticé, E (2004). “*Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine*”, Springer-Verlag 2004, 347-349.
- [3] Corticiera Amorim, S.G.P.S., S.A., 2018. “Consolidated Annual Report 2018 – Corticiera Amorim, S.G.P.S., S.A.” (versão PDF do documento descarregado em 13 de Maio de 2019).
- [4] Amorim “Unidades de negócio – Matérias-primas”, 2015. <https://www.amorim.com/lideranca-global/i&d-inovacao/> (acedido em 20 de Fevereiro de 2019).
- [5] Pereira, H, Emilia Rosa, M, Fortes, MA (1987). “THE CELLULAR STRUCTURE OF CORK FROM QUERCUS SUBER L.”, JAWA Bulletin n.s., Vol. 8 (3), 213-218.
- [6] Amorim “A cortiça – O sobreiro”, 2015. <https://www.corticeiraamorim.com/cortica/mitos-e-curiosidades/O-Sobreiro/110/#collapse407> (acedido em 3 de Maio de 2019).
- [7] APCOR, Associação Portuguesa da Cortiça “Cortiça - Descortiçamento”, 2018. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/descortiçamento/> (acedido em 23 de Maio de 2019).
- [8] Correia, A.C., Pereira, J. S., Costa-e-Silva, F., Almeida, M. H., Pinheiro, C. Vitalidade do sobreiro - revisão do conhecimento. Lisboa: Filcork - Associação Interprofissional da Fileira da Cortiça. Abril 2015. 47 pág.
- [9] APCOR, Associação Portuguesa da Cortiça, 2011. Manual de rolhas APCOR. (versão PDF do documento descarregado em 16 de Maio de 2019).
- [10] Teixeira, MIV, Vitória San Romão, M, Rosário Bronze, M, Boas, LV, (2006). “2,4,6-trichloroanisole: a consumer panel evaluation.”, Ciência Téc. Vitiv. 21 (2), 53-65.
- [11] Michalowicz, J, Duda, W, (2007). “Phenols-Sources and toxicity”, Polish J. Of Environ. Stud., Vol 16, 347-362.
- [12] Nakayama, T, Amachi, T, (1999). “Fungal peroxidase: its structure, function and application.”, Journal of molecular catalysis B: Enzymatic 6, 185-198.

- [13] Miao, M, Zhang, Y, Shu, L, Zhang, J, Kong, Q, Li, N, (2014). “Development and characterization of the 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) aerobic degrading granules in sequencing batch airlift reactor.”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 61-66.
- [14] Chatonnet, P, Fleury, A, Boutou, S, (2010). “Identification of a new source of contamination of *Quercus* sp. Oak Wood by 2,4,6-trichloroanisole and its impact on the contamination of barrel-aged wines.”, *J. Agric. Food Chem.*
- [15] Álvarez-Rodríguez, ML, López-Ocaña, L, López-Coronado, JM, Rodríguez, E, Martínez, MJ, Larriba, G, Coque, JJR, (2002). “Cork Taint of Wines: Role of the filamentous Fungi Isolated from Cork in the Formation of 2,4,6-Trichloroanisole by O Methylation of 2,4,6-Trichlorophenol.”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 68, 5860-5869.
- [16] Sefton, MA, Simpson, RF, (2005). “Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review.”, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 226-240.
- [17] *Quercus* Final Consolidated Report – Technical Report – June 1996. (versão PDF descarregada em 19 de Fevereiro de 2019).
- [18] Simpson, RF, Sefton, MA, (2007). “Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks.”, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13, 106-116.
- [19] Azevedo, J, Fernandes, I, Lopes, P, Roseira, I, Cabral, M, Mateus, N, Freitas, V, (2014). “Migration of phenolic compounds from different cork stoppers to wine model solutions: antioxidant and biological relevance.”, *Eur. Food Res. Technol*, 239, 951-960.
- [20] Fernandes, A, Fernandes, I, Cruz, L, Mateus, N, Cabral, M, Freitas, V, (2009). “Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from *Quercus suber* L.”, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 11154-11160.
- [21] Danilewicz, JC, (2011). “Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron.”, *AJEV* papers in press.
- [22] European Cork Federation – Celiege. Código internacional das práticas rolheiras. (versão PDF descarregada em 29 de Maio de 2019).

- [23] Nikolantonaki, M, Waterhouse, AL. “A method to quantify quinone reaction rates with wine relevant nucleophiles: A key to the understanding of oxidative loss of varietal thiols.”, *J. Agric. Food Chem.*.
- [24] Tarasov, A, Rauhut, D, Jung, R, (2017). ““Cork tain” responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review”, *Talanta* 175, 82-92.
- [25] Anónimo, (2014). “Cork stoppers – determination of releasable 2,4,6-trichloroanisol (TCA)”, ISO20752:2014(E).
- [26] Anónimo, (2009). “Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisol in wine by cork stoppers (Resolution OIV-Oeno296/2009)”, Method OIV-MA-AS315-16.
- [27] Capone, DL, Skouroumounis, GK, Barker, DA, McLean, HJ, Sefton, MA, (1999). “Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials.”, *Aust. J. Grape Wine*. 5, 91-98.
- [28] Capone, DL, Skouroumounis, GK, Barker, DA, McLean, HJ, Sefton, MA, (2002). “Permeation of 2,4,6-trichloroanisol through cork closures in wine bottles.”, *Aust. J. Grape Wine*. 8, 196-199.
- [29] Kedare, SB, Singh, RP, (2011). “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay”, *J. Food Sci Technol*, 48(4), 412-422.
- [30] Benzie, IFF, Strain, JJ, (1996). “The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay.”, *Analytical biochemistry*, Vol. 239, 70-76.
- [31] Danilewicz, JC, (2016). “Reaction of oxygen and sulfite in wine.”, *Am. J. Enol. Vitic.*, 67.
- [32] Amorim & Irmãos, (2019). “Ridurre la cessione dei composti fenolici ossidati (chinoni) dai tappi di sughero monopezzo al vino.”, (versão PDF obtida a 18 de Fevereiro de 2019).

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

## **Anexo 1 – Procedimento de análise por SPME-GC-MS**

Descrição do equipamento e método:

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo gasoso de espetometria em massa “Shimadzu-QP2010 plus NCL”. O GC-MS especificado utilizou uma coluna cromatográfica apolar ZB-5 MS com fase estacionária de difenil-dimetil polissiloxano. A pre-incubação aumenta a temperatura nas amostras gradualmente para ajudar a libertar os analitos. Os analitos são recolhidos durante 8 minutos com agitação e a 50 graus celsius, etapa em que a fibra é exposta à fase gasosa presente no vial da amostra. A fase estacionária retém os analitos através do filme polimérico fino na extremidade da fibra. De seguida, ocorre o arrasto dos compostos voláteis a 270 graus celsius e durante 4 minutos o gás de arrasto, hidrogénio de alta pureza, faz o transporte dos mesmos no interior da coluna.

Para referência entre amostras utilizou-se um padrão interno de TCA. No caso das amostras em que a contaminação é feita por adição de 2,4,6 – tricloroanisol usou-se d5-TCA como padrão interno de referência. Para as amostras com contaminação de d5-TCA usou-se d5-TBA como padrão interno.

Procedimento para preparação de padrão interno de d5-TCA e d5-TBA:

Pesou-se 10 mg de padrão de d5-TCA numa balança analítica  $\pm 0,0001$  g e dissolveu-se num balão volumétrico de 100 mL com etanol a 96 % (v/v). Obteu-se uma concentração de 100 mg/L. A partir dessa solução pipetou-se 100  $\mu$ L e diluiu-se num novo balão com etanol de iguais medidas. A concentração obtida é de 100  $\mu$ g/L, a partir desta solução foi feita uma nova pipetagem de 2 mL para diluir para a concentração de 2  $\mu$ g/L. Para a preparação do padrão interno de d5-TBA o procedimento é o mesmo descrito anteriormente com a diferença do padrão inicial usado, que desta vez é o d5-TBA.

Os ensaios realizados por este método foram calibrados para duas gamas de concentrações utilizadas. A gama baixa, corresponde a limites de deteção entre os 0 e os 20 ng/L, e a gama alta que corresponde aos limites entre 0 e 200 ng/L.

Procedimento para preparação das soluções necessárias à calibração:

Pesou-se 10 mg de TCA e dissolveu-se em 100 mL de solução etanólica a 96% (v/v) (solução 1). A partir da solução 1 de concentração 100 mg/L pipetou-se 100  $\mu$ L e diluiu-se novamente nas mesmas condições (solução 2). Pipetou-se 10 mL da solução 2 e diluiu-se novamente nas

mesmas condições (solução 3). Voltou-se a repetir a pipetação e diluição originando a solução com concentração 1 µ/L (solução 4). Repetiu-se pela ultima vez a pipetação e diluição originando a solução de concentração 100 ng/L (solução 5).

A programção das retas de calibração é feita por análise de amostras preparadas com concentrações finais conhecidas especificas para cada gama do método, conforme descrito na tabela A.1.1 e A1.2..

Tabela A.1 1. Preparação das amostras da reta de calibração para gama de baixa concentração.

Concentração teórica do padrão (ng/L)	Solução etanólica a 12% (mL)	Volume pipetado da solução 4 (µL) de TCA	Volume pipetado da solução 5 (µL) de TCA	Volume pipetado da solução 3 (µL) de padrão interno	Concentração real padrão (ng/L)
0,5	10	-	50	100	0,498
1,5		-	150		1,478
2,5		25	-		2,494
3,5		35	-		3,488
4,5		45	-		4,480
5,5		55	-		5,470

Tabela A.1 .2. Preparação das amostras da reta de calibração para gama de alta concentração.

Concentração teórica do padrão (ng/L)	Solução etanólica a 12% (mL)	Volume pipetado da solução 4 (µL) de TCA	Volume pipetado da solução 5 (µL) de TCA	Volume pipetado da solução 3 (µL) de padrão interno	Concentração real padrão (ng/L)
5,5	10	55	50	100	5,470
7,5		75	150		7,444
9,5		95	-		9,411
11,5		115	-		11,37
13,5		135	-		13,32

## Anexo 2 – Dados para o ensaio de migração de TCA em rolhas de champanhe I

No presente anexo estão afixados os dados referentes à análise feita aos discos de champanhe para determinar qual a sua concentração de TCA.

Tabela A.2 .1 – Dados para concentração de TCA nos discos antes da colagem organizados por grupos de concentração e numerados.

grupo	rolha	concentração de TCA disco interno (ng/L)	concentração TCA espelho (ng/L)
grupo 1	1	nd	nd
	2	nd	nd
	3	nd	nd
	4	nd	nd
	5	nd	nd
	6	nd	nd
	7	nd	nd
	8	nd	nd
	9	nd	nd
	10	nd	nd
	11	nd	nd
	12	nd	nd
	13	nd	nd
	14	nd	nd
	15	nd	nd
	16	nd	nd
	17	nd	nd
	18	nd	nd
	19	nd	nd
	20	nd	nd
	21	nd	nd
	22	nd	nd
	23	nd	nd
grupo 2	24	nd	nd
	25	nd	nd
	26	nd	nd
	27	nd	nd
	28	nd	nd
	29	nd	nd
	30	nd	nd
	31	nd	nd

grupo	rolha	concentração de TCA disco interno (ng/L)	concentração TCA espelho (ng/L)
grupo 3b	64	6	nd
	65	9,4	nd
	66	7,4	nd
	67	9,6	nd
	68	10,5	nd
	69	5,9	nd
	70	7,3	nd
	71	6,2	nd
	72	6,3	nd
	73	5,8	nd
	74	5,7	nd
	75	62	nd
	76	9,1	nd
	77	6,9	nd
	78	7	nd
	79	26	nd
	80	8,5	nd
	81	8,7	nd
	82	5,1	nd
	83	39	nd
grupo 4a	84	nd	1,4
	85	nd	1,0
	86	nd	3,1
	87	nd	1,9
	88	nd	2,8
	89	nd	1,4
	90	nd	4,9
	91	nd	1,0
	92	nd	3,0
	93	nd	1,2
	94	nd	3,6

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

grupo 2	32	nd	nd
	33	nd	nd
	34	nd	nd
	35	nd	nd
	36	nd	nd
	37	nd	nd
	38	nd	nd
	39	nd	nd
	40	nd	nd
	41	nd	nd
	42	nd	nd
	43	nd	nd
	grupo 3a	44	1,8
45		1,8	nd
46		2,2	nd
47		3,4	nd
48		1,0	nd
49		1,7	nd
50		1,1	nd
51		1,8	nd
52		4,4	nd
53		1,9	nd
54		2,3	nd
55		4,7	nd
56		1,1	nd
57		1,1	nd
58		1,5	nd
59		4,4	nd
60	1,5	nd	
61	1,5	nd	
62	4,5	nd	
63	1,4	nd	

grupo 4a	95	nd	2,2	
	96	nd	1,0	
	97	nd	3,3	
	98	nd	1,7	
	99	nd	3,8	
	100	nd	1,4	
	101	nd	3,8	
	102	nd	1,7	
	103	nd	1,2	
	grupo 4b	104	nd	7,2
		105	nd	11
		106	nd	7,4
		107	nd	8,2
108		nd	12,1	
109		nd	41,9	
110		nd	5,9	
111		nd	11	
112		nd	7,4	
113		nd	6,0	
114		nd	7,7	
115		nd	7,4	
116		nd	5,1	
117		nd	5,3	
118		nd	14,3	
119		nd	13,9	
120	nd	6,8		
121	nd	6,1		
122	nd	7,7		
123	nd	5,4		

Tabela A.2 .2. – Dados para os resultados da concentração de TCA após 6 meses de engarrafamento.

Grupo	nº rolha	concentração de TCA disco interno (ng/L)	concentração TCA espelho (ng/L)	concentração TCA corpo (ng/L)	concentração TCA vinho (ng/L)
1	1	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd	nd
	4	nd	nd	nd	nd
	5	nd	nd	nd	nd
2	24	nd	nd	0,8	nd
	25	nd	nd	nd	nd
	26	nd	nd	nd	nd
	27	nd	nd	nd	nd
3A	45	1,8	nd	nd	1,8
	50	1,1	nd	nd	nd
	51	1,8	nd	nd	nd
	52	4,4	nd	1,1	0,9
	54	2,3	nd	1,0	nd
3B	64	6,0	nd	1,3	nd
	67	9,6	nd	2,2	1,9
	68	11	nd	1,0	1,7
	71	6,2	nd	nd	nd
	75	62	nd	0,9	1,5
4A	29*	nd	3,9	nd	2,5
	85	nd	1,0	nd	nd
	86	nd	3,1	0,7	1,7
	87	nd	1,9	nd	nd
	88	nd	2,8	nd	nd
4B	84*	nd	15	nd	6,2
	104	nd	7,2	nd	3,9
	105	nd	11	nd	109
	106	nd	7,4	nd	41
	114	nd	7,7	nd	11,1
	118	nd	12,1	0,8	19,4

\*rolhas reagrupadas

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

Tabela A.2 .3. – Dados para os resultados da concentração de TCA após 12 meses de engarrafamento.

Grupo	nº rolha	concentração de TCA disco interno (ng/L)	concentração TCA espelho (ng/L)	concentração TCA corpo (ng/L)	concentração TCA vinho (ng/L)
1	7	nd	nd	0,7	nd
	9	nd	nd	nd	nd
	15	nd	nd	nd	nd
	19	nd	nd	nd	nd
2	30	nd	nd	0,7	nd
	32	nd	nd	0,9	nd
	34	nd	nd	nd	nd
	39	nd	nd	nd	nd
3A	44	1,8	nd	1,6	0,9
	46	2,2	nd	1,7	1,8
	47	3,4	nd	nd	2,8
	48	1,0	nd	nd	nd
	49	1,7	nd	nd	nd
3B	70	7,3	nd	nd	2,8
	72	6,3	nd	0,9	1,2
	73	5,8	nd	1,2	3,9
	76	9,1	nd	0,9	1,4
	77	6,9	nd	0,9	4,1
4A	89	nd	1,4	nd	nd
	90	nd	4,9	nd	3,7
	100	nd	1,4	nd	1,1
4B	101*	nd	8,4	nd	7,4
	102*	nd	19	nd	18
	107	nd	8,2	nd	35
	109*	nd	452	6,1	286
	110*	nd	29	nd	11
	112*	nd	32	nd	39
	121*	nd	10	nd	18

### Anexo 3 - Dados para o ensaio de regeneração de compostos fenólicos oxidados

Neste anexo estão representados os dados referentes às figuras apresentadas no capítulo da regeneração de compostos fenólicos. Cada ensaio corresponde a uma extração diferente em que cada uma das extrações foi analisada 4 vezes.

Tabela A.3 .1. – Resultados obtidos no método de Folin-Ciocalteu com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre.

	Branco	Ac. Citrico	Nature	Clean 0 1	Clean 0 2	Clean 0 3	0.5 g/L 1	0.5 g/L 2	0.5 g/L 3
<b>A</b>	0.045	0.045	0.047	0.046	0.048	0.049	0.058	0.051	0.052
<b>B</b>	0.046	0.046	0.05	0.048	0.047	0.048	0.057	0.05	0.052
<b>C</b>	0.046	0.046	0.048	0.048	0.047	0.047	0.059	0.05	0.052
<b>D</b>	0.047	0.045	0.048	0.048	0.048	0.05	0.06	0.051	0.053

	1 g/L 1	1 g/L 2	1 g/L 3	2 g/L 1	2 g/L 2	2 g/L 3	4 g/L 1	4 g/L 2	4 g/L 3
<b>A</b>	0.055	0.053	0.05	0.05	0.051	0.05	0.056	0.051	0.057
<b>B</b>	0.052	0.052	0.049	0.05	0.049	0.049	0.054	0.051	0.056
<b>C</b>	0.053	0.052	0.048	0.05	0.048	0.048	0.054	0.053	0.055
<b>D</b>	0.053	0.053	0.05	0.051	0.047	0.05	0.053	0.05	0.055

Tabela A.3 .2 – Resultados obtidos pelo método de FRAP com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre.

	Branco	Ac Citrico	Nature	Clean 0 1	Clean 0 2	Clean 0 3	0.5 g/L 1	0.5 g/L 2	0.5 g/L 3
Leitura 1	0.144	0.144	0.155	0.152	0.16	0.154	0.175	0.159	0.159
	0.144	0.144	0.169	0.163	0.167	0.164	0.2	0.17	0.177
Leitura 2	0.142	0.144	0.155	0.202	0.15	0.155	0.175	0.162	0.158
	0.142	0.144	0.165	0.216	0.165	0.165	0.199	0.174	0.178
Leitura 3	0.143	0.143	0.156	0.161	0.154	0.157	0.176	0.16	0.146
	0.144	0.143	0.167	0.174	0.166	0.166	0.199	0.173	0.146
Leitura 4	0.148	0.144	0.158	0.157	0.791	0.156	0.177	0.16	0.158
	0.143	0.144	0.169	0.169	0.165	0.164	0.201	0.174	0.179

	1 g/L 1	1 g/L 2	1 g/L 3	2 g/L 1	2 g/L 2	2 g/L 3	4 g/L 1	4 g/L 2	4 g/L 3
Leitura 1	0.165	0.163	0.152	0.149	0.159	0.15	0.164	0.164	0.163
	0.182	0.179	0.164	0.16	0.172	0.162	0.186	0.183	0.186
Leitura 2	0.165	0.162	0.153	0.15	0.156	0.152	0.169	0.165	0.165
	0.18	0.179	0.165	0.161	0.165	0.165	0.191	0.182	0.186
Leitura 3	0.166	0.164	0.155	0.151	0.155	0.153	0.164	0.164	0.163
	0.183	0.178	0.166	0.166	0.167	0.164	0.187	0.18	0.184
	0.165	0.162	0.155	0.155	0.154	0.15	0.165	0.163	0.163

Regeneração dos compostos fenólicos oxidados (quinonas) e avaliação da capacidade migratória do tricloroanisol em rolhas de cortiça.

Leitura 4	0.182	0.178	0.165	0.167	0.165	0.163	0.187	0.181	0.185
-----------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabela A.3 .3. – Resultados obtidos pelo método de DPPH com três ensaios para Clean 0 e para as diferentes concentrações de dióxido de enxofre.

	<b>Branco</b>	<b>Ac Citrico</b>	<b>Nature</b>	<b>Clean 0 1</b>	<b>Clean 0 2</b>	<b>Clean 0 3</b>	<b>0.5 g/L 1</b>	<b>0.5 g/L 2</b>	<b>0.5 g/L 3</b>
Leitura 1	0.559	0.576	0.584	0.605	0.598	0.599	0.572	0.605	0.548
	0.529	0.56	0.499	0.503	0.489	0.528	0.311	0.475	0.373
Leitura 2	0.611	0.605	0.582	0.595	0.601	0.582	0.55	0.586	0.574
	0.587	0.586	0.494	0.499	0.495	0.499	0.306	0.462	0.398
Leitura 3	0.604	0.6	0.588	0.604	0.609	0.581	0.57	0.597	0.588
	0.582	0.583	0.509	0.522	0.508	0.509	0.329	0.473	0.416
Leitura 4	0.601	0.612	0.607	0.581	0.576	0.579	0.55	0.597	0.582
	0.585	0.588	0.531	0.497	0.478	0.5	0.315	0.477	0.411

	<b>1 g/L 1</b>	<b>1 g/L 2</b>	<b>1 g/L 3</b>	<b>2 g/L 1</b>	<b>2 g/L 2</b>	<b>2 g/L 3</b>	<b>4 g/L 1</b>	<b>4 g/L 2</b>	<b>4 g/L 3</b>
Leitura 1	0.563	0.578	0.596	0.525	0.582	0.579	0.509	0.543	0.544
	0.399	0.416	0.499	0.392	0.461	0.445	0.293	0.427	0.314
Leitura 2	0.563	0.573	0.591	0.562	0.555	0.579	0.507	0.514	0.537
	0.406	0.418	0.498	0.443	0.452	0.452	0.308	0.398	0.318
Leitura 3	0.551	0.553	0.58	0.549	0.563	0.576	0.509	0.538	0.524
	0.392	0.402	0.49	0.431	0.454	0.455	0.308	0.422	0.314
Leitura 4	0.548	0.545	0.571	0.533	0.558	0.577	0.497	0.522	0.527
	0.4	0.409	0.486	0.425	0.459	0.459	0.315	0.409	0.326