

**Instituto Superior de Engenharia do Porto**

**Mestrado em Engenharia Química**

**Otimização Energética na Indústria Química**

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES EM VINHO POR  
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E GC-MS/MS E SUA  
CORRELAÇÃO COM A ANÁLISE SENSORIAL**

Susana Maria Fernandes Faria

Orientadora: Prof. Doutora Maria Manuela Barbosa Correia (ISEP)

Co-orientadora: Prof. Doutora Cristina Maria Fernandes Delerue Alvim de Matos (ISEP)

Orientadora no IVDP: Dra. Cristina Maria Sampaio Esteves

**Porto**

**2012**



## **Agradecimentos**

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Esteves que todos os dias trouxe consigo muita energia e boa disposição para me inspirar. Por todos os ensinamentos, orientação e apoio para a concretização deste trabalho.

Às colaboradoras do setor de Cromatografia Gasosa do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P., Ana Cidade e Graça Barbosa, pelo apoio, boa disposição e carinho demonstrado.

Ao Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P., em particular, ao Engenheiro Tomás Simões, à Engenharia Ana Faria e à Engenharia Natália Ribeiro, pela oportunidade de realizar este estudo, disponibilizando todos os meios necessários para a sua execução.

À Prof. Doutora Manuela Correia e à Prof. Doutora Cristina Matos por terem proporcionado este trabalho, pela orientação científica e pelo seu espírito crítico.

Aos meus pais e ao meu irmão um agradecimento especial pelo apoio incondicional, motivação e presença constante.



## Sumário

Cada vez mais começa a notar-se, na indústria vitivinícola, uma grande preocupação com a qualidade dos seus produtos, motivada pela maior sensibilização e exigência dos consumidores. Deste modo, a presença de defeitos organoléticos no vinho representa uma fonte de perda financeira nesta indústria, pelo que o seu controlo se torna indispensável para que se obtenha um produto de elevada qualidade. Neste sentido, torna-se interessante desenvolver um método de análise que seja rápido de forma a permitir a quantificação simultânea das moléculas identificadas como principais responsáveis pelos distúrbios olfativos dos vinhos. Assim, este trabalho surge com o objetivo de implementar e validar um método para a determinação de contaminantes em vinho por microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa tandem (GC-MS/MS) e a sua correlação com a análise sensorial. A técnica de microextração em fase sólida é simples e rápida na medida em que não requer um pré-tratamento da amostra. Por sua vez, a análise por GC-MS permite identificar de forma clara os compostos em estudo, nomeadamente, 4-Etilfenol (4-EP), 4-Etilguaiacol (4-EG), 2,4,6-Tricloroanisol (TCA), 2,3,4,6-Tetracloroanisol (TeCA) e 2,4,6-Tribromoanisol (TBA).

Foram realizados estudos de otimização das condições de extração, comparando as fibras 100  $\mu\text{m}$  PDMS e 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS. Obtiveram-se resultados mais satisfatórios, em termos de resposta e da relação sinal/ruído, com a fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS e estabeleceram-se como condições de extração 55°C para a temperatura de incubação/extração, uma velocidade de agitação de 250 rpm e 60 minutos de tempo de extração.

Ao longo deste trabalho, analisaram-se 50 amostras de vinho, das quais 48 eram amostras de Vinho Tinto do Douro e 2 de Vinho do Porto. Para validar a metodologia foram realizados estudos de linearidade, limiares analíticos, repetibilidade, precisão intermédia e recuperação.

De um modo geral, obtiveram-se bons resultados ao nível da linearidade para as gamas de concentração escolhidas. Quanto aos limites de deteção e de quantificação, o 4-EP é o contaminante que apresenta uma gama de concentrações mais alta, notando-se limiares analíticos mais elevados, com valores próximos dos últimos níveis de concentração, oscilando entre 65 e 583  $\mu\text{g/L}$ . No caso dos Anisóis, o TBA apresenta limites de deteção mais baixos, entre 0,4 e 17,0  $\text{ng/L}$ . Os limiares analíticos foram validados com recurso a estudos de precisão intermédia e repetibilidade, cujos resultados se encontram dentro das especificações descritas no documento SANCO/10684/2009 ( $\%RSD \leq 30\%$  para os Anisóis e  $\%RSD \leq 20\%$  para os Fenóis Voláteis).

Foram, ainda, realizados estudos de exatidão recorrendo a ensaios de recuperação e a ensaios interlaboratoriais. Muitas vezes conseguem-se boas recuperações, no entanto notam-se maiores dificuldades para o TBA e para o TeCA. Relativamente aos ensaios interlaboratoriais, verificam-se maiores discrepâncias para o 4-EP. Já os restantes contaminantes apresentam resultados, geralmente, satisfatórios ( $|z\text{-score}| \leq 2$ ).

Palavras – Chave: Vinho, Contaminantes, SPME, GC-MS/MS, Validação do método.

## Abstract

There is an increasing concern, in the wine industry, with the quality of their products, driven by increased awareness and consumer demand. Thus, the presence of organoleptic defects in wine represents a source of economic loss in this industry and, for this reason, its control becomes necessary in order to obtain a high quality product. Accordingly, it is interesting to develop a method which is fast to enable the simultaneous measurement of the molecules identified as responsible for the main olfactory disorders of the wine. This work appears in order to implement and validate a method for the determination of contaminants in wine by SPME/GC-MS/MS and its correlation with sensory analysis. The SPME technique is simple and fast as it does not require a pre-treatment of the sample. The analysis by gas chromatography with mass spectrometer detector (GC-MS/MS) allows to clearly identify the desired compounds, namely, 4-Ethylphenol (4-EP), 4-Ethylguaiacol (4-EG), 2,4,6-Trichloroanisole (TCA), 2,3,4,6-Tetrachloroanisole (TeCA) and 2,4,6-Tribromoanisole (TBA).

Studies of optimization of the extraction conditions were performed, comparing the 100  $\mu\text{m}$  PDMS fiber and 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS fiber. More satisfactory results were obtained, in terms of response and signal/noise ratio, with the 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS fiber and established as extraction conditions 55°C for the temperature of incubation/extraction, a speed of agitation of 250 rpm and 60 minutes of extraction time.

Throughout this paper, 50 samples of wine were analyzed, of which 48 were samples of red wine from Douro and 2 samples of Port Wine. To validate the methodology studies of linearity, analytical thresholds, repeatability, intermediate precision and recovery were performed.

In general, good results were obtained in terms of linearity in the selected concentration ranges. Regarding the limits of detection and quantification, 4-EP is the contaminant which presents higher concentration range and analytical thresholds, with values near the last concentration levels, ranging from 65 to 583  $\mu\text{g/L}$ . In the case of Anisoles, TBA presents the lowest detection limits (0.4 - 17.0  $\text{ng/L}$ ). The thresholds were validated by intermediate precision and repeatability studies whose results are within the specifications described in the document SANCO/10684/2009 (%RSD  $\leq$  30% for Anisoles and %RSD  $\leq$  20% for Volatile Phenols).

Studies of accuracy through interlaboratory tests and recovery studies were also performed. Recoveries were generally good, but some difficulties were observed for TBA and TeCA. As regards the interlaboratory tests, there were higher discrepancies for 4-EP. The remaining contaminants present, generally, satisfactory results ( $|z\text{-score}| \leq 2$ ).

Keywords: Wine, Contaminants, SPME, GC-MS/MS, Validation of the method.



# Índice

Sumário .....	v
Abstract .....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas .....	xv
1. Introdução .....	1
1.1. A vinha e o vinho .....	1
1.1.1. A vinha e o vinho em Portugal .....	2
1.1.2. Região Demarcada do Douro .....	4
1.2. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto .....	5
1.3. Contaminantes .....	6
1.3.1. Contaminação por haloanisóis .....	8
1.3.2. Contaminação por fenóis voláteis .....	12
1.4. Análise de contaminantes .....	13
1.4.1. Técnicas de extração .....	13
1.4.2. Métodos de análise e deteção .....	18
1.4.3. Análise de contaminantes em vinhos – Estado da Arte .....	25
1.5. Validação do método .....	27
1.5.1. Linearidade .....	28
1.5.2. Sensibilidade .....	29
1.5.3. Limiares analíticos do método de ensaio .....	29
1.5.4. Precisão .....	30
1.5.5. Exatidão .....	33
1.6. Enquadramento e objetivos do trabalho .....	33
2. Parte Experimental .....	35
2.1. Reagentes e soluções .....	35
2.1.1. Preparação das soluções padrão .....	35
2.1.2. Preparação dos padrões de calibração .....	36
2.1.3. Preparação das amostras .....	37
2.1.4. Solução hidroalcoólica a 6% .....	37
2.2. Método de extração – SPME .....	38

2.2.1.	Diluição da amostra .....	39
2.2.2.	Condições de extração .....	39
2.2.3.	Efeito da adição de sal .....	39
2.3.	Análise cromatográfica .....	39
2.4.	Deteção por espectrometria de massa .....	40
2.5.	Tratamento e eliminação dos resíduos tóxicos .....	40
2.6.	Validação da metodologia analítica .....	41
3.	Resultados e discussão .....	43
3.1.	Otimização do método .....	43
3.1.1.	Escolha do tipo de fibra .....	43
3.1.2.	Diluição da amostra .....	43
3.1.3.	Condições de extração .....	45
3.1.4.	Efeito da adição de sal .....	49
3.1.5.	Condições MS/MS adotadas e gama de concentrações .....	50
3.2.	Validação do método .....	61
3.2.1.	Aplicabilidade .....	61
3.2.2.	Linearidade e limiares analíticos .....	61
3.2.3.	Precisão .....	72
3.2.4.	Exatidão .....	75
3.3.	Teores de contaminantes nas amostras estudadas .....	84
3.4.	Controlo de qualidade .....	93
4.	Conclusões e sugestões para trabalho futuro .....	95
	Bibliografia .....	99
	Anexos .....	105
	Anexo A – Preparação das Soluções .....	107
	Anexo B – Otimização do método .....	109
	Anexo C – Espectros de Massa obtidos através da biblioteca de espectros NIST .....	115
	Anexo D – Propriedades físico-químicas dos contaminantes estudados .....	117
	Anexo E – Resultados da validação do método. ....	119

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Mapa representativo da Região Demarcada do Douro (RDD) [6].	4
Figura 1.2 - Estrutura química dos halofenóis (clorofenóis e bromofenóis), dos haloanisóis e do anisol envolvidos na contaminação do vinho [16].	9
Figura 1.3 – Esquema do processo de formação do 2,4,6-tricloroanisol [11].	10
Figura 1.4 – Esquema do processo de biossíntese do 2,4,6-tribromoanisol [11].	11
Figura 1.5 – Esquema do processo de biossíntese do 2,3,4,6-tetracloroanisol [11].	11
Figura 1.6 – Estrutura química do 4-Vinilfenol, do 4-Vinilguaiacol, do 4-Etilfenol e do 4-Etilguaiacol [20, 21].	12
Figura 1.7 – Esquema representativo das opções de preparação de amostras sólidas e líquidas [25].	13
Figura 1.8 – Sistemas de extração por SPME: A – Sistema de Imersão Direta (DI-SPME); B – Sistema <i>Headspace</i> (HS-SPME) (Adaptado de [26]).	14
Figura 1.9 – Dispositivo da fibra SPME. (A) representa a posição com a fibra retraída; (B) corresponde à posição com a fibra exposta. No detalhe encontram-se representadas as dimensões típicas da secção com recobrimento de 100 µm de espessura [27].	16
Figura 1.10 – Diagrama esquemático do funcionamento de uma câmara de ionização por impacto eletrónico (IE) [33].	21
Figura 1.11 – Representação esquemática de um detetor de “armadilha de iões”[31].	23
Figura 2.1 – Amostrador automático Combipal MH 01-00B CTC.	38
Figura 2.2 – Fibra de SPME utilizada para a extração.	39
Figura 3.1 – Efeito da diluição (a) tendo em conta as áreas dos picos para o 4-Etilfenol e (b) as respetivas razões sinal/ruído. Condições: Fibra 100 µm PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e 18 minutos de extração (Anexo B, Tabela B.1)	44
Figura 3.2 – Efeito da diluição nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis (a) e dos Anisóis (b). Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min (Anexo B, Tabela B.2).	45
Figura 3.3 – Efeito da diluição na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min (Anexo B, Tabela B.3).	45
Figura 3.4 – Efeito do tempo de extração: (a, c) para os Fenóis Voláteis e (b, d) para os Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e diluição a 6% de etanol (V/V) (Anexo B, Tabela B.4 e Tabela B.5).	46
Figura 3.5 - Efeito do tempo de extração: (a, c) para os Fenóis Voláteis e (b, d) para os Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e diluição a 6% de etanol (V/V) (Anexo B, Tabela B.6 e Tabela B.7).	47

Figura 3.6 – Efeito da temperatura na extração: (a, c) nos Fenóis Voláteis e (b, d) nos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, 60 minutos de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.8 e Tabela B.9). .....	48
Figura 3.7 - Efeito da temperatura na extração: (a) nos Fenóis Voláteis e (b) nos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 60 minutos de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.10 e Tabela B.11).....	49
Figura 3.8 – Efeito da adição do sal: (a) nos Fenóis Voláteis e (b) nos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e 60 minutos de tempo de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.12).....	50
Figura 3.9 – Cromatograma e respetivo espectro de massa obtido para o 4-EP, em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) e modo <i>full scan</i> . .....	51
Figura 3.10 – Cromatograma e respetivo espectro de massa obtido para o 4-EP, em solução hidroalcoólica a 20% (V/V) e modo <i>full scan</i> . .....	52
Figura 3.11 – Cromatograma e respetivo espectro de massa obtido para o 4-EG, em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) e modo <i>full scan</i> . .....	53
Figura 3.12 – Cromatograma e respetivo espectro de massa obtido para o 4-EG, em solução hidroalcoólica a 20% (V/V) e modo <i>full scan</i> . .....	54
Figura 3.13 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o ião de relação <i>m/z</i> 152 para o 4-EG e 122 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 6% (V/V) em etanol. .	55
Figura 3.14 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o ião de relação <i>m/z</i> 152 para o 4-EG e 122 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) em etanol.	56
Figura 3.15 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o ião de relação <i>m/z</i> 137 para o 4-EG e 107 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 6% (V/V) em etanol. .	57
Figura 3.16 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o ião de relação <i>m/z</i> 137 para o 4-EG e 107 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) em etanol.	58
Figura 3.17 – Exemplo de um teste de voltagem de fragmentação para os Fenóis Voláteis. Condições: 1,0V para o 4-EP e 1,3V para o 4-EG. ....	59
Figura 3.18 – Curva de calibração obtida para o 4-EP, em 18/04/2012. ....	64
Figura 3.19 – Curva de calibração obtida para o 4-EG, em 18/04/2012.....	64
Figura 3.21 – Curva de calibração obtida para o TBA, em 18/04/2012. ....	65
Figura 3.22 – Curva de calibração obtida para o TeCA, em 18/04/2012. ....	66
Figura 3.23 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o 4-EP. ....	66
Figura 3.24 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o 4-EG.....	67
Figura 3.25 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TCA. ....	67

Figura 3.26 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TBA. ....	68
Figura 3.27 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TeCA. ....	68
Figura 3.28 – Cromatograma obtido para o 4-EP, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 115,200 µg/L.....	69
Figura 3.29 – Cromatograma obtido para o 4-EG, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 28,990 µg/L.....	70
Figura 3.30 – Cromatograma obtido para o TCA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L. ....	70
Figura 3.31 – Cromatograma obtido para o TBA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L. ....	71
Figura 3.32 – Cromatograma obtido para o TeCA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L. ....	71
Figura 3.33 – Teor de 4-EP nas amostras de 2011 analisadas. ....	84
Figura 3.34 - Teor de 4-EG nas amostras de 2011 estudadas. ....	85
Figura 3.35 – Teor de TCA nas amostras de 2011 estudadas. ....	85
Figura 3.36 – Teor de TBA nas amostras de 2011 estudadas. ....	86
Figura 3.37 – Teor de TeCA nas amostras de 2011 estudadas. ....	86
Figura 3.38 – Teor de 4-EP nas amostras de 2012 analisadas. ....	87
Figura 3.39 – Teor de 4-EG nas amostras de 2012 estudadas. ....	88
Figura 3.40 – Teor de TCA nas amostras de 2012 estudadas. ....	89
Figura 3.41 – Teor de TBA nas amostras de 2012 estudadas. ....	90
Figura 3.42 – Teor de TeCA nas amostras de 2012 estudadas. ....	91
Figura C.2 – Espetro de Massa para o 4-Etilguaiacol. ....	115
Figura C.3 – Espetro de Massa para o 2,4,6-Tricloroanisol.....	116
Figura C.4 – Espetro de Massa para o 2,3,4,6-Tetracloroanisol. ....	116
Figura C.5 – Espetro de Massa para o 2,4,6-Tribromoanisol. ....	116



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Principais defeitos sensoriais do vinho (Adaptado de [9] e [10]).	7
Tabela 1.2 – Fibras de SPME disponíveis comercialmente [26].	17
Tabela 1.3 – Métodos de ionização para espectrometria de massa [30, 32].	20
Tabela 1.4 – Tipos de analisadores utilizados em espectrometria de massa [32].	22
Tabela 2.1 – Preparação das soluções padrão individuais.	36
Tabela 2.2 – Registo dos volumes a medir na preparação dos padrões de calibração. ...	37
Tabela 2.3 – Procedimentos adotados no tratamento e eliminação dos resíduos resultantes das análises efetuadas.	41
Tabela 3.1 – Condições de MS/MS adotadas para o método proposto para a determinação de contaminantes em vinhos por SPME/GC-MS/MS.	60
Tabela 3.2 – Gamas de concentração para cada um dos contaminantes em estudo e respetivos tempos de retenção.	60
Tabela 3.3 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o 4-Etilfenol. ....	62
Tabela 3.4 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o 4-Etilguaicol.	62
Tabela 3.5 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o TCA.	63
Tabela 3.6 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o TBA. ....	63
Tabela 3.7 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o TeCA.	63
Tabela 3.8 – Valores de repetibilidade (r), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respetivo nível de concentração. ....	72
Tabela 3.9 – Valores de repetibilidade (r), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respetivo nível de concentração, segundo o documento de validação da OIV.	72
Tabela 3.10 – Valores de precisão intermédia (P.I.), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respetivo nível de concentração.	73
Tabela 3.11 – Valores de repetibilidade obtidos para cada contaminante segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV com base nas amostras. ....	74
Tabela 3.12 – Ensaios de recuperações para os Fenóis Voláteis. ....	76
Tabela 3.13 – Ensaios de recuperações para os Anisóis.	77
Tabela 3.14 – Resultados obtidos para as amostras participantes dos ensaios interlaboratoriais.	78

Tabela 3.15 – Concentrações dos analitos em estudo obtidas nos ensaios realizados para a amostra EIL C. ....	80
Tabela 3.16 – Representação das concentrações obtidas nas sequências de trabalho, para as amostras distribuídas pelo BIPEA.....	82
Tabela 3.17 – Percentagem média de provadores que detetaram Fenóis Voláteis em 18 das amostras analisadas.....	92
Tabela A.1 – Preparação das Soluções Padrão de Fenóis Voláteis.....	107
Tabela A.2 – Preparação das Soluções Padrão de Anisóis. ....	107
Tabela B.1 – Efeito da diluição nas áreas dos picos e na razão sinal/ruído do 4-EP. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 18 min. ....	109
Tabela B.2 – Efeito da diluição nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min.....	109
Tabela B.3 – Efeito da diluição na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min.....	110
Tabela B.4 – Efeito do tempo de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	110
Tabela B.5 – Efeito do tempo de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, 6% de etanol (V/V).....	111
Tabela B.6 – Efeito do tempo de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	111
Tabela B.7 – Efeito do tempo de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	112
Tabela B.8 – Teste da temperatura de extração na área dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	112
Tabela B.9 – Efeito da temperatura de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	113
Tabela B.40 – Efeito da temperatura de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V). ....	113

Tabela B.11 – Efeito da temperatura de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V). .....	114
Tabela B.52 – Efeito da adição do sal nos Fenóis Voláteis e nos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V). .....	114
Tabela D.6 – Propriedades físico-químicas dos contaminantes estudados [14, 19, 36].	117
Tabela E.7 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do 4-EP. ....	119
Tabela E.2 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do 4-EG. ....	119
Tabela E.3 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TCA. ....	119
Tabela E.4 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TBA. ....	120
Tabela E.5 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TeCA. ....	120
Tabela E.6 – Determinação da repetibilidade para os diversos contaminantes estudados. ....	121
Tabela E.7 – Determinação da repetibilidade para os Fenóis Voláteis, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV. ....	122
Tabela E.8 – Determinação da repetibilidade para os Anisóis, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV. ....	123
Tabela E.9 – Determinação da precisão intermédia para os diversos contaminantes estudados. ....	124
Tabela E.10 – Determinação da repetibilidade para o 4-EP, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho. ....	126
Tabela E.11 – Determinação da repetibilidade para o 4-EG, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho. ....	127
Tabela E.12 – Determinação da repetibilidade para o TCA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho. ....	128
Tabela E.13 – Determinação da repetibilidade para o TBA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho. ....	129
Tabela E.14 – Determinação da repetibilidade para o TeCA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho. ....	130
Tabela E.15 – Teores dos diversos contaminantes nas amostras de 2011 analisadas. .	131
Tabela E.16 – Teores dos diversos contaminantes nas amostras de 2012 analisadas. .	132



## Nomenclatura

$\Delta C$  – Variação da concentração correspondente a um determinado acréscimo (ng/L ou  $\mu\text{g/L}$ )

$\Delta L$  – Acréscimo do valor lido

2-MIB – 2-Metilisoborneol (*2-Methylisoborneol*)

3,4-DMP – 3,4-Dimetilfenol (*3,4-Dimethylphenol*)

4-EG – 4-Etilguaiacol (*4-Ethylguaiacol*)

4-EP – 4-Etilfenol (*4-Ethylphenol*)

4-VG – 4-Vinilguaiacol (*4-Vinylguaiacol*)

4-VP – 4-Vinilfenol (*4-Vinylphenol*)

AA – Área de integração

$b$  – Valor da ordenada na origem

CAR/PDMS – Carboxeno/ Poldimetilsiloxano

CD – Casa do Douro

CI – Ionização Química (*Chemical Ionization*)

CIRDD – Comissão Interprofissional da Região Demarcada do Douro

COV – Compostos Orgânicos Voláteis

$CV_r$  – Coeficiente de Variação de repetibilidade

CW/DVB – *Carbowax*/ Divinilbenzeno

CW/TPR – *Carbowax* / *Template Resin*

DI-SPME – Microextração em fase sólida por imersão directa (*Direct Imersion – Solid Phase Microextraction*)

DVB/CAR/PDMS – Divinilbenzeno/ Carboxeno/ Poldimetilsiloxano

ECD – Detetor de captura de eletrões (*Electron Capture Detector*)

ESI – *Electrospray Ionization*

FAB – *Fast Atom Bombardment*

FD – *Field Desorption*

FI – *Field Ionization*

FV – Fenóis Voláteis

GC – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

HSSE – Extração sortiva no espaço de cabeça (*Headspace Sorptive Extraction*)

HS-SPME – Microextração em fase sólida no espaço de cabeça (*Headspace – Solid Phase Microextraction*)

IE (EI) – Impacto eletrónico (*Electron Impact*)

ITD – Detetor de armadilha de iões (*Ion Trap Detector*)

IVDP, I.P. – Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P.

IVP – Instituto dos Vinhos do Porto

IVV, I.P. – Instituto da Vinha e do Vinho, I.P.

LC – Cromatografia líquida (*Liquid chromatography*)

L.D. – Limite de deteção (ng/L ou µg/L)

L.Q. – Limite de quantificação (ng/L ou µg/L)

$m$  – Declive da recta

MAE – *Microwave assisted extraction*

MALDI – *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*

MHS-SPME – *Multiple Headspace – Solid Phase Microextraction*

MS – Espetrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

MSPD – *Matrix solid phase dispersion*

$(n_{ij} - 1)$  – Graus de liberdade da série de análises

OIV – *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*

$p$  – Número de laboratórios participantes

PA – Poliacrilato

PCA – Pentacloroanisol

PCP – Pentaclorofenol

PD – *Plasma Desorption*

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/ Divinilbenzeno

PG – Valor teste

PLE – Pressurized liquid extraction

q – Número de ensaios de repetibilidade

r – Repetibilidade

$R^2$  – Coeficiente de correlação linear

RDD – Região Demarcada do Douro

RSD – Desvio padrão relativo

RT – Tempo de retenção (*Retention Time*)

$S_{ij}^2$  – Variância associada aos resultados considerados

$S_{rj}^2$  – Variância de repetibilidade associada aos resultados considerados

$S_{y/x}$  – Desvio padrão residual da curva de calibração

SAFE – *Solid-assisted flavour evaporation*

SBSE – Extração Sortiva em Barra de Agitação (*Stir Bar Sorptive Extraction*)

SDE – *Simultaneous distillation extraction*

SIMS – *Secondary Ion Mass Spectrometry*

SN – Relação Sinal/Ruído

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*)

TBA – 2,4,6-Tribromoanisol

TBP – 2,4,6-Tribromofenol

TCA – 2,4,6-Tricloroanisol

TCA-d<sub>5</sub> – 2,4,6-Tricloroanisol deuterado

TCP – 2,4,6-Triclorofenol

TeCA – 2,3,4,6-Tetracloroanisol

TeCP – 2,3,4,6-Tetraclorofenol

USE – Extração assistida por micro-ondas (*Ultrasound-assisted extraction*)

V/V – Volume/ Volume

W<sub>i</sub> – Diferença absoluta entre duplicados

x – Eixo das abcissas

$\bar{x}$  – Média dos valores considerados

y,yy – Eixo das ordenadas

## **1. Introdução**

A produção de vinho requer uma série de cuidados especiais por parte do vitivicultor que até ao momento da vindima já empregou imenso trabalho e dinheiro, não podendo a partir de então perder qualquer oportunidade para a obtenção de um produto final de excelente qualidade [1].

O processo de fabrico de vinho envolve uma série de etapas. Inicialmente, antes de partir para as operações tecnológicas envolvidas na produção dos diversos tipos de vinho, deve considerar-se a importância da higienização, onde a adega e todo o equipamento envolvido no processo são sujeitos a uma limpeza e desinfeção. À semelhança do que se verifica noutras indústrias alimentares, estas operações merecem especial atenção não só por uma questão de saúde pública, mas essencialmente pelos riscos de contaminação e possível deterioração do produto. Para que se obtenha um produto de elevada qualidade, a limpeza é fundamental. Esta etapa começa antes da vindima, continua no processo produtivo e prolonga-se até ao engarrafamento. O vinho é extremamente sensível a contaminações e à sujidade, uma vez que é facilmente sujeito a alterações em termos gustativos e sanitários, sendo o turvar e as infeções bacteriológicas transmitidas pelo vasilhame e pelo material que integra a adega [1].

Atualmente começa a notar-se, na indústria vitivinícola, uma grande preocupação com a qualidade dos seus produtos, motivada pela maior sensibilização dos consumidores ao nível da qualidade. Cada vez mais, os consumidores são capazes de detetar defeitos organoléticos.

### **1.1. A vinha e o vinho**

Desde a antiguidade mais remota, o vinho tem desempenhado um papel importante em quase todas as civilizações. Trata-se de um produto carregado de simbologia, religiosidade e misticismo que leva ao aparecimento de lendas e surge como inspiração de mitos. Na Bíblia menciona-se pela primeira vez a videira: “Noé plantou a vinha e tendo bebido do seu vinho, embriagou-se”. A mitologia romana diz que Baco, deus do vinho, ao tornar-se adulto descobriu a forma de extrair o suco da uva e produzir o vinho [2, 3].

A literatura permite perceber a distribuição dos vinhedos na Antiguidade. Por exemplo, na Ásia prosperavam sobre as margens do Golfo Pérsico, na Babilónia, na Assíria, no litoral dos mares Cáspio, Negro e Egeu, na Síria e na Fenícia [4].

Chegada à Europa, inicialmente, a viticultura instalou-se na Grécia. Os vinhos aí produzidos eram transportados em navios para Roma, chegando a atingir preços exorbitantes. Seguindo os passos dos exércitos romanos, a viticultura prosseguiu para a Gália (França), atravessou o Ródão até Lyon e alcançou a Borgonha, passando pela Helvécia (parte ocidental da Suíça). No século III,

o vinhedo já ocupava, na Europa, as mesmas regiões dos tempos atuais. A queda do Império Romano não teve grande influência na progressão da viticultura e a Igreja começou a dedicar-se a esta arte, não só para assegurar a produção necessária para abastecer a população, mas também para presentear os monarcas entre outras figuras importantes que passassem pelas cidades. Não foi necessário muito tempo para que a realeza e os senhores feudais seguissem o exemplo da Igreja [4].

Mais tarde, já na época do Renascimento, com a colonização e com a expansão do cristianismo, a viticultura chegou à América do Sul, México, Califórnia e África do Sul.

Atualmente, os métodos de vinificação alcançaram um grau quase científico e o vinho continua a ser a mais nobre das bebidas [4].

Segue-se uma breve descrição da história da vinha e do vinho em Portugal.

### **1.1.1. A vinha e o vinho em Portugal**

Pensa-se que a vinha terá sido cultivada na Península Ibérica, pela primeira vez, nos vales do Tejo e do Sado, cerca de 2000 a.C.. Os Tartessos, conhecidos como os habitantes mais antigos da Península, tinham uma civilização bastante avançada que estabelecia negociações comerciais com outros povos, permutando uma série de produtos, entre os quais se destaca o vinho, que serviria como moeda de troca no comércio dos metais [3].

Mais tarde, no século X a.C., os Fenícios apoderaram-se dos negócios dos Tartessos e pensa-se que tenham trazido algumas das castas que introduziram na Lusitânia [3].

No século VII a.C., os Gregos instalaram-se na Península Ibérica e desenvolveram a viticultura, atribuindo especial atenção à arte de fazer vinho [3].

Crê-se que no século VI a.C., os Celtas, já conhecedores da videira, tenham trazido para a Península Ibérica as variedades que cultivavam. Posteriormente, estes Celtas fundiram-se com os Iberos num só povo – Celtiberos –, ascendentes dos Lusitanos que se viriam a afirmar no século IV a.C. [3].

Com a expansão guerreira de Roma, que subjugou os Lusitanos e a romanização da Península, a cultura da vinha foi modernizada através da introdução de novas variedades e do aperfeiçoamento de técnicas de cultivo, entre as quais se destaca a poda. Notou-se, neste período, um desenvolvimento considerável da cultura da vinha, devido à necessidade de enviar vinho para Roma, cuja produção não satisfazia a procura [3].

Mais tarde, e com as invasões bárbaras, assiste-se à decadência do Império Romano. A Lusitânia, tomada aos romanos pelos Suevos e Visigodos, favorece a fusão de raças e culturas e

o paganismo dá lugar ao Cristianismo, em grande expansão. É então, entre os séculos VI e VII, que o vinho se torna indispensável no ato da comunhão [3].

Ao assimilar a civilização e a religião dos romanos, os bárbaros adotam o vinho, considerando-o como a bebida digna dos povos “civilizados”, sem, no entanto, introduzirem quaisquer inovações no cultivo da videira [3].

No início do século VIII inicia-se uma nova vaga de invasões: os árabes. O Corão proibia o consumo de bebidas fermentadas, no entanto, dado que para os Árabes, a agricultura era de extrema importância, o emir de Córdoba, que governava a Lusitânia, mostrou-se tolerante para com os cristãos, não proibindo a cultura da vinha, bem como a produção do vinho. Posteriormente, com o domínio dos Almorávidas e Almóadas, entre os séculos XI e XII, os preceitos do Corão foram levados com maior rigor, assistindo-se a uma regressão na cultura da vinha [3].

As lutas da Reconquista Cristã ocorrem por todo o território e as constantes ações de guerra iam destruindo as culturas, incluindo a vinha [3].

Em 1143, assiste-se à fundação de Portugal por D. Afonso Henriques e em 1249 dá-se a conquista da totalidade do território português aos Mouros, o que permitiu que se instalassem ordens religiosas, militares e monásticas. Foram povoadas extensas regiões que se tornaram centros ativos de colonização agrícola, alargando as áreas de cultivo da vinha. Na segunda metade do século XIV, a produção de vinho começou a apresentar um grande desenvolvimento, renovando-se e incrementando-se a sua exportação [2].

No período da expansão portuguesa, nos séculos XV e XVI, as naus que partiram rumo à Índia transportavam, entre outros produtos, vinho. Após os Descobrimentos, os vinhos constituíam lastro nas naus e caravelas que comercializavam os produtos trazidos do Brasil e do Oriente. A expansão marítima portuguesa levava o vinho para todo o mundo e em meados do século XVI, Lisboa era o maior centro de consumo e distribuição deste produto do império [2].

Em 1703, Portugal e Inglaterra assinaram o Tratado de Methuen, facilitando a exportação de vinhos portugueses para Inglaterra [3].

É no século XVIII, sob a influência do Marquês de Pombal, que a vinha conquista o seu grande estatuto. Em 1756, é criada a Companhia Geral de Agricultura das Vinhas do Alto Douro, demarcada e regulamentada a primeira região vinícola do mundo: a região do Douro [2, 3].

Em 1865 surgiu no Douro a praga da filoxera, um inseto da família dos Afidídeos, oriundo da América do Norte, que ataca as folhas e raízes da videira, e que rapidamente se espalhou por todo o país, devastando grande parte das regiões vinícolas. Já em 1900, Portugal participou na Exposição Universal de Paris, para a qual se editou especificamente a obra “Le Portugal vinicole”

de B.C. Cincinnato da Costa. Por sua vez, entre 1907 e 1908 demarcaram-se regiões de produção de vinhos importantes: Madeira, Moscatel de Setúbal, Carcavelos, Dão, Colares e Vinho Verde [2].

Com o Estado Novo (1926 – 1974), foi iniciada a “Organização Corporativa e de Coordenação Económica” e, mais tarde, em 1933, a Federação dos Vinicultores do Centro e Sul de Portugal, seguida da Junta Nacional do Vinho que viria a ser substituída, em 1986, pelo Instituto da Vinha e do Vinho, no âmbito da adesão de Portugal à Comunidade Europeia. Aqui, surge uma nova perspetiva na economia portuguesa e, conseqüentemente, na viticultura. O conceito de Denominação de Origem foi conciliado com a legislação comunitária e, de modo a reforçar a política de qualidade dos vinhos portugueses, foi criada a classificação de “Vinho Regional” para os vinhos de mesa com indicação geográfica. No intuito de garantir a preservação da qualidade e do prestígio dos vinhos portugueses, foram constituídas as Comissões Vitivinícolas Regionais. Atualmente encontram-se reconhecidas e protegidas 33 Denominações de Origem e 8 Indicações Geográficas, no território português [2].

### 1.1.2 Região Demarcada do Douro

A Região Demarcada do Douro foi a primeira região vitícola a ser demarcada e reconhecida a nível mundial. Criada no reinado de D. José I, pelo seu Primeiro-Ministro, Sebastião José de Carvalho e Melo, mais tarde Marquês de Pombal, esta região é também conhecida como “País Vinhateiro” e estende-se ao longo do vale do Rio Douro e dos seus afluentes, desde Barqueiros até Barca d’Alva, abrangendo concelhos dos distritos de Vila Real, Viseu, Bragança e Guarda, numa área de cerca de 250 000 hectares. Situada a nordeste do país, encontra-se dividida, devido a fatores climáticos e socioeconómicos, em três sub-regiões: Baixo-Corgo, Cima-Corgo e Douro Superior, tal como representado na Figura 1.1. Atualmente, a vinha da região ocupa uma área efetiva de cerca de 18% da área total, sendo trabalhada por aproximadamente 33 000 viticultores [5, 6].



Figura 1.1 – Mapa representativo da Região Demarcada do Douro (RDD) [6].

Na Região Demarcada do Douro produzem-se essencialmente dois tipos de vinho: os vinhos do Porto e os vinhos de consumo. Da produção total de uvas, 50% é destinada à produção de Vinho do Porto, enquanto o restante volume se destina à produção de vinhos de grande qualidade que utilizam a denominação de origem controlada “Douro” ou “Vinho do Douro” [2, 6].

Os Vinhos do Porto distinguem-se dos vinhos comuns pelas suas características particulares, como a diversidade, intensidade de aromas, um elevado teor alcoólico – entre os 19 e 22% em volume –, uma vasta gama de doçuras e grande diversidade de cores. São vinhos licorosos e o seu processo de vinificação difere do processo seguido pelos vinhos tranqüilos, como os vinhos do Douro, na medida em que dispõem de um tempo de fermentação e maceração consideravelmente mais curto (2 a 3 dias) com a adição de aguardente vínica. Por sua vez, os vinhos do Douro caracterizam-se por uma fermentação completa, originando vinhos secos [2, 6].

## **1.2. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto**

O Estado tem desempenhado um papel fundamental na Região Demarcada do Douro (RDD), angariando um importante capital de credibilidade para o setor do vinho do Porto, fruto da disciplina e controlo exercidos ao longo dos seus 250 anos de história, dando garantias de genuinidade essenciais para o prestígio deste vinho. Desde 1933, este papel tem sido desempenhado pelo Instituto do Vinho do Porto (IVP) que adquiriu uma credibilidade que é importante preservar. Em 1995, foi adotado, com a reforma institucional, um modelo de gestão interprofissional que continuou a reservar ao Estado, através do IVP, a fiscalização da atividade e a certificação do Vinho do Porto. A reforma efetuada em 2003 simplificou o modelo de gestão do setor, concentrando a supervisão da viticultura duriense num único organismo, mediante a fusão da Comissão Interprofissional da Região Demarcada do Douro (CIRDD) com o IVP, e redefinindo as funções da Casa do Douro (CD), tendo-se criado o Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P. (IVDP, I.P.) [6].

Assim, o Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto é um instituto público, com administração indireta por parte do Estado, sendo dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio. É um organismo central com jurisdição sobre todo o território nacional com sede em Peso da Régua, dispondo também de um serviço desconcentrado, com a designação de delegação, no Porto.

O IVDP, I.P. tem por missão promover o controlo da qualidade e quantidade dos vinhos do Porto, regulamentando o processo produtivo, a proteção e defesa das denominações de origem “Douro” e “Porto” e indicação geográfica “Duriense”. Deste modo, são atribuições do IVDP, I.P.:

a) Propor a orientação estratégica e executar a política vitivinícola para a Região Demarcada do Douro (RDD), designadamente assegurando o conhecimento de toda a fileira e da estrutura de

produção e comércio, incluindo a exportação, e as ações que lhe venham a ser delegadas pelo Instituto da Vinha e do Vinho, I. P. (IVV, I. P.);

b) Promover a convergência dos interesses da produção e do comércio na defesa do interesse geral da RDD, disciplinando, controlando e fiscalizando a produção e a comercialização dos vinhos produzidos na RDD, assegurando o ficheiro das parcelas de vinha desta região, controlando o recenseamento dos viticultores, efetuando as verificações adequadas para este efeito e determinando as correções necessárias;

c) Controlar, promover e defender as denominações de origem e indicação geográfica da RDD, bem como os restantes vinhos e produtos víquicos produzidos, elaborados ou que transitem na RDD, sem prejuízo das atribuições do IVV, I. P.;

d) Instruir os processos de contraordenação e aplicar às infrações detetadas, pelos seus serviços ou por outras entidades, as sanções relativamente às quais disponha de competência;

e) Estimular a adoção das melhores práticas no domínio da vitivinicultura e do desenvolvimento tecnológico [6, 7].

O IVDP, I.P. dispõe de quatro órgãos, sendo dirigido por um presidente, coadjuvado por um vice-presidente, nomeado após consulta às profissões. O conselho interprofissional que é responsável pela gestão das denominações de origem e indicações geográficas da Região Demarcada do Douro. O conselho consultivo que é composto por individualidades de mérito reconhecido nos domínios relevantes para a RDD e para os seus vinhos. Estas individualidades são nomeadas por despacho do Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, sob proposta do presidente, depois de consultados o vice-presidente e o conselho interprofissional. O último órgão é o fiscal único [6].

### **1.3. Contaminantes**

Na indústria alimentar, as características gustativas são muito importantes e devem ser consideradas na análise da qualidade do produto. Em particular na produção de vinhos, a sua qualidade é fortemente dependente do sabor. Segundo Pizarro *et al.*, muitos estudos consideram que a perda de componentes responsáveis pelo sabor original do vinho, assim como a ocorrência de maus gostos degradam a qualidade do produto [8].

Existem vários fatores que podem afetar as características dos vinhos, podendo surgir em diversos momentos e estar relacionados com uma série de fatores como os vedantes utilizados, o local e até a forma como é feito seu o armazenamento.

A qualidade organolética dos vinhos pode ser alterada, como já foi referido, devido à presença de moléculas aromáticas específicas, que devem respeitar um determinado valor mínimo de modo que a sua presença não seja perceptível através de estímulos sensoriais. A Tabela 1.1 agrupa os defeitos encontrados frequentemente nos vinhos devido à presença desses compostos com teores acima de determinados valores.

**Tabela 1.1 – Principais defeitos sensoriais do vinho (Adaptado de [9] e [10]).**

<b>Defeitos</b>	<b>Indicadores químicos</b>	<b>Limite de perceção nos vinhos</b>
Mofo	Cloroanisóis	A partir de 2 ng/L
	2,4,6 – Tribromoanisol	
Terroso	Geosmina	A partir de 30 ng/L
	2-metilisoborneol	3 ng/L (água)
	3-isopropil-2-metoxipirazina	2 ng/L
Animal, fumado	Fenóis Voláteis	430 µg/L

De seguida apresenta-se uma breve explicação acerca de cada um dos defeitos apresentados na Tabela 1.1.

➤ Sensação do tipo “mofo”

Como se pode verificar pela análise da Tabela 1.1, a sensação do tipo “mofo” é muito associada à presença de cloroanisóis ou do 2,4,6-tribromoanisol nos vinhos. Os anisóis tri-halogenados podem apresentar concentrações extremamente baixas, de acordo com o tipo de vinho. A sua perceção por parte dos consumidores depende de fatores como o teor de álcool, as características do vinho e a sensibilidade do próprio consumidor [11].

➤ Sensação do tipo “terroso”

Atualmente, a sensação do tipo “terroso” está associada, sobretudo, a presença de geosmina. No entanto, compostos como o 2-metilisoborneol e a 3-isopropil-2-metoxipirazina também induzem este tipo de sensação. A 3-isopropil-2-metoxipirazina é encontrada em vinhos tintos, em concentrações de 2 ng/L; ao passo que o 2-metilisoborneol é instável em meio ácido e embora surja em vinhos, a sua presença é mais frequente em águas contaminadas.

➤ Sensação do tipo “animal” ou “fumado”

A sensação do tipo “animal” ou “fumado” caracteriza-se pela presença de fenóis voláteis, como o 4-etilfenol (4-EP) e o 4-etilguaiacol (4-EG) que são suscetíveis de ser detetados se estiverem presentes em concentrações superiores a 430 µg/L e 33 µg/L, respetivamente.

Os haloanisóis e halofenóis são conhecidos por causarem um sabor desagradável numa série de produtos, entre os quais, o vinho. A sua presença representa um problema, dado que são detetados, sensorialmente, muito facilmente, com concentrações não muito elevadas. Estima-se que tenham uma ocorrência de 2,5 a 5%, em vinhos, o que dá ao problema uma expressão económica relevante [12, 13].

### **1.3.1. Contaminação por haloanisóis**

Já se referiu a importância da higienização da adega, bem como de todo o equipamento envolvido, no intuito de evitar possíveis contaminações do vinho. No entanto, um dos fatores de risco na contaminação do vinho corresponde precisamente a esta etapa de higienização, na medida em que, muitas vezes, são utilizadas soluções à base de compostos clorados. Os haloanisóis podem ser transferidos para o vinho pelas condições da adega ou através do contacto com materiais contaminados, entre os quais se podem destacar a proteção dos reservatórios, mangueiras, barris, fragmentos de madeira de carvalho, filtros, vedantes e aditivos como a bentonite [14]. O armazenamento de garrafas de vinho em paletes de madeira tratada com produtos à base de clorofenóis, que visam dificultar a combustão da madeira em caso de incêndio, além de funcionarem como fungicidas, pode também contribuir para a contaminação das rolhas de cortiça. Por outro lado, as paletes podem funcionar como meio de crescimento para fungos que podem vir a contaminar os vinhos [11].

Para que se formem os compostos clorofenólicos é necessária a existência de cloro e fenóis. Os fenóis são resultantes da degradação da lenhina, pela ação de enzimas, dos barris ou da cortiça. Estes, ao reagirem com o cloro, originam os compostos clorofenólicos que podem ser metilados por diversos microrganismos, levando ao aparecimento de cloroanisóis [11,12,15].

Os haloanisóis mais encontrados no vinho transmitem um aroma a mofo ou bolor. Na Figura 1.2 mostram-se as estruturas químicas do anisol, dos halofenóis (clorofenóis e bromofenóis) e dos correspondentes haloanisóis, envolvidos na contaminação do vinho.

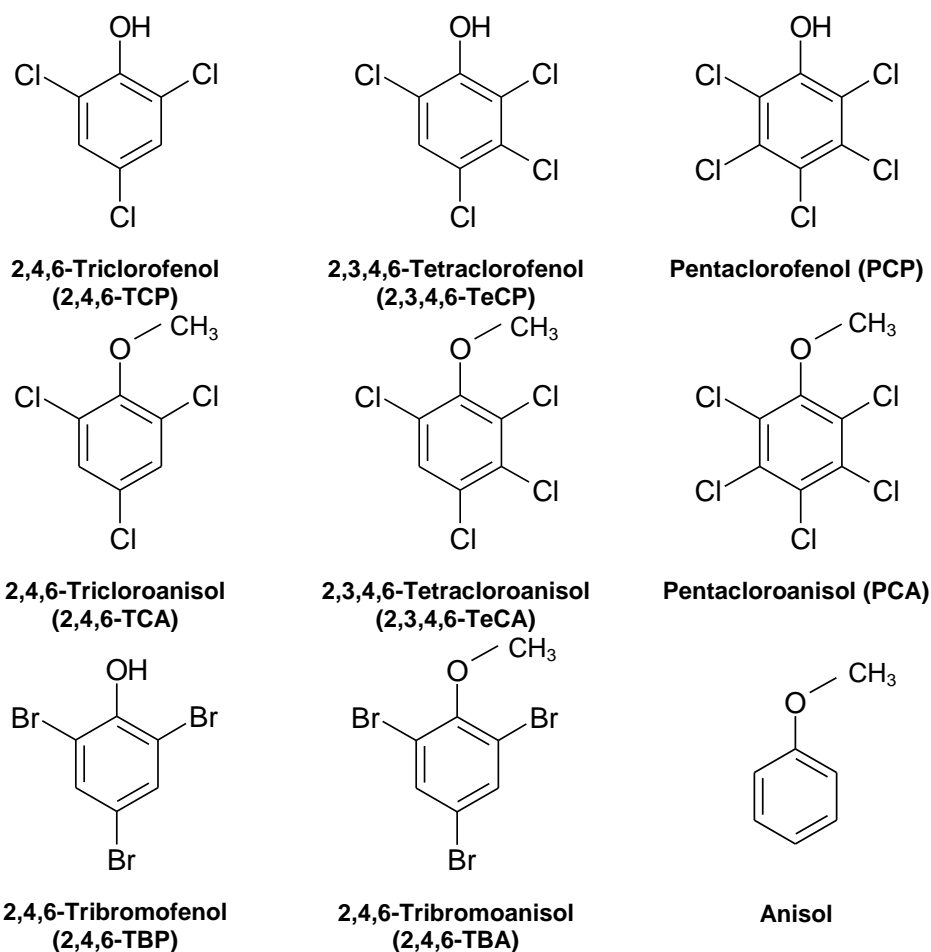


Figura 1.2 - Estrutura química dos halofenóis (clorofenóis e bromofenóis), dos haloanisóis e do anisol envolvidos na contaminação do vinho [16].

➤ 2,4,6-Tricloroanisol (TCA): identificado pela primeira vez, em 1981, por Tanner e Buser, é a molécula responsável por grande parte dos defeitos qualificados como “gosto a rolha” e que origina um odor a mofo. Os métodos tradicionais usados no processo de produção de rolhas e as condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos levam ao aparecimento deste contaminante nas rolhas e conseqüente contaminação do vinho. Os vinhos contaminados com TCA apresentam um gosto a cartão húmido, o chamado “sabor a mofo” [14, 17].

O TCA é facilmente encontrado na natureza, podendo estar presente na água, na terra, em legumes e frutas, em madeiras e na cortiça. Uma das formas de aparecimento de anisóis não tóxicos é a metilação de precursores de clorofenóis tóxicos, num processo de desintoxicação do meio levado a cabo por diversos microrganismos. Porém, nem todos os microrganismos são capazes de metilar o triclorofenol (TCP). Segundo Álvarez-Rodríguez *et al.*, citado por Patrícia Simões e Tiago Macena, as estirpes de microrganismos com maior capacidade de formação do

TCA, tendo como precursor o TCP, são as de *Trichoderma* e *Fusarium* [11]. Na Figura 1.3 encontra-se representado o esquema do processo de formação do TCA.

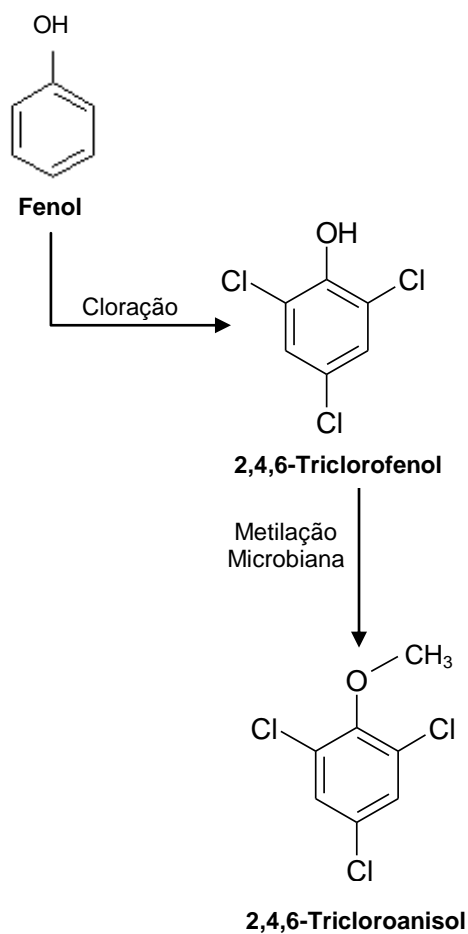


Figura 1.3 – Esquema do processo de formação do 2,4,6-tricloroanisol [11].

➤ 2,4,6-Tribromoanisol (TBA): produzido pela O-metilação microbiológica do seu precursor direto 2,4,6-tribromofenol (TBP), provém essencialmente do ambiente das caves, uma vez que surge como componente dos retardadores de chama utilizados para proteger as madeiras das adegas contra incêndios. Dado que as adegas são locais húmidos, os fungos tendem a desenvolver-se, produzindo este composto com aroma e limite de deteção muito próximos aos do TCA [14,18].

O TBA pode, ainda, ser produzido quimicamente em níveis residuais em água tratada com cloro, e na presença de iões bromo e fenóis orgânicos [13]. A Figura 1.4 representa o esquema do processo de biossíntese deste composto.

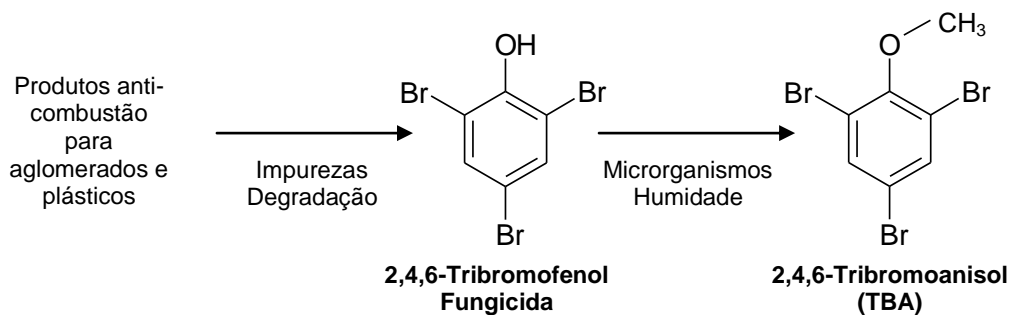


Figura 1.4 – Esquema do processo de biossíntese do 2,4,6-tribromoanisol [11].

➤ 2,3,4,6-Tetracloroanisol (TeCA): é um cloroanisol constituído por um anel benzénico em que os hidrogénios dos carbonos 2,3,4 e 6 foram substituídos por cloro. A contaminação por TeCA deve-se, geralmente, à presença de pentaclorofenol (PCP), frequentemente utilizado como fungicida, cuja composição pode apresentar tetraclorofenóis como impurezas. Por norma, a sua presença é indicadora de contaminação ambiental [15]. A Figura 1.5 representa o processo de biossíntese do TeCA.

➤ Pentacloroanisol (PCA): é um composto aromático clorado que pode resultar da degradação do pentaclorofenol, tal como se pode verificar pela análise da Figura 1.5. Tem um odor muito menos intenso que os restantes anisóis. Tal como o TeCA, a presença deste composto indica, geralmente, contaminação ambiental [11, 15].

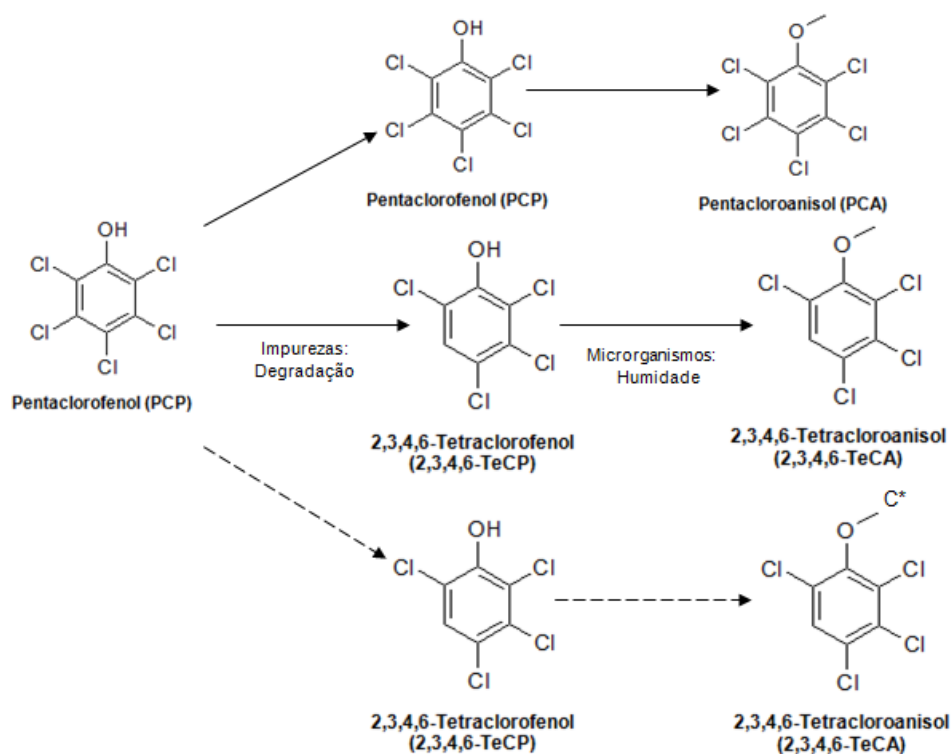


Figura 1.5 – Esquema do processo de biossíntese do 2,3,4,6-tetracloroanisol [11].

### 1.3.2. Contaminação por fenóis voláteis

O desenvolvimento de leveduras, das quais se destacam os géneros *Brettanomyces* e *Dekkera*, leva ao aparecimento de fenóis voláteis. Estas leveduras são capazes de se desenvolver nos vinhos em quantidades muito baixas de açúcar residual e têm a capacidade de transformar os ácidos fenólicos em fenóis voláteis. Estas leveduras conseguem descarboxilar os ácidos *trans-p*-cumáricos e obter vinilfenóis, que posteriormente darão origem a etilfenóis a partir de reações de redução. A presença de fenóis voláteis como o 4-vinilfenol, o 4-vinilguaiacol, o 4-etilfenol e o 4-etilguaiacol originam defeitos nos vinhos, como se descreve posteriormente. A Figura 1.6 apresenta a estrutura química destes compostos [14, 19].

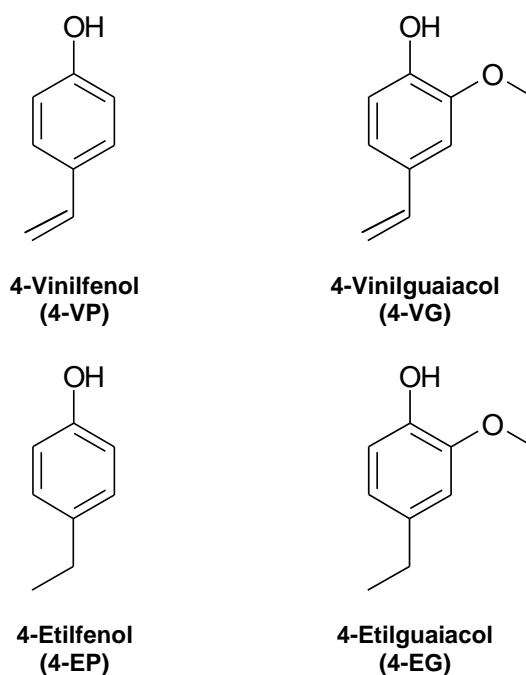


Figura 1.6 – Estrutura química do 4-Vinilfenol, do 4-Vinilguaiacol, do 4-Etilfenol e do 4-Etilguaiacol [20, 21].

- 4-Vinilfenol (4-VP): a presença de 4-VP encontra-se, muitas vezes, associada a descritores como um odor farmacêutico ou guache.
- 4-Vinilguaiacol (4-VG): este composto apresenta descritores como odor a estrebaria e suor de cavalo.
- 4-Etilfenol (4-EP): o aroma associado à presença de 4-EP é descrito como de couro, cavalaria e suor de cavalo.
- 4-Etilguaiacol (4-EG): a presença deste composto, em teores mais elevados, apresenta descritores como temperos, baunilha, cravo, fumo e madeira queimada [14,19].

Ainda no âmbito dos Fenóis Voláteis é importante destacar compostos como o Guaiacol ou o Eugenol responsáveis por defeitos olfativos relacionados com o envelhecimento dos vinhos em

barris de carvalho. Quer o Guaiacol, quer o Eugenol são produzidos pela decomposição da lenhina da madeira, no entanto, o Guaiacol confere ao vinho odores a fumo, fenólicos ou medicinais e foi identificado como um metabolito da estirpe de *Streptomyces sp.* presente em rolhas com defeito [22]. Por sua vez, o Eugenol é associado a aromas como especiarias, cravo e fumo [23,24].

## 1.4. Análise de contaminantes

### 1.4.1. Técnicas de extração

Existe uma vasta variedade de contaminantes com as mais diversas origens. Como resultado de tal variedade de analitos, existe uma série de métodos de extração a que se pode recorrer. No geral, a escolha das técnicas de preparação da amostra está relacionada com o contaminante de interesse, a matriz e o instrumento de análise a utilizar. Na Figura 1.7 encontra-se representado um esquema que mostra as diferentes possibilidades pelas quais se pode optar, de acordo com o tipo de amostra. Assim, pela análise da Figura 1.7 podem identificar-se uma série de técnicas de extração, entre as quais se destacam a extração com solvente ou a extração por sorção [25].

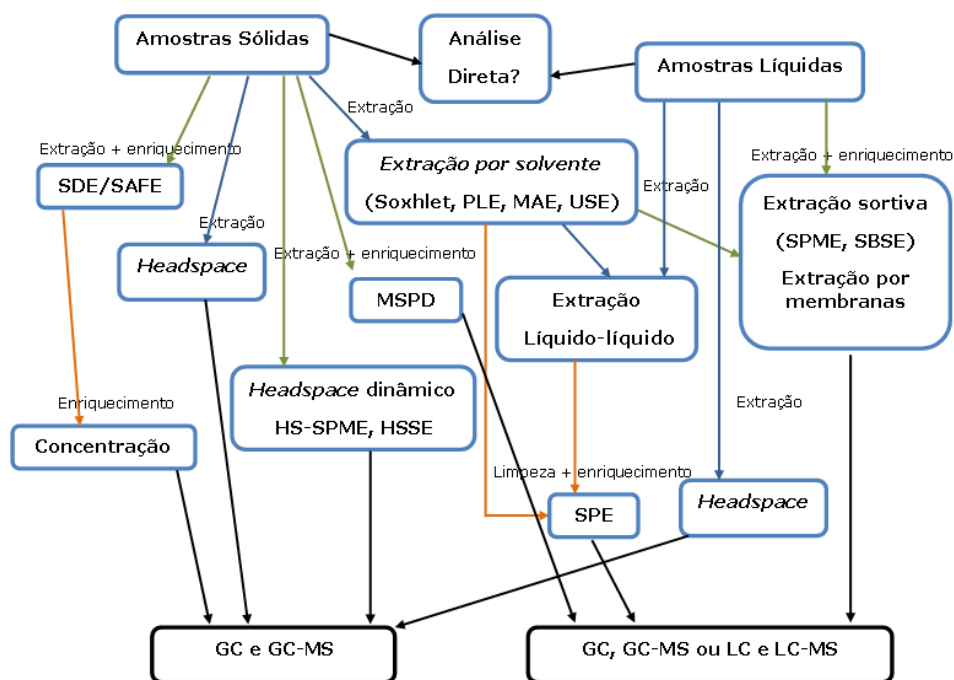


Figura 1.7 – Esquema representativo das opções de preparação de amostras sólidas e líquidas [25].

Neste trabalho será abordada a microextração em fase sólida, descrita de seguida de forma mais pormenorizada.

#### 1.4.1.1. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida, SPME, foi desenvolvida por Pawliszyn e pelos seus colaboradores em 1990 [26]. É uma técnica de extração, concentração e introdução da amostra, simultânea, aplicável a compostos voláteis e semi-voláteis, que não requer a utilização de solventes e que ocorre a uma escala dimensional reduzida. A SPME surgiu como alternativa aos métodos tradicionais de extração em *headspace* dinâmico, também denominado espaço de cabeça dinâmico, extração líquido-líquido e outras técnicas de extração [26 - 28]. Envolve a exposição de uma fase estacionária à amostra e a partição dos analitos entre fases, que serão, posteriormente, desorvidos no injetor de um instrumento analítico, como um cromatógrafo [29].

- **Fundamentos teóricos**

Existem diferentes modelos de fundamentação teórica da extração de analitos por SPME de acordo com o processo de “sorção” envolvido. Assim, para uma extração por absorção, que se caracteriza por uma fase estacionária líquida, o princípio base é a partição do analito entre fases. No caso de revestimentos sólidos, o que corresponde ao processo de adsorção, o modelo baseia-se na isotérmica de adsorção de Langmuir [29].

Tal como é possível verificar na Figura 1.8, a técnica de SPME pode funcionar segundo um sistema de duas fases, que corresponde ao sistema de imersão direta, ou de acordo com um sistema de três fases ou *headspace* constituído pela amostra, o próprio espaço de cabeça e a fase estacionária. A fase estacionária é colocada em contacto com a amostra sob condições específicas durante um determinado período de tempo. Se este tempo for suficiente ocorre o equilíbrio entre as diversas fases. Dito isto, é possível relacionar a quantidade de analito sorvida na fase estacionária com a concentração de equilíbrio dos analitos nas fases do sistema.

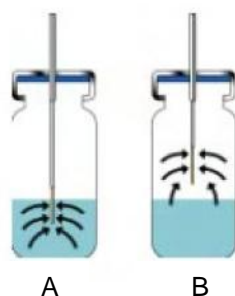


Figura 1.8 – Sistemas de extração por SPME: A – Sistema de Imersão Direta (DI-SPME); B – Sistema *Headspace* (HS-SPME) (Adaptado de [26]).

Considerando um sistema de três fases, no equilíbrio, a quantidade de analito presente inicialmente na amostra será igual à quantidade de analito em equilíbrio nas três fases, como se pode verificar na Equação 1 [26, 27, 29].

$$C_0V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad \text{Equação 1}$$

Com  $C_0$  igual à concentração inicial do analito na amostra;  $C_1^\infty$ ,  $C_2^\infty$  e  $C_3^\infty$  correspondentes à concentração de equilíbrio do analito em cada uma das fases: estacionária, amostra e espaço de cabeça, respectivamente;  $V_1$ ,  $V_2$  e  $V_3$  iguais ao volume de cada uma das fases (estacionária, da amostra e espaço de cabeça).

Recorrendo ao conceito de coeficiente de partição entre a fase estacionária e o espaço de cabeça, representado na Equação 2; e entre espaço de cabeça e a solução aquosa, segundo a Equação 3, a quantidade de analito acumulada pela fase estacionária, à qual se dá o nome de capacidade do revestimento, pode ser dada pela expressão descrita na Equação 4.

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} \quad \text{Equação 2}$$

$$K_2 = \frac{C_3^\infty}{C_2^\infty} \quad \text{Equação 3}$$

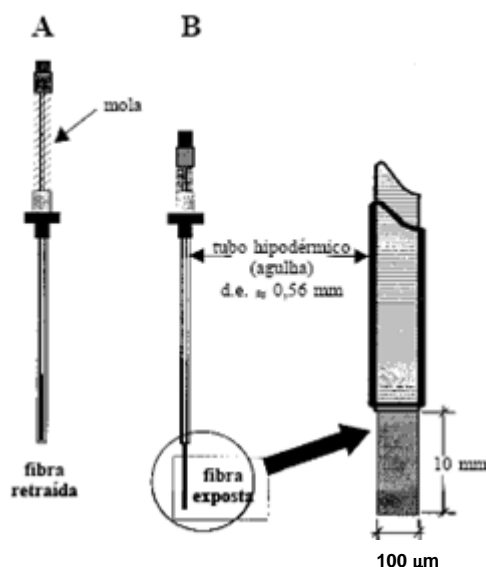
$$n = \frac{K_1 K_2 V_1 V_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} C_0 \quad \text{Equação 4}$$

Assim, dependendo dos coeficientes de partição entre as fases e dos volumes de cada fase, é possível traçar uma relação de proporcionalidade entre a concentração inicial do analito na amostra e a quantidade de equilíbrio do analito acumulada na fase estacionária [26, 29].

A técnica de HS-SPME baseia-se no processo de sorção. Assim, a amostra, quer sólida, quer líquida, é colocada num frasco selado com um septo. Posteriormente, a amostra segue para uma etapa de termostatização para que os compostos voláteis se libertem e passem para o espaço de cabeça, de modo a estabelecer um equilíbrio entre a fase gasosa e a amostra. No entanto, uma vez que nem sempre se trabalha nas condições de equilíbrio, é necessário ter atenção às condições experimentais de modo a que se mantenham nos vários ensaios [26].

- **Dispositivos e modos de extração**

O dispositivo de SPME mais utilizado pode ser descrito como uma seringa com agulha, septo e êmbolos exteriores, semelhante ao representado na Figura 1.9. A agulha encerra um suporte de sílica fundida revestido com a fase estacionária polimérica. Este suporte pode ser introduzido na matriz líquida da amostra – imersão direta (DI) – ou na fase gasosa acima da amostra – espaço de cabeça ou *headspace* (HS) – no caso de matrizes líquidas ou sólidas [27, 29].



**Figura 1.9 – Dispositivo da fibra SPME. (A) representa a posição com a fibra retraída; (B) corresponde à posição com a fibra exposta. No detalhe encontram-se representadas as dimensões típicas da secção com recobrimento de 100 µm de espessura [27].**

A seleção do modo de extração, DI-SPME ou HS-SPME, deve ser feita de acordo com a volatilidade do analito e a solubilidade ou afinidade dos compostos para a fase estacionária.

A extração em *headspace* apresenta vantagens relativamente à proteção da fase estacionária de efeitos adversos causados por compostos não voláteis existentes na amostra, de elevado peso molecular. Confere maior durabilidade na utilização, bem como a possibilidade de se proceder ao ajuste das condições de extração da amostra sem danificar a fase estacionária. As fases estacionárias encontram-se disponíveis comercialmente em suporte de sílica fundida com comprimento de 1 a 2 cm. A sua seleção deverá ser efetuada de forma a haver uma forte afinidade com os analitos. A Tabela 1.2 apresenta as fibras disponíveis comercialmente e algumas sugestões de aplicações genéricas.

Tabela 1.2 – Fibras de SPME disponíveis comercialmente [26].

Fase Estacionária	Espessura (µm)	Temperatura (°C)	Uso recomendado
PDMS	100	200-270	COVs
	30	200-270	COVs apolares
	7	220-320	COVs semi polares
PDMS/DVB	65	200-270	Voláteis polares
	60	200-270	HPLC
CAR/PDMS	75	240-300	COVs vestigiais
CW/DVB	65	200-260	Compostos polares
<i>StableFlex</i> DVB/CAR/PDMS	50/30	230-270	-
CW/TPR	50	-	Compostos polares
PA	85	220-310	COVs polares

CAR - Carboxeno; COVs – Compostos Orgânicos Voláteis; CW – Carbowax; DVB – Divinilbenzeno; PA – Poliacrilato; PDMS - Poldimetilsiloxano; TPR – *Template Resin*.

- **Fases estacionárias**

Para se desenvolverem metodologias de SPME é importante conhecer as características físico-químicas dos analitos, como a polaridade, os grupos funcionais, a pressão de vapor, a estrutura e a massa molecular, e os efeitos de matriz. Deste modo, quando se seleciona corretamente o tipo de fase estacionária e o modo de extração, a sensibilidade melhora visivelmente. Quando se estudam analitos voláteis e semi-voláteis não polares deverá optar-se por análise em *headspace*, uma vez que para além de a difusão ocorrer mais rapidamente, os dispositivos de extração apresentam maior durabilidade e reduzem-se as interferências de matriz.

Como já foi referido anteriormente, no intuito de assegurar os níveis adequados de reprodutibilidade, é importante manter fixos os parâmetros experimentais que têm influência sobre a extração do analito.

- **Influência das condições experimentais**

Na etapa de sorção, o equilíbrio de partição dos compostos voláteis entre o espaço de cabeça e a fibra de SPME é influenciado por diversas condições experimentais como o volume, a temperatura de extração, a agitação, a composição da amostra e o tempo de extração.

A eficiência da dessorção térmica do analito no injetor do GC depende de fatores, que devem ser controlados, como a volatilidade do analito, espessura do revestimento da fibra, temperatura do injetor e o tempo de exposição. De um modo geral, a temperatura ótima de dessorção é aproximadamente igual à temperatura de ebulição do componente menos volátil. Para prevenir o alargamento dos picos, a temperatura inicial da coluna do GC deve ser mantida baixa, para que

se consiga uma maior concentração de analitos à cabeça da coluna. O tempo de dessorção estará dependente da temperatura do injetor.

A utilização de sistemas automáticos de injeção permite um maior controlo das condições de injeção, como a posição e a profundidade da fibra, e do tempo de dessorção, o que melhora a reprodutibilidade da metodologia [26].

#### **1.4.2. Métodos de análise e deteção**

Os métodos para análise química são, em geral, seletivos e poucos são realmente específicos. Assim, a separação do analito de potenciais interferências torna-se uma etapa crucial nos procedimentos analíticos. As aplicações da cromatografia têm vindo a crescer de forma explosiva, não só devido ao desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas, mas também devido à necessidade de criar métodos capazes de caracterizar misturas cada vez mais complexas [30]. No estudo de contaminantes do vinho é frequente recorrer à cromatografia gasosa.

O desenvolvimento da cromatografia gasosa foi possível com o estudo e utilização de diversos tipos de detetores. Deste modo, existem diversas opções disponíveis e a sua escolha deve atender a fatores como o tipo de analito que se pretende identificar, apresentar sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, entre outras. A espetrometria de massa (MS) é frequentemente utilizada no âmbito da análise dos contaminantes presentes no vinho.

É, então, importante efetuar as escolhas adequadas relativamente aos métodos de extração, análise e deteção de modo a que se consigam boas condições de sensibilidade e seletividade.

##### **1.4.2.1. Cromatografia gasosa (GC)**

A cromatografia compreende uma série de técnicas, entre as quais a cromatografia gasosa, que permitem a separação de componentes semelhantes de misturas complexas. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico, através de uma fase estacionária que não é miscível com a anterior. Estas fases são escolhidas de modo a que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus. A cromatografia gás-líquido baseia-se na partição do analito entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida na superfície de um sólido inerte. É habitual recorrer a hélio, azoto ou hidrogénio como gases de arraste, que devem ser quimicamente inertes [30, 31].

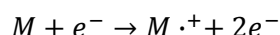
Em termos de otimização das condições cromatográficas é necessário atender a vários fatores como o tipo de fase estacionária da coluna, a configuração da coluna, o programa de temperaturas do forno e o fluxo de gás de arraste. Cada analito terá as suas condições

características, no entanto, o que acontece muitas vezes é a análise de vários analitos em simultâneo, pelo que não é possível manter as condições ótimas de cada um deles. Nesta situação estabelecem-se as mesmas condições para todos os analitos, ainda que não sejam as mais satisfatórias para todos eles. É o que se chama situação de compromisso.

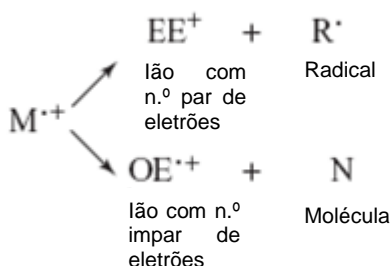
#### 1.4.2.2. Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa é considerada uma das técnicas analíticas mais versáteis e sensíveis, caracterizando-se pela sua elevada aplicabilidade. É capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, as estruturas de moléculas orgânicas, inorgânicas e biológicas, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas e as razões isotópicas de átomos nas amostras [30]. Há mais de 30 anos que os espectrómetros de massa têm vindo a ser utilizados como detetores de efluentes cromatográficos, em fase gasosa [31].

Em espectrometria de massa, o primeiro passo corresponde à produção, em fase gasosa, de iões do composto a analisar. Tomando como exemplo a ionização por impacto eletrónico, ter-se-ia,



Por norma, este ião molecular sofre fragmentações pelo que, uma vez que se trata de um catião radical com número ímpar de eletrões, pode fragmentar-se, originando um radical e um ião com número par de eletrões ou uma molécula e um novo catião radical [32].



Estes dois tipos de iões que podem ser originados apresentam diferentes propriedades químicas. Cada ião produto da fragmentação do ião molecular pode, por sua vez, também sofrer fragmentação e assim sucessivamente. Todos estes iões serão, posteriormente, separados por espectrometria de massa, de acordo com a sua relação massa/carga, sendo detetados tendo em conta a sua abundância. Deste modo, é, então, produzido o espectro de massa da molécula do composto em análise dado pela abundância relativa do ião em função da sua relação massa/carga [32].

- **Métodos de ionização**

O ponto de partida para uma análise por espectrometria de massa passa pela formação de iões gasosos do analito e quer a finalidade, quer a utilidade de um determinado método de espectrometria de massa são ditadas pelo processo de ionização [30]. A formação de um grupo de iões característicos de um dado composto a partir da sua molécula original requer que a esta seja fornecida energia que conduza à formação desses iões. Atualmente, existem múltiplos processos de ionização que serão usados de acordo com as diferentes aplicações a que se destinam, dividindo-se em duas categorias principais: fontes de fase gasosa e fontes de dessorção. Nas fontes de fase gasosa a amostra começa por ser vaporizada e só depois ionizada. Por sua vez, nas fontes de dessorção, a amostra em estado sólido ou líquido é convertida diretamente em iões gasosos, sendo aplicáveis a amostras não-voláteis e termicamente instáveis. A Tabela 1.3 regista as principais fontes de iões que têm vindo a ser aplicadas em espectrometria de massa.

**Tabela 1.3 – Métodos de ionização para espectrometria de massa [30, 32].**

<b>Categoria</b>	<b>Método de ionização</b>	<b>Descrição</b>
Fontes de Fase Gasosa	Impacto Eletrónico (IE)	Tem como agente ionizante eletrões energéticos.
	Ionização Química (CI)	Ionização com recurso a iões gasosos reativos.
	Ionização por campo (FI)	Ionização sob influência de um campo elétrico elevado.
Fontes de Dessorção	Dessorção por campo (FD)	Ionização de moléculas apolares com elevada massa molecular.
	Ionização por eletronebulização (ESI)	Usualmente acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência.
	Dessorção/ionização com laser auxiliada por matriz (MALDI)	Adequada para o estudo de superfícies e análise local da composição de amostras.
	Dessorção por plasma (PD)	Permite a observação de iões com massas superiores a 10 000 Daltons.
	Bombardeamento rápido de eletrões (FAD)	Técnica utilizada quando a amostra está dissolvida em matrizes líquidas não voláteis.
	Espectrometria de massa de iões secundários (SIMS)	Técnica de ionização maioritariamente utilizada para sólidos, como superfícies condutoras.
	Ionização por termonebulização	Tem como agente ionizante elevadas temperaturas.

Neste texto dar-se-á particular atenção à ionização por impacto eletrónico, uma vez que corresponde à técnica utilizada no estudo que se apresenta.

### ➤ Ionização por impacto eletrônico (IE)

A ionização por impacto eletrônico, também denominada por ionização eletrônica, é amplamente utilizada em espectrometria de massa orgânica, apresentando bons resultados para muitas moléculas na fase gasosa. No entanto induz a fragmentação extensiva, de modo que nem sempre se conseguem observar os iões moleculares.

De acordo com o esquema representado na Figura 1.10, as substâncias que eluem da coluna entram na câmara de ionização. Aqui, os eletrões provenientes de um filamento incandescente são focados através da câmara de ionização e obrigados a atravessá-la por ação de um elétrodo com potencial positivo, cujo valor pode ser fixo ou variável, consoante o tipo de instrumento. Geralmente, este valor de potencial é de 70 volts, transmitindo a cada eletrão uma energia de 70 eV, no intuito de produzir espectros de massa mais reprodutíveis e característicos. Nestas condições, em média, é produzido um ião por cada 1000 moléculas que entram na fonte. Cerca de 10 a 20 eV são transferidos para as moléculas durante o processo de ionização e, uma vez que 10 eV são suficientes para ionizar grande parte das moléculas orgânicas, o excesso de energia é gasto na fragmentação extensiva, que poderá ser útil na medida em que fornece informação estrutural para a elucidação da estrutura de compostos desconhecidos. Outro fator a ter em conta para a obtenção de espectros reprodutíveis é o valor da pressão, que irá influenciar as colisões entre as moléculas da substância e os iões radiantes [31, 32, 33].

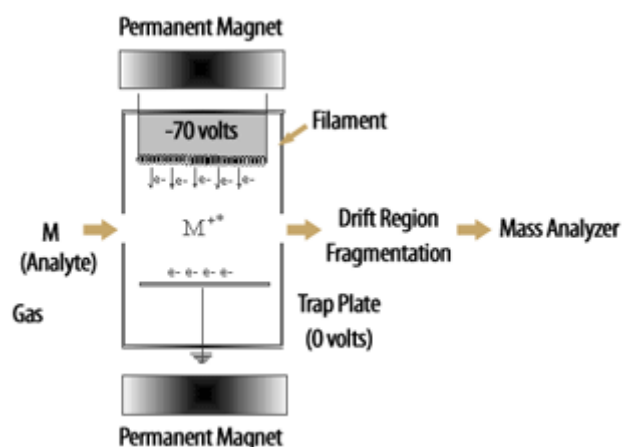


Figura 1.10 – Diagrama esquemático do funcionamento de uma câmara de ionização por impacto eletrônico (IE) [33].

Para evitar espectros não reprodutíveis é necessário que o percurso médio do ião ou molécula seja superior às dimensões da câmara, de modo a evitar que estas moléculas ou iões sofram colisões entre si, o que alteraria o padrão de fragmentação [31].

- **Analisadores de massa**

Uma vez produzidos os iões, na ionização, é necessário proceder à sua separação de acordo com as respetivas massas, que devem ser determinadas. As propriedades físicas dos iões medidas pelos analisadores de massa correspondem à razão massa/carga em vez das suas massas individuais. Tal como se verificou anteriormente para os métodos de ionização, também foram desenvolvidos diferentes analisadores de massa, uma vez que a separação dos iões de acordo com a sua relação massa/carga se pode basear em diferentes princípios. Assim, na Tabela 1.4 destacam-se analisadores que podem ser utilizados em espetrometria de massa [32].

**Tabela 1.4 – Tipos de analisadores utilizados em espetrometria de massa [32].**

<b>Analisador</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Princípio de separação</b>
Elétrico	E ou ESA	Energia cinética
Magnético	B	Momento
Quadrupolo	Q	$m/z$
Armadilha de iões	IT	$m/z$
Tempo de voo	TOF	Velocidade (tempo de voo)
Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier	FTICR	$m/z$
Orbitrap com Transformada de Fourier	FT-OT	$m/z$

Para este estudo recorreu-se ao analisador “armadilha de iões” (*Ion Trap*), pelo que, de seguida se abordará de forma sucinta o seu modo de funcionamento.

Neste analisador os iões são gerados a partir de amostras eluídas através de impacto eletrónico. Este instrumento é um dispositivo que utiliza um campo elétrico oscilante para armazenar iões. Os iões presos são ejetados, de forma controlada de modo a possibilitar o varrimento com base na razão massa/carga, da área de armazenamento para um detetor de eletrões [30, 32].

A Figura 1.11 representa esquematicamente a conceção instrumental de um detetor de armadilha de iões. O sistema de vácuo é baseado numa bomba turbomolecular e os iões são detetados por um multiplicador de eletrões. O sistema é muito simples na medida em que é controlado por um computador pessoal, é capaz de varrimento espectral e de monitorização por ião selecionado. A fonte iónica e o analisador não se encontram separados. As moléculas que entram na zona do analisador são ionizadas e os iões com valores de  $m/z$  definidos não conseguem abandonar a região, permanecendo presos num campo quadropolar formado pela aplicação de uma voltagem de radiofrequência entre as placas terminais de um elétrodo circular. O valor da radiofrequência inicial deve ser tal que permita que os iões com razão  $m/z$  inferior a um

determinado valor, previamente definido, abandonem a zona. Uma rampa de radiofrequência adequada faz com que os iões armadilhados passem a instáveis segundo uma ordem crescente de valores de  $m/z$ , que vão abandonando rapidamente a zona de ionização em direção aos elétrodos terminais [31].

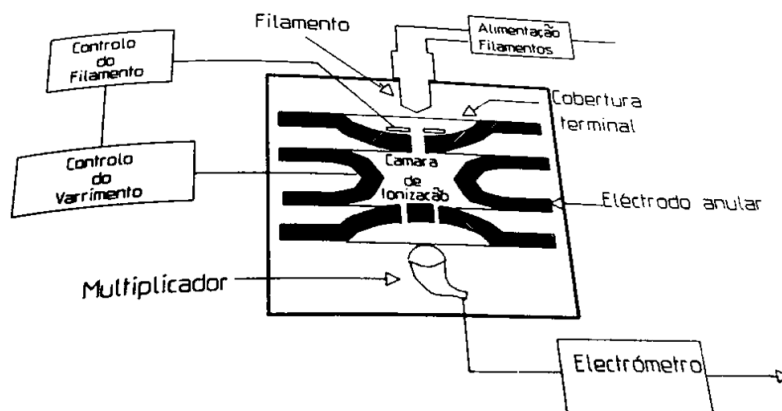


Figura 1.11 – Representação esquemática de um detector de “armadilha de iões”[31].

- **Detetores**

Depois de passarem pelo analisador, os iões são detetados e transformados num sinal mensurável pelo detetor. Os detetores são capazes de gerar uma corrente eléctrica, a partir dos iões incidentes, que é proporcional à sua abundância. Existem muitos tipos de detetores que podem ser utilizados: copo de Faraday, multiplicador de electrões, entre outros [32]. Neste estudo utilizou-se o multiplicador de electrões, pelo que será este o tipo de detetor descrito.

O multiplicador de electrões é um equipamento altamente sensível para detetar partículas energéticas individuais. Nestes instrumentos, a partícula a detetar tem de ser convertida em electrões. Posteriormente, ocorre a amplificação causada por uma cascata de elétrodos de aceleração que aceleram os electrões a velocidades que permitam gerar novos electrões através do choque com os elétrodos [34].

➤ **MS/MS**

A espetrometria de massa tandem, denominada MS/MS, é um método que envolve pelo menos duas etapas de análise de massas. Geralmente este método requer um primeiro analisador que visa isolar o ião precursor, que sofre fragmentações espontâneas ou através de alguma forma de ativação, originando produtos como iões ou fragmentos neutros. Os iões produzidos são posteriormente analisados [32].

A espectrometria de massa tandem pode ser concebida de duas formas: no espaço, associando dois instrumentos fisicamente diferentes ou no tempo, realizando uma sequência apropriada de eventos num dispositivo de armazenamento de iões. Os instrumentos mais comuns de análise de massas no espaço utilizam dois analisadores, frequentemente do tipo quadrupolo, que permitem a realização de experiências em MS/MS. Por sua vez, os instrumentos de análise temporal podem recorrer, por exemplo, a analisadores do tipo *Ion Trap* [32].

A espectrometria de massa tandem tem uma grande variedade de aplicações, mostrando-se vantajosa relativamente a outras técnicas de deteção, na medida em que permite a análise de compostos, entre os quais se destacam os compostos de baixa volatilidade, termolábeis ou com elevado peso molecular [32, 35].

#### **1.4.2.3. Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS)**

O acoplamento de dois ou mais instrumentos num único sistema integrado designa-se, de uma forma geral, por hifenação. As técnicas de cromatografia baseadas neste princípio são genericamente conhecidas como técnicas hifenadas [31].

Acoplar um cromatógrafo gasoso a um espectrómetro de massa poderia representar um problema, na medida em que ambos apresentam exigências relacionadas com a dinâmica de fluidos. Um cromatógrafo gás-líquido opera com pressão gasosa positiva no interior da coluna cromatográfica, cujo efluente deve ser introduzido no espectrómetro de massa, que, por sua vez, exige condições de alto vácuo. Assim, a interface deve ser capaz de adequar a diferença de pressão que estes sistemas distintos requerem [31].

De um modo geral, os instrumentos de GC-MS são equipados de origem com todos os sistemas de computação e tratamento de dados. Relativamente às operações de arranque de um GC-MS é necessário efetuar a calibração do analisador de massas para condições de operação estabelecidas. Esta pode ser efetuada sob controlo do computador ou manualmente. De seguida devem ser fixadas as condições de análise. Posteriormente, o computador toma a seu cargo uma série de operações de controlo [31].

Os instrumentos de GC-MS têm sido amplamente utilizados na identificação de centenas de componentes presentes em sistemas naturais e biológicos, devido à sua boa sensibilidade e boa seletividade [28]. Estes procedimentos permitiram, por exemplo, a identificação de poluentes da água, diagnósticos médicos baseados em componentes do ar expirado, estudos de metabólitos de medicamentos e a caracterização de componentes que conferem odor e sabor aos alimentos [30], destacando-se os contaminantes que se podem encontrar no vinho.

### 1.4.3. Análise de contaminantes em vinhos – Estado da Arte

A presença de contaminantes organoléticos no vinho representa uma fonte de perda financeira nesta indústria. Deste modo, o controlo da qualidade organolética dos vinhos é indispensável para que se obtenha um produto de elevada qualidade [36, 37]. Neste sentido, têm vindo a ser desenvolvidas diferentes metodologias para a determinação de contaminantes em vinhos.

Em 1999, Claire Jomini [38] elaborou um projeto no intuito de desenvolver um método que permitisse a identificação rápida de clorofenóis e cloroanisóis nos vinhos. Sabendo que a deteção destes compostos clorados requer a utilização de um método fiável e sensível sugere a SPME como técnica de pré-tratamento da amostra, com a vantagem de não serem necessários solventes ou aparelhos complexos. Relativamente ao método de análise escolhe a cromatografia gasosa, que pode ser associada a vários detetores, entre os quais o ECD.

Jean-Michel Riboulet *et al.* [15] descreveram um método de doseamento dos cloroanisóis extraídos das rolhas pelo vinho. Os cloroanisóis são analisados por SPME/GC-MS, o que permitiu obter um limite de deteção de 0,2 ng/L para cada um dos compostos estudados: TCA, PCA e TeCA.

Dumoulin e Barthas [10] quiseram ter uma visão global das aplicações de SPME no domínio dos vinhos tendo, para isso, recorrido à rotina do Laboratório EXACT. A utilização da SPME para a caracterização dos constituintes do vinho apresenta um tempo reduzido de preparação das amostras e não requer a utilização de solventes, características que constituem vantagens consideráveis relativamente às técnicas clássicas. Neste estudo, a análise dos compostos foi feita por adsorção, recorrendo a uma fibra à base de poliacrilato (PA) que se adapta muito bem a compostos polares. A análise cromatográfica foi realizada por GC-MS ou por GC-FID. Utilizou-se este método na análise de fenóis voláteis.

M.-C. Monje *et al.* [19] recorreram, em 2001, à HS-SPME como método de extração e determinação do 4-Etilfenol e do 4-Etilguaiacol em vinhos tintos por GC-FID. Concluíram que a técnica de HS-SPME apresenta mais vantagens relativamente à extração líquido-líquido, destacando-se a sua simplicidade, rapidez, elevada sensibilidade e utilização de um pequeno volume de amostra.

Paula Neto [29] desenvolveu, em 2005, uma metodologia de HS-SPME para identificar e quantificar compostos voláteis da cortiça suscetíveis de provocar defeitos sensoriais em vinhos: 3-metil-1-butanol, 1-octeno-3-ol, 1-octanol, guaiacol, 2-metilisoborneol, 2,4,6-tricloroanisol e geosmina. As amostras foram analisadas em modo espaço de cabeça, recorrendo a uma fase estacionária do tipo absorvente: 100 µm PDMS. Os resultados obtidos levam a concluir que os compostos apresentam comportamentos distintos em HS-SPME. Verificou-se que o 1-octanol interferiu na quantificação dos restantes componentes, à exceção do 1-octeno-3-ol. A discrepância

verificada entre a análise sensorial e a quantificação por HS-SPME pode estar relacionada com o facto de o 1-octanol fazer parte da composição química, quer de vinhos, quer da cortiça, em quantidades que variam entre 3 e 250 µg/L.

A. Zalacain *et al.* [39] analisaram o “gosto a rolha” em vinhos por SBSE/GC-MS. Os componentes em estudo foram o TCA, o TeCA, o PCA e os respetivos fenóis em amostras de vinho reais e sintéticas. Este método mostrou boa linearidade, reprodutibilidade e repetibilidade na gama de concentrações estudada para todos os analitos.

Tendo por base a norma ISO/CD 20752.2, foi implementada, numa indústria corticeira, uma metodologia para quantificar o TCA por HS-SPME/GC-ECD. O método foi aplicado na determinação de TCA em rolhas de cortiça de diferentes qualidades visuais e calibres, obtidas a partir de nove fornecedores, ao longo do ano de 2007. Foram otimizados parâmetros como a linearidade, limites de deteção e quantificação, repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. A metodologia apresenta boa linearidade ( $R^2=0,9964$ ) para a gama de concentrações testada (0,63 – 16,75 ng/L), com limite de deteção de 0,21 ng/L e limite de quantificação de 0,63 ng/L. A repetibilidade e a reprodutibilidade apresentam coeficientes de variação de 1% e 2%, respetivamente [26].

Ó. Ezquerro *et al.* [40] descreveram um método analítico que consiste numa extração de fluido pressurizado e GC-MS com o objetivo de determinar o TCA e o guaiacol em rolhas de cortiça. Os resultados foram comparados com os obtidos por *Soxhlet* e MHS-SPME, concluindo-se que o método era adequado para a determinação destes compostos. Como vantagens, a extração de fluido pressurizado apresenta menor consumo de solvente e um tempo de extração mais curto relativamente à extração *Soxhlet*.

Chatonnet *et al.* [36] apresentaram um método que recorre à HS-SPME/GC-MS por impacto eletrónico, para determinar 18 contaminantes, entre os quais TCA, TBA, TeCA, PCA, 4-EP, 4-EG, acetato de etilo, guaiacol e geosmina que conduzem a defeitos organoléticos. O método foi validado de acordo com os protocolos NF ISO 5725-1, NF ISO 5725-2 e NF V03-110. Foram analisados dois vinhos – um vinho tinto e um vinho branco – cujos resultados foram comparados com os obtidos por outros métodos. Verificou-se que os resultados obtidos para os dois vinhos foram semelhantes para todos os métodos. O vinho branco não apresentava defeitos sensoriais e não foram detetadas moléculas com teores acima do respetivo nível de perceção. Já o vinho tinto apresentava características fenólicas e o método detetou a presença de 4-EP e 4-EG. Foram realizados estudos de recuperação, tendo-se obtido valores satisfatórios para as duas matrizes.

Andreas Hoffmann *et al.* [41] sugeriram o estudo do TCA por SBSE-GC/MS. Esta metodologia não requer preparação da amostra e é “amiga do ambiente” na medida em que não são envolvidos solventes orgânicos na análise. No âmbito deste trabalho foram analisados dois

conjuntos de vinho: o primeiro contendo vinhos com “gosto a rolha” e o segundo constituído por vinhos que apresentavam aroma, mas que não era descrito como “rolha”. Todos os vinhos analisados apresentaram TCA, mesmo aqueles que não eram identificados com “gosto a rolha”. A amostra do segundo conjunto apresentava uma concentração de TCA entre 0,3 e 1,3 ng/L, inferior ao limite de perceção encontrado na literatura – entre 3 e 15 ng/L.

C. Pizarro *et al.* [42] otimizaram um método para determinação de haloanisóis e halofenóis recorrendo à técnica de extração assistida por micro-ondas associada a GC-ECD. Realizaram-se estudos para otimizar os parâmetros do processo de extração tendo-se verificado que os valores ótimos seriam de 170°C de temperatura, 35 mL de volume de solvente e 90 minutos como tempo de extração. No sentido de avaliar a aplicabilidade do método proposto efetuaram-se ensaios de recuperação que foram comparados com os resultados obtidos para o método de extração *Soxhlet*, tendo-se concluído que os valores obtidos eram similares para ambos os métodos.

M. Riu *et al.* [43] apresentaram dois métodos para quantificar TCA em vinhos. Elaboraram um estudo comparativo, tendo concluído que ambos os detetores usados – MS e ECD – apresentam resultados semelhantes. Segundo M. Riu *et al.*, a diferença entre os dois métodos desenvolvidos assenta na melhor sensibilidade do GC-ECD e no facto de se conseguir obter um cromatograma com um menor tempo de corrida por GC-MS.

Mais recentemente, Chatonnet *et al.* [44] desenvolveram um método nos laboratórios Excell apresentado no *site* como *Check List Excell*. Trata-se de um método de análise rápido que permite a deteção e a quantificação simultânea de 26 contaminantes sensoriais. Este método recorre à HS-SPME/GC-MS, com o objetivo de determinar defeitos com diversas origens de modo a que seja possível a sua reparação e bloqueio, evitando que estes compostos ultrapassem os limites de perceção.

Apresentados alguns dos trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos no âmbito da determinação de contaminantes em vinhos é importante fazer referência a algumas características essenciais para a validação destas metodologias.

## **1.5. Validação do método**

Grande parte das análises enológicas realizadas em todo o mundo, para a elaboração e comercialização dos vinhos, são realizadas por diversos laboratórios que recorrem a métodos usuais, na sua maioria comparativos ou relativos, muitas vezes automatizados. Os métodos a que se pode recorrer encontram-se previstos em diversos documentos, dos quais se destaca o “*Recueil des méthodes d’analyse des vins et des moûts de l’OIV*” [45].

Para avaliar um método de análise é necessário atender a um conjunto de características importantes. A validação de um método é possível através de uma análise intralaboratorial. Assim,

a validação de um método não é mais que a avaliação das suas características aliada à análise interlaboratorial dos resultados [46].

Para a validação de um método, é necessário que as características desse método cumpram os requisitos para as aplicações analíticas a que este se destina. Essas características são expressas segundo determinados parâmetros, nomeadamente a linearidade, a sensibilidade, os limites analíticos, como o limite de deteção e o limite de quantificação, a precisão intermédia, a exatidão e a repetibilidade. De seguida são abordados cada um destes parâmetros.

### 1.5.1. Linearidade

A linearidade caracteriza-se como sendo a capacidade de um método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, para uma dada gama de concentrações [47]. Para proceder à quantificação de um determinado analito na amostra é necessário conhecer a dependência entre a resposta medida e a concentração desse analito. A linearidade é obtida por padronização, interna ou externa, e formulada como expressão matemática, de acordo com a Equação 5, de modo a que se possa determinar a concentração do analito na amostra real [26].

$$y = mx + b \quad \text{Equação 5}$$

Onde  $y$  corresponde à resposta medida,  $x$  à concentração,  $m$  é o declive da curva de calibração e  $b$  corresponde ao valor da interseção da curva com o eixo das ordenadas ( $yy$ ).

Este parâmetro de validação pode ser observado pelo traçado gráfico que relaciona os resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou determinado a partir da equação da regressão linear obtida pelo método dos mínimos quadrados. Para esta equação, é frequente admitir como coeficiente de correlação linear,  $R^2$ , um valor superior a 0,995. Este coeficiente visa indicar se a curva obtida pode ser considerada como modelo matemático linear [26].

Ao recorrer a uma metodologia que envolva o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho poderá ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias, determinando-se as variâncias associadas aos padrões mais baixo e mais elevado:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^p (y_{ij} - \bar{y})^2}{n_i - 1} \quad \text{Equação 6}$$

Com  $i$  igual ao número do padrão ( $i = 1, \dots, p$ ) e  $j$  ao número de repetições efetuadas para cada um desses padrões. Este teste pretende verificar a existência de diferenças significativas entre as variâncias nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$PG = \frac{S_p^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_p^2 > S_1^2 \quad \text{Equação 7}$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_p^2}, \text{ quando } S_p^2 < S_1^2 \quad \text{Equação 8}$$

Posteriormente, compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição de F de Snedecor/Fisher, para  $n-1$  graus de liberdade:

Se  $PG \leq F$ , as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se  $PG > F$ , as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter  $PG \leq F$  [26].

### 1.5.2. Sensibilidade

A sensibilidade pode definir-se como o quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente àquele acréscimo e visa avaliar a capacidade de um método ou de um equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito [47].

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \text{Equação 9}$$

Trata-se de um parâmetro interessante quando se pretende averiguar a sua evolução ao longo do tempo; quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos para um mesmo analito; e, quando se pretende comparar a sensibilidade para diversos analitos.

### 1.5.3. Limiares analíticos do método de ensaio

Os limiares analíticos, limite de deteção e limite de quantificação, podem ser determinados de acordo com o que descreve de seguida.

#### 1.5.3.1. Limite de deteção

O limite de deteção (LD) corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Diz respeito à menor quantidade da substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, sem que implique a sua quantificação como valor exato. Em termos qualitativos, o limite de deteção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, que apresenta a mesma matriz e ausência do componente em estudo.

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que o analito não se encontre presente na amostra. No entanto, pode afirmar-se, com uma probabilidade definida, que a sua concentração será inferior a um determinado valor [47].

Para os casos em que o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de deteção pode ser dado por,

$$LD = \frac{[3.3S_{y/x}]}{m} \quad \text{Equação 10}$$

Onde  $S_{y/x}$  corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e  $m$  é o seu declive [26, 47].

#### 1.5.3.2. Limite de quantificação

Por limite de quantificação (LQ) entende-se a menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada precisão e exatidão. Na prática, normalmente, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração [26, 47].

Quando o método envolve a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação pode determinar-se de acordo com a expressão:

$$LQ = \frac{[10S_{y/x}]}{m} \quad \text{Equação 11}$$

Este limite é frequente e preferencialmente utilizado nos relatórios de ensaio, devendo ser identificado e quantificado de forma clara [47].

#### 1.5.4. Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [26, 47]. Para eliminar os efeitos da matriz, será mais realista estudar a precisão sobre amostras. No entanto, é importante alertar para o facto de a precisão poder variar de acordo com a gama de concentrações em que se trabalha [25].

Para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes existem duas medidas extremas: a repetibilidade e a reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão destaca-se a precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial, como situação intermédia.

### 1.5.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade indica a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas. Refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, destacando-se:

- ✓ Mesmo Laboratório;
- ✓ Mesmo analista;
- ✓ Mesmo equipamento;
- ✓ Mesmo tipo de reagentes;
- ✓ Curtos intervalos de tempo.

O limite de repetibilidade caracteriza-se como o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente de 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas.

A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efetuados no próprio Laboratório. Para determinar a repetibilidade no próprio Laboratório, efetuam-se uma série de medições sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Quando se pretende avaliar a repetibilidade através de um ensaio interlaboratorial, o número de medições em cada nível de concentração, pode ser inferior [47].

A estimativa de variação de um método de análise pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de  $p$  séries de análises estudadas nas condições de repetibilidade:

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p [(n_{ij}-1) \times S_{ij}^2]}{\sum_{i=1}^p (n_{ij}-1)} \quad \text{Equação 12}$$

Sendo  $S_{rj}^2$  a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados,  $S_{ij}^2$  a variância associada aos resultados considerados,  $(n_{ij} - 1)$  os graus de liberdade da série de análises e  $p$  o número de laboratórios participantes.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade é avaliado de acordo com a expressão,

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{rj} = 1.96 \times \sqrt{2} \times S_{rj} = 2.8 \times S_{rj} \quad \text{Equação 13}$$

Com  $S_{rj}$  igual ao desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados, isto é,

$$r = 2.8 \sqrt{S_{rj}^2}$$

**Equação 14**

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade (CV<sub>r</sub>), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{rj}}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 15**

#### 1.5.4.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade de um método corresponde à aproximação entre os resultados das medições sucessivas de uma determinada amostra, efetuada com a alteração de pelo menos uma das condições de medição, como por exemplo, realizar o ensaio no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, recorrer a diferentes analistas, equipamentos ou realizar o mesmo ensaio em épocas distintas [48].

#### 1.5.4.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, destacando-se, por exemplo, diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas, com ou sem variação da calibração. Este parâmetro corresponde à medida mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. A sua determinação requer *n* medições sobre a amostra em replicado, duplicado ou ensaio único, nas condições pré-definidas, uma vez que existem vários métodos de estudo deste tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, com o intuito de abranger outras gamas de concentração. Em grande parte dos casos, o valor da precisão intermédia é função da gama de concentrações do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após a eliminação dos resultados aberrantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores aberrantes [47].

Dependendo do tipo de ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos que permitem a sua determinação e controlo, nomeadamente através de cartas de controlo de amplitudes ou através da Equação 16,

$$S_{i0} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

**Equação 16**

Onde *S*<sub>*i*0</sub> corresponde ao desvio padrão da precisão intermédia; *t* ao número de amostras ensaiadas; *n* ao número de ensaios efetuados por amostra; *j* é o número da amostra; *k*, o número

do resultado obtido para a amostra;  $y_{jk}$  diz respeito ao resultado individual ( $k$ ) para a amostra  $j$  de 1 a  $t$ , e  $\bar{y}_j$  representa a média aritmética dos resultados da amostra  $j$  de 1 a  $t$  [47].

### **1.5.5. Exatidão**

A exatidão caracteriza-se por uma avaliação direta. É definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Para avaliar este parâmetro pode recorrer-se a processos como testes comparativos, ensaios interlaboratoriais e materiais de referência certificados.

## **1.6. Enquadramento e objetivos do trabalho**

É atualmente bem nítida a crescente exigência do consumidor e a sua preferência pelo consumo de vinhos de elevada qualidade, o que torna o controlo de qualidade organolética deste produto indispensável. A qualificação de um defeito organolético é muito difícil, na ausência de dados objetivos relativos à identificação e quantificação precisa dos contaminantes responsáveis pela anomalia detetada.

Torna-se, então, interessante utilizar um método de análise que seja rápido de forma a permitir a quantificação simultânea das moléculas identificadas como principais responsáveis pelos distúrbios olfativos dos vinhos. Assim, este trabalho surge com o objetivo de implementar e validar um método para a determinação de contaminantes em vinho por HS-SPME/GC-MS/MS e a sua correlação com a análise sensorial.

Todo o trabalho foi realizado no Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, I.P. em condições reais de trabalho diário, desenvolvido entre Novembro de 2011 e Junho de 2012. Utilizou-se a SPME como método de extração, não havendo a necessidade de qualquer pré-tratamento da amostra. A determinação é, então, efetuada por cromatografia gasosa associada a espetrometria de massa tandem, de modo a identificar de forma clara os compostos pretendidos.



## 2. Parte Experimental

O trabalho experimental subdividiu-se na implementação e validação da metodologia analítica para a determinação de contaminantes em vinho por HS-SPME/GC-MS/MS e no tratamento estatístico dos resultados.

### 2.1. Reagentes e soluções

No estudo dos contaminantes utilizaram-se como reagentes o 2,4,6-Tribromoanisol (*Sigma*, Seelze, Alemanha), o 2,4,6-Tricloroanisol (*Sigma*, Seelze, Alemanha), o 2,3,4,6-Tetracloroanisol (*Cluzeau Info Labo*, Sainte-Foy-La-Grande, França), o 4-Etilfenol (*Aldrich*, Wisconsin, EUA) e o 4-Etilguaicol (*Aldrich*, Steinheim, Alemanha).

Como solvente para a preparação das soluções padrão utilizou-se metanol de qualidade HPLC (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se, ainda, cloreto de sódio (*Panreac*, Barcelona, Espanha) para melhorar a extração e água ultrapura na diluição das amostras.

Para a quantificação destes compostos recorreu-se ao método do padrão interno. Utilizaram-se dois padrões: o 2,4,6-Tricloroanisol deuterado (*Riedel-de Haën*, Seelze, Alemanha) – padrão interno para o TBA, TCA e TeCA – e o 3,4-Dimetilfenol (*Aldrich*, Wisconsin, EUA) – padrão interno para o 4-EG e o 4-EP.

#### 2.1.1 Preparação das soluções padrão

Foram preparadas soluções padrão individuais de cada contaminante. Para tal, recorreu-se à pesagem rigorosa de uma massa adequada de cada composto numa balança Sartorius Genius (modelo ME 215 S) e procedeu-se à sua diluição com metanol, no respetivo balão volumétrico, de acordo com o representado na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1 – Preparação das soluções padrão individuais.**

<b>Composto</b>	<b>Massa (aproximada) (g)</b>	<b>Balão Volumétrico (mL)</b>	<b>Identificação das soluções individuais</b>
3, 4-Dimetilfenol	0,05	50	3, 4-Dimetilfenol, PI
2, 4, 6-Tricloroanisol Deuterado	0,05	50	TCA-d <sub>5</sub> , PI
4-Etilfenol	0,05	50	4-EP
4-Etilguaiacol	0,05	50	4-EG
2, 4, 6-Tricloroanisol	0,005	50	TCA
2, 4, 6-Tribromoanisol	0,005	50	TBA
2, 3, 4, 6-Tetracloroanisol	0,005	50	TeCA

Partindo das soluções padrão individuais, foram preparados dois tipos de soluções mistas: solução conjunta de Fenóis Voláteis e solução conjunta de Anisóis. A solução conjunta de Anisóis foi preparada medindo, com o auxílio de micropipeta automática, volumes adequados de cada solução individual destes compostos de modo a obter, uma concentração de cerca de 5000 ng/L para cada um dos Anisóis. A solução mista de Fenóis Voláteis foi elaborada com recurso à medição de volumes adequados, com o auxílio de micropipeta automática, das soluções individuais de cada um dos compostos identificados como Fenóis Voláteis, de modo a obter concentrações aproximadas de 100 µg/L para o 4-Etilfenol e 25 µg/L para o 4-Etilguaiacol.

Todas as soluções padrão, individuais ou conjuntas, utilizadas ao longo deste trabalho, foram preparadas em metanol e refrigeradas a 4°C. As soluções conjuntas foram utilizadas na preparação dos padrões de calibração.

### **2.1.2 Preparação dos padrões de calibração**

Os padrões de calibração foram preparados diariamente, em vinho, adicionando volumes rigorosos das soluções padrão conjuntas. Para seis *vials* de vidro âmbar, com capacidade de 20 mL, de rosca com septo, adicionaram-se cerca de 2 g de NaCl, pipetaram-se 5 mL de água ultrapura, 5 mL de vinho e 100 µL de cada um dos padrões internos. Com o auxílio de micropipeta automática adicionaram-se 0,010; 0,020; 0,040; 0,060; 0,080 e 0,100 mL da solução conjunta dos Anisóis. Da solução conjunta de Fenóis Voláteis (FV), adicionaram-se, com o auxílio de micropipeta automática, 0,0125; 0,025; 0,050; 0,100; 0,150 e 0,200 mL. Perfez-se o volume de

10,5 mL com metanol, tal como se pode verificar na Tabela 2.2. A título indicativo, encontram-se registadas, sob a forma de tabela, as concentrações destas soluções de calibração no Anexo A.

**Tabela 2.2 – Registo dos volumes a medir na preparação dos padrões de calibração.**

Solução	V H <sub>2</sub> O (mL)	V amostra (mL)	V PI (3,4-DMP) (mL)	V PI (TCA-d <sub>5</sub> ) (mL)	V FV (mL)	V Anisóis (mL)	V MeOH (mL)
P1	5,00	5,00	0,100	0,100	0,0125	0,010	0,275
P2	5,00	5,00	0,100	0,100	0,025	0,020	0,255
P3	5,00	5,00	0,100	0,100	0,050	0,040	0,210
P4	5,00	5,00	0,100	0,100	0,100	0,060	0,140
P5	5,00	5,00	0,100	0,100	0,150	0,080	0,070
P6	5,00	5,00	0,100	0,100	0,200	0,100	0,000

Para a medição dos volumes rigorosos dos padrões internos e de calibração foram utilizadas micropipetas automáticas de 10 – 100 µL e 20 – 200 µL (*Mettler Toledo*). Para completar o volume pela adição de metanol recorreu-se também a uma micropipeta automática de 100 – 1000 µL (*Mettler Toledo*).

### **2.1.3. Preparação das amostras**

Para *vials* de 20 mL de rosca com septo, adicionaram-se cerca de 2 g de NaCl, pipetaram-se 5 mL de água ultrapura, 5 mL de amostra de vinho e 0,100 mL de cada um dos padrões internos preparados de acordo com o descrito no ponto 2.1.1. Completou-se o volume de 10,5 mL, adicionando 0,300 mL de metanol.

### **2.1.4. Solução hidroalcoólica a 6%**

Para um balão volumétrico de 500 mL, mediu-se com proveta, aproximadamente 30 mL de etanol, completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se.

Para *vials* de 20 mL de rosca com septo, adicionaram-se cerca de 2 g de NaCl e pipetaram-se 10 mL da solução hidroalcoólica a 6%. Esta preparação foi colocada entre cada amostra a analisar com o objetivo de garantir que as preparações das amostras não sofriam contaminações devido a possíveis concentrações mais elevadas de determinados compostos em estudo (*carry-over*).

## 2.2. Método de extração – SPME

Para a extração por SPME recorreu-se a um amostrador automático Combipal MH 01-00B CTC (*Analytics AG, Zwingen, Suíça*), ilustrado na Figura 2.1. As fibras de SPME encontravam-se novas no início do estudo e foram colocadas a acondicionar, antes da primeira utilização, de acordo com as instruções do fornecedor. Relativamente às utilizações seguintes, as fibras foram colocadas a acondicionar durante meia hora no início de cada sequência de trabalho. Na Figura 2.2 ilustra-se um exemplar das fibras utilizadas. Foram testados dois tipos de fibra de SPME (*Supelco, Bellefonte, EUA*): Polidimetilsiloxano de 100  $\mu\text{m}$  de espessura (PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ) e a fibra DVB/CAR/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$  tendo-se optado pela fibra DVB/CAR/PDMS. Os estudos relativos à escolha do tipo de fibra encontram-se no capítulo 3 – Resultados e discussão. Como condições de extração estabeleceram-se 55°C para a temperatura de incubação/extração, uma velocidade de agitação de 250 rpm e 60 minutos de tempo de extração. O processo de extração decorreu em *vials* de vidro âmbar, com uma capacidade de 20 mL, num sistema de três fases ou *headspace*. Depois dos processos de extração e dessorção, a fibra foi acondicionada durante 5 minutos a 270°C, na presença de uma corrente de azoto.



Figura 2.1 – Amostrador automático Combipal MH 01-00B CTC.



Figura 2.2 – Fibra de SPME utilizada para a extração.

### 2.2.1. Diluição da amostra

No intuito de perceber a influência da diluição das amostras na análise, testaram-se em solução hidroalcoólica, diferentes concentrações de etanol: 6%, 12% e 20% (V/V). Numa fase posterior, testaram-se matrizes diferentes – um lote de vinho branco e um lote de vinho tinto – a 6% (após diluição) e 12% (V/V).

### 2.2.2. Condições de extração

Para estabelecer as condições mais apropriadas ao nível da extração estudou-se o efeito da temperatura e do tempo de extração. Foram realizadas preparações em triplicado para as temperaturas de 45 e 55°C. Relativamente ao tempo de extração foram feitos estudos em triplicado para 18, 40 e 60 minutos à temperatura de 55°C.

### 2.2.3. Efeito da adição de sal

Para estudar o efeito do sal na análise, foram elaboradas duas preparações, em triplicado, em solução hidroalcoólica a 6% (V/V). A primeira contendo cerca de 2 g de cloreto de sódio e a segunda na ausência de sal.

## 2.3. Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas recorrendo a um cromatógrafo gasoso *FocusGC*, munido de um injetor do tipo *split/splitless* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA) e uma

coluna cromatográfica capilar TG-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Como gás de arraste utilizou-se hélio com elevado grau de pureza (99,9999%), a uma pressão constante de 47 kPa. O injetor foi mantido no modo *splitless* por 2 minutos a uma temperatura constante de 250°C. A dessorção da fibra de SPME ocorreu no injetor por um período de tempo igual a 6 minutos. Relativamente ao programa de temperaturas, seguiu-se o mesmo procedimento para todas as análises efetuadas. Assim, cada análise teve início à temperatura de 50°C, a qual se manteve durante 2 minutos. Seguiu-se um aquecimento a uma velocidade de 9°C/min até atingir 147°C, mantendo-se a esta temperatura durante 0,5 minutos. Voltou a subir-se a temperatura a uma velocidade de 15°C/min até aos 230°C, permanecendo a essa temperatura durante 1 minuto. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 23,48 minutos.

## **2.4. Detecção por espectrometria de massa**

Associada à cromatografia gasosa, recorreu-se à espectrometria de massa como método de deteção. Utilizou-se um espectrómetro de massa do tipo *Ion Trap* PolarisQ (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA). A fonte de ionização e a linha de transferência foram mantidas a 250 e 280°C, respetivamente. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrónico, EI, para uma deteção MS/MS, que confere maior sensibilidade e seletividade. A emissão de corrente do filamento de ionização utilizada foi de 250 µA, gerando eletrões com 70 eV. A voltagem do multiplicador de eletrões utilizada foi de 1600 V, no entanto, por vezes, houve a necessidade de ajustar este valor, devido à perda de sensibilidade do aparelho, no sentido de garantir uma contagem total de iões de aproximadamente  $10^7$ . As restantes condições MS/MS, relativas a cada contaminante são apresentadas no capítulo 3 – Resultados e discussão. Os dados cromatográficos foram adquiridos e tratados pelo *software* X-Calibur (versão 1.4).

## **2.5. Tratamento e eliminação dos resíduos tóxicos**

Os compostos manuseados ao longo deste trabalho experimental caracterizam-se por apresentarem riscos para o Homem e para o meio ambiente, pelo que os resíduos resultantes das análises efetuadas foram, sempre que possível, recuperados, tratados ou devidamente armazenados, de acordo com os procedimentos descritos na Tabela 2.3. Deve salientar-se que, devido à toxicidade destes compostos, o seu manuseamento foi sempre realizado com luvas e sob ventilação.

**Tabela 2.3 – Procedimentos adotados no tratamento e eliminação dos resíduos resultantes das análises efetuadas.**

<b>Resíduos tóxicos</b>	<b>Procedimentos adotados</b>
Material contaminado	Lavagem com acetona, lavagem com solução de <i>extran</i> e água, lavagem com água ultrapura e secagem.
Resíduos com contaminantes	Armazenamento em recipiente apropriado, rotulado com indicação de resíduos clorados e encaminhamento para empresas especializadas no seu tratamento.

## **2.6. Validação da metodologia analítica**

Para a validação desta metodologia foram feitos estudos no que respeita à linearidade, através das curvas de calibração efetuadas e dos limiares analíticos; estudos de precisão, recorrendo à repetibilidade e precisão intermédia; e estudos de exatidão, através do cálculo de valores de recuperação para amostras fortificadas.



### 3. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentar-se-á o desenvolvimento de uma metodologia que permita a determinação de contaminantes em vinhos do Douro e vinhos do Porto, utilizando a técnica de SPME/GC-MS/MS. Este estudo possibilitou o desenvolvimento de um método para a determinação de cinco contaminantes: 4-EP, 4-EG, TCA, TeCA, e TBA.

#### 3.1. Otimização do método

A otimização do método teve em conta essencialmente as condições de SPME, nomeadamente o tipo de fibra, a diluição da amostra, as condições de extração (tempo de extração e temperatura de incubação/extração) e o efeito da adição de sal às preparações.

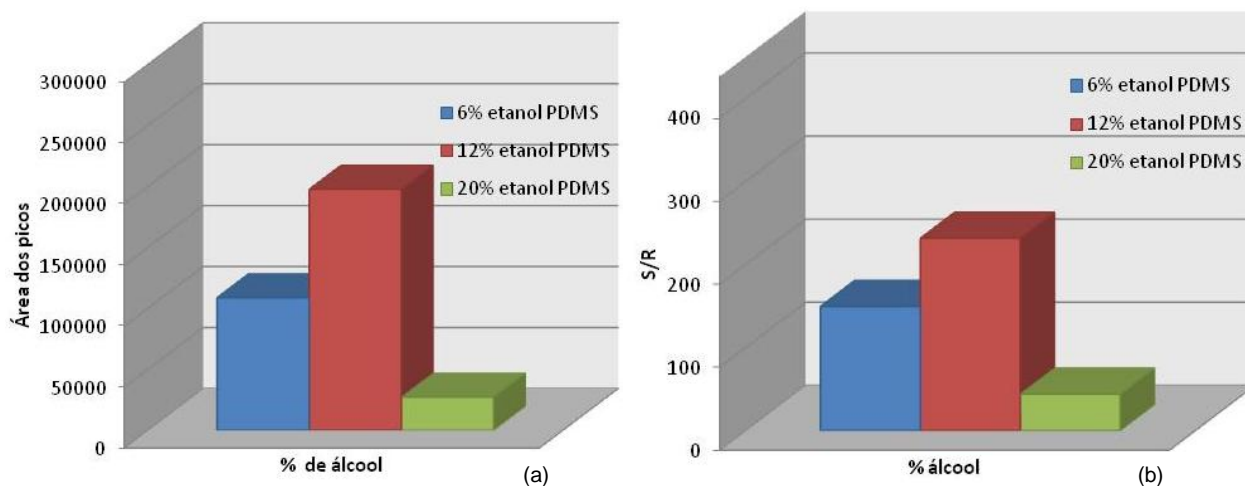
##### 3.1.1. Escolha do tipo de fibra

Tendo em conta as propriedades físico-químicas dos contaminantes em estudo, foram testados dois tipos de fibra: 100  $\mu\text{m}$  PDMS e 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS.

##### 3.1.2. Diluição da amostra

O objetivo da diluição da amostra consistiu em levar o etanol das amostras a diferentes concentrações: 6, 12 e 20% (V/V), de modo a otimizar os resultados. Foram efetuados estudos relativos à diluição da amostra para ambas as fibras testadas: 100  $\mu\text{m}$  PDMS e 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS. De acordo com trabalho de Chatonnet *et al.* [36], que serviu de base a este estudo, diluições que conduzam a uma concentração inferior a 6% (V/V) de etanol não conduzem a melhorias em termos da razão sinal/ruído para os compostos com níveis mais baixos, nomeadamente na ordem dos ng/L. Deste modo, optou-se por não se estudarem diluições superiores a 1/2. No caso dos Vinhos do Porto, uma vez que a concentração de etanol na sua composição é superior, a diluição é superior a metade, de modo a que estes vinhos sejam analisados com uma concentração de etanol semelhante à utilizada para os Vinhos do Douro.

A Figura 3.1 representa o estudo do efeito da diluição, em solução hidroalcoólica a 6, 12 e 20% (V/V), em triplicado, para o 4-Etilfenol, recorrendo à fibra 100  $\mu\text{m}$  PDMS, tendo em conta as áreas obtidas para os picos e a respetiva razão sinal/ruído.



**Figura 3.1 – Efeito da diluição (a) tendo em conta as áreas dos picos para o 4-Etilfenol e (b) as respetivas razões sinal/ruído. Condições: Fibra 100  $\mu$ m PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e 18 minutos de extração (Anexo B, Tabela B.1)**

De acordo com a análise gráfica foi possível verificar que os melhores resultados – áreas dos picos e razões sinal/ruído mais elevadas – ocorrem para ensaios sem diluição, isto é, com uma percentagem de álcool igual a 12.

Numa fase posterior do estudo, alargou-se o estudo da diluição das amostras aos cinco contaminantes: 4-EP, 4-EG, TCA, TeCA e TBA, utilizando a fibra 50/30  $\mu$ m DVB/CAR/PDMS. Aqui, foram elaborados estudos sem diluição (12% de etanol (V/V)) e diluindo a amostra a metade (6% de etanol (V/V)), recorrendo a diferentes matrizes – Lotes de Vinhos do Douro Branco e Tinto.

Assim, de acordo com a Figura 3.2 é possível verificar que os resultados em termos de resposta relativa a cada composto são melhores para as preparações diluídas a 6% de etanol (V/V). O mesmo se verifica em termos da razão sinal/ruído, tal como representa a Figura 3.3. Por este motivo, escolheu-se a diluição a 6% de etanol (V/V) que melhora a extração das moléculas em análise.

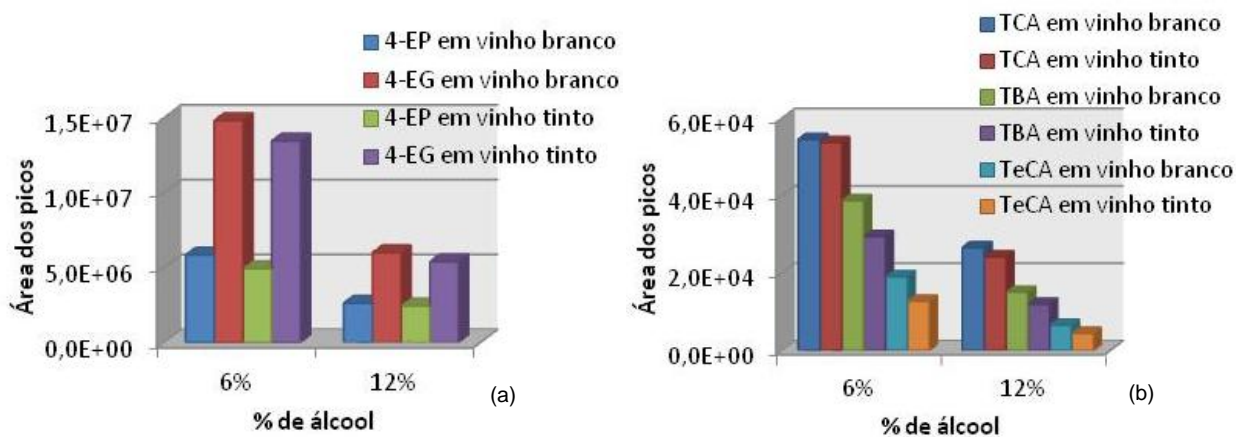


Figura 3.2 – Efeito da diluição nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis (a) e dos Anisóis (b). Condições: Fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min (Anexo B, Tabela B.2).

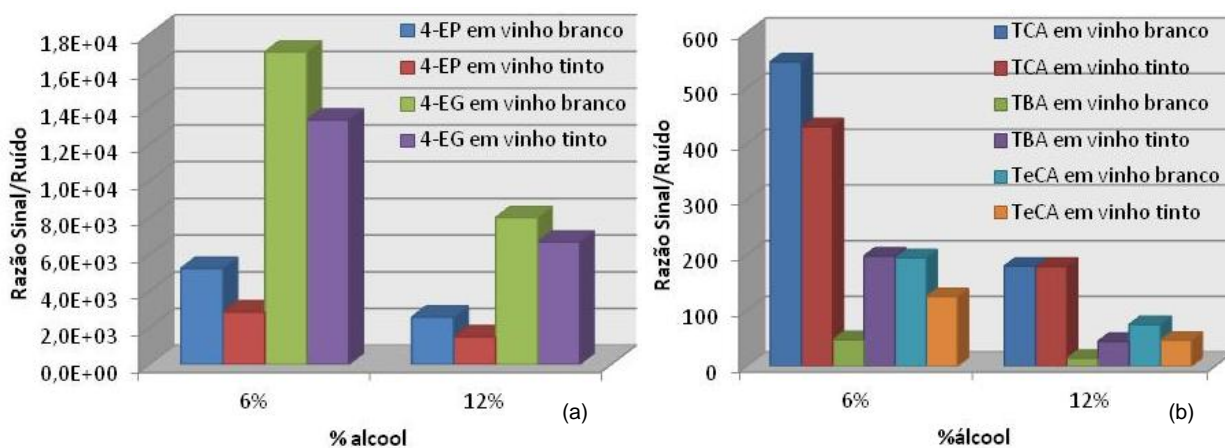


Figura 3.3 – Efeito da diluição na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min (Anexo B, Tabela B.3).

### 3.1.3. Condições de extração

Para otimizar as condições de extração, foram feitos estudos ao nível do tempo de extração, bem como da temperatura de incubação/extração.

#### 3.1.3.1. Tempo de extração

A duração da exposição da fibra no espaço de cabeça (*headspace*) é um parâmetro extremamente importante, na medida em que exerce influência sobre a “sorção” dos compostos na fase estacionária da fibra de SPME. Foram realizados estudos, para as duas fibras em estudo, utilizando preparações em triplicado e para três tempos de extração: 18, 45 e 60 minutos.

Na Figura 3.4 representam-se os estudos em termos de áreas de pico e razão sinal/ruído com a fibra 100  $\mu\text{m}$  PDMS, diluindo as amostras a 6% de etanol (V/V) e para uma temperatura de extração de 55°C. Por sua vez, a Figura 3.5 apresenta as respostas relativas e razão sinal/ruído para cada composto recorrendo à fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS.

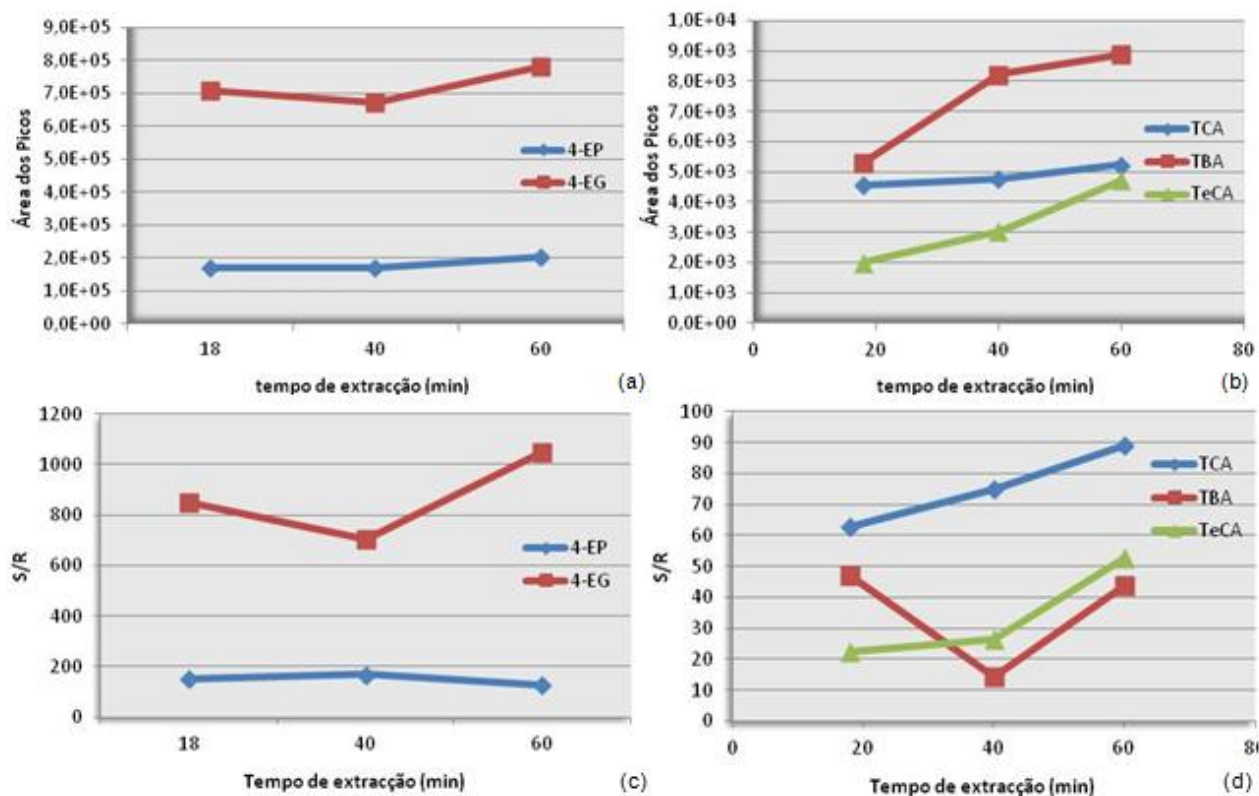


Figura 3.4 – Efeito do tempo de extração: (a, c) para os Fenóis Voláteis e (b, d) para os Anisóis. Condições: Fibra 100  $\mu\text{m}$  PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e diluição a 6% de etanol (V/V) (Anexo B, Tabela B.4 e Tabela B.5).

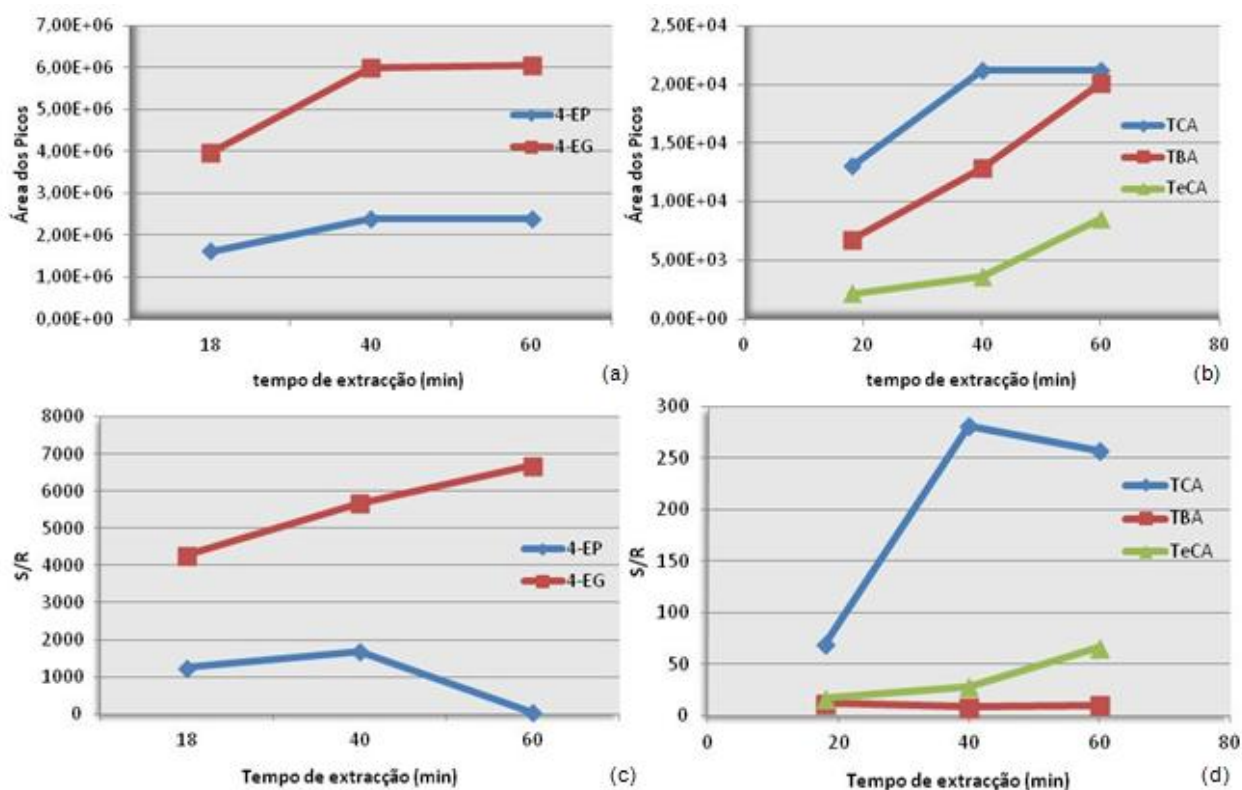


Figura 3.5 - Efeito do tempo de extração: (a, c) para os Fenóis Voláteis e (b, d) para os Anisóis. Condições: Fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e diluição a 6% de etanol (V/V) (Anexo B, Tabela B.6 e Tabela B.7).

De acordo com a análise da Figura 3.4 e da Figura 3.5, optou-se por um tempo de extração de 60 minutos. Embora os resultados obtidos para os Fenóis Voláteis, assim como para o TCA, relativamente às áreas dos picos obtidas, levem a concluir que o equilíbrio é atingido ao fim de 40 minutos de extração, o mesmo não se verifica para o TBA e para o TeCA. Ao fim de 60 minutos ainda continua a dar-se a sorção destes compostos na fase estacionária da fibra. Porém, dado que para os restantes compostos o equilíbrio havia sido atingido e que aumentar o tempo de extração para além de 60 minutos conduziria a análises extremamente demoradas, assumiu-se o compromisso de que este tempo de extração seria suficiente.

### 3.1.3.2. Temperatura de extração

Em SPME a temperatura de extração é, também, um parâmetro importante na medida em que permite o controlo da vaporização das moléculas, bem como da sua retenção na fibra. Foram estudados dois valores de temperatura: 45 e 55°C, para os dois tipos de fibra estudados (100  $\mu\text{m}$  PDMS, Figura 3.6 e 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, Figura 3.7).

A temperatura considerada ótima para continuar com os estudos foi de 55°C. De acordo com a Figura 3.7, a resposta dos componentes, em geral, melhora a esta temperatura. No entanto, nota-se um ligeiro decréscimo na resposta do TCA, enquanto para o 4-etilfenol a resposta é semelhante para as duas temperaturas estudadas.

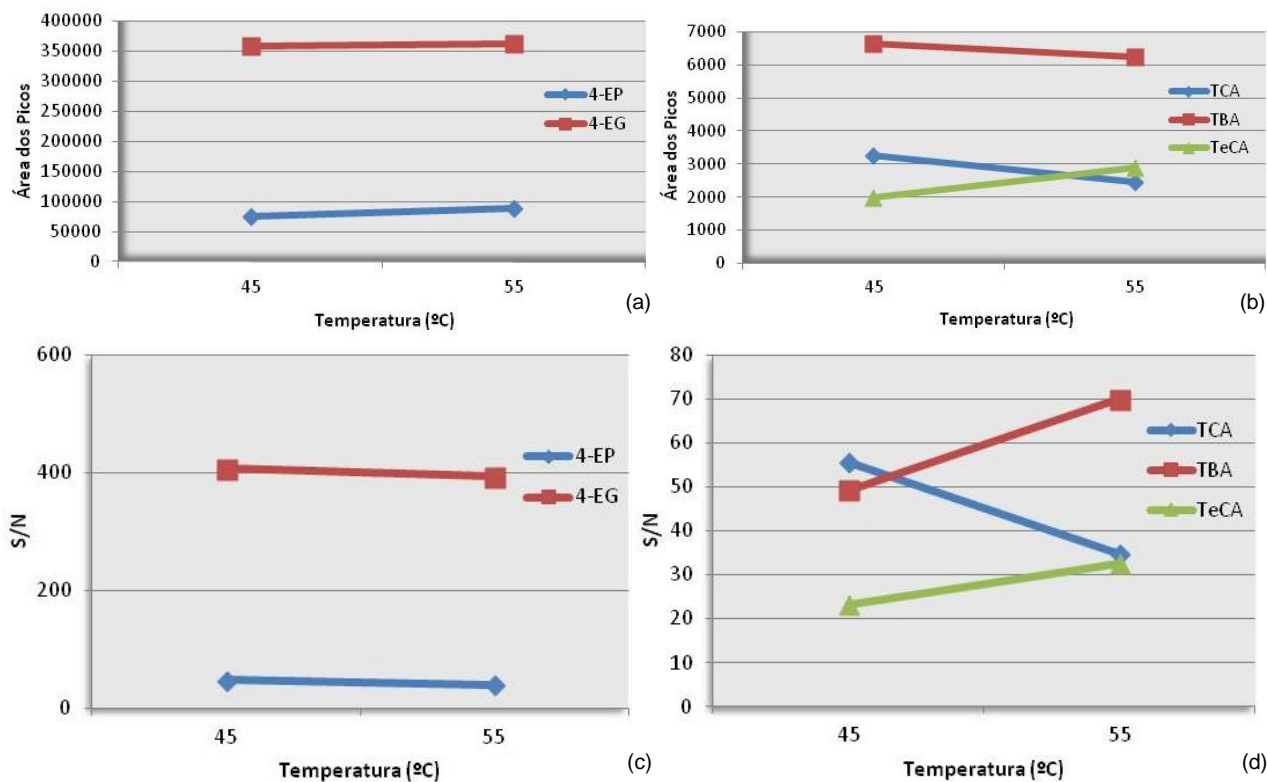


Figura 3.6 – Efeito da temperatura na extração: (a, c) nos Fenóis Voláteis e (b, d) nos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, 60 minutos de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.8 e Tabela B.9).

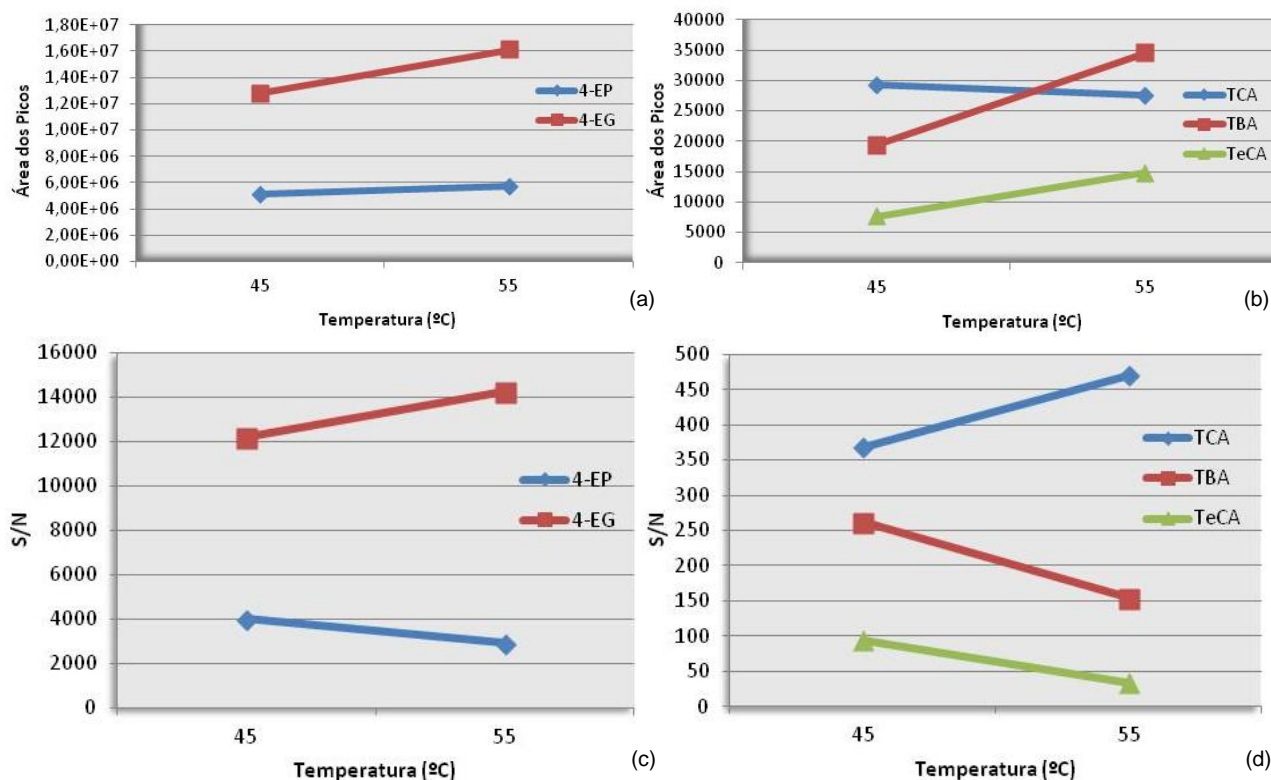


Figura 3.7 - Efeito da temperatura na extração: (a) nos Fenóis Voláteis e (b) nos Anisóis. Condições: Fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, 60 minutos de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.410 e Tabela B.11).

Uma vez que a fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS mostrou melhores resultados em termos de áreas de pico mais elevadas e melhores relações sinal/ruído para todas as condições de extração estudadas, optou-se por este tipo de fibra para prosseguir com os estudos.

### 3.1.4. Efeito da adição de sal

Estabelecidas as condições de extração, procedeu-se ao estudo do efeito da adição de sal na extração dos compostos (Figura 3.8). Estudaram-se duas possibilidades: a ausência e a adição de aproximadamente 2 g de NaCl. Conclui-se que a extração melhora substancialmente com a adição de sal às preparações, tal como seria de esperar, pois o aumento da força iônica da solução favorece a transferência dos analitos para a fase gasosa.

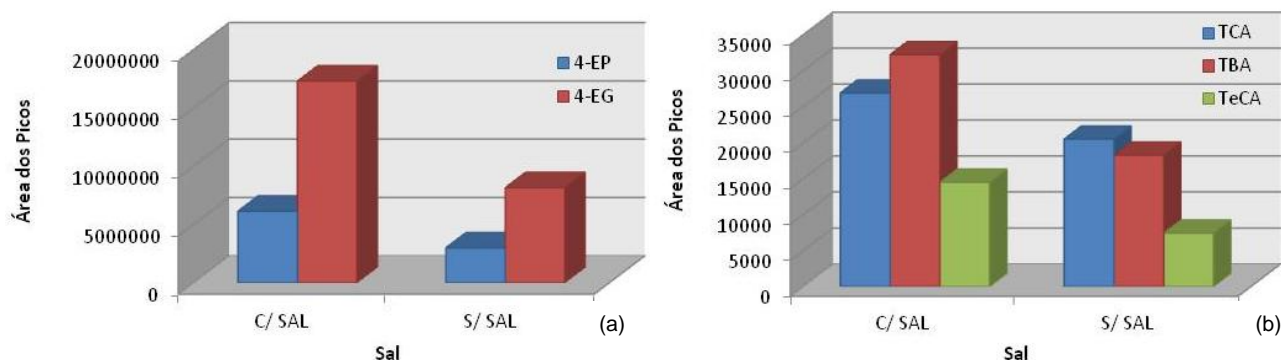


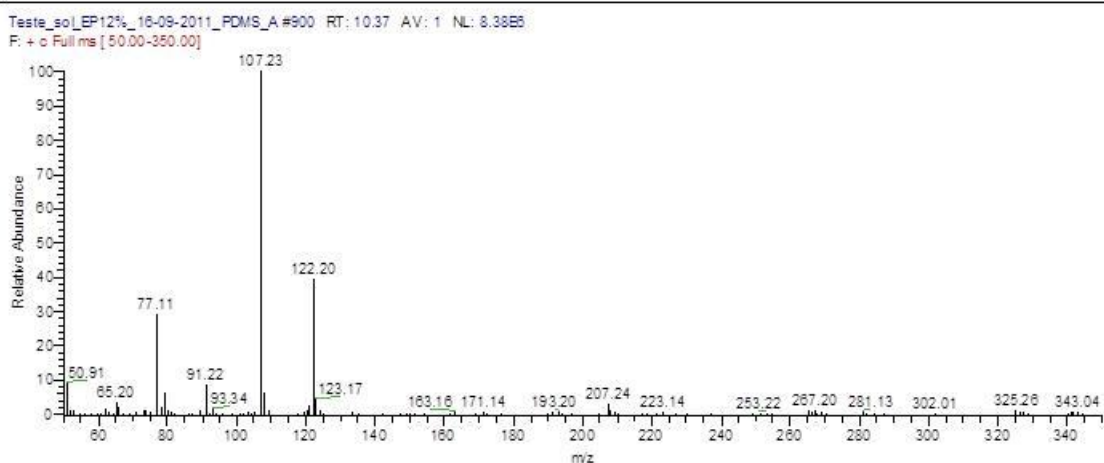
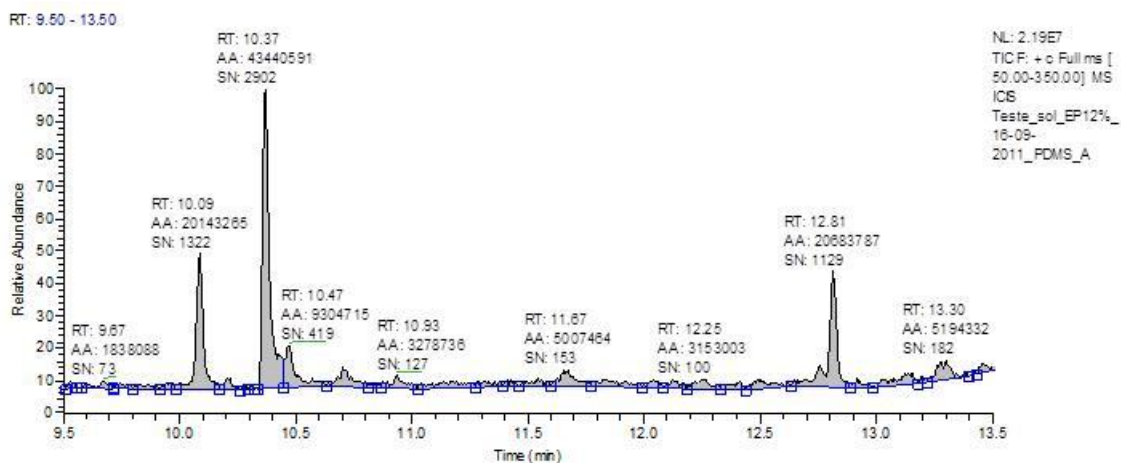
Figura 3.8 – Efeito da adição do sal: (a) nos Fenóis Voláteis e (b) nos Anisóis. Condições: Fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, 55°C de temperatura de incubação/extração e 60 minutos de tempo de extração e diluição a 6% de etanol (Anexo B, Tabela B.512).

### 3.1.5. Condições MS/MS adotadas e gama de concentrações

Considerando as condições cromatográficas descritas no ponto 2.3, otimizaram-se as condições de deteção MS/MS para a determinação dos contaminantes, tal como se representa na Tabela 3.1. Os valores referentes aos tempos de isolamento do ião precursor e de excitação adotados são os valores assumidos por defeito pelo *software*. A voltagem de excitação e o ião precursor foram escolhidos após estudos prévios de otimização.

Estes estudos foram realizados numa fase inicial do trabalho, pelo que se utilizou a fibra 100  $\mu\text{m}$  PDMS. Os tempos de retenção foram obtidos através da análise cromatográfica com deteção MS de padrões individuais concentrados de cada um dos compostos, seguida da confirmação dos espetros de massa, recorrendo à biblioteca de espetros NIST (versão 2.0).

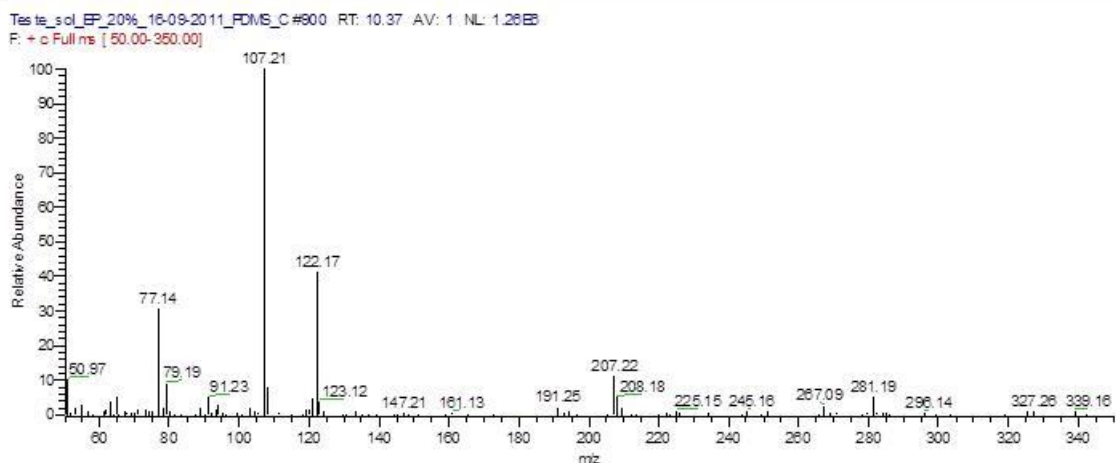
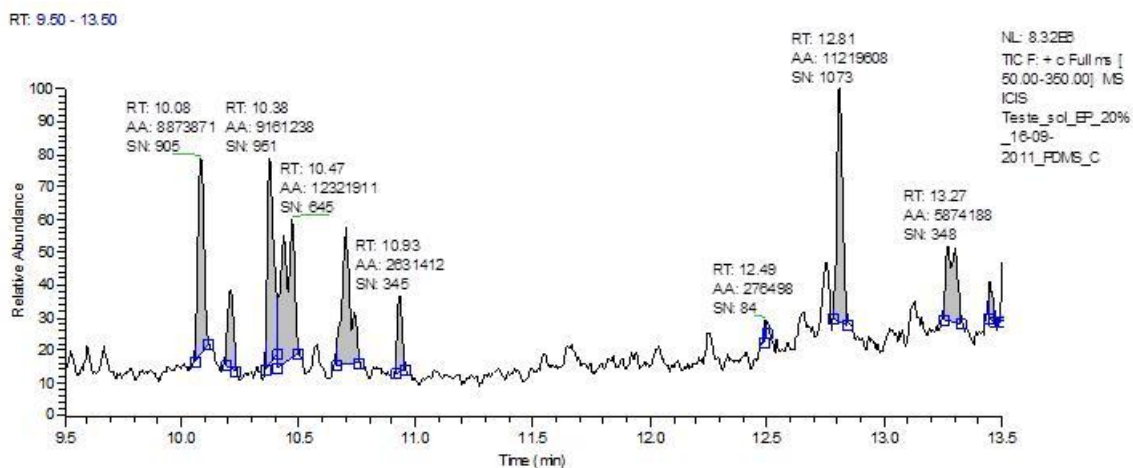
Inicialmente, foram realizadas preparações independentes em solução hidroalcoólica a 12 e 20% (V/V) em etanol, no modo *full scan*, de modo a tentar perceber qual seria o tempo de retenção para cada um dos compostos em estudo. Na Figura 3.9 encontram-se representados o cromatograma e o espetro de massa obtidos para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) em etanol, enquanto a Figura 3.10 corresponde ao estudo em solução hidroalcoólica a 20% (V/V) em etanol. Cada um destes espetros de massa foi comparado com o espetro de massa proveniente da biblioteca de espetros NIST (anexo C).



**Figura 3.9 – Cromatograma e respetivo espetro de massa obtido para o 4-EP, em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) e modo *full scan*.**

Analisando cada um dos picos obtidos na Figura 3.9 é possível verificar que o pico correspondente ao tempo de retenção de 10,37 minutos apresenta um espetro semelhante ao da biblioteca de espetros NIST para o 4-EP, com os fragmentos 122, 107 e 77.

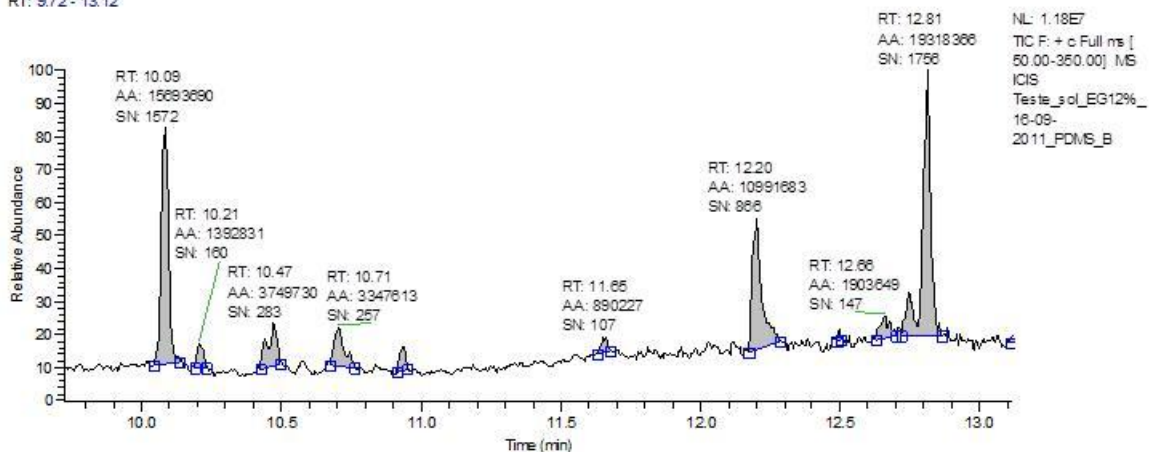
Tal como na Figura 3.9, também na Figura 3.10 é possível verificar que o espetro característico do 4-EP ocorre aos 10,37 minutos.



**Figura 3.10 – Cromatograma e respetivo espetro de massa obtido para o 4-EP, em solução hidroalcoólica a 20% (V/V) e modo *full scan*.**

O mesmo estudo foi realizado para o 4-EG, representando-se nas Figuras 3.11 e 3.12 os cromatogramas e respetivos espetros obtidos em preparações independentes de solução hidroalcoólica a 12 e 20% (V/V).

RT: 9.72 - 13.12



Teste\_s\_of\_EG12%\_16-09-2011\_PDMS\_B#1205 RT: 12.20 AV: 1 NL: 1.58E7  
F: + c Full ms [ 50.00-350.00]

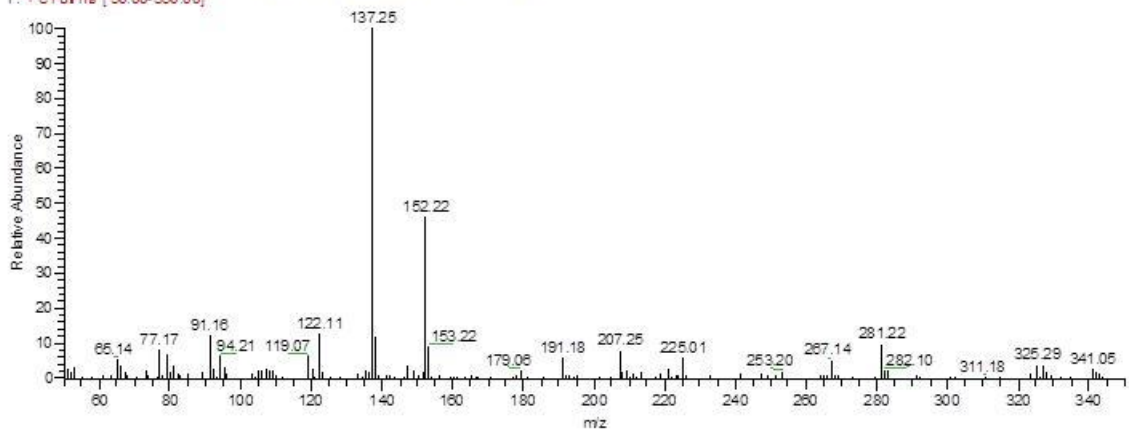
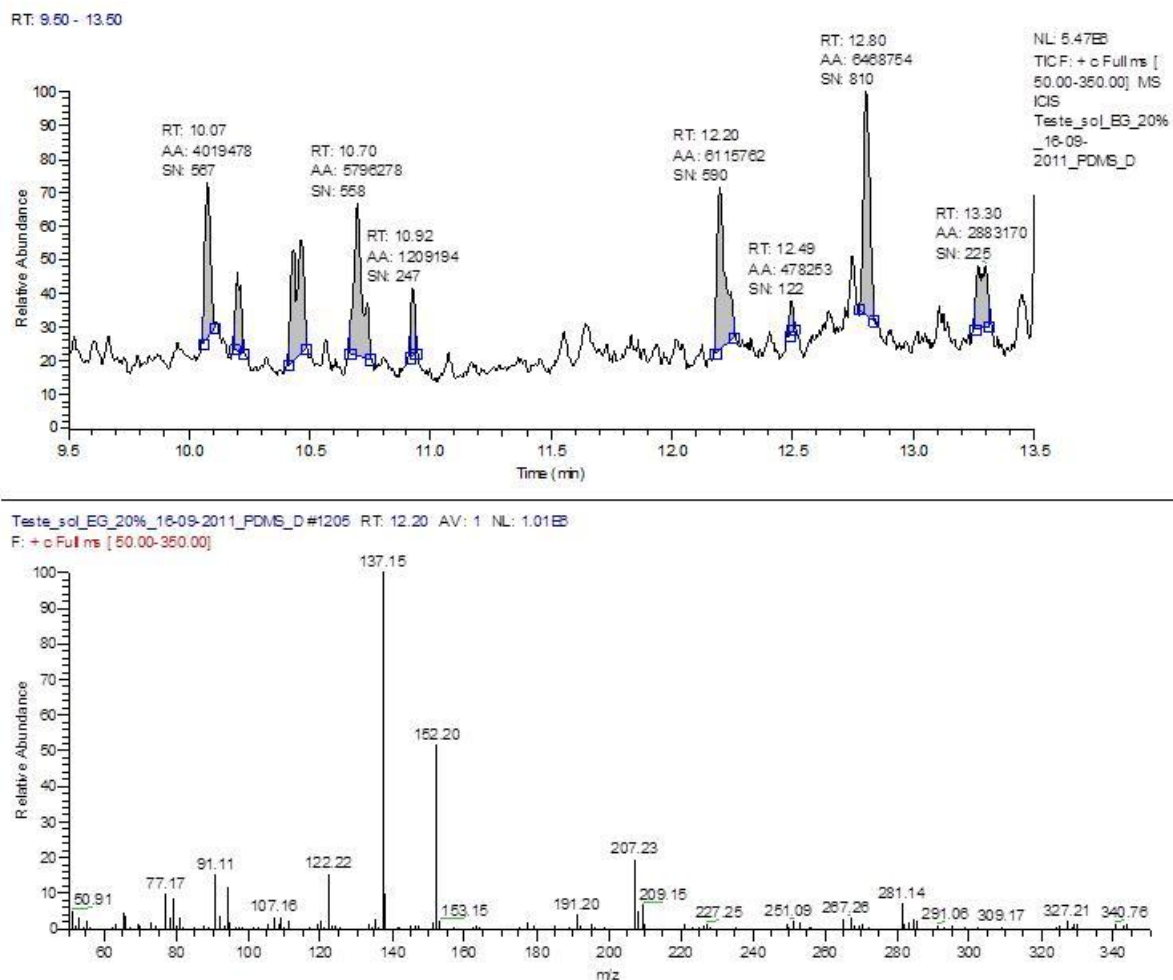


Figura 3.11 – Cromatograma e respetivo espetro de massa obtido para o 4-EG, em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) e modo *full scan*.

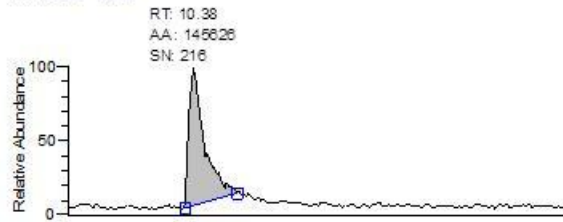


**Figura 3.12 – Cromatograma e respetivo espetro de massa obtido para o 4-EG, em solução hidroalcoólica a 20% (V/V) e modo *full scan*.**

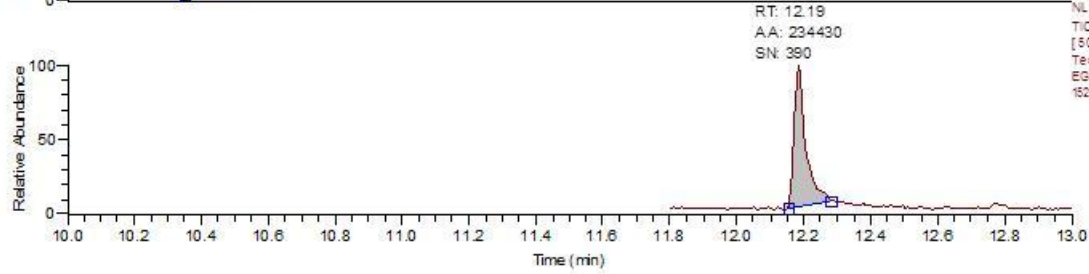
De acordo com as Figuras 3.11 e 3.12 consegue-se um espetro de massa semelhante ao obtido pela biblioteca de espetros NIST aos 12,20 minutos, apresentando os iões de relação  $m/z$  152, 137, 122 e 94 como fragmentos.

Estudados os resultados obtidos em *full scan*, procedeu-se à análise cromatográfica com deteção MS de cada composto, em soluções hidroalcoólica a 6 e 12% (V/V) em etanol. Foram analisados os resultados fragmentando o ião de relação  $m/z$  152 para o 4-EG e 122 para o 4-EP, representados nas Figuras 3.13 e 3.14.

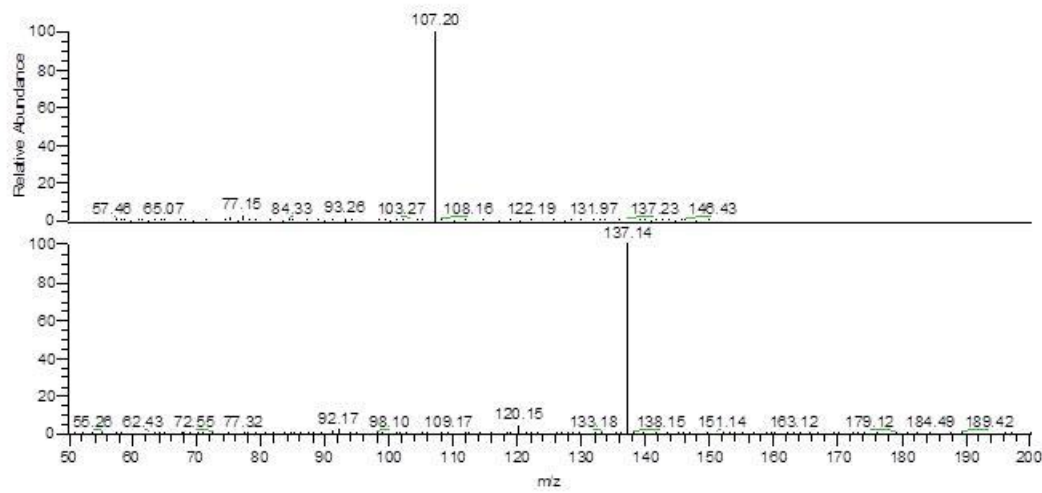
RT: 10.00 - 13.00



NL: 477E4  
TIC F: +o SRM m/z 122.00@120  
[57.00-150.00] MS ICIS  
Teste\_60\_EP+  
EG6%\_21-09-2011\_PDMS\_122+  
152\_MSMS01



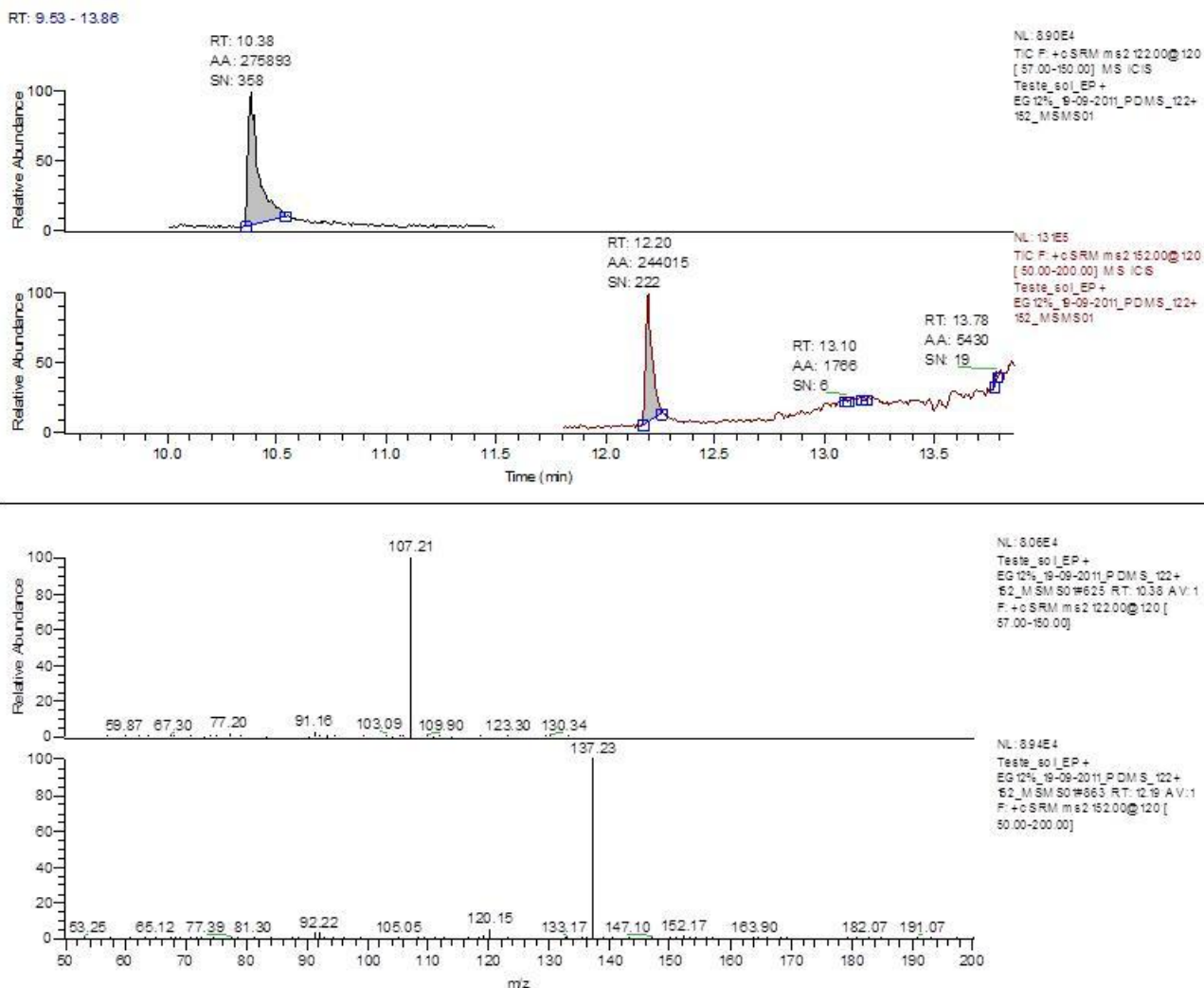
NL: 100E5  
TIC F: +o SRM m/z 122.00@120  
[50.00-200.00] MS ICIS  
Teste\_60\_EP+  
EG6%\_21-09-2011\_PDMS\_122+  
152\_MSMS01



NL: 428E4  
Teste\_60\_EP+  
EG6%\_21-09-2011\_PDMS\_122+  
152\_MSMS01#616 RT: 10.38 AV: 1  
F: +o SRM m/z 122.00@120 [57.00-150.00]

NL: 833E4  
Teste\_60\_EP+  
EG6%\_21-09-2011\_PDMS\_122+  
152\_MSMS01#652 RT: 12.18 AV: 1  
F: +o SRM m/z 122.00@120 [50.00-200.00]

Figura 3.13 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o íon de relação  $m/z$  152 para o 4-EG e 122 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 6% (V/V) em etanol.



**Figura 3.14 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o íon de relação  $m/z$  152 para o 4-EG e 122 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) em etanol.**

De acordo com as Figuras 3.13 e 3.14 é possível confirmar os tempos de retenção obtidos através dos testes em *full scan* para estes compostos. Para o 4-EP, fragmentando o íon de relação  $m/z$  122, obtém-se o fragmento 107 como mais intenso. Já para o 4-EG obtém-se o fragmento 137 como sendo o mais intenso.

Nas Figuras 3.15 e 3.16 encontram-se representados os cromatogramas e correspondentes espectros de massa para o 4-EP e para o 4-EG em solução hidroalcoólica a 6 e 12% (V/V), fragmentando os íões de relação  $m/z$  137 e 107, respetivamente.

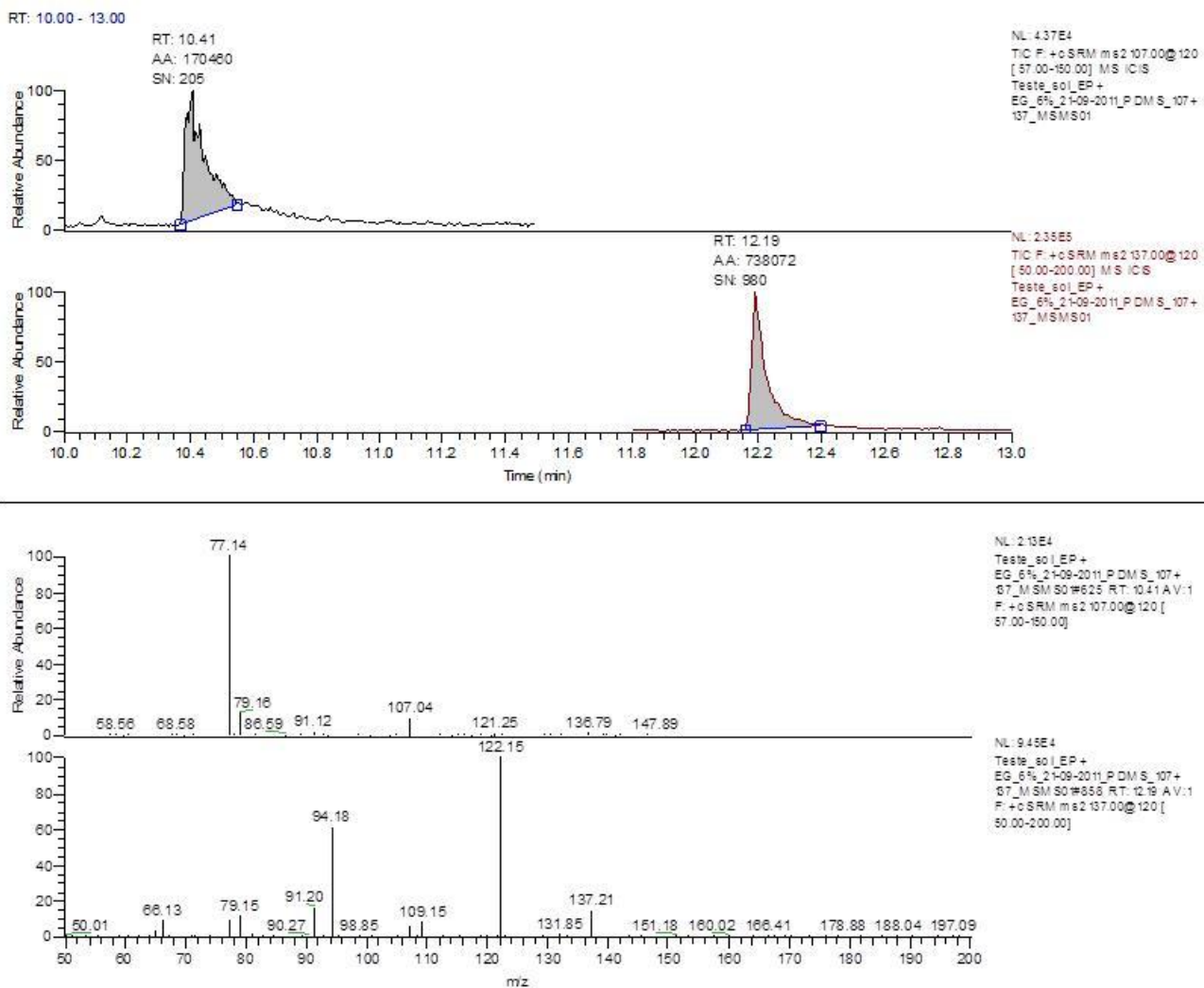
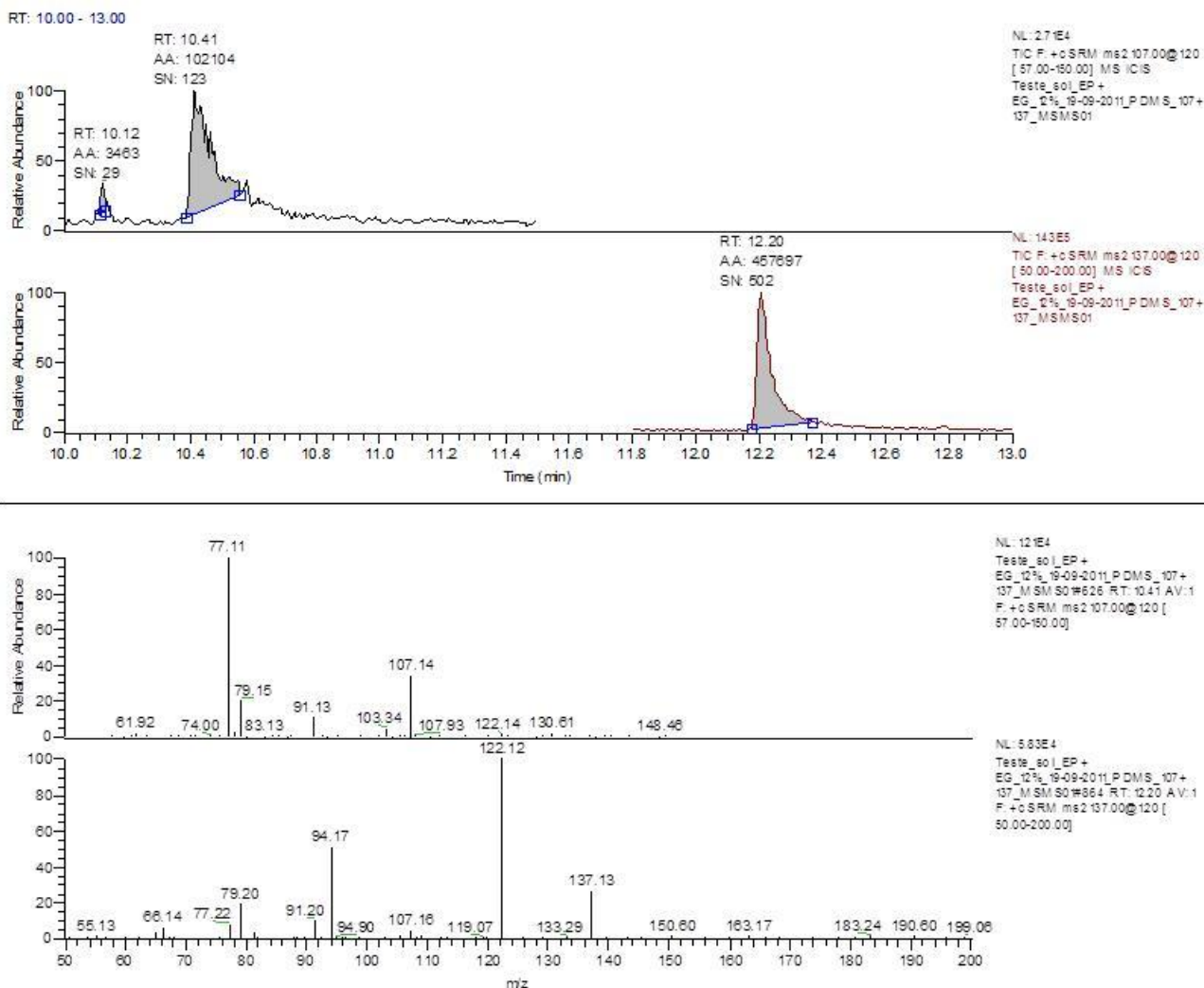


Figura 3.15 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o íon de relação  $m/z$  137 para o 4-EG e 107 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 6% (V/V) em etanol.

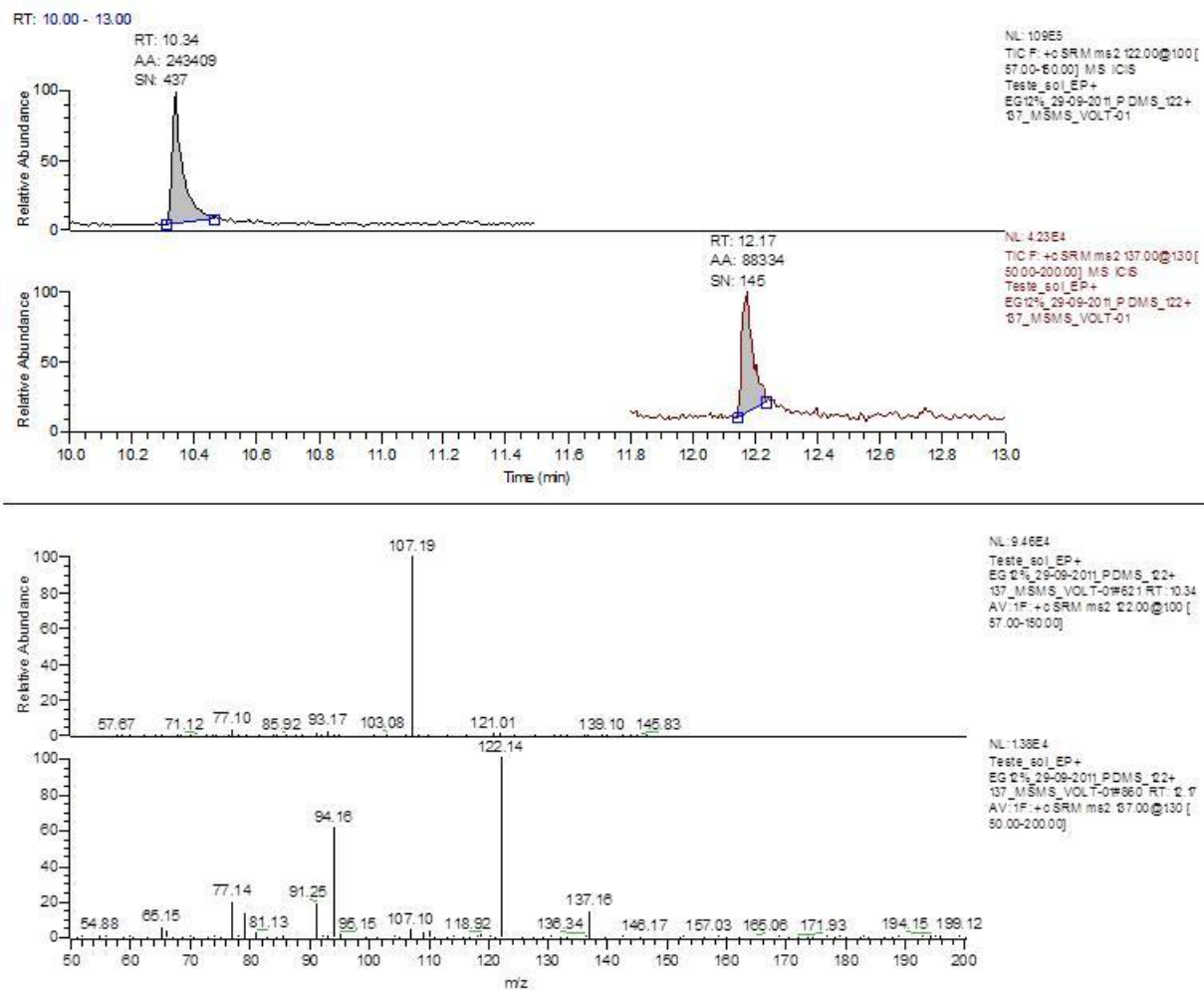


**Figura 3.16 – Cromatograma e espectro de massa obtido fragmentando o íon de relação  $m/z$  137 para o 4-EG e 107 para o 4-EP em solução hidroalcoólica a 12% (V/V) em etanol.**

Tal como se tinha verificado anteriormente, também as Figuras 3.15 e 3.16 confirmam os tempos de retenção obtidos através dos testes em *full scan* para estes compostos. Neste caso, fragmentando o íon de relação  $m/z$  107, para o 4-EP, obtêm-se os fragmentos 77 (mais intenso) e 107, enquanto para o 4-EG, fragmentando o íon 152, se obtêm os fragmentos 94, 122 (mais intenso) e 137.

Relativamente ao 4-EG optou-se por continuar os estudos fragmentando o íon 137 uma vez que apresenta melhores relações sinal/ruído. Já para o 4-EP, optou-se por fragmentar o íon 122 que verifica melhores resultados em termos de curvas de calibração e na quantificação do analito nas amostras.

Na Figura 3.17 apresenta-se um exemplo dos testes relativos à voltagem de fragmentação a utilizar para os Fenóis Voláteis.



**Figura 3.17 – Exemplo de um teste de voltagem de fragmentação para os Fenóis Voláteis. Condições: 1,0V para o 4-EP e 1,3V para o 4-EG.**

A Figura 3.17 é composta pelo cromatograma obtido para cada composto (4-EP e 4-EG, respectivamente) e espectros de massa correspondentes. Estes estudos foram realizados fragmentando o íon de relação  $m/z$  122, para o 4-EP, e 137 para o 4-EG.

A quantificação de cada um dos contaminantes foi efetuada através da contagem total dos íões resultantes da fragmentação do íon precursor. Na Tabela 3.1, indicam-se os íões que apresentam maior abundância relativa para cada um dos compostos e que são usados como íões qualificadores/quantificadores.

**Tabela 3.1 – Condições de MS/MS adotadas para o método proposto para a determinação de contaminantes em vinhos por SPME/GC-MS/MS.**

Composto	Isolamento			Excitação			Fragmentos MS/MS (m/z)
	Íon precursor (m/z)	Janela (m/z)	Tempo (ms)	Voltagem (V)	Tempo (ms)	Energia (V)	
TCA	212	2,0	12	1,30	15	0,45	197, 169
TBA	346	2,0	12	1,30	15	0,45	331, 303
TeCA	246	2,0	12	1,30	15	0,45	246, 231,203
4-EP	122	2,0	12	1,20	15	0,30	107
4-EG	137	2,0	12	1,20	15	0,30	137, 122, 94
TCA-d <sub>5</sub>	217	2,0	12	1,20	15	0,45	199, 171
3,4-DMP	122	2,0	12	1,20	15	0,30	107, 91, 77

Usando as condições cromatográficas já descritas, apresentam-se na Tabela 3.2 as gamas de concentração usadas para traçar as curvas de calibração correspondentes a cada um dos contaminantes em estudo, assim como os respectivos tempos de retenção.

**Tabela 3.2 – Gamas de concentração para cada um dos contaminantes em estudo e respectivos tempos de retenção.**

Composto	Tempo de retenção (min)	Gama de concentrações (unidades)
TCA	12,93	[5 – 50] (ng/L)
TeCA	16,98	[5 – 50] (ng/L)
TBA	16,57	[5 – 50] (ng/L)
4-EP	10,35	[100 – 1800] (µg/L)
4-EG	12,12	[30 – 500] (µg/L)

Os tempos de retenção foram obtidos através da análise cromatográfica com detecção MS de padrões individuais concentrados de cada um dos compostos, seguida da confirmação dos espectros de massa, recorrendo à biblioteca de espectros NIST. Por sua vez, as gamas de concentração foram escolhidas de modo a permitir a quantificação dos contaminantes, tendo em

conta os valores de concentração que são referidos na bibliografia e também os limites de percepção nos vinhos.

As propriedades físico-químicas destes compostos encontram-se descritas na Tabela D.6 do anexo D.

## **3.2. Validação do método**

A validação desta metodologia consistiu na realização de estudos dos seguintes parâmetros: aplicabilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão. No Anexo E são apresentados todos os resultados experimentais que foram utilizados para a validação do método.

### **3.2.1. Aplicabilidade**

A metodologia em estudo aplica-se à análise de contaminantes como o 4-EP, 4-EG, TCA, TeCA e TBA em Vinhos do Douro. Foram também analisadas duas amostras de Vinho do Porto. Uma vez que a percentagem de álcool nos Vinhos do Porto é superior à dos Vinhos do Douro, a sua diluição foi diferente, sendo de aproximadamente três vezes, de modo a que a preparação sujeita a análise apresentasse uma concentração de etanol de cerca de 6% (V/V).

### **3.2.2. Linearidade e limiares analíticos**

Para o estudo da linearidade foram elaboradas calibrações diárias, com matriz, usando vinho de um lote de Vinho do Douro Tinto. Esta matriz foi previamente analisada, não tendo sido detetada a presença de nenhum dos contaminantes em estudo.

A quantificação dos diversos contaminantes com recurso à técnica de SPME pode ser efetuada recorrendo a diferentes métodos de calibração, nomeadamente ao método do padrão interno, da adição de padrão e ao método do padrão externo. O método de calibração adotado foi o método do padrão interno, que visa a utilização de uma referência com características similares à do analito que pode ser adicionada a amostras, padrões e brancos. O sinal de resposta é o correspondente à razão entre o sinal do analito e o do padrão interno. Este método permite compensar determinados efeitos que influenciem tanto o analito como a referência, com a mesma intensidade. Nas Tabelas 3.3 a 3.7 apresentam-se as curvas de calibração obtidas para cada um dos contaminantes estudados, assim como os respetivos coeficientes de correlação e limites de detecção e de quantificação obtidos.

As curvas de calibração apresentadas foram obtidas através da fortificação de amostras de lote de vinho tinto com seis níveis de concentração e apenas uma preparação por nível de

concentração. Para a sua representação recorreu-se à razão das áreas dos picos de contaminante e do respetivo padrão interno em função da concentração dos padrões de calibração utilizados.

Os limites de deteção e de quantificação foram determinados de acordo com as Equações 10 e 11 (1.5.3. Limiares analíticos do método de ensaio).

**Tabela 3.3 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o 4-Etilfenol.**

Data	Equação da curva de calibração	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	L.D. (µg/L)	L.Q. (µg/L)
30/03/2012	$y = 0,0007360x + 0,02875$	0,9920	0,051	228	690
02/04/2012	$y = 0,0008726x - 0,02730$	0,9981	0,063	239	724
18/04/2012	$y = 0,0007624x - 0,03453$	0,9989	0,034	146	443
20/04/2012	$y = 0,0006305x - 0,02008$	0,9986	0,028	146	443
14/05/2012	$y = 0,0006780x - 0,04002$	0,9970	0,013	65	196
25/05/2012	$y = 0,0014451x - 0,06347$	0,9997	0,053	121	366
14/06/2012	$y = 0,0007736x - 0,00724$	0,9900	0,064	272	825
19/06/2012	$y = 0,0011170x - 0,14818$	0,9848	0,197	583	1766

**Tabela 3.4 – Curvas de calibração e respetivos limites de deteção e de quantificação para o 4-Etilguaicol.**

Data	Equação da curva de calibração	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	L.D. (µg/L)	L.Q. (µg/L)
30/03/2012	$y = 0,0073207x + 0,16238$	0,9959	0,091	41	124
02/04/2012	$y = 0,0105381x - 0,12938$	0,9955	0,170	53	162
18/04/2012	$y = 0,0038693x - 0,05393$	0,9964	0,023	20	60
20/04/2012	$y = 0,0035906x - 0,04785$	0,9906	0,053	48	147
14/05/2012	$y = 0,0033417x - 0,06257$	0,9890	0,010	10	31
25/05/2012	$y = 0,0060962x - 0,07894$	0,9980	0,095	51	156
14/06/2012	$y = 0,0037069x - 0,03697$	0,9955	0,057	51	153
19/06/2012	$y = 0,0052750x - 0,17997$	0,9825	0,208	130	395

**Tabela 3.5 – Curvas de calibração e respectivos limites de detecção e de quantificação para o TCA.**

Data	Equação da curva de calibração	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	L.D. (ng/L)	L.Q. (ng/L)
30/03/2012	$y = 0,016835x - 0,00162$	0,9963	0,020	3,9	11,9
02/04/2012	$y = 0,018821x - 0,07781$	0,9911	0,048	8,4	25,6
18/04/2012	$y = 0,017279x - 0,03543$	0,9921	0,007	1,4	4,3
20/04/2012	$y = 0,019249x - 0,04341$	0,9950	0,020	3,5	10,5
14/05/2012	$y = 0,018614x - 0,03271$	0,9991	0,028	4,9	14,9
25/05/2012	$y = 0,016616x - 0,04669$	0,9878	0,030	5,9	17,9
14/06/2012	$y = 0,022339x - 0,05505$	0,9805	0,053	7,8	23,7
15/06/2012	$y = 0,017394x - 0,05386$	0,9928	0,073	13,8	41,8
19/06/2012	$y = 0,016804x - 0,03603$	0,9987	0,037	7,3	22,0

**Tabela 3.6 – Curvas de calibração e respectivos limites de detecção e de quantificação para o TBA.**

Data	Equação da curva de calibração	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	L.D. (ng/L)	L.Q. (ng/L)
30/03/2012	$y = 0,013019x + 0,12487$	0,9948	0,018	4,7	14,1
02/04/2012	$y = 0,016662x + 0,01435$	0,9951	0,023	4,5	13,5
18/04/2012	$y = 0,014825x - 0,01335$	0,9990	0,024	5,4	16,3
20/04/2012	$y = 0,009136x - 0,01555$	0,9947	0,029	10,6	32,0
14/05/2012	$y = 0,019404x - 0,08442$	0,9728	0,019	3,2	9,8
25/05/2012	$y = 0,010199x - 0,00288$	0,9853	0,053	17,0	51,6
14/06/2012	$y = 0,010444x - 0,00165$	0,9976	0,019	5,9	17,8
15/06/2012	$y = 0,008684x - 0,02231$	0,9960	0,001	0,4	1,1
19/06/2012	$y = 0,005987x + 0,03775$	0,9929	0,003	1,8	5,5

**Tabela 3.7 – Curvas de calibração e respectivos limites de detecção e de quantificação para o TeCA.**

Data	Equação da curva de calibração	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	L.D. (ng/L)	L.Q. (ng/L)
30/03/2012	$y = 0,007254x - 0,03395$	0,9921	0,012	5,4	16,3
02/04/2012	$y = 0,006893x - 0,01507$	0,9944	0,013	6,3	19,0
18/04/2012	$y = 0,006697x - 0,02187$	0,9990	0,012	6,0	18,2
20/04/2012	$y = 0,002243x + 0,00144$	0,9924	0,005	6,7	20,2
14/05/2012	$y = 0,006949x + 0,00757$	0,9920	0,012	5,5	16,6
25/05/2012	$y = 0,005436x - 0,00411$	0,9992	0,012	7,1	21,5
14/06/2012	$y = 0,005174x - 0,04587$	0,9872	0,014	8,9	26,9
15/06/2012	$y = 0,003107x - 0,00585$	0,9944	0,013	14,1	42,8
19/06/2012	$y = 0,003312x - 0,01012$	0,9994	0,005	5,3	15,9

De acordo com os resultados apresentados, na generalidade, os compostos apresentam boa linearidade para as gamas de concentração estudadas. Obtiveram-se coeficientes de correlação ( $R^2$ ) superiores a 0,99 para todos os compostos, no entanto, algumas curvas de calibração apresentam um valor de  $R^2$  inferior. É, ainda possível verificar que as diversas calibrações para cada composto apresentam diferenças, sobretudo ao nível do valor da ordenada na origem. Estes resultados podem estar relacionados com a sensibilidade do aparelho, cuja resposta apresenta variações de dia para dia e com o desgaste da fibra de SPME. O valor de  $R^2$  mais elevado foi conseguido para o 4-EP (0,9997), enquanto o mais baixo pertence ao TBA (0,9728).

As Figuras 3.18 a 3.22 representam um exemplo das curvas de calibração obtidas para cada um dos analitos em estudo.

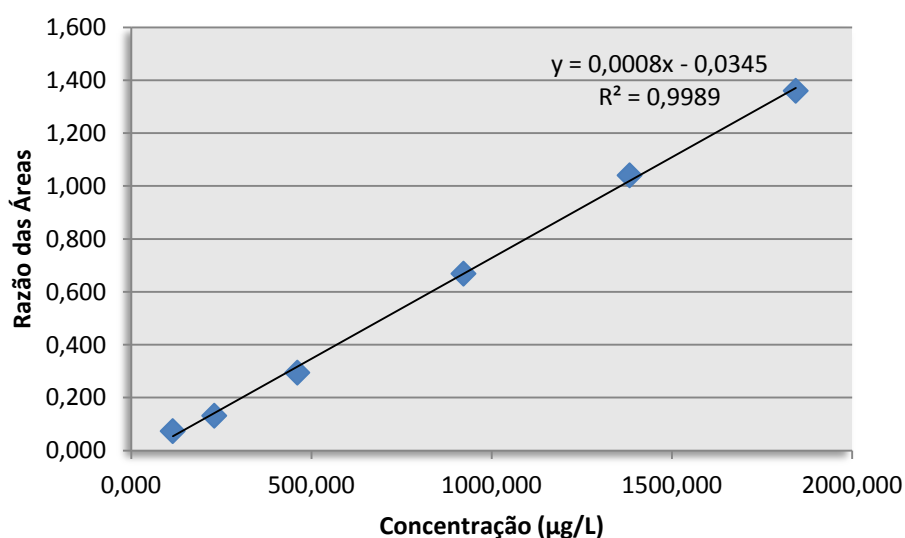


Figura 3.18 – Curva de calibração obtida para o 4-EP, em 18/04/2012.

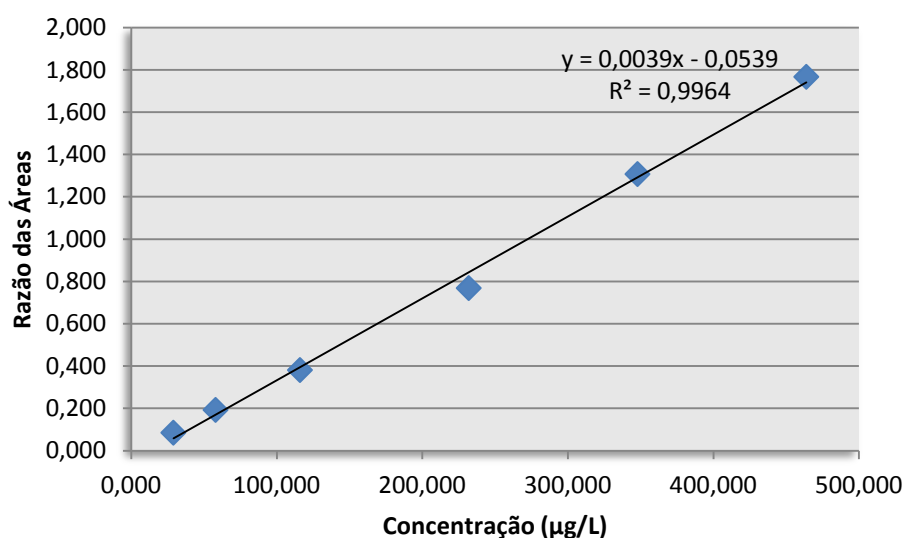


Figura 3.19 – Curva de calibração obtida para o 4-EG, em 18/04/2012.

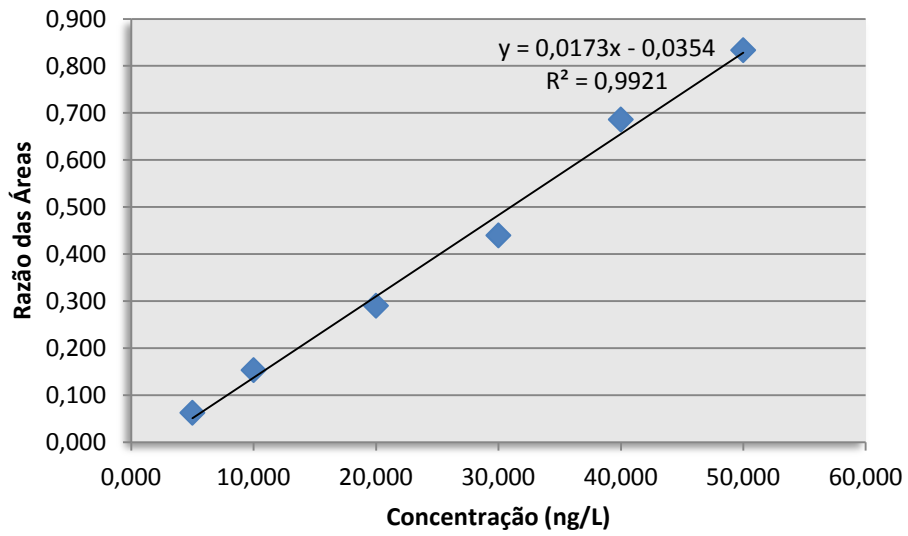


Figura 3.20 – Curva de calibração obtida para o TCA, em 18/04/2012.

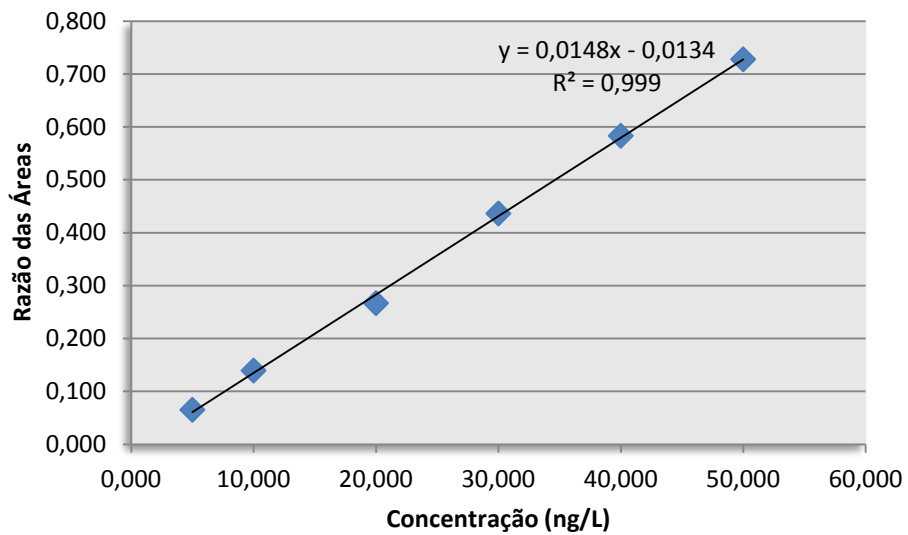


Figura 3.21 – Curva de calibração obtida para o TBA, em 18/04/2012.

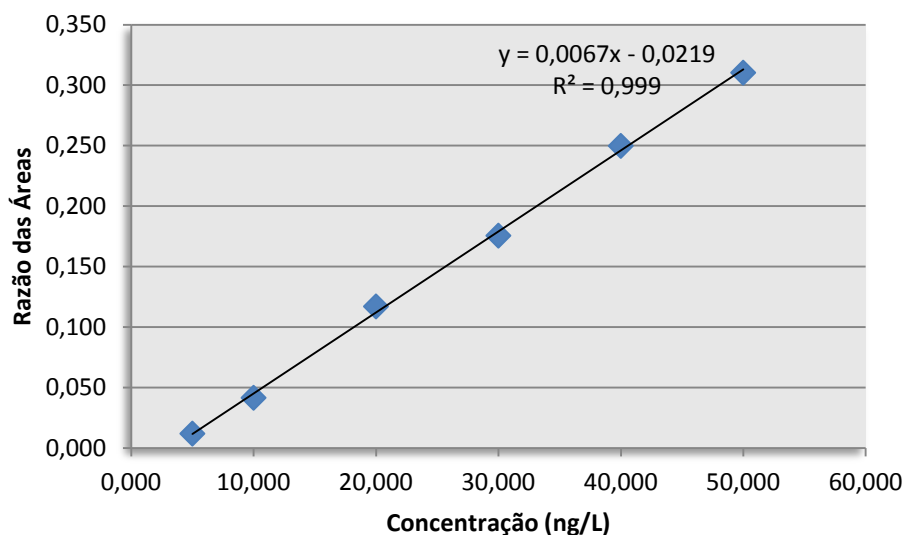


Figura 3.22 – Curva de calibração obtida para o TeCA, em 18/04/2012.

Nas Figuras 3.23 a 3.27 encontram-se representadas as concentrações calculadas em função das concentrações de cada padrão de calibração, para cada um dos compostos, em matriz de Vinho do Douro Tinto. As curvas de calibração obtidas apresentam, para cada nível de concentração, uma determinada concentração calculada. Fazendo a média de todas as concentrações calculadas por nível de concentração obtém-se uma concentração média calculada que pode ser comparada com o valor da concentração teórica do respetivo padrão de calibração.

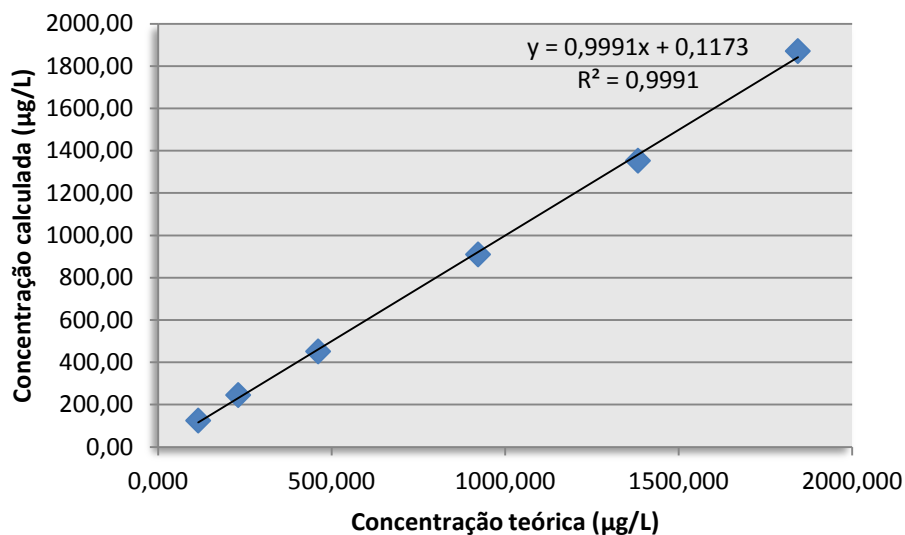


Figura 3.23 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o 4-EP.

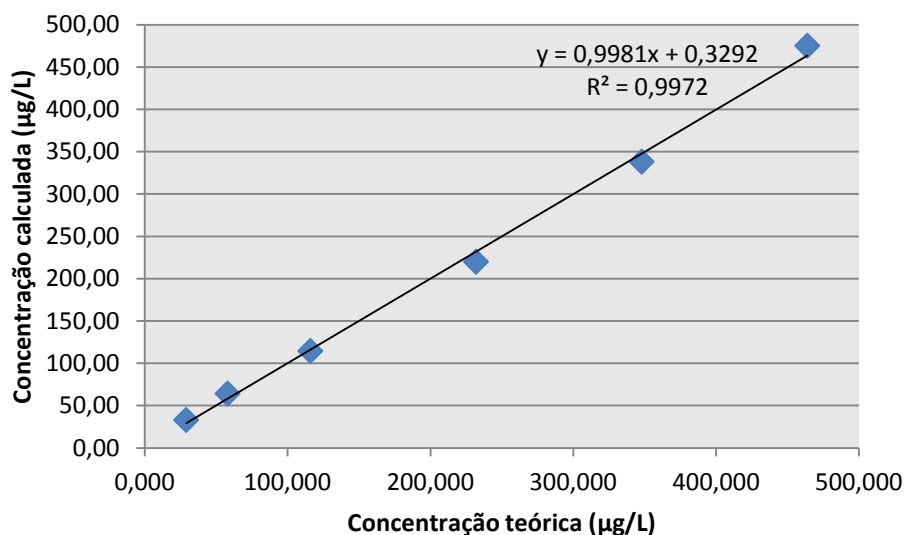


Figura 3.24 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o 4-EG.

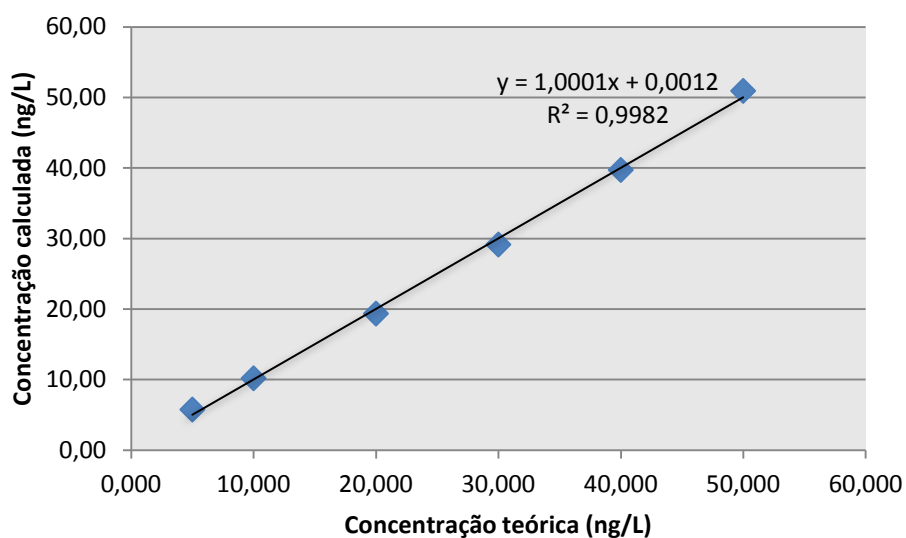


Figura 3.25 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TCA.

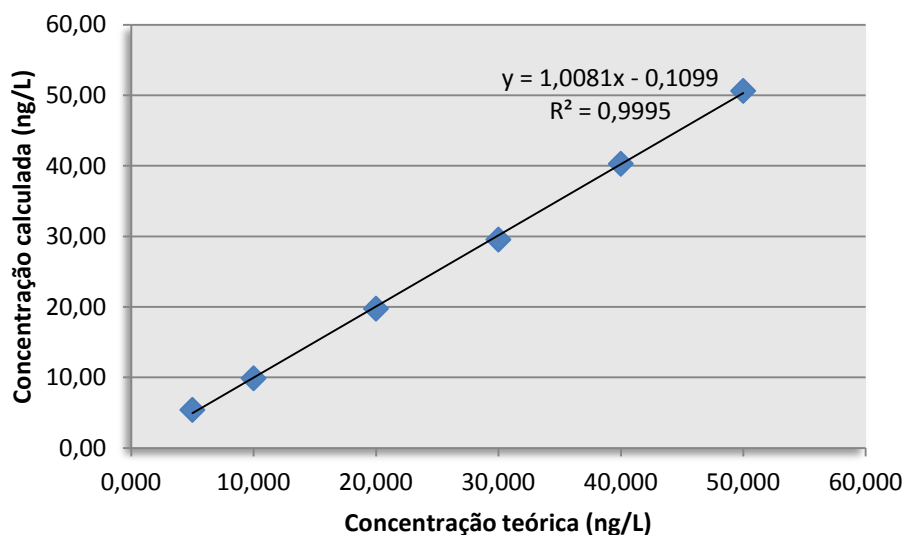


Figura 3.26 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TBA.

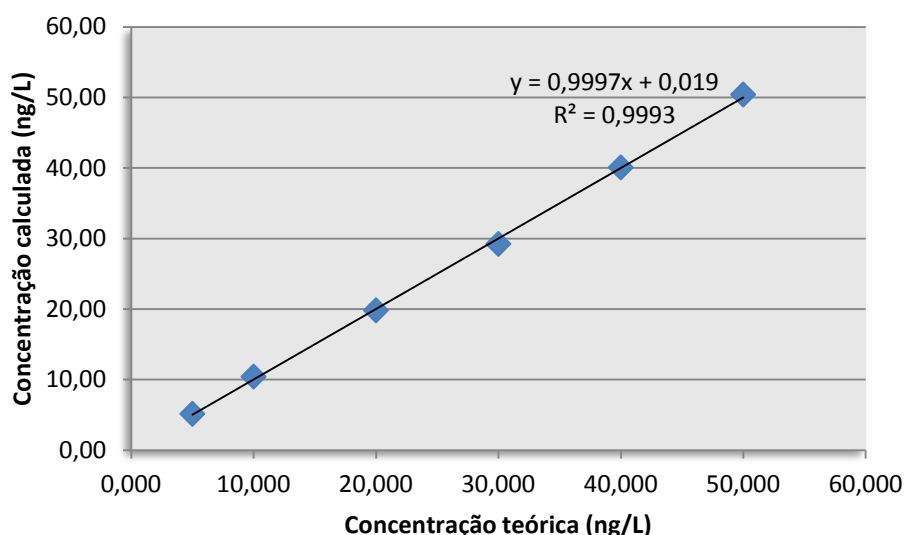


Figura 3.27 – Representação gráfica da concentração calculada em função da concentração dos padrões de calibração, em Vinho do Douro Tinto, para o TeCA.

Pela análise das representações gráficas de cada composto é possível verificar que a variação dos resultados expressos em concentrações calculadas não é muito acentuada, tendo-se obtido para todos os compostos coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os declives, para todas as curvas traçadas, são semelhantes e próximos da unidade.

Foram, ainda, determinados os limites de deteção e de quantificação para cada um dos contaminantes, recorrendo às várias curvas de calibração. Verifica-se que para o mesmo

composto ocorrem variações significativas, tal como se referiu na análise dos declives e das ordenadas na origem de cada curva de calibração.

Relativamente aos Fenóis Voláteis, o 4-EP apresenta valores de limite de deteção superiores, entre 65 e 583  $\mu\text{g/L}$ . Já nos Anisóis, o TCA apresenta limites de deteção mais baixos, variando entre 1,4 – 13,8  $\text{ng/L}$ ; enquanto os valores mais elevados foram obtidos para o TeCA, que variam entre 5,3 e 14,1  $\text{ng/L}$ . O TBA apresenta o limite de deteção mais baixo para uma das curvas com 0,4  $\text{ng/L}$  e o mais elevado para outra curva com 17,0  $\text{ng/L}$ . A tendência é semelhante para o limite de quantificação e tal como seria de esperar, estes valores são superiores comparativamente aos obtidos para os limites de deteção.

Os limites de deteção e de quantificação foram determinados considerando o desvio padrão residual e o declive das curvas de calibração, no entanto existem outras formas de proceder à sua determinação. As técnicas analíticas, como a espetrometria de massa, em particular, utilizam, muitas vezes, o método da relação sinal/ruído. Recorrendo a este método, o limite de deteção seria o valor de concentração para o qual se obteria uma relação sinal/ruído de 3 e o limite de quantificação corresponderia ao valor de concentração para o qual se obteria uma relação sinal/ruído de 10 [49].

Nas Figuras 3.28 a 3.32 encontram-se ilustrados, a título exemplificativo, os cromatogramas obtidos para o padrão mais baixo de cada contaminante, com indicação dos respetivos picos, tempos de retenção (RT), área de integração (AA) e razão sinal/ruído (SN).

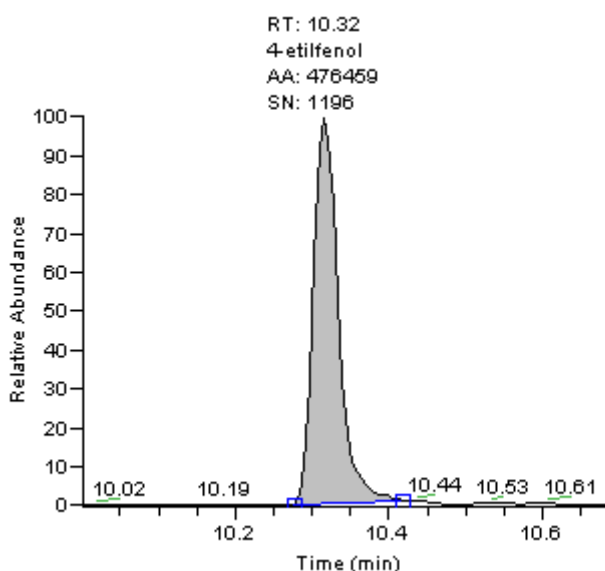


Figura 3.28 – Cromatograma obtido para o 4-EP, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 115,200  $\mu\text{g/L}$ .

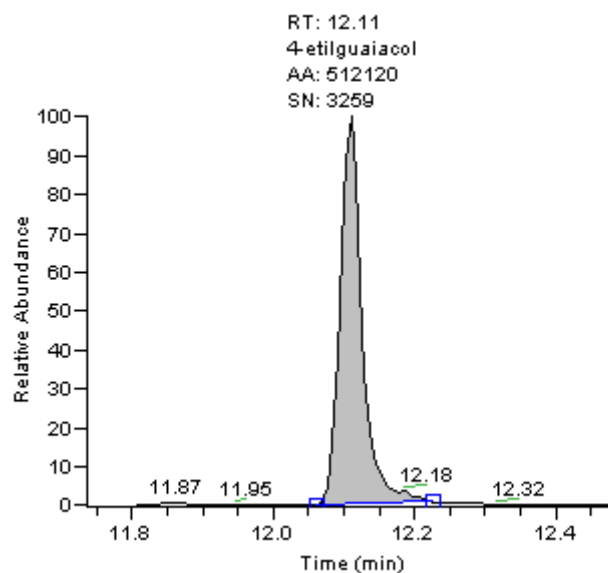


Figura 3.29 – Cromatograma obtido para o 4-EG, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 28,990 µg/L.

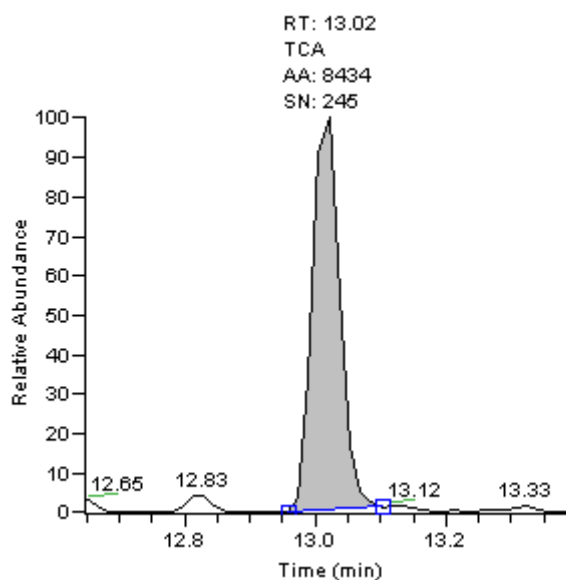


Figura 3.30 – Cromatograma obtido para o TCA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L.

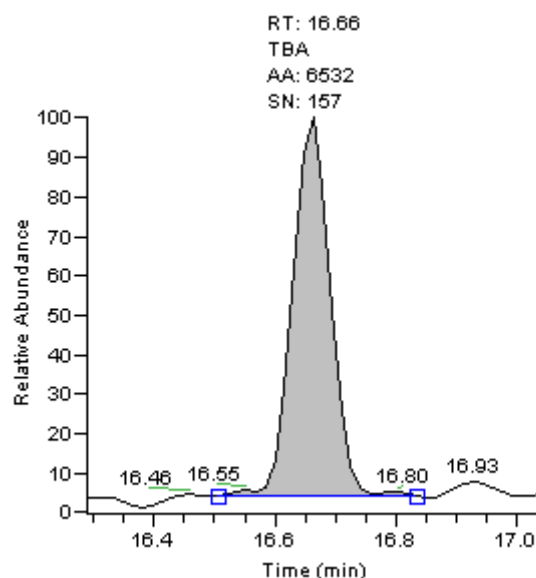


Figura 3.31 – Cromatograma obtido para o TBA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L.

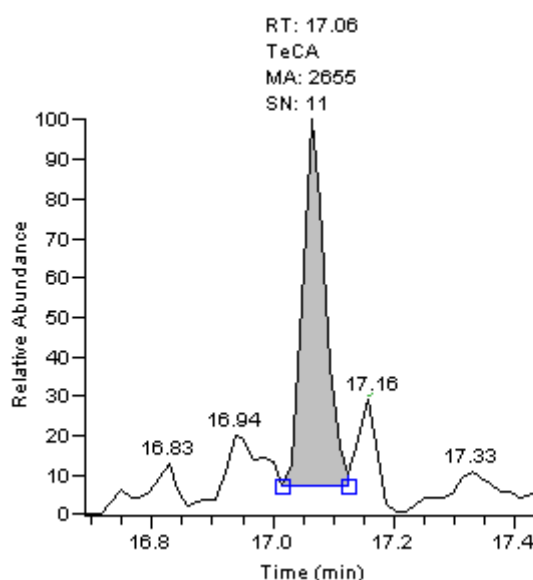


Figura 3.32 – Cromatograma obtido para o TeCA, por GC-MS/MS, em vinho do Douro Tinto, fortificado com uma concentração de 5 ng/L.

Analisando os cromatogramas apresentados, pode concluir-se que seria possível conseguir detetar e quantificar estes contaminantes abaixo dos limites determinados a partir dos parâmetros da curva de calibração, recorrendo ao método da relação sinal/ruído. Porém, quaisquer limites de deteção e de quantificação que sejam considerados requerem validação ao nível da precisão intermédia e da repetibilidade – questões abordadas no ponto 3.2.3.

### 3.2.3. Precisão

Nas Tabelas 3.8, 3.9 e 3.10 encontram-se representados os resultados obtidos para os estudos de repetibilidade e de precisão intermédia, para cada um dos contaminantes, na matriz constituída pelo lote de vinho do Douro tinto. Foram realizados estudos para vários níveis de concentração através da fortificação das amostras do lote de vinho.

Os estudos de repetibilidade foram realizados segundo duas fórmulas de cálculo. Na primeira foram realizados estudos de repetibilidade para cinco níveis de concentração correspondentes aos padrões 2, 3, 4 e 5 de calibração. Os valores encontram-se expressos em termos de desvio padrão relativo e foram obtidos a partir da análise de, pelo menos, quatro preparações independentes, realizadas no mesmo dia. A segunda fórmula de cálculo segue o procedimento descrito no documento de validação da OIV “*Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse oenologique alternative*” [50]. De acordo com este documento, os estudos, em condições de repetibilidade, foram realizados várias vezes em duplicado e em dias diferentes. Assim, a Tabela 3.9 apresenta os resultados tratados estatisticamente, obtidos segundo este método para os padrões 3 e 4 de calibração.

**Tabela 3.8 – Valores de repetibilidade (r), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respetivo nível de concentração.**

Padrão de concentração	4-EP		4-EG		TCA		TBA		TeCA	
	4-EP ad.	r	4-EG ad.	r	TCA ad.	r	TBA ad.	r	TeCA ad.	r
	(µg/L)	(%RSD)	(µg/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)
P2	230,500	8,3	57,990	5,8	10,00	19,3	10,00	14,8	10,00	17,2
P3	460,900	12,5	115,97	12,1	20,00	12,9	20,00	24,2	20,00	23,5
P4	921,900	7,2	231,95	12,0	30,00	-	30,00	-	30,00	-
P5	1382,80	2,5	347,92	4,8	40,00	7,0	40,00	23,1	40,00	11,3

**Tabela 3.9 – Valores de repetibilidade (r), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respetivo nível de concentração, segundo o documento de validação da OIV.**

Padrão de concentração	4-EP		4-EG		TCA		TBA		TeCA	
	4-EP ad.	r	4-EG ad.	r	TCA ad.	r	TBA ad.	r	TeCA ad.	r
	(µg/L)	(%RSD)	(µg/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)	(ng/L)	(%RSD)
P3	460,900	3,8	115,97	3,9	20,00	4,3	20,00	18,0	20,00	7,6
P4	921,900	10,2	231,95	32,7	30,00	1,3	30,00	3,7	30,00	23,0

Relativamente aos estudos de precisão intermédia, foram analisados todos os níveis de concentração dos padrões de calibração (P1, P2, P3, P4, P5 e P6). Os valores encontram-se

expressos em RSD, % e foram obtidos a partir da análise de, pelo menos quatro preparações independentes realizadas em dias diferentes.

**Tabela 3.10 – Valores de precisão intermédia (P.I.), expressos em RSD (%), obtidos para cada contaminante e respectivo nível de concentração.**

Padrão de concentração	4-EP		4-EG		TCA		TBA		TeCA	
	4-EP ad. (µg/L)	P.I. (%RSD)	4-EG ad. (µg/L)	P.I. (%RSD)	TCA ad. (ng/L)	P.I. (%RSD)	TBA ad. (ng/L)	P.I. (%RSD)	TeCA ad. (ng/L)	P.I. (%RSD)
P1	115,200	12,2	28,990	12,2	5,00	6,2	5,00	21,1	5,00	12,9
P2	230,500	13,3	57,990	9,6	10,00	7,3	10,00	11,4	10,00	10,8
P3	460,900	7,6	115,97	9,0	20,00	5,1	20,00	7,0	20,00	5,2
P4	921,900	9,0	231,95	10,6	30,00	3,4	30,00	7,6	30,00	6,6
P5	1382,80	3,9	347,92	3,0	40,00	6,6	40,00	6,0	40,00	4,8
P6	1843,60	3,3	463,90	2,9	50,00	3,0	50,00	4,5	50,00	2,7

Cruzando os resultados da Tabela 3.8 com a informação do documento SANCO/10684/2009 [51] é possível verificar que foram obtidos bons resultados em termos de repetibilidade. Para os Fenóis Voláteis, obtiveram-se, tal como descrito no documento, valores de RSD inferiores a 20%. Para os Anisóis, devido à gama de concentrações estudada, na ordem dos ng/L, o valor máximo de RSD considerado aceitável segundo o referido documento deve ser igual ou inferior a 30%. Todos os Anisóis apresentam valores de RSD que respeitam o valor máximo de 30%. O TBA é o contaminante que apresenta, de um modo geral, valores mais elevados. Quanto aos resultados obtidos recorrendo ao método proposto pela OIV, verificam-se, na generalidade, repetibilidades melhores. O valor de RSD mais elevado pertence ao TBA no terceiro nível de concentração da curva de calibração, no entanto respeita as especificações do SANCO/10684/2009 com o valor de 24,2%, inferior ao máximo de 30% tendo em conta a gama de concentrações em causa. O padrão de concentração identificado como P3 conduz a melhores resultados (valores de RSD mais baixos) para o método proposto pelo documento de validação da OIV. Conseguem-se melhores resultados de repetibilidade fazendo preparações em duplicado, em dias diferentes comparativamente à fórmula de cálculo que sugere a realização de várias medições sobre a mesma amostra.

Relativamente à precisão intermédia obtiveram-se resultados aceitáveis perante o critério do documento SANCO/10684/2009. Os valores mais elevados foram obtidos para o TBA, oscilando entre 4,5 e 21,1% (valor obtido mais elevado, %RSD). Já o valor mais baixo foi conseguido para o TeCA, para o sexto nível de concentração dos padrões de calibração (2,7%).

Nos estudos de repetibilidade, as condições de análise são as mesmas, isto é, os ensaios são efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível. Por sua vez, no caso da precisão intermédia há pelo menos uma das condições que se faz variar. Deste modo,

seria de esperar que os valores obtidos em termos de precisão intermédia fossem superiores aos resultados obtidos para a repetibilidade, no entanto nem sempre se verifica esta tendência.

À medida que a sequência de trabalho vai avançando, as condições de trabalho do equipamento vão sendo alteradas. Cada preparação tem um tempo de análise superior a uma hora e meia. Com calibrações diárias e preparações de solução hidroalcoólica entre as amostras, o tempo de análise de uma sequência completa pode tornar-se muito elevado. Com o decorrer das análises, a fibra DVB/CAR/PDMS, o *liner* do injetor, a coluna e o detetor vão ficando sujos e perdendo sensibilidade.

No caso da precisão intermédia, apesar dos ensaios se realizarem em alturas diferentes, as condições acabam por ser semelhantes. Antes de se iniciar cada sequência de trabalho é feita a manutenção do equipamento, nomeadamente a troca do septo e verificação do *liner*, realização de uma corrida em branco, verificação do estado da fibra seguido de um acondicionamento a 270°C (com a duração de uma hora se a fibra for nova ou de meia hora se for usada) e verificação da voltagem do multiplicador de eletrões, de forma a garantir uma contagem total de iões na ordem dos  $10^7$ . Assim, as condições no início de cada sequência, bem como a sensibilidade que se vai perdendo à medida que decorrem as análises, são semelhantes de dia para dia. Deste modo, é possível que os valores obtidos para a precisão intermédia sejam inferiores quando comparados com os resultados em termos de repetibilidade.

Apresentados os estudos de repetibilidade e precisão intermédia nos padrões de calibração, mostram-se, agora, os estudos de repetibilidade segundo a fórmula de cálculo descrita pelo documento de validação da OIV (Tabela 3.11) para as amostras analisadas.

**Tabela 3.11 – Valores de repetibilidade obtidos para cada contaminante segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV com base nas amostras.**

	4-EP (µg/L)	4-EG (µg/L)	TCA (ng/L)	TBA (ng/L)	TeCA (ng/L)
<b>q</b>	40	78	83	64	55
<b><math>\Sigma w_i^2</math></b>	471	719	66	99	61
<b>Sr</b>	2,4	2,1	0,6	0,9	0,7
<b>r</b>	6,8	6,0	1,8	2,5	2,1

q – Número de amostras analisadas;  $w_i$  – Diferença absoluta entre duplicados;  
Sr – desvio padrão; r – repetibilidade.

Os resultados descritos na Tabela 3.11 indicam a repetibilidade de cada contaminante com um nível de confiança de 95%. Assim, é possível verificar que para o 4-EP e para o 4-EG, os resultados obtidos indicam uma repetibilidade inferior a 6,8 µg/L e 6,0 µg/L, respetivamente. Tendo em conta a gama de concentrações utilizadas para estes compostos, estes valores podem considerar-se aceitáveis. Já para os Anisóis, os resultados conduzem a repetibilidades na ordem de 1,8 ng/L para o TCA, 2,5 ng/L para o TBA e 2,1 ng/L para o TeCA.

### 3.2.4. Exatidão

A exatidão da metodologia foi avaliada por ensaios de recuperação, através da fortificação de amostras de vinho e soluções hidroalcoólicas com padrões e também pelo recurso a ensaios interlaboratoriais.

Relativamente aos estudos de recuperação realizados no laboratório utilizaram-se amostras de lote de Vinho do Douro Tinto, lote de Vinho do Douro Branco, Solução Hidroalcoólica, uma amostra de Vinho Tinto distribuída pela entidade organizadora de ensaios interlaboratoriais *Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques – BIPEA* – (EIL C) e uma amostra de Vinho do Douro Tinto contaminada por Fenóis Voláteis (Amostra 35).

Quanto aos ensaios interlaboratoriais, fizeram parte deste estudo 8 amostras, das quais 5 pertencem a ensaios de anos anteriores, sendo utilizadas como amostras de referência nas sequências de trabalho, juntamente com padrões de verificação. Estas amostras são provenientes do circuito dos “contaminantes no vinho”, são fortificadas com contaminantes e a sua distribuição é trimestral (4 amostras/ano).

Nas Tabelas 3.12 e 3.13 encontram-se registados os ensaios de recuperação realizados no laboratório para os Fenóis Voláteis e para os Anisóis. Na Tabela 3.14 apresentam-se os resultados obtidos e respetivos valores de referência para as amostras participantes dos ensaios interlaboratoriais que decorreram durante o estudo.

Tabela 3.12 – Ensaio de recuperações para os Fenóis Voláteis.

Amostra	4-EP				4-EG			
	C <sub>i</sub> (µg/L)	V solução adicionado (mL)	C <sub>f</sub> (µg/L)	R. (%)	C <sub>i</sub> (µg/L)	V solução adicionado (mL)	C <sub>f</sub> (µg/L)	R. (%)
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.025	334,9	145	17,7	0.025	64,4	80
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.100	778,2	86	17,7	0.100	185,7	145
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.200	1616,3	88	17,7	0.200	425,4	88
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.050	407,0	88	15,8	0.050	66,6	44
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.0125	114,1	99	0,0	0.0125	39,3	135,6
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.050	482,9	105	0,0	0.050	94,0	81
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.150	1398,1	101	0,0	0.150	266,0	76
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.025	251,4	109	0,0	0.025	59,3	102
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.100	913,9	99	0,0	0.100	201,7	87
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.200	1746,6	95	0,0	0.200	376,5	81
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.025	214,3	93	16,5	0.025	60,3	75
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.100	824,2	89	16,5	0.100	177,5	69
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.200	1547,9	84	16,5	0.200	424,1	88
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.025	255,7	111	0,0	0.025	46,7	81
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.100	778,1	84	0,0	0.100	166,5	72
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.200	1748,0	95	0,0	0.200	397,0	86
Lote Vinho do Douro Branco	0,0	0.050	451,8	98	0,0	0.050	79,8	69
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.150	981,6	71	0,0	0.150	187,8	54
EIL C	112,9	0.025	340,0	99	74,0	0.025	135,0	106
EIL C	117,6	0.025	380,8	114	73,1	0.025	150,3	133
Amostra 35	954,0	0.025	1217,3	114	80,7	0.025	128,5	82
Amostra 35	954,0	0.050	1530,3	125	80,7	0.050	195,3	99
Amostra 35	954,0	0.100	1690,9	80	80,7	0.100	269,4	81

C<sub>i</sub> – Concentração inicial do analito na amostra; C<sub>f</sub> – Concentração final do analito na amostra; R - Recuperação

Tabela 3.13 – Ensaio de recuperações para os Anisóis.

Amostra	TCA				TBA				TeCA			
	C <sub>i</sub> (ng/L)	V solução		R. (%)	C <sub>i</sub> (ng/L)	V solução		R. (%)	C <sub>i</sub> (ng/L)	V solução		R. (%)
		adicionado	C <sub>f</sub> (ng/L)			adicionado	C <sub>f</sub> (ng/L)			adicionado	C <sub>f</sub> (ng/L)	
(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)	(mL)					
Lote Vinho do Douro Tinto	5,3	0.060	39,8	115	5,7	0.060	30,8	83	0,0	0.060	9,7	32
Lote Vinho do Douro Tinto	5,3	0.100	65,5	120	5,7	0.100	41,8	72	0,0	0.100	60,1	120
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.010	7,8	157	4,3	0.010	8,1	76	10,1	0.010	12,0	37
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.040	16,3	82	4,3	0.040	20,6	82	10,1	0.040	19,4	46
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.080	30,4	76	4,3	0.080	28,8	61	10,1	0.080	23,9	34
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.040	16,6	83	0,0	0.040	19,8	99	0,0	0.040	20,4	102
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.080	48,8	102	0,0	0.080	32,2	80	0,0	0.080	41,2	103
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.020	5,2	52	0,0	0.020	9,9	99	0,0	0.020	-	-
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.060	22,5	75	0,0	0.060	40,5	135	0,0	0.060	-	-
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.100	46,4	93	0,0	0.100	50,1	100	0,0	0.100	52,6	105
Lote Vinho do Douro Tinto	0,3	0.020	13,9	136	0,3	0.020	10,0	97	1,7	0.020	4,5	28
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.010	5,0	101	0,0	0.010	6,8	136	0,0	0.010	5,8	116
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.020	9,5	96	0,0	0.020	12,1	121	0,0	0.020	6,2	62
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.060	31,8	80	0,0	0.060	22,1	55	0,0	0.060	43,1	108
Solução Hidroalcoólica a 6%	0,0	0.100	49,6	99	0,0	0.100	47,7	96	0,0	0.100	52,0	104
Lote Vinho do Douro Branco	0,0	0.040	16,0	80	3,7	0.040	15,3	58	5,7	0.040	15,7	50
Lote Vinho do Douro Tinto	0,0	0.080	33,3	83	4,5	0.080	28,2	59	4,3	0.080	30,6	66
EIL C	3,1	0.020	10,7	76	3,9	0.020	14,0	100	4,1	0.020	13,7	96
EIL C	3,9	0.020	11,5	76	4,9	0.020	15,0	101	4,3	0.020	14,3	100
EIL C	2,3	0.040	20,9	93	5,1	0.040	28,8	119	3,5	0.040	22,6	95
Amostra 35	2,2	0.020	11,5	93	2,1	0.020	4,8	27	4,6	0.020	5,9	13
Amostra 35	2,2	0.040	21,6	97	2,1	0.040	8,6	32	4,6	0.040	9,8	26
Amostra 35	2,2	0.060	29,0	90	2,1	0.060	13,5	38	4,6	0.060	12,7	27

C<sub>i</sub> – Concentração inicial do analito na amostra; C<sub>f</sub> – Concentração final do analito na amostra; R - Recuperação

Tabela 3.14 – Resultados obtidos para as amostras participantes dos ensaios interlaboratoriais.

Fenóis Voláteis (µg/L)					Anisóis (ng/L)				
Composto	Amostra	EIL A	EIL B	EIL C	Composto	Amostra	EIL A	EIL B	EIL C
4-EP	Valor de Referência	465	610	412	TCA	Valor de Referência	19,4	15	9,6
	Valor máximo	669	904	518		Valor máximo	31,8	23,2	16,2
	Valor mínimo	261	316	306		Valor mínimo	7,0	6,8	3,0
	Resultado obtido	225	241	235		Resultado obtido	10,7	6,4	6,7
	Z-score	-2,35	-2,51	-3,34		Z-score	-1,40	-2,10	-0,88
4-EG	Valor de Referência	91	309	186	TBA	Valor de Referência	17,1	5,6	8,6
	Valor máximo	45	473	248		Valor máximo	27,9	8,8	12,2
	Valor mínimo	137	145	124		Valor mínimo	6,3	2,4	5,0
	Resultado obtido	61	82	143		Resultado obtido	14,0	9,4	8,4
	Z-score	-1,30	-2,77	-1,39		Z-score	-0,57	2,38	-0,11
					TeCA	Valor de Referência	9,9	7,5	11,2
						Valor máximo	18,3	12,7	17,0
						Valor mínimo	1,5	2,3	5,4
						Resultado obtido	3,6	12,7	7,8
						Z-score	-1,50	2,00	-1,17

De acordo com o documento SANCO/10684/2009, para a gama de concentrações testada dos Fenóis Voláteis, são consideradas aceitáveis recuperações entre 70 e 120%. Por sua vez, para os Anisóis são aceitáveis recuperações entre os 60 e os 120%, uma vez que a gama de concentrações estudada para estes compostos é consideravelmente inferior, quando comparada com a dos Fenóis Voláteis.

Relativamente aos Fenóis Voláteis é possível verificar que, na generalidade, as preparações em Solução Hidroalcoólica apresentam valores de recuperação aceitáveis. Também se pode verificar que, em geral, é mais fácil a recuperação do 4-EP comparativamente ao 4-EG. No caso dos Anisóis, o TCA é o composto que apresenta melhores resultados. Já o TBA e o TeCA apresentam recuperações mais baixas. De acordo com a análise da Tabela 3.12, é possível verificar que em 26 amostras analisadas, 5 não respeitam os critérios propostos pelo documento SANCO/10684/2009 para o 4-EP, o que corresponde a uma percentagem de 81% de resultados aceitáveis. Já para o 4-EG, das 26 amostras analisadas, 9 estão fora da gama considerada aceitável, correspondendo a uma percentagem de 65% de sucesso. Relativamente aos Anisóis, de acordo com a Tabela 3.13, a percentagem de resultados considerados aceitáveis corresponde a 95% para o TCA (1 resultado fora da gama aceitável, em 19 análises), 63% para o TBA (7 valores, em 19 análises, que não respeitam os critérios estabelecidos) e 50% para o TeCA (8 resultados que não respeitam a gama de recuperações estabelecida para estes compostos, em 17 análises).

Ainda relativamente aos ensaios de recuperação, é importante referir os resultados obtidos para a Amostra 35. Esta amostra foi encaminhada para análise de Fenóis Voláteis, no entanto, optou-se por analisar todos os compostos em estudo. Os resultados indicam boas recuperações para os Fenóis Voláteis, assim como para o TCA. Porém, os resultados obtidos para o TBA e para o TeCA não são satisfatórios, pelo que esta amostra necessitaria de mais estudos relativamente à presença destes compostos.

Na análise dos resultados de ensaios interlaboratoriais é importante avaliar o valor de *z-score*, que permite perceber qual o desvio do resultado obtido relativamente ao valor real. Os resultados são considerados satisfatórios para  $|z\text{-score}| \leq 2$ , considerados questionáveis quando  $2 < |z\text{-score}| \leq 3$  e insatisfatórios para  $|z\text{-score}| > 3$  [47]. Assim, de acordo com a Tabela 3.14 é possível verificar que em nenhum dos ensaios interlaboratoriais em que se participou durante o estudo se conseguiram bons resultados para o 4-EP. O valor de *z-score* foi superior a 2 para todas as amostras, o que faz destes resultados questionáveis. A amostra EIL B apresenta um valor de *z-score* superior a 2 para todos os compostos, à exceção do TeCA. Para este composto o *z-score* é igual a 2, o que faz dele um resultado satisfatório. O desvio mais elevado corresponde ao 4-EP na amostra EIL C (3,34), enquanto o valor com menor desvio foi conseguido para o TBA para a mesma amostra (0,11).

Os ensaios realizados para quantificar a amostra EIL A foram realizados numa fase inicial do trabalho, antes de se concluírem os estudos de otimização do método. Assim, esta amostra foi analisada sem diluição, com um tempo de extração de 18 minutos e recorrendo à fibra 100 µm PDMS. Já a amostra EIL B foi estudada numa fase intermédia, no período de otimização do método. Por fim, a amostra EIL C foi quantificada com todos os parâmetros devidamente otimizados. Na Tabela 3.15 encontram-se registados os dados obtidos através dos ensaios realizados para o lançamento dos resultados.

**Tabela 3.15 – Concentrações dos analitos em estudo obtidas nos ensaios realizados para a amostra EIL C.**

<b>Data de realização do ensaio</b>	<b>4-EP</b>	<b>4-EG</b>	<b>TCA</b>	<b>TBA</b>	<b>TeCA</b>
30/03/2012 (a)	92	72	4.2	6.3	8.3
2/4/2012 (a)	216	134	10.4	7.9	6.6
9/4/2012 (a)	226	148	6.2	7.9	8.2
9/4/2012 (b)	235	146	7.8	9.8	8.7
12/4/2012 (b)	263	142	4.7	10.3	7.1
Amostra de 12/04/2012 na curva de 09/04/2012 (b)	235	148	6.7	4.8	8.4
<b>Média (c)</b>	<b>235</b>	<b>143</b>	<b>6.7</b>	<b>8.4</b>	<b>7.8</b>
Desvio Padrão	60	30	2.3	2.1	0.6
%RSD	26	21	33.8	24.6	7.9
Valor Máximo	263	148	10.4	10.3	8.7
Valor Mínimo	92	72	4.2	4.8	6.6
<b>Mediana</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>6.2</b>	<b>7.9</b>	<b>8.2</b>

(a) Método de processamento de Dezembro de 2011; (b) Método de processamento de Abril de 2012; (c) Valor médio desprezando os resultados obtidos em 30/03/2012.

O método (b) difere do método (a) no que respeita ao 4-EP, uma vez que com o método de Dezembro de 2011 o pico integrado continha sempre o ião 105 e não o 107 – ião pretendido. Por este motivo alterou-se o método modificando o tipo de gráfico ao passar a opção *TIC* para *Base Peak* com o ião 107.

Uma vez que os resultados obtidos para o 4-EP não foram satisfatórios, apresentando um valor de  $|z\text{-score}|$  superior a 3, seguem-se algumas considerações sobre cada um dos ensaios que conduziram ao valor final lançado de 235 µg/L.

No dia 30/03/2012, antes de iniciar a sequência de trabalho foi colocada uma fibra nova que acondicionou a 270°C durante 60 minutos e verificou-se a voltagem do multiplicador de elétrons, de forma a garantir uma contagem total de iões na ordem dos  $10^7$  ( $TIC = 1,1 \times 10^7$ ). A calibração foi feita em vinho tinto, de modo a diminuir o efeito de matriz. No entanto, os resultados obtidos foram claramente insatisfatórios, apresentando uma concentração muito baixa, não só de 4-EP, mas também de 4-EG.

No dia 02/04/2012 verificou-se o estado da fibra de SPME 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, que estava em boas condições, pelo que se colocou a acondicionar por 30 minutos a 270°C. Foi, mais uma vez, verificada a voltagem do multiplicador de elétrons, tendo-se constatado que estava ajustado de forma adequada ( $TIC = 1,1 \times 10^7$ ). Para este ensaio foram preparados seis padrões de calibração com o lote de Vinho do Douro Tinto, tendo-se adicionado duas soluções hidroalcoólicas a 6% depois destas preparações. Foram, ainda, elaboradas duas preparações da amostra em estudo (EIL C) com soluções hidroalcoólicas a 6% entre cada uma delas.

Em 09/04/2012, repetiu-se todo o procedimento do ensaio anterior. Acrescentaram-se dois padrões de verificação com o padrão de concentração equivalente a P2, com soluções hidroalcoólicas a 6% entre cada preparação e também foi adicionado um ensaio de recuperação em duplicado com a amostra EIL C, utilizando um dos padrões mais baixos (P2). Obteve-se uma recuperação de 98,5%, processando os dados com o método de Dezembro de 2011 e 114,2% recorrendo ao método de Abril de 2012. O padrão de verificação apresentava um valor muito próximo do esperado e um %RSD de 7,5 entre as duas preparações.

A 12/04/2012 verificou-se o estado da fibra de SPME 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS, que estava ainda em boas condições, pelo que se colocou a acondicionar por 30 minutos a 270°C. Foi, mais uma vez, verificada a voltagem do multiplicador de elétrons, tendo-se constatado que estava ajustado de forma adequada ( $TIC = [1,0 \times 10^7 - 1,1 \times 10^7]$ ). Foram preparados seis padrões de calibração com o lote de Vinho do Douro Tinto. Adicionaram-se duas soluções hidroalcoólicas a 6% depois das seis preparações. Preparou-se um duplicado da amostra separado por soluções hidroalcoólicas e realizou-se um ensaio de recuperação em duplicado com a amostra, utilizando um dos padrões intermédios (P3). O ensaio de recuperação não apresentou bons resultados, no entanto a concentração obtida para a amostra foi semelhante à obtida para os ensaios realizados anteriormente, pelo que se considerou um resultado satisfatório.

Todas as amostras distribuídas pela entidade BIPEA, assim como todas as amostras que contribuíram para a realização deste trabalho, foram analisadas segundo procedimento descrito para a amostra EIL C, com recurso a padrões de verificação, ensaios de recuperação, estudos de repetibilidade e precisão intermédia. Na Tabela 3.16 encontram-se representados alguns dos resultados obtidos para as amostras fornecidas pela entidade BIPEA, usados como referência nas sequências de trabalho.

Tabela 3.16 – Representação das concentrações obtidas nas seqüências de trabalho, para as amostras distribuídas pelo BIPEA.

Composto Amostra	Data	4-EP (µg/L)		4-EG (µg/L)		TCA (ng/L)		TBA (ng/L)		TeCA (ng/L)	
EIL A	22/11/2011	753		103		9,7		7,6		-	
	23/11/2011	885		108		6,8		6,0		5,0	
	14/12/2011	225		61		10,7		14,0		3,6	
	12/01/2012	611	465	39	91	-	19,4	-	17,1	-	9,9
	19/01/2012	632	[261 - 669]	40	[45 - 137]	6,5	[7 - 31,8]	7,2	[6,3 - 27,9]	9,0	[1,5 - 18,3]
	03/02/2012	845		33		7,1		10,7		11,9	
	09/02/2012	740		43		7,4		2,3		-	
	10/02/2012	653		48		2,8		19,5		-	
EIL B	03/02/2012	138		70		4,7		10,6		19,0	
	09/02/2012	312		86		10,1		3,2		-	
	10/01/2012	274	610 [316 - 904]	83	309 [145 - 473]	5,0	15 [6,8 - 23,2]	5,2	5,6 [2,4 - 8,8]	-	7,5 [2,3 - 12,7]
	13/02/2012	196		86		6,5		9,1		13,6	
	01/03/2012	482		96		4,2		3,1		1,6	
EIL C	30/03/2012	92		72		4,2		6,3		8,3	
	02/02/2012	216		134		10,4		7,9		6,6	
	09/04/2012	226		148		6,2		7,9		8,2	
	09/04/2012	235	412 [306 - 518]	146	186 [124 - 248]	7,8	9,6 [3 - 16,2]	9,8	8,6 [5 - 12,2]	8,7	11,2 [5,4 - 17]
	12/04/2012	263									
	25/05/2012	316		126		4,9		8,5		7,9	
	25/05/2012	331		133		5,2		14,2		3,4	
	11/06/2012	393		170		4,7		5,1		10,6	
EIL D	13/04/2012	200		98		11,0		10,7		3,4	
	14/05/2012	168	130 [104 - 156]	22	23 [7 - 39]	11,8	14,1 [11,5 - 16,7]	20,2	11,4 [5 - 17,8]	5,2	13,3 [4,7 - 21,9]
	18/05/2012	275		84		12,1		16,1		7,3	
EIL E	09/12/2011	-		200		14,4		4,3		5,9	
	13/12/2011	-	840	138	288	13,2	21,3	3,8	5,2	3,2	5,3
	12/03/2012	-	[346 - 1334]	73	[148 - 428]	7,4	[11,3 - 31,3]	9,4	[1,6 - 8,8]	12,3	[1,1 - 9,5]
	13/04/2012	737		275		18,2		2,0		2,8	

Composto Amostra	Data	4-EP (µg/L)		4-EG (µg/L)		TCA (ng/L)		TBA (ng/L)		TeCA (ng/L)	
EIL F	01/04/2012	152	454	-	99	7,6	17	3,0	6,5	0,5	6,3
	05/01/2012	-	[278 - 630]	27	[17 - 181]	4,5	[9 - 25]	5,3	[1,9 - 11,1]	4,2	[0,7 - 11,9]
EIL G	10/10/2011	1008		230		-		-	15,6	-	
	12/10/2011	1015		348		-		-	[8,4 - 22,8]	-	
	04/11/2011	821		257		-		-		-	
	09/11/2011	867	1007 [637 - 1377]	296	419 [301 - 537]	-	3,8 [1,2 - 6,4]	-		-	8 [5 - 11]
	22/11/2011	653		174		5,3		2,6		-	
	30/03/2012	409		159		3,0		-		6,2	
	22/06/2012	357		136							
	04/11/2011	223		103		-		-		-	
EIL H	09/11/2011	208	208	45	155	-	3,9	-	13,6	-	16,9
	17/11/2011	232	[110 - 306]	90	[107 - 203]	-	[1,1 - 6,7]	-	[4 - 23,2]	-	[7,1 - 26,7]
	22/11/2011	305		57		5,3		4,1		-	

As amostras EIL D a EIL H correspondem a amostras distribuídas pela BIPEA em anos anteriores e que foram utilizadas como balizas no controlo de qualidade do método.

De acordo com a análise da Tabela 3.16 é possível verificar que os resultados obtidos para o 4-EP estão, geralmente, fora das gamas consideradas como satisfatórias. Porém, é também possível verificar que os valores obtidos se aproximam dos valores considerados como satisfatórios para os ensaios realizados mais recentemente. Para as amostras EIL B e EIL H não se obtiveram quaisquer resultados que respeitassem as gamas de concentração de 4-EG consideradas como satisfatórias. Já para os Anisóis, todas as amostras apresentam resultados satisfatórios, embora surjam alguns valores que se encontram fora dos limites estipulados.

### 3.3. Teores de contaminantes nas amostras estudadas

Deste estudo fizeram parte 50 amostras de vinho enviadas pela Câmara de Provedores do IVDP, I.P. com suspeita de Fenóis Voláteis, das quais 48 eram amostras de Vinho Tinto do Douro e 2 de Vinho do Porto. Nas Figuras 3.33 a 3.42 representam-se os teores de cada contaminante nas amostras de 2011 e 2012 analisadas.

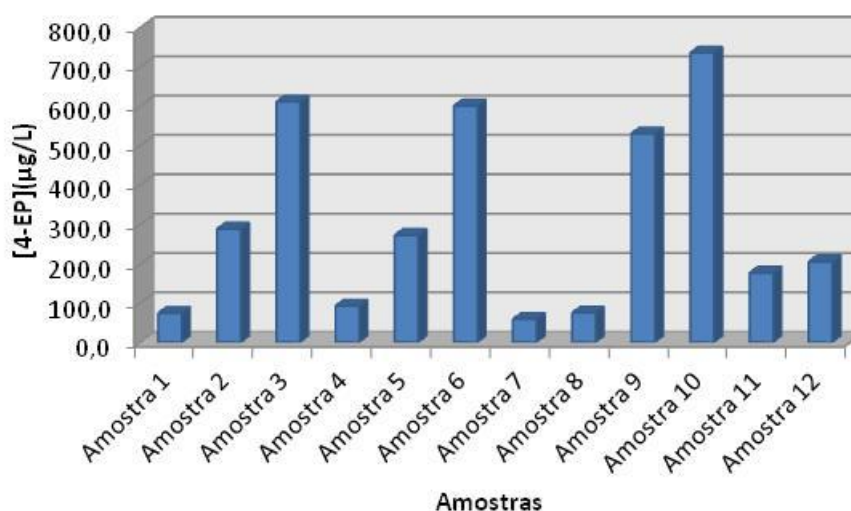


Figura 3.33 – Teor de 4-EP nas amostras de 2011 analisadas.

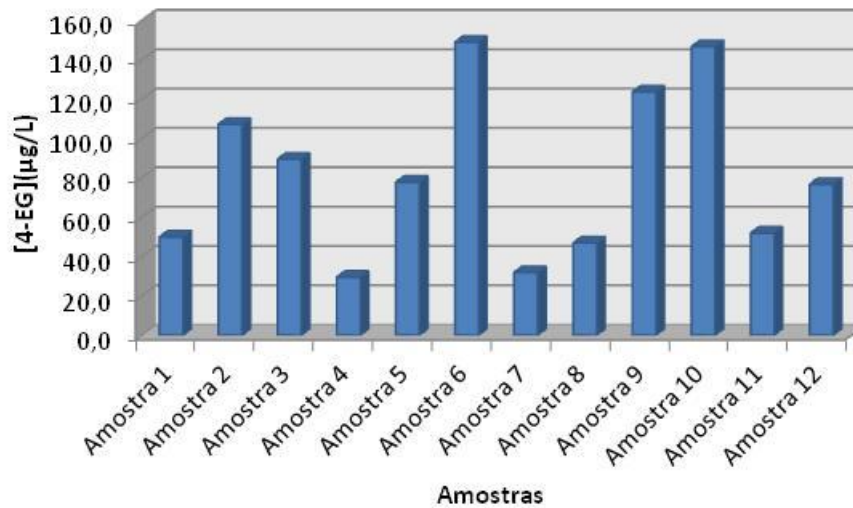


Figura 3.34 - Teor de 4-EG nas amostras de 2011 estudadas.

Todas as amostras de 2011 analisadas apresentam teores de Fenóis Voláteis. Porém, os valores obtidos não são sensorialmente detetáveis para todas as amostras estudadas. Para o 4-EP, o limite de percepção é de 430 µg/L [36], pelo que apenas 4 das amostras analisadas seriam identificadas sensorialmente devido à presença deste contaminante. Já o 4-EG apresenta um limite de percepção de 33 µg/L [36], verificando-se a existência de 10 amostras com uma concentração superior.

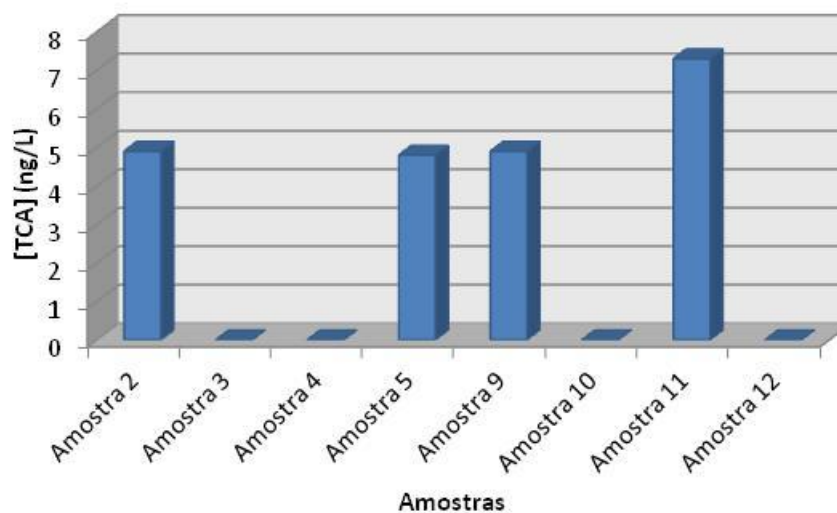


Figura 3.35 – Teor de TCA nas amostras de 2011 estudadas.

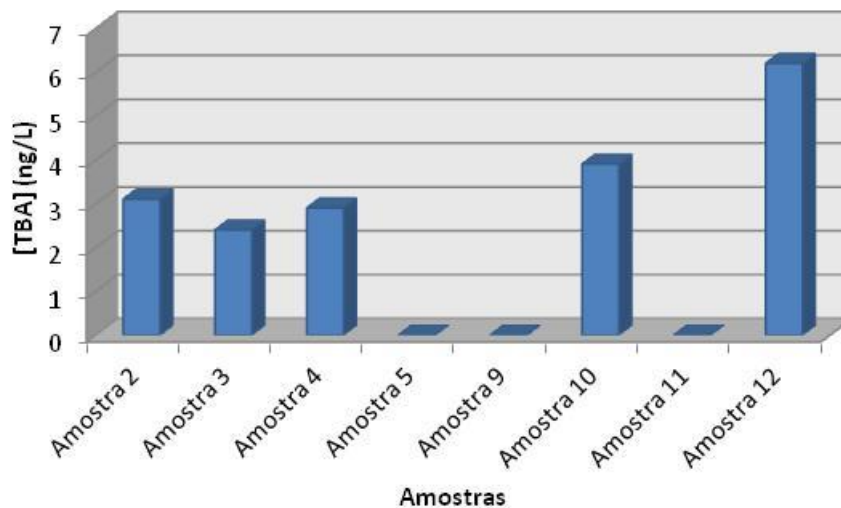


Figura 3.36 – Teor de TBA nas amostras de 2011 estudadas.

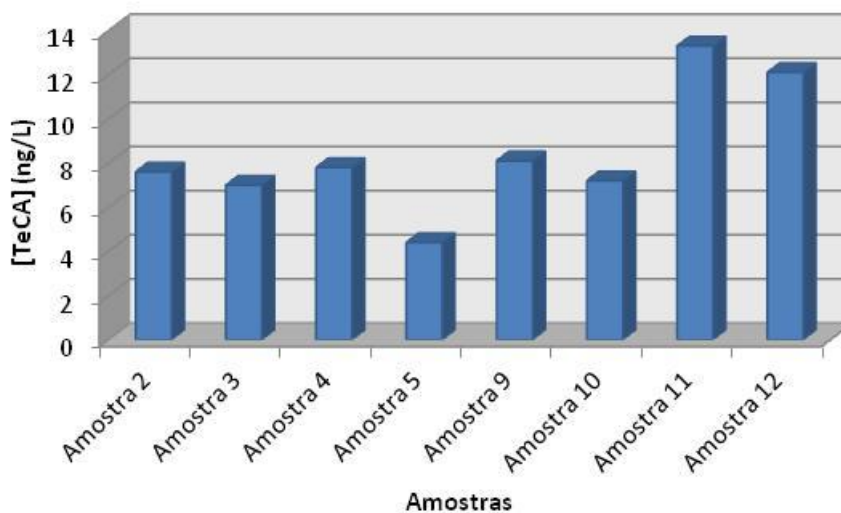


Figura 3.37 – Teor de TeCA nas amostras de 2011 estudadas.

Relativamente aos Anisóis, nem todas as amostras apresentam teores detetáveis destes contaminantes. Das 8 amostras analisadas, apenas 4 apresentam teores de TCA e com valores superiores ao limite de perceção de 3 ng/L. No caso do TBA, apresentam teores deste contaminante 5 das amostras analisadas, no entanto, a concentração obtida é superior à do limite de perceção (3 ng/L) em apenas 3. Todas as amostras manifestam a presença de TeCA, no entanto em quantidade inferior à do limite de perceção (15 ng/L).

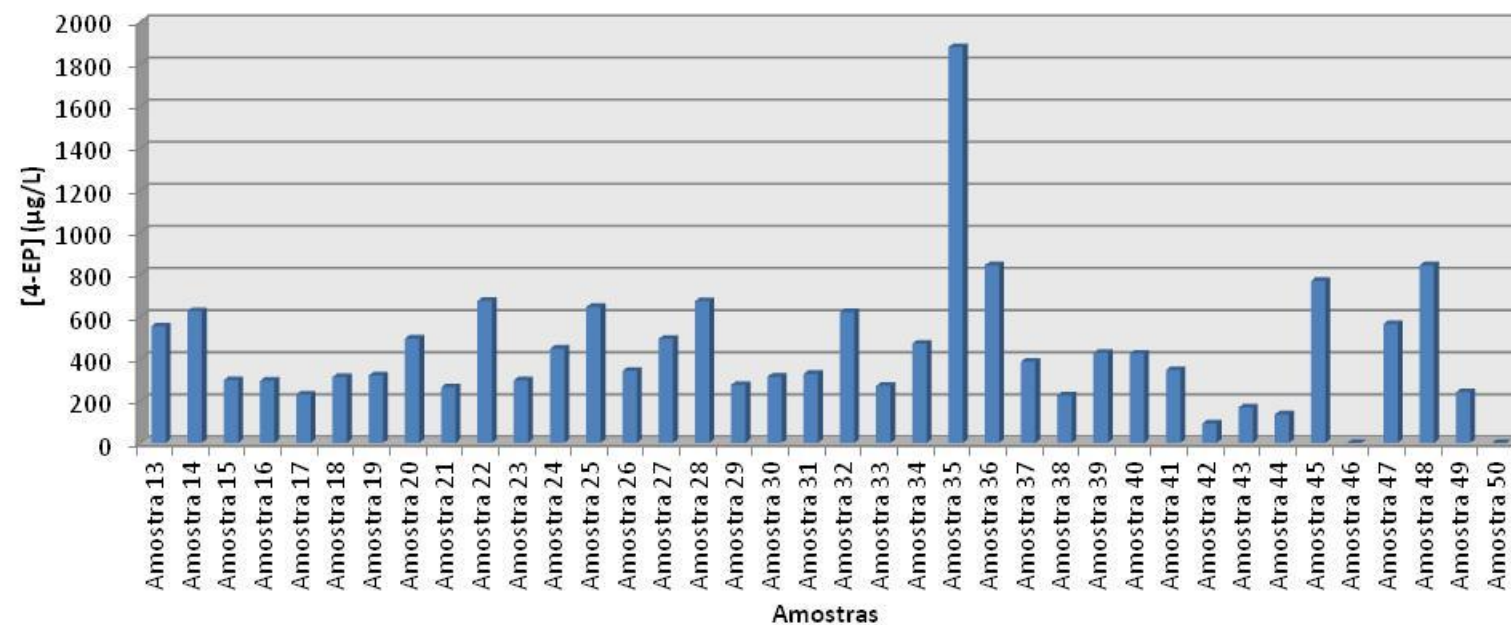


Figura 3.38 – Teor de 4-EP nas amostras de 2012 analisadas.

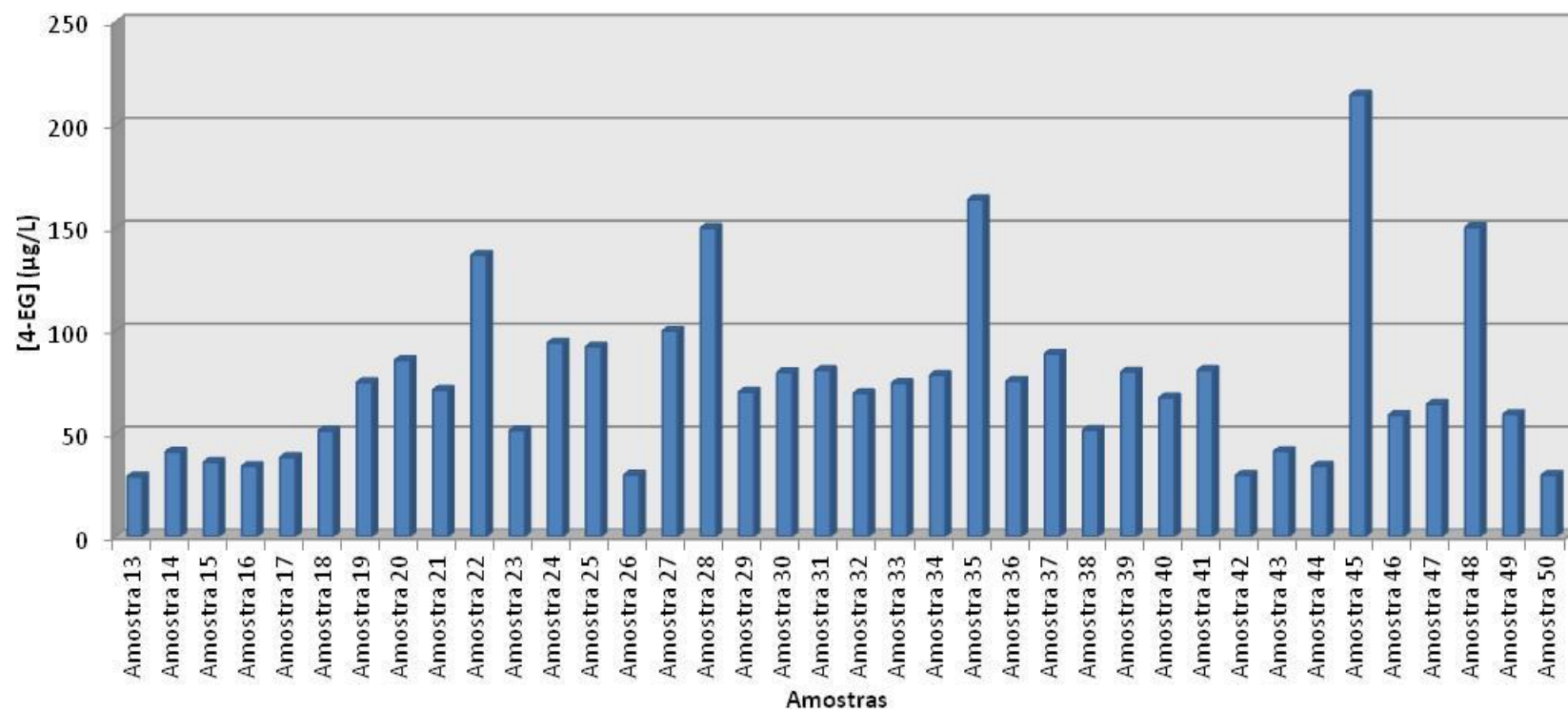


Figura 3.39 – Teor de 4-EG nas amostras de 2012 estudadas.

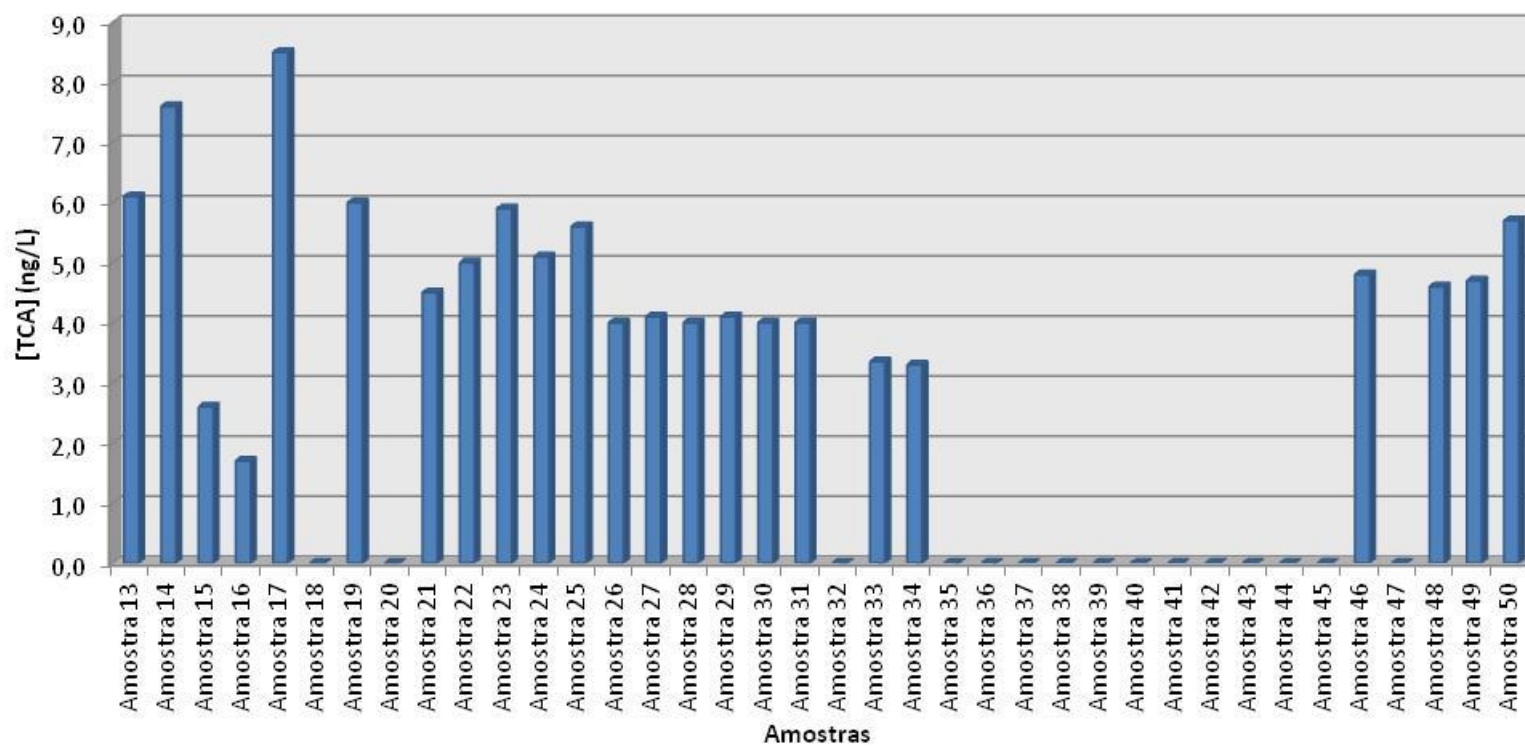


Figura 3.40 – Teor de TCA nas amostras de 2012 estudadas.

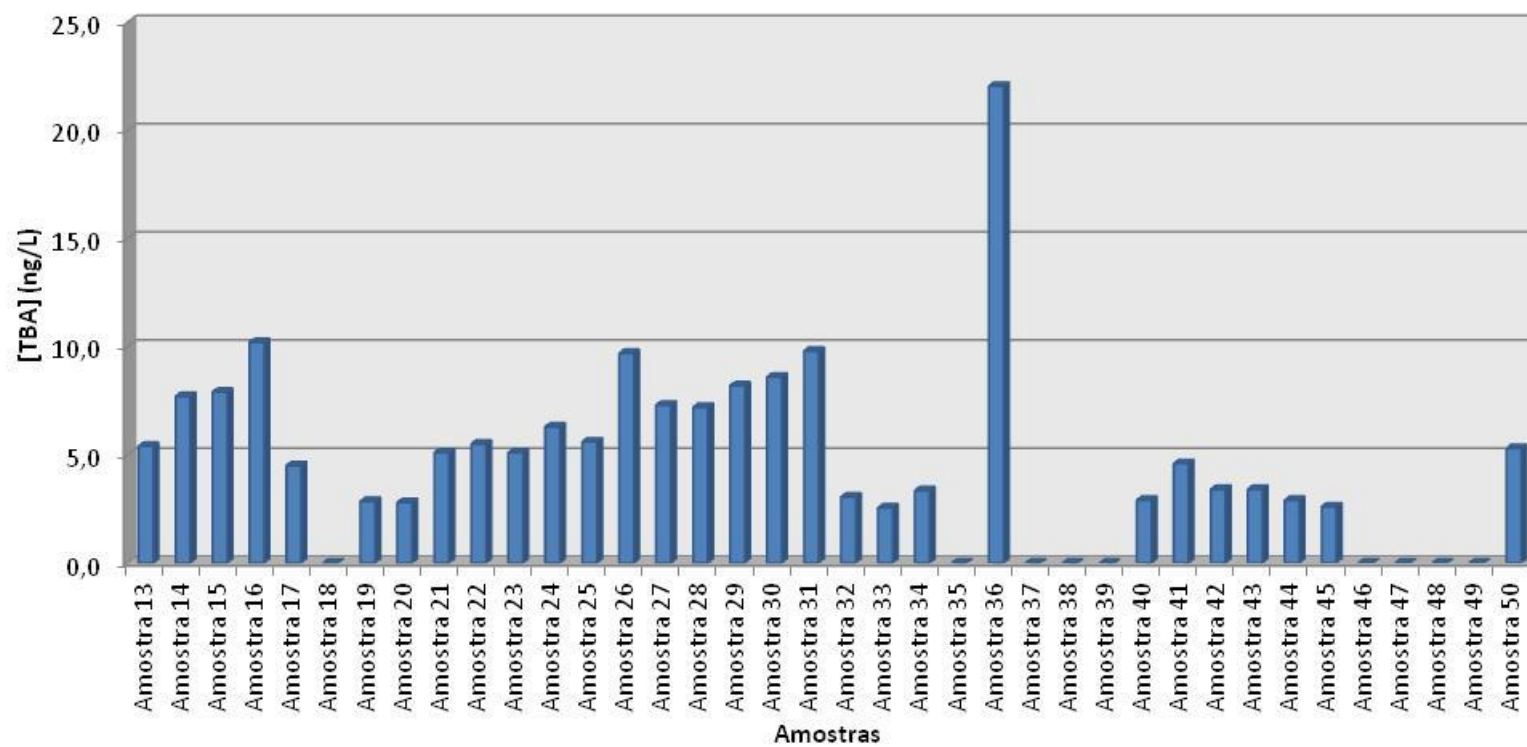


Figura 3.41 – Teor de TBA nas amostras de 2012 estudadas.

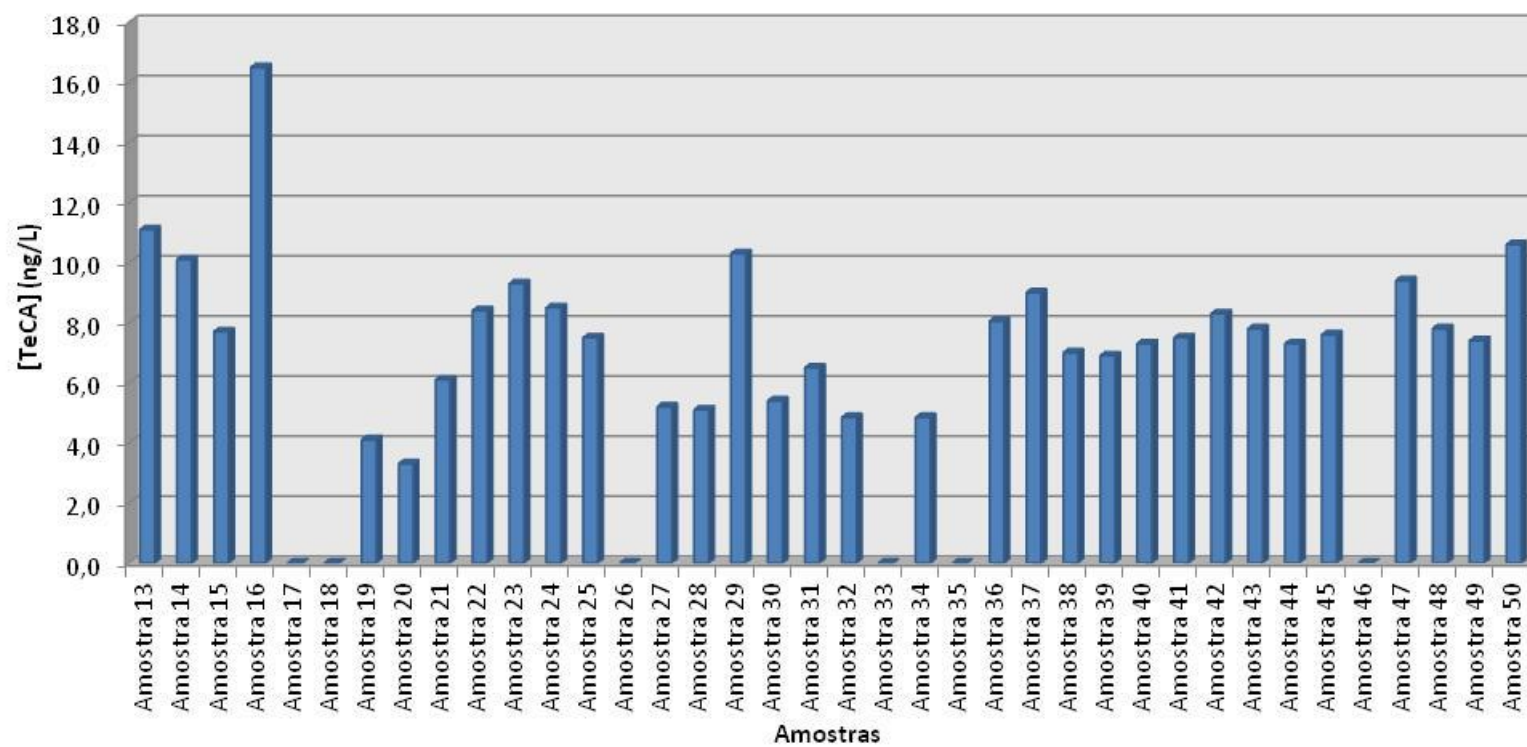


Figura 3.42 – Teor de TeCA nas amostras de 2012 estudadas.

Relativamente ao ano de 2012 foram analisadas 38 amostras de vinho. Para o 4-EP, apenas em duas amostras não foi detetada a presença deste contaminante. Das 36 amostras cuja presença de 4-EP foi confirmada, apenas 15 apresentam uma concentração superior à indicada como limite de perceção (430 µg/L). Por sua vez, foi detetada a presença de 4-EG em todos os vinhos estudados. Das 38 amostras analisadas, 34 mostram uma concentração superior ao limite de perceção de 33 µg/L sugerido pela literatura.

No que diz respeito aos Anisóis, nem todas as amostras verificam a presença destes contaminantes. Para o TCA, duas das amostras que contêm este contaminante apresentam um teor inferior ao limite de perceção e 15 revelam a ausência deste composto. Para o TBA, apenas 9 das amostras analisadas não apresentam este contaminante na sua constituição e 6 encontram-se abaixo do limite de perceção de 3 ng/L. Relativamente ao TeCA, apenas uma, das 32 amostras que apresentam este contaminante, se encontra acima do limite de perceção de 15 ng/L.

Foram estudadas algumas das amostras enviadas pela Câmara de Provedores do IVDP, I.P., e analisados os valores obtidos para o 4-EP e para o 4-EG pelo método anteriormente descrito e os dados da Câmara de Provedores. Na Tabela 3.17 encontra-se representada a percentagem média de provedores que detetaram Fenóis Voláteis em 18 das amostras analisadas do ano de 2012.

**Tabela 3.17 – Percentagem média de provedores que detetaram Fenóis Voláteis em 18 das amostras analisadas.**

<b>Concentração de FV (µg/L)</b>	<b>Número de amostras analisadas</b>	<b>% Média de provedores que detetaram Fenóis Voláteis</b>
<b>[300-400]</b>	10	59
<b>[400-500]</b>	0	-
<b>[500-600]</b>	5	52
<b>[600-700]</b>	1	78
<b>[700-800]</b>	0	-
<b>[800-900]</b>	1	80
<b>[900-1000]</b>	1	80

O número de amostras estudado, com o objetivo de estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos por SPME/GC-MS/MS e a análise sensorial, não é representativo, dado que foram estudadas poucas amostras. No entanto, tendo em conta os resultados descritos na Tabela 3.17, pode concluir-se que à medida que a concentração de Fenóis Voláteis nas amostras aumenta, a perceção sensorial também tende a aumentar. Porém, existem outros fatores que seria interessante ter em consideração (matriz e a complexidade dos vinhos) que podem influenciar a perceção sensorial.

De acordo com a literatura, a concentração média de Fenóis Voláteis numa amostra é sensorialmente perceptível para valores superiores a 430 µg/L. Dado que 59% dos provadores conseguem detetar a presença destes componentes para uma gama de concentrações que varia entre 300 e 400 µg/L, inferior ao limite de perceção, pode considerar-se que a Câmara de Provadores apresenta muito boa sensibilidade.

Deve, ainda, destacar-se o baixo número de amostras analisadas por SPME/GC-MS/MS, desde o início do ano, com valores de Fenóis Voláteis muito elevados, o que poderá significar uma maior atenção a este problema por parte dos agentes económicos.

### **3.4. Controlo de qualidade**

O controlo de qualidade efetuado durante as determinações analíticas dos diversos contaminantes em estudo consistiu na utilização periódica de padrões de verificação entre as determinações cromatográficas e, por vezes, no recurso a amostras utilizadas em ensaios interlaboratoriais.

Os padrões de verificação eram preparados da mesma forma que os padrões de calibração, sendo, por norma, utilizados padrões com concentrações intermédias (Padrões 2, 3 e/ou 4). Tal como nos padrões de calibração foi determinada a área dos picos, o tempo de retenção, analisado o espetro de massa e respetiva concentração estimada pela curva de calibração (concentração calculada) para cada contaminante.



## 4. Conclusões e sugestões para trabalho futuro

Este trabalho surgiu com o objetivo de implementar e validar um método para a determinação de contaminantes em vinho por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e a sua correlação com a análise sensorial.

Numa fase inicial do trabalho, foram feitos estudos acerca das condições MS/MS a utilizar, assim como das gamas de concentração para todos os compostos que se pretendem quantificar (4-EP, 4-EG, TCA, TBA e TeCA), recorrendo à fibra 100  $\mu\text{m}$  PDMS. Foram estabelecidas as condições MS/MS e os tempos de retenção.

Numa fase posterior, tendo em vista a inclusão de novos compostos, foram elaborados estudos de otimização das condições de extração, comparando a fibra em utilização 100  $\mu\text{m}$  PDMS com a fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS. Concluiu-se que os resultados eram mais satisfatórios, em termos de resposta e da relação sinal/ruído, com a fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS. Como condições de extração estabeleceram-se 55°C para a temperatura de incubação/extração, uma velocidade de agitação de 250 rpm e 60 minutos de tempo de extração. O processo de extração decorreu em *vials* de vidro âmbar, com uma capacidade de 20 mL, num sistema de três fases ou *headspace*, tendo-se optado pela diluição das amostras com água ultrapura (1:2, no caso dos Vinhos do Douro e 1:3 para os Vinhos do Porto). Depois dos processos de extração e dessorção, a fibra foi acondicionada durante 5 minutos a 270°C, na presença de uma corrente de azoto.

Para validar a metodologia foram realizados estudos de linearidade, limites de deteção e de quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e recuperação.

Relativamente aos estudos de linearidade, de um modo geral, obtiveram-se bons resultados para as gamas de concentração escolhidas. Foram obtidos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) superiores a 0,99 para todos os contaminantes, em grande parte das curvas de calibração. O valor de  $R^2$  mais elevado foi conseguido para o 4-EP (0,9997), enquanto o mais baixo pertence ao TBA (0,9728).

Quanto aos limites de deteção e de quantificação pode considerar-se que se obtiveram bons resultados. O 4-EP é o contaminante que apresenta uma gama de concentrações mais alta, notando-se limiares analíticos mais elevados. Apresenta limites de quantificação próximos dos últimos níveis de concentração para algumas das curvas de calibração e os limites de deteção variam entre 65 e 583  $\mu\text{g/L}$ , quando calculados através dos parâmetros associados à curva de calibração. No caso dos Anisóis, o TBA apresenta o limite de deteção mais baixo para uma das curvas com 0,4 ng/L e o mais elevado para outra curva de calibração com 17,0 ng/L.

Através da análise dos cromatogramas obtidos para os padrões de concentração mais baixa de todos os contaminantes, foi possível concluir que seria possível determinar os limites de deteção e

quantificação através do método da relação sinal/ruído. Segundo esta fórmula de cálculo, o limite de quantificação seria equivalente ao valor da concentração para o qual se obteria uma relação sinal/ruído igual a 10. Deste modo, seria possível baixar os limites de quantificação obtidos, especialmente no caso do 4-EP, que apresenta os valores mais elevados. Porém, não seria possível manter sempre os mesmos limites, uma vez que a resposta do aparelho apresenta variações de dia para dia, razão pela qual se recorre a calibrações diárias. No caso do TeCA poderia tornar-se particularmente mais complicado, visto que a relação sinal/ruído para o padrão mais baixo é muito próxima de 10. Podem considerar-se válidos os limites de quantificação que se inferem dos estudos de repetibilidade e precisão intermédia.

Foram utilizadas duas fórmulas de cálculo para o estudo da repetibilidade. Na primeira foram analisadas pelo menos cinco preparações independentes, realizadas em condições de repetibilidade, isto é, sem que se fizessem variar as condições a que estavam sujeitas. A segunda forma utilizada para determinar a repetibilidade foi realizada tendo em conta o documento de validação da OIV, tendo-se elaborado vários estudos de repetibilidade em duplicado e em dias diferentes. Obtiveram-se resultados mais satisfatórios segundo a fórmula de cálculo proposta pelo documento de validação da OIV. Este resultado estará relacionado com o facto de as amostras serem analisadas em duplicado, uma vez que à medida que a sequência de trabalho vai avançando, as condições de trabalho do equipamento vão sendo alteradas: a fibra DVB/CAR/PDMS, o *liner* do injetor, a coluna e o detetor vão ficando sujos e perdendo sensibilidade.

No que respeita à precisão intermédia, pela mesma razão que a fórmula de cálculo proposta pela OIV se revela mais eficaz, também se verificam bons resultados, sobretudo se comparada com os valores de repetibilidade determinados segundo a primeira fórmula de cálculo descrita. O facto de se fazer uma manutenção diária antes de iniciar cada sequência de trabalho contribui para que as condições e a sensibilidade que se vão perdendo ao longo de uma sequência se mantenham de dia para dia, conduzindo a resultados mais satisfatórios.

De acordo com as especificações descritas no documento SANCO/10684/2009, todos os contaminantes apresentam bons resultados de repetibilidade e precisão intermédia.

Foram, ainda, realizados estudos de exatidão recorrendo a ensaios de recuperação e a ensaios interlaboratoriais. Muitas vezes conseguem-se boas recuperações, no entanto notam-se maiores dificuldades para o TBA e para o TeCA.

Relativamente aos ensaios interlaboratoriais, verificaram-se mais discrepâncias para o 4-EP. Embora se tenham realizado diversos estudos, obtiveram-se, na sua maioria, resultados questionáveis para este composto. Na generalidade, os restantes contaminantes apresentam resultados satisfatórios ( $|z\text{-score}| \leq 2$ ).

No que diz respeito ao teor de contaminantes nos vinhos estudados é possível concluir que nem todas as amostras verificam a presença destes compostos. Nos vinhos de 2011 foram detetados Fenóis Voláteis em todas as amostras. Já para os Anisóis, 4 das 8 amostras analisadas encontram-se contaminadas com TCA com níveis acima do limite de perceção. No caso do TBA, apresentam teores deste contaminante 5 das amostras analisadas, no entanto, a concentração obtida é superior à do limite de perceção (3 ng/L) em apenas 3. Todas as amostras manifestam a presença de TeCA, no entanto em quantidade inferior à do limite de perceção (15 ng/L). Para o ano de 2012, das 36 amostras cuja presença de 4-EP foi confirmada, apenas 15 apresentam uma concentração superior à indicada como limite de perceção (420 µg/L). O valor mais elevado de 4-EP foi obtido para a Amostra 35 com cerca de 2000 µg/L. Já para o 4-EG, das 38 amostras analisadas, 34 mostram uma concentração superior ao limite de perceção de 33 µg/L sugerido pela literatura. Quanto aos Anisóis, verifica-se que duas amostras contêm TCA com um teor inferior ao limite de perceção e 15 revelam a ausência deste composto. Para o TBA, em 9 das amostras analisadas não foi detetado este contaminante e em 6 encontra-se abaixo do limite de perceção de 3 ng/L. Relativamente ao TeCA, apenas uma, das 32 amostras que apresentam este contaminante, se encontra acima do limite de perceção de 15 ng/L.

Em termos de correlação entre os resultados obtidos e a análise sensorial, foram feitos estudos relativamente aos Fenóis Voláteis, no entanto para um número de amostras pouco representativo (18 amostras de 2012). Tendo em conta os estudos elaborados pode concluir-se que a Câmara de Provedores apresenta muito boa sensibilidade e que o número de provedores que detetam Fenóis Voláteis aumenta com a concentração destes contaminantes nas amostras. Deve ainda referir-se que o baixo número de amostras com elevado teor de Fenóis Voláteis poderá significar uma maior atenção por parte dos agentes económicos para este problema.

De modo a que se possa dar continuidade a este estudo propõem-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Repetir o estudo tendo em conta diferentes matrizes, nomeadamente lotes de Vinho do Douro Branco, Vinho do Porto Branco e Tinto, de modo a verificar quais as consequências do efeito da matriz nas análises.
- ✓ Analisar mais amostras dos componentes estudados neste trabalho e procurar estabelecer uma correlação sustentada com a Câmara de Provedores.
- ✓ O estudo de novos compostos e a otimização das condições de trabalho de modo que seja possível incorporar todos os contaminantes no mesmo método de análise.
- ✓ Tentar que a análise dos novos contaminantes possa ser correlacionada com a análise sensorial, de forma a criar uma maior interação entre os sectores.



## Bibliografia

1. Jovens Agricultores. Vinho. O Vinho: um beber de gerações. [Online] [Citação: 13 de Novembro de 2011.] <http://www.ajap.pt/sippi/recursos/docs/Vinho.pdf>.
2. Instituto da Vinha e do Vinho, I.P. A Vinha e o Vinho em Portugal. [Online] [Citação: 29 de Dezembro de 2011.] <http://www.ivv.min-agricultura.pt/np4/47>.
3. Especialização em Produção Enológica. História do Vinho e da Vinha. [Online] [Citação: 29 de Dezembro de 2011.] <http://www.aesbuc.pt/twt/ETGI/MyFiles/MeusSites/Enologia/historia.html>.
4. M. Q. Monteiro. Vinhos Portugueses - Online - The Portuguese Wine Page. A História do Vinho. [Online] 21 de Abril de 2002. [Citação: 29 de Dezembro de 2011.] <http://www.vinhos.online.pt/dar.asp?id=765>.
5. Peixoto, M. A.. Região Demarcada do Douro. [Online] UTAD. [Citação: 22 de Maio de 2012.] [http://home.utad.pt/~rfvr/reg\\_dem\\_douro.html](http://home.utad.pt/~rfvr/reg_dem_douro.html).
6. Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto. IVDP.pt. [Online] [Citação: 8 de Novembro de 2011.] <http://www.ivdp.pt/index.asp?idioma=0>.
7. Decreto-Lei nº 47 de 2007. 27 de Fevereiro de 2007.
8. Pizarro, C., Pérez-del-Notário, N. e González-Sáiz, J. M. 2007. Multiple headspace solid phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1166, pp. 1-8.
9. Dumoulin, M., Barthas, S.. Applications courantes de la micro-extraction en phase solide (SPME) à l'analyse des vins. *Revue OEnologues*. Vol. 114, pp. 19-20.
10. Dumoulin, M., Barthas, S., 2005. Applications de la Micro Extraction en Phase Solide (SPME) à l'analyse des vins. Laboratoire EXACT - MACON - FRANCE : Côté vigne.
11. Simões, P. e Macena, T., 2006. O "gosto a rolha" no Vinho. Instituto Superior de Agronomia : Enologia.
12. Gómez-Azira, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., 2006. Use of Multiple headspace solid phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1112, pp. 133-140.
13. Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N. e González-Sáiz, J. M., 2007. Optimization of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation method for the direct

determination of haloanisoles and halophenols in wine. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1143, pp. 26-35.

14. Qualidade. Cork Information Bureau, 2010.

15. Riboulet, J.-M., Alves, L. A. R. e Urreizti, N., 2002. Quantificação dos cloroanisóis por micro extracção em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrometria de massa (MS) em macerados de lotes de rolhas de cortiça ou em vinho. Dosage des chloroanisoles par microextraction en phase solide (SPME) et en chromatographie gazeuse (GC) avec detection en spectrometrie de masse (MS) dans les lixiviats de lots de bouchons de liège ou dans un vin. *Ciência Téc. Vitiv.*, Vol. 17 (2), pp. 61-71.

16. Coque, J. J. R., Rodríguez, M. L. A., Goswami, M., Martínez, R. F., 2006. Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles). Léon : Agrupación Sanvicenteña Empresarios del Corcho.

17. Chatonnet, P., 2004. Dosage du TCA extractible appliqué au contrôle de la qualité des bouchons ALTEC - Particularités et interprétations. *Revue des OEnologues*, Vol. 112, pp. 25-28.

18. Chatonnet, P., 2004.. Identification d'une nouvelle source de contamination des vins responsable de mauvaises odeurs à caractère «moisi»: le 2,4,6-tribromoanisole (TBA). [ed.] American Chemical Society. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in «corky, musty» odors in wines. Merignac, France : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

19. Monje, M.-C., Privat, C., Gastine, V., Nepveu, F., 2002. Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. France : *Analytica Chimica Acta*, Vol. 458, pp.111-117.

20. Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Sefton, M. A., 2000. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol in red wine.. Australia : *Journal of Chromatography A*, Vol. 874, pp. 101-109.

21. Roseira, M., 2011. O caso dos Fenóis Voláteis nos Vinhos Tintos da Região Demarcada do Douro.. Portugal : técnica.

22. Coque, J. J. R., Pérez, E. R., Goswami, M., Martínez, R. F., García, S. C., Rodríguez, M. L. A., Martín, J. F. M., 2006. Contaminação do Vinho por Haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis. Espanha : APCOR - Associação Portuguesa da Cortiça.

23. Arapitsas, P., et al., 2003. Artificial aging of wines using oak chips. Greece : *Food Chemistry*, Vol. 86.

24. Carrillo, J. D., Garrido-López, A., Tena, M. T., 2006. Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography - mass spectrometry. Spain : Journal of Chromatography A, Vol. 1102, pp. 25-36.
25. Ridgway, K., 2012. Sample Preparation for Food Contaminant Analysis, LCGC EUROPE. Vol. 25. 2.
26. Sousa e Silva, A. S. C. R. B.V. de., 2009. Dissertação de Mestrado: Estudo da Relação entre Parâmetros de Qualidade de Rolhas de Cortiça e a sua Contaminação com 2,4,6-Tricloroanisol. Universidade de Aveiro.
27. Pires Valente, A. L., Augusto, F., 1999. Microextração por Fase Sólida. Campinas - SP : Química Nova, Vol. 23 (4), pp. 523-530.
28. Martins, J. G., 2009. Dissertação de Mestrado: Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para a Determinação de Pesticidas em Vinhos do Douro e Vinhos do Porto. Porto.
29. Neto, P. M. C. V., 2005. Dissertação de Mestrado: Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de Quercus suber L.: Estudo dos efeitos de matriz por micro-extração em fase sólida na região de espaço de cabeça. Universidade de Aveiro.
30. Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. A., 1998. Princípios de Análise Experimental. Porto Alegre : Bookman, 5ª Ed..
31. Chaves das Neves, H.J. e Costa Freitas, A.M., 1996. Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução. Dias de Sousa, Lda..
32. Hoffmann, E., Stroobant, V. 2007. Mass Spectrometry: Principles and Applications 3rd Edition. West Sussex, England : John Wiley & Sons, Ltd..
33. Sumner Group: Ionization Technique. The Samuel Roberts Noble Foundation. [Online] 1997 - 2010. [Citação: 22 de Fevereiro de 2012.] <http://www.noble.org/PlantBio/Sumner/ionization-tech.html>.
34. Learning by Simulations. [Online] [Citação: 2012 de Fevereiro de 28.] [http://www.vias.org/simulations/simusoft\\_emultiplier.html](http://www.vias.org/simulations/simusoft_emultiplier.html).
35. De Grande, S.M.B., Aquino Neto, F.R., 1990. A Espectrometria de Massas Acoplada a Espectrometria de Massas EM-EM. Rio de Janeiro, Brasil.
36. Chatonnet, P., Boutou, S., 2006. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatography/ mass spectrometry assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine.. France : Journal of Chromatography A, Vol. 1141, pp. 1-9.

37. Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., Pizarro, C., 2004. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. Spain : Journal of Chromatography A, Vol. 1056, pp.1-2.
38. Jomini, C., 1999. Développement d'une méthode rapide d'identification de chlorophénols et chloroanisoles dans les vins.
39. Zalacain, A., Alonso, G.L., Lorenzo, C., Iñiguez, M., Salinas, M., 2004. Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. Argentina : Journal of Chromatography A, Vol. 1033, pp. 173-178.
40. Ezquerro, O., Garrido-López, A. e Tena, M.T., 2006. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and guaiacol in cork stoppers by pressurised extractin and GC/MS. Spain : Journal of Chromatography A, Vol. 1102, pp. 18-24.
41. Hoffmann, A., Sponholz, W.R., David, F., Sandra, P., 2000. Corkiness in wine - Trace Analysis of 2,4,6-Trichloroanisole by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Thermal Desorption GC/MS. Global Analytical Solutions, Vol. 03, pp. 1-5.
42. Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J. M., 2007. Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. Spain : Journal of Chromatography A, Vol. 1149, pp. 138-144.
43. Riu, M., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J., 2007. Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines. Spain : Journal of Chromatography A, Vol. 1138, pp. 18-25.
44. Chatonnet, P., Boutou, S, Dominique, L., 2010. Identificación y cuantificación rápida de los contaminantes químicos considerados como defectos organolépticos más importantes del vino. s.l. : Enoviticultura, Vol. 2, pp. 1-5.
45. Dubernet, M.. Protocole de validation d'une méthode d'analyse usuelle par rapport à la méthode de référence OIV. France : Office International de la Vigne et du Vin.
46. Bouvier, J. C., 1994. Guide d'évaluation et de validation d'une méthode d'analyse. INRA.
47. Guia RELACRE nº 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Portugal : Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, Fevereiro 2000. Q-DST 19.
48. Mendes, A. S. R.. Implementação e Validação de métodos analíticos. [Online] [Citação: 2012 de Fevereiro de 15.] <http://www3.uma.pt/valimed/livro%202004/artigo6-AR.pdf>.
49. Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. Campinas, SP : Quim. Nova, Vol. 27. 5.

50. OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyses - OIV - Guide de validation - Contrôle qualité. Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse oenologique alternative. 2005. OIV\_MA\_AS1-12:R2005.

51. Method Validations and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. 2010. SANCO/10684/2009.

52. OIV. Dosage de résidus de pesticides dans le vin après extraction par la méthode QuEChERS. 2012. CII-SCMA 2010-03 32 (FV 1340).



## **Anexos**



## Anexo A – Preparação das Soluções

Tabela A.1 – Preparação das Soluções Padrão de Fenóis Voláteis.

Solução		Primária	Secundária
4-Etilfenol	Massa (g)	0,0500	--
	Balão Volumétrico (mL)	50	50
	Volume pipetado (mL)	--	5
	Concentração (mg/L)	999	99,9
4-Etilguaiacol	Massa (g)	0,0500	--
	Balão Volumétrico (mL)	50	50
	Volume pipetado (mL)	--	1,15
	Concentração (mg/L)	993	22,8

Tabela A.2 – Preparação das Soluções Padrão de Anisóis.

Solução		Primária	Secundária	Terciária
TCA	Massa (g)	0,005	--	--
	Balão Volumétrico (mL)	50	50	25
	Volume pipetado (mL)	--	0,065	1,000
	Concentração	99,9 mg/L	0,1299 µg/L	0,005195 ng/L
TBA	Massa (g)	0,005	--	--
	Balão Volumétrico (mL)	50	50	25
	Volume pipetado (mL)	--	0,100	0,050
	Concentração	99,9 mg/L	2,4975 µg/L	0,004995 ng/L
TeCA	Massa (g)	0,005	--	--
	Balão Volumétrico (mL)	50	50	25
	Volume pipetado (mL)	--	0,250	0,250
	Concentração	99,0 mg/L	0,4950 µg/L	0,004950 ng/L

**Tabela A.3 – Representação das concentrações de cada contaminante nos Padrões de Calibração.**

<b>Composto</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>
<b>4-EP (µg/L)</b>	115,200	230,500	460,900	922,800	1382,80	1843,60
<b>4-EG (µg/L)</b>	28,990	57,990	115,970	231,950	347,920	463,900
<b>TCA (ng/L)</b>	5,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
<b>TBA (ng/L)</b>	5,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00
<b>TeCA (ng/L)</b>	5,00	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00

## Anexo B – Otimização do método

### Diluição da amostra

Tabela B.1 – Efeito da diluição nas áreas dos picos e na razão sinal/ruído do 4-EP. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 18 min.

% álcool	Área do Pico (4-EP)	Relação Sinal/Ruído
	145626	216
6%	86222	108
	94267	125
<b>Média</b>	108705	150
	275893	358
12%	181229	201
	135591	136
<b>Média</b>	197571	232
	42050	65
20%	20534	36
	18571	31
<b>Média</b>	27052	44

Tabela B.2 – Efeito da diluição nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min.

Matriz	% álcool	Área dos picos				
		4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
Vinho Branco	6%	5996703	13665439	45973	35046	19288
	6%	5627671	15167086	58753	39310	18108
	6%	5892997	15626933	58851	41899	19992
	<b>Média</b>	<b>5839124</b>	<b>14819819</b>	<b>54526</b>	<b>38752</b>	<b>19129</b>
	12%	2597930	6116557	27652	16812	7364
	12%	2615175	6049552	25596	14467	7187
	12%	2690340	5807912	26610	14079	5164
<b>Média</b>	<b>2634482</b>	<b>5991340</b>	<b>26619</b>	<b>15119</b>	<b>6572</b>	
Vinho Tinto	6%	4354697	12169044	49232	26491	12047
	6%	5519162	13805079	54830	29625	12605
	6%	4889039	14394269	57177	32239	13682
	<b>Média</b>	<b>4920966</b>	<b>13456131</b>	<b>53746</b>	<b>29452</b>	<b>12778</b>
	12%	2383583	5842253	23506	13007	4615
	12%	2619492	5499902	23803	11925	5316
	12%	2321144	4860438	25494	11128	3529
	<b>Média</b>	<b>2441406</b>	<b>5400864</b>	<b>24268</b>	<b>12020</b>	<b>4487</b>

Tabela B.3 – Efeito da diluição na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, tempo de extração 60 min.

Matriz	% álcool	Razão Sinal/Ruído				
		4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
Vinho Branco	6%	6001	15256	539	56	195
	6%	4786	16748	549	50	191
	6%	4910	19053	552	37	198
	<b>Média</b>	<b>5232</b>	<b>17019</b>	<b>547</b>	<b>48</b>	<b>195</b>
	12%	2268	9755	191	17	84
	12%	2813	7215	127	14	82
	12%	2650	7027	221	11	58
	<b>Média</b>	<b>2577</b>	<b>7999</b>	<b>180</b>	<b>14</b>	<b>75</b>
Vinho Tinto	6%	3114	11284	514	41	122
	6%	3301	16243	399	279	128
	6%	2164	12428	377	273	125
	<b>Média</b>	<b>2860</b>	<b>13318</b>	<b>430</b>	<b>198</b>	<b>125</b>
	12%	76	6928	203	12	47
	12%	2523	7184	214	110	57
	12%	1941	5883	121	11	36
	<b>Média</b>	<b>1513</b>	<b>6665</b>	<b>179</b>	<b>44</b>	<b>47</b>

### Tempo e temperatura de extração

Tabela B.4 – Efeito do tempo de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V).

Tempo de extração	Área dos picos				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
18	148067	654078	4637	3863	2223
	179927	718991	4463	5990	1946
	184148	747862	4626	6135	1865
<b>Média</b>	<b>170714</b>	<b>706977</b>	<b>4575</b>	<b>5329</b>	<b>2011</b>
40	194717	719652	4809	7537	2665
	153766	633637	4578	8079	2893
	164122	658959	4931	9075	3535
<b>Média</b>	<b>170868</b>	<b>670749</b>	<b>4773</b>	<b>8230</b>	<b>3031</b>
60	222685	941114	5633	8574	4733
	179553	746474	4985	8721	5362
	201635	654078	5105	9388	4141
<b>Média</b>	<b>201291</b>	<b>780555</b>	<b>5241</b>	<b>8894</b>	<b>4745</b>

Tabela B.5 – Efeito do tempo de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, temperatura de extração 55°C, 6% de etanol (V/V).

Tempo de extração	Razão Sinal/Ruído				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	139	763	63	10	23
18	145	910	58	14	21
	175	875	67	117	23
<b>Média</b>	<b>153</b>	<b>849</b>	<b>63</b>	<b>47</b>	<b>22</b>
	200	769	68	13	32
40	133	696	58	16	22
	175	654	99	14	25
<b>Média</b>	<b>169</b>	<b>706</b>	<b>75</b>	<b>14</b>	<b>26</b>
	14	1287	119	11	60
60	174	814	77	106	55
	192	1046	71	15	43
<b>Média</b>	<b>127</b>	<b>1049</b>	<b>89</b>	<b>44</b>	<b>53</b>

Tabela B.6 – Efeito do tempo de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V).

Tempo de extração	Área dos picos				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	1560960	3966586	12973	6170	2526
18	1648323	3964845	13460	6929	1799
	1641779	3989752	12595	7032	2113
<b>Média</b>	<b>1617021</b>	<b>3973728</b>	<b>13009</b>	<b>6710</b>	<b>2146</b>
	2408859	6487728	19770	13288	4717
40	2432265	5877869	22269	13986	4346
	2321771	5611630	21535	11366	1690
<b>Média</b>	<b>2387632</b>	<b>5992409</b>	<b>21191</b>	<b>12880</b>	<b>3584</b>
	2609003	6104527	18134	22345	8922
60	2277982	5602874	23233	16804	8903
	2501094	6456502	22247	21203	7776
<b>Média</b>	<b>2387632</b>	<b>6054634</b>	<b>21205</b>	<b>20117</b>	<b>8534</b>

Tabela B.7 – Efeito do tempo de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, temperatura de extração 55°C, diluição a 6% de etanol (V/V).

Tempo de extração	Razão Sinal/Ruído				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	1197	4642	135	4	25
18	1292	3999	35	8	21
	1288	4208	40	25	5
<b>Média</b>	<b>1259</b>	<b>4283</b>	<b>70</b>	<b>12</b>	<b>17</b>
	1147	5270	280	7	7
40	2011	5501	266	9	41
	1886	6279	299	9	37
<b>Média</b>	<b>1681</b>	<b>5683</b>	<b>282</b>	<b>8</b>	<b>28</b>
	42	7580	216	11	54
60	60	5921	313	8	76
	60	6583	243	11	69
<b>Média</b>	<b>54</b>	<b>6695</b>	<b>257</b>	<b>10</b>	<b>66</b>

Tabela B.8 – Teste da temperatura de extração na área dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V).

Temperatura de extração	Área dos picos				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	88837	468813	4030	7721	2724
45	71500	314876	3221	6103	1741
	65990	292109	2496	6148	1501
<b>Média</b>	<b>75442</b>	<b>358599</b>	<b>3249</b>	<b>6657</b>	<b>1989</b>
	53867	241553	1619	5145	2181
55	75119	343328	2622	6369	3220
	135882	504097	3100	7182	3249
<b>Média</b>	<b>88289</b>	<b>362993</b>	<b>2447</b>	<b>6232</b>	<b>2883</b>

Tabela B.9 – Efeito da temperatura de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 100 µm PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V).

Temperatura de extração	Razão Sinal/Ruído				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	8	553	67	120	30
45	68	338	59	10	22
	69	329	41	18	18
<b>Média</b>	<b>48</b>	<b>407</b>	<b>56</b>	<b>49</b>	<b>23</b>
	51	281	18	83	25
55	59	381	39	108	38
	11	516	47	19	35
<b>Média</b>	<b>40</b>	<b>393</b>	<b>35</b>	<b>70</b>	<b>33</b>

Tabela B.40 – Efeito da temperatura de extração nas áreas dos picos dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V).

Temperatura de extração	Área dos picos				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	4591668	11507473	28255	16872	6942
45	4568562	11471598	28741	18615	7566
	6217947	15345360	30708	22624	8384
<b>Média</b>	<b>5126059</b>	<b>12774810</b>	<b>29235</b>	<b>19370</b>	<b>7631</b>
	5585345	16306151	29445	33505	15272
55	5966233	16567481	28167	35368	14962
	5650801	15454183	25127	34654	14242
<b>Média</b>	<b>5734126</b>	<b>16109272</b>	<b>27580</b>	<b>34509</b>	<b>14825</b>

Tabela B.11 – Efeito da temperatura de extração na razão sinal/ruído dos Fenóis Voláteis e dos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V).

Temperatura de extração	Razão Sinal/Ruído				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
	3895	13795	416	213	86
45	3973	9078	370	284	90
	4155	13633	319	287	107
<b>Média</b>	<b>4008</b>	<b>12169</b>	<b>368</b>	<b>261</b>	<b>94</b>
	3488	13806	549	45	32
55	2790	15437	477	380	31
	2430	13490	387	36	37
<b>Média</b>	<b>2903</b>	<b>14244</b>	<b>471</b>	<b>154</b>	<b>33</b>

Tabela B.52 – Efeito da adição do sal nos Fenóis Voláteis e nos Anisóis. Condições: Fibra 30/50 µm DVB/CAR/PDMS, tempo de extração 60 min, diluição a 6% de etanol (V/V).

Adição de Sal	Área dos picos				
	4-EP	4-EG	TCA	TBA	TeCA
Com Sal ( $\cong$ 2g de NaCl)	5928025	17062024	26934	35612	13613
	5978375	16801530	24967	27483	13601
	6498266	18012256	28882	33610	16335
<b>Média</b>	<b>6134889</b>	<b>17291937</b>	<b>26928</b>	<b>32235</b>	<b>14516</b>
	3270046	8070263	18291	17890	7506
Sem Sal	2996338	8569738	22825	18181	6359
	2702583	7800484	20393	18768	8453
<b>Média</b>	<b>2989656</b>	<b>8146828</b>	<b>20503</b>	<b>18280</b>	<b>7439</b>

## Anexo C – Espectros de Massa obtidos através da biblioteca de espectros NIST.

### ➤ Fenóis Voláteis

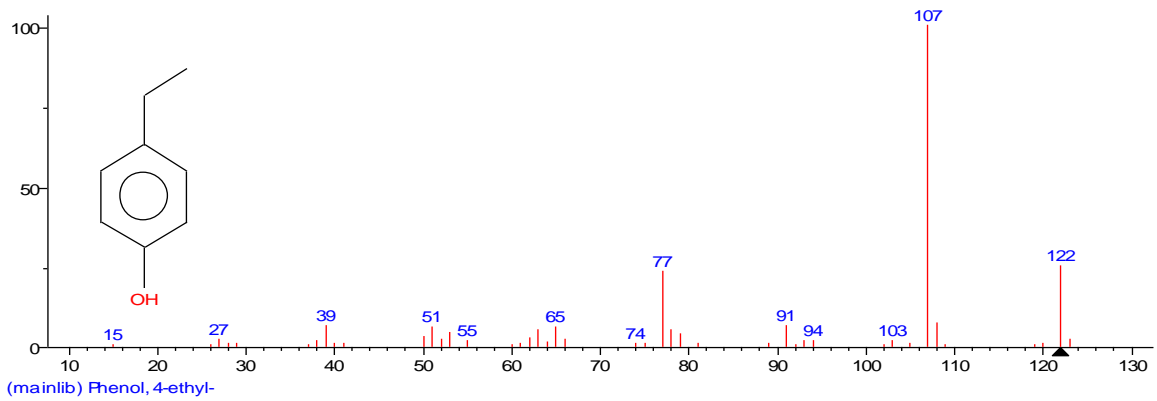


Figura C.1 – Espectro de Massa para o 4-Etilfenol.

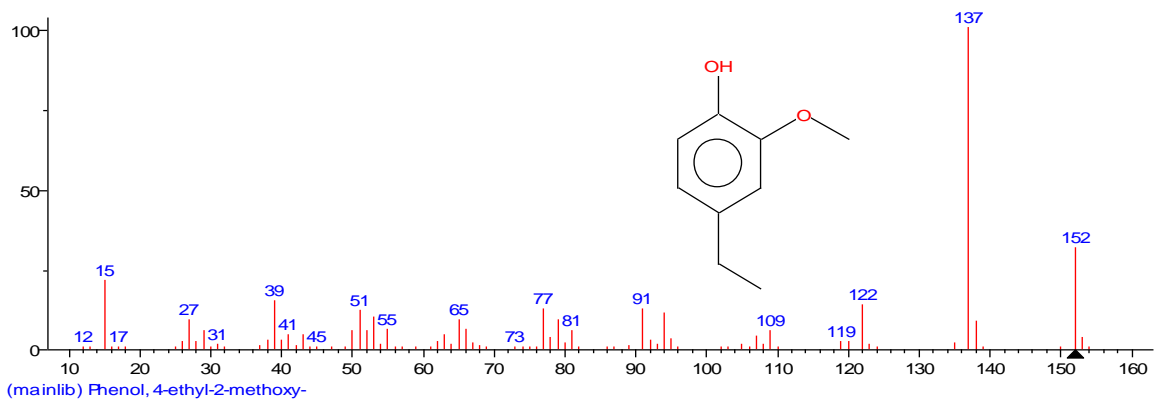


Figura C.2 – Espectro de Massa para o 4-Etilguaicol.

## ➤ Anisóis

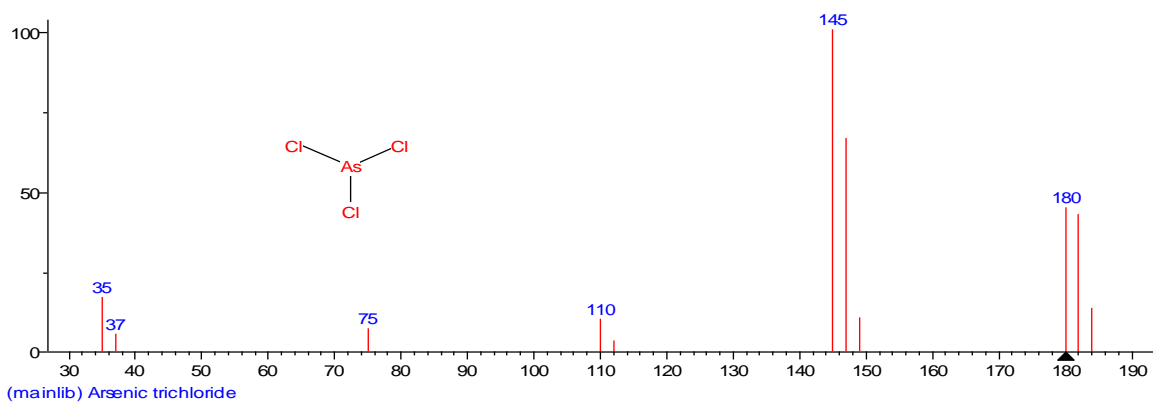


Figura C.3 – Espectro de Massa para o 2,4,6-Tricloroanisol.

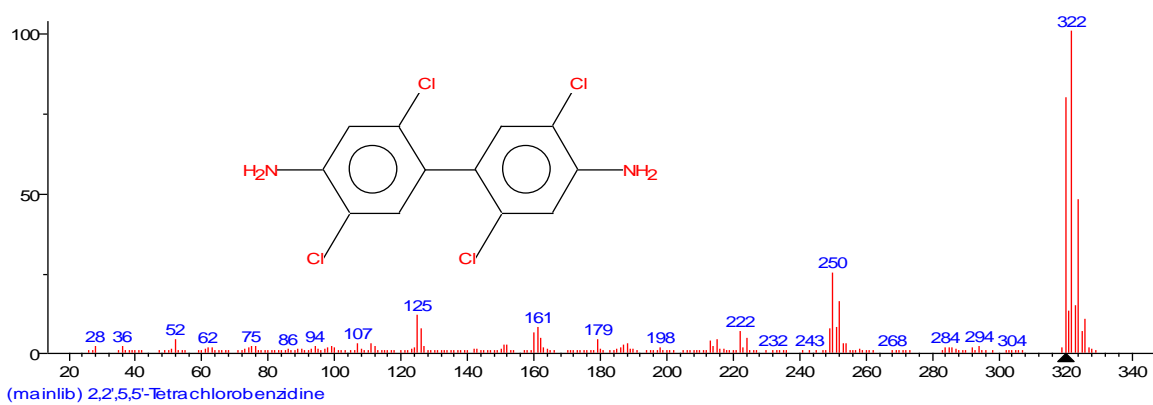


Figura C.4 – Espectro de Massa para o 2,3,4,6-Tetracloroanisol.

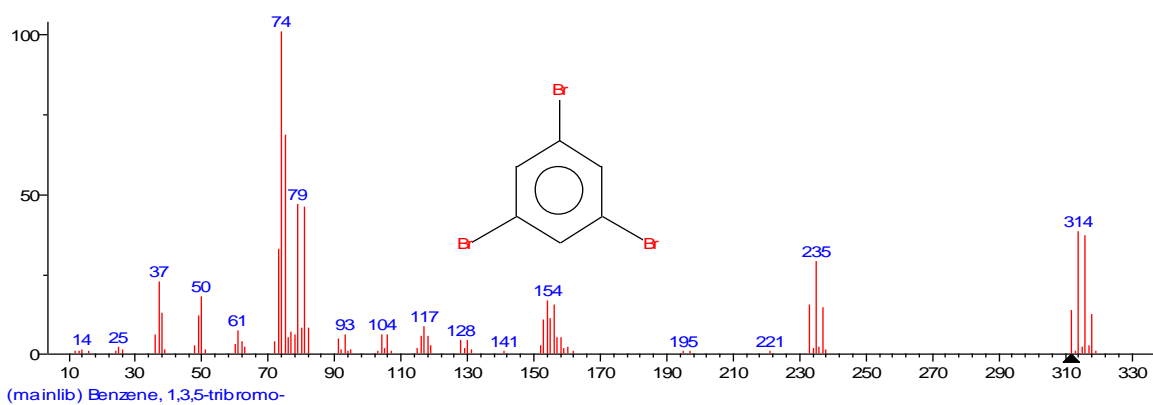
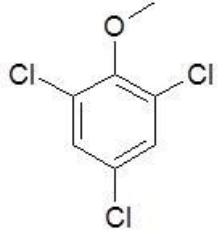
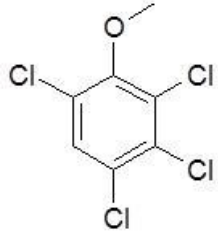
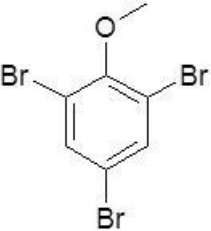
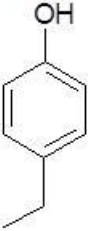
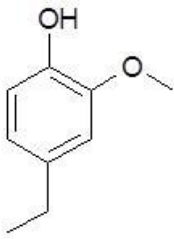


Figura C.5 – Espectro de Massa para o 2,4,6-Tribromoanisol.

## Anexo D – Propriedades físico-químicas dos contaminantes estudados

Tabela D.6 – Propriedades físico-químicas dos contaminantes estudados [14, 19, 36].

Composto	Massa Molecular (g/mol)	Odor	Limite de percepção	Estrutura
2,4,6-Tricloroanisol	211,47	Mofo	3 ng/L	
2,4,5,6-Tetracloroanisol	231,89	Mofo/ Pó	15 ng/L	

Composto	Massa Molecular (g/mol)	Odor	Limite de percepção	Estrutura
2,4,6-Tribromoanisol	344,83	Mofo	3 ng/L	
4-Etilfenol	122,16	Fenólico, couro, cavalaria e suor de cavalo	430 µg/L	
4-Etilguaiacol	152,19	Fenólico, temperos, baunilha, cravo, fumo e madeira queimada	33 µg/L	

## Anexo E – Resultados da validação do método.

### Linearidade

Tabela E.7 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do 4-EP.

Concentração (µg/L)	115,20	230,50	460,90	921,90	1382,8	1843,6	<i>m</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
30-03-2012	249458	686504	1364809	2744093	4070336	5566143	3029	-54561	0,9995
02-04-2012	568963	1387681	2591777	5009877	8302669	11152124	6082	-187173	0,9974
18-04-2012	398650	775624	1783867	5001777	5673017	9052325	4880	-249104	0,9755
20-04-2012	504601	1166984	2674541	4242359	7603853	10539274	5682	-236864	0,9900
14-05-2012	329885	502447	1523630	3591803	5753342	8431131	4703	-528106	0,9943
25-05-2012	657778	1923606	4275078	8936969	16552786	20249682	11719	-911968	0,9914
14-06-2012	476459	1528285	2531523	5326102	-	10815771	5897	-77658	0,9987
19-06-2012	537765	1485795	2919147	6793140	12050408	13702518	8083	-427262	0,9840

Tabela E.2 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do 4-EG.

Concentração (µg/L)	28,990	57,990	115,97	231,95	347,92	463,90	<i>m</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
30-03-2012	727890	1955388	3983751	6967604	11262083	13875643	30349	155948	0,9951
02-04-2012	1620612	3778176	7882821	14359110	24596551	33988963	73455	-891931	0,9948
18-04-2012	459538	1131922	2305684	5743851	7124565	11756441	24788	-396854	0,9801
20-04-2012	715480	1664757	3578696	5707659	10207883	15425623	32379	-511204	0,9806
14-05-2012	423010	-	1851938	4203035	6854344	10589256	23099	-707449	0,9850
25-05-2012	768484	1983151	4345112	9391389	17069378	21695530	49390	-1053800	0,9939
14-06-2012	512120	1724452	2696050	5973154	-	12985233	28318	-312156	0,9966
19-06-2012	675694	1750671	3475560	7720973	14462266	16262961	38184	-542828	0,9805

Tabela E.3 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TCA.

Concentração (ng/L)	5,000	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	<i>m</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
30-03-2012	1665	5821	11334	16747	22441	28471	580	-582	0,9982
02-04-2012	2789	8661	18458	29297	45108	54748	1171	-3747	0,9948
18-04-2012	3864	9678	19138	32945	43282	58728	1200	-3049	0,9952
20-04-2012	5322	14396	30518	41094	62428	72659	1509	-1243	0,9926
14-05-2012	2727	7864	15875	27796	36808	46422	977	-2313	0,9982
25-05-2012	8434	13537	33356	55464	84334	118317	2433	-10618	0,9808
14-06-2012	4174	11521	26790	41635	60953	75248	1598	-4554	0,9983
15-06-2012	3571	8919	26407	40206	57951	63660	1418	-3192	0,9863
19-06-2012	5232	15083	32434	54838	70528	84136	1791	-2561	0,9947

Tabela E.4 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TBA.

Concentração (ng/L)	5,000	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	<i>m</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
30-03-2012	4275	7984	14119	16402	22503	25741	468	3087	0,9831
02-04-2012	7906	13015	-	31872	44326	53774	1023	2568	0,9982
18-04-2012	4020	8792	17583	32677	36773	51260	1033	-1491	0,9858
20-04-2012	3087	6695	14941	-	28455	35224	714	-162	0,9987
14-05-2012	-	6880	16263	22396	33944	48461	1008	-4664	0,9777
25-05-2012	6532	10394	25253	38339	62068	70032	1501	-3352	0,9850
14-06-2012	-	7680	13474	20553	-	34879	687	267	0,9982
15-06-2012	2019	5213	13031	21998	27174	-	746	-1776	0,9935
19-06-2012	7807	11172	15718	25593	30708	35668	639	4593	0,9886

Tabela E.5 – Áreas dos picos e construção das curvas de calibração do TeCA.

Concentração (ng/L)	5,000	10,00	20,00	30,00	40,00	50,00	<i>m</i>	<i>b</i>	R <sup>2</sup>
30-03-2012	-	1198	4144	5621	8624	11269	246	-1215	0,9914
02-04-2012	1621	4346	7841	12040	-	21079	425	-393	0,9980
18-04-2012	739	2626	7725	13161	15763	21872	463	-1656	0,9928
20-04-2012	1084	2452	3929	5391	7915	8925	175	432	0,9892
14-05-2012	-	4220	7417	10338	15090	18476	362	253	0,9934
25-05-2012	2655	6041	13422	20766	29900	38583	798	-2048	0,9974
14-06-2012	-	1072	3522	6611	-	14578	342	-2963	0,9887
15-06-2012	774	1835	5109	8274	10170	11658	253	-242	0,9813
19-06-2012	520	2520	-	10652	13787	16024	355	-885	0,9901

## Precisão

Tabela E.6 – Determinação da repetibilidade para os diversos contaminantes estudados.

Composto	Nível de concentração	Concentrações Calculadas										Média	Desvio Padrão
4-EP (µg/L)	P2	284,9	345,8	286,8	305,0	335,1	290,4	277,0	302,5	282,7	270,2	298,0	24,8
	P3	475,7	574,7	407,6	360,1	448,4	409,7	471,5	446,9	475,4	448,2	451,8	56,6
	P4	800,7	944,3	844,1	812,6	915,0	932,8	-	-	-	-	874,9	63,4
	P5	981,6	991,2	1000,6	985,2	1009,9	1013,0	972,5	966,6	961,2	933,6	981,6	24,2
4-EG (µg/L)	P2	53,6	55,4	52,1	51,3	60,5	52,6	52,3	55,5	53,0	48,9	53,5	3,1
	P3	80,4	102,5	74,6	67,0	78,6	75,8	80,6	73,8	88,4	76,8	79,8	9,7
	P4	204,1	275,7	216,4	204,0	237,0	242,9	-	-	-	-	230,0	27,7
	P5	198,4	184,4	189,8	185,3	196,5	192,3	198,1	185,6	174,7	173,5	187,8	8,9
TCA (ng/L)	P2	9,2	9,8	6,2	7,0	11,5	10,1	10,5	9,3	-	-	9,2	1,8
	P3	12,9	17,3	14,1	18,1	14,1	18,9	18,2	16,2	14,5	16,0	16,0	2,1
	P5	35,1		38,6	34,1	31,9	32,2	31,8	34,0	37,5	34,6	34,4	2,4
TBA (ng/L)	P2	11,3	12,0	12,6	11,3	11,8	14,6	12,4	8,4	-	-	11,8	1,7
	P3	16,0	15,2	14,2	10,9	8,6	10,0	-	-	-	-	12,5	3,0
	P5	42,3	46,5	39,7	24,5	33,1	-	-	-	-	-	37,2	8,6
TeCA (ng/L)	P2	8,0	9,5	10,8	9,7	7,9	9,8	12,3	7,5	-	-	9,4	1,6
	P3	18,7	12,9	23,7	15,6	21,3	-	-	-	-	-	18,4	4,3
	P5	32,4	30,5	40,8	38,6	31,2	32,9	34,9	-	-	-	34,5	3,9

Tabela E.7 – Determinação da repetibilidade para os Fenóis Voláteis, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV.

Padrão de Concentração	4-EP				4-EG			
	Ensaio 1 (µg/L)	Ensaio 2 (µg/L)	$W_i$ (valor absoluto)	$W_i^2$	Ensaio 1 (µg/L)	Ensaio 2 (µg/L)	$W_i$ (valor absoluto)	$W_i^2$
P3	433,3	414,9	18,5	340,7	105,0	96,6	8,4	71,1
	447,5	484,6	37,1	1378,0	113,6	119,8	6,2	38,6
	445,8	446,1	0,3	0,1	114,9	115,8	0,9	0,7
			<b>q</b>	<b>3</b>			<b>q</b>	<b>3</b>
			$\Sigma W_i^2$	1718,9			$\Sigma W_i^2$	110,4
			<b>Sr</b>	16,9			<b>Sr</b>	4,3
			<b>r (µg/L)</b>	47,4			<b>r (µg/L)</b>	12,0
		<b>C<sub>média</sub> (µg/L)</b>	445,4			<b>C<sub>média</sub> (µg/L)</b>	111,0	
P4	1025,4	964,8	60,5	3665,7	245,2	242,3	2,9	8,6
	941,7	764,1	177,7	31565,6	242,4	105,7	136,7	18690,5
			<b>q</b>	<b>2</b>			<b>q</b>	<b>2</b>
			$\Sigma W_i^2$	35231,3			$\Sigma W_i^2$	18699,1
			<b>Sr</b>	93,9			<b>Sr</b>	68,4
			<b>r (µg/L)</b>	262,8			<b>r (µg/L)</b>	191,4
			<b>C<sub>média</sub> (µg/L)</b>	924,0			<b>C<sub>média</sub> (µg/L)</b>	208,9

Tabela E.8 – Determinação da repetibilidade para os Anisóis, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV.

Padrão de Concentração	TCA				TBA				TeCA			
	Ensaio 1 (ng/L)	Ensaio 2 (ng/L)	W <sub>i</sub> (valor absoluto)	W <sub>i</sub> <sup>2</sup>	Ensaio 1 (ng/L)	Ensaio 2 (ng/L)	W <sub>i</sub> (valor absoluto)	W <sub>i</sub> <sup>2</sup>	Ensaio 1 (ng/L)	Ensaio 2 (ng/L)	W <sub>i</sub> (valor absoluto)	W <sub>i</sub> <sup>2</sup>
P3	19,1	20,3	1,2	1,4	30,8	30,4	0,4	0,2	24,5	28,8	4,3	18,4
	20,5	22,4	1,9	3,6	34,8	21,4	13,5	181,2	35,8	36,4	0,6	0,4
	18,1	19,0	0,8	0,7	22,6	19,1	3,5	12,4	22,4	20,0	2,4	5,7
	19,1	19,8	0,7	0,5	24,3	21,4	2,9	8,1	20,7	23,5	2,8	7,9
	20,1	19,0	1,1	1,1	22,4	22,1	0,3	0,1	26,6	24,0	2,7	7,1
			<b>q</b>	5,0			<b>q</b>	5,0			<b>q</b>	5,0
			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	7,3			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	202,1			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	39,4
			<b>Sr</b>	0,9			<b>Sr</b>	4,5			<b>Sr</b>	2,0
			<b>r (ng/L)</b>	2,4			<b>r (ng/L)</b>	12,6			<b>r (ng/L)</b>	5,6
			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	19,7			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	24,9			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	26,3
P4	32,7	32,9	0,2	0,1	57,4	53,9	3,5	12,2	67,9	48,0	19,9	394,7
	29,1	28,4	0,7	0,5	39,6	39,2	0,4	0,2	42,3	32,9	9,3	87,3
			<b>q</b>	2,0			<b>q</b>	2,0			<b>q</b>	2,0
			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	0,6			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	12,4			<b>Σ W<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	482,1
			<b>Sr</b>	0,4			<b>Sr</b>	1,8			<b>Sr</b>	11,0
			<b>r (ng/L)</b>	1,1			<b>r (ng/L)</b>	4,9			<b>r (ng/L)</b>	30,7
			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	30,8			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	47,5			<b>C<sub>média</sub> (ng/L)</b>	47,8

Tabela E.9 – Determinação da precisão intermédia para os diversos contaminantes estudados.

Composto	Padrão de concentração	Concentração Calculada							Média	Desvio Padrão
4-EP	P1	-	159,4	141,9	185,5	147,5	-	-	158,6	19,4
	P2	269,2	208,0	218,3	283,4	228,9	213,8	-	236,9	31,6
	P3	493,9	481,5	431,9	401,0	467,4	446,9	-	453,8	34,3
	P4	859,7	854,2	922,8	818,3	871,0	1044,7	-	895,1	80,7
	P5	1272,6	1369,8	1410,4	1320,8	1349,8	-	-	1344,7	51,8
	P6	1944,3	1882,2	1829,6	1945,8	1890,4	1790,2	-	1880,4	61,9
4-EG	P1	-	40,6	35,9	48,2	41,7	-	-	41,6	5,1
	P2	62,4	56,3	63,7	71,7	-	58,1	-	62,5	6,0
	P3	111,8	131,0	112,4	101,8	119,4	107,2	-	113,9	10,2
	P4	187,6	200,5	212,5	199,1	211,5	252,3	-	210,6	22,4
	P5	345,6	327,9	351,7	336,1	330,7	-	-	338,4	10,1
	P6	486,8	490,4	470,5	489,8	485,4	456,1	-	479,8	13,7
TCA	P1	5,6	6,4	5,7	5,3	5,5	5,8	5,9	5,7	0,4
	P2	10,9	10,5	10,9	9,6	9,9	10,0	8,9	10,1	0,7
	P3	18,8	17,5	18,8	20,3	19,1	20,2	19,8	19,2	1,0
	P4	29,9	29,7	27,5	30,2	30,4	30,1	29,2	29,6	1,0
	P5	37,5	.	41,8	38,9	39,8	35,7	42,6	39,4	2,6
	P6	52,3	51,0	50,3	50,7	50,2	53,3	48,6	50,9	1,5

Composto	Padrão de concentração	Concentração Calculada						Média	Desvio Padrão	
TBA	P1	-	4,8	5,3	6,8	-	-	4,2	5,3	1,1
	P2	11,9	10,0	10,3	9,3	11,2	10,9	8,4	10,3	1,2
	P3	17,5	-	18,9	18,3	21,4	19,2	19,7	19,2	1,3
	P4	-	30,4	30,3	30,5	26,5	29,3	33,6	30,1	2,3
	P5	-	-	40,2	38,6	38,0	-	43,4	40,1	2,4
	P6	50,6	49,8	50,0	51,4	52,9	50,5	45,6	50,1	2,2
TeCA	P1	6,3	4,6	5,1	4,6	-	-	5,3	5,2	0,7
	P2	11,3	11,0	9,5	10,2	10,6	11,9	8,6	10,4	1,1
	P3	18,4	-	20,8	-	20,7	18,9	20,0	19,8	1,0
	P4	27,0	30,8	29,5	30,7	27,5	27,8	32,0	29,3	1,9
	P5	-	36,2	40,6	39,5	40,7	-	40,6	39,5	1,9
	P6	52,1	52,4	49,6	49,9	50,6	51,4	48,6	50,6	1,4

**Tabela E.10 – Determinação da repetibilidade para o 4-EP, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho.**

<b>AMOSTRA</b>	<b>[C1] (µg/L)</b>	<b>[C2] (µg/L)</b>	<b>w<sub>i</sub>  C1-C2  (µg/L)</b>	<b>w<sub>i</sub><sup>2</sup> (C1-C2)<sup>2</sup></b>
Amostra 11	69	71	2	4
EIL A	882	888	6	36
Amostra 9	345	347	2	5
Amostra 10	352	355	3	8
EIL A	167	171	4	18
Amostra 10	383	376	6	41
Amostra A	17	18	1	1
Lote V. Tinto	122	123	1	0
Lote V. Tinto	0	0	0	0
Amostra 13	805	801	4	12
EIL A	611	611	0	0
Amostra A	576	572	4	16
Amostra 13	514	513	2	2
EIL A	634	629	5	28
Amostra 14	622	626	4	17
Lote V. Tinto			0	0
Lote V. Tinto	17	16	0	0
Amostra 16	323	316	6	40
Amostra 15	276	276	0	0
Amostra 15	323	328	5	22
EIL B	138	139	2	2
Amostra 16	747	746	1	2
Amostra 17	739	735	3	12
EIL B	721	721	1	0
Amostra 15	796	795	2	3
EIL E	159	165	6	41
EIL C	92	92	1	1
EIL C	115	120	5	25
Amostra 21	72	75	3	6
Amostra 23	111	111	0	0
Amostra 21	125	131	6	31
Amostra 24	228	232	4	13
Amostra 21	93	121	28	3
Amostra 24	219	232	13	41
Amostra 26	154	152	3	8
Amostra 28	352	353	2	3
Amostra 29	121	120	1	1
Amostra 30	134	136	2	2
Amostra 31	136	137	1	0
Amostra 40	81	87	5	27

**Tabela E.11 – Determinação da repetibilidade para o 4-EG, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho.**

AMOSTRA	[C1] (µg/L)	[C2] (µg/L)	$w_i$  C1-C2  (µg/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>	AMOSTRA	[C1] (µg/L)	[C2] (µg/L)	$w_i$  C1-C2  (µg/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>
Amostra 4	60	64	4	16	Amostra 14	17	19	2	4
EIL H	90	91	1	1	Lote V. Tinto	16	16	0	0
Amostra 2	30	26	4	16	Lote V. Tinto			0	0
EIL H	53	48	5	25	Amostra 16	22	24	2	6
EIL A	20	25	5	25	Amostra 16	37	41	4	14
Amostra 11	38	36	2	4	Amostra 15	34	33	1	1
EIL A	25	29	4	16	EIL A	32	34	2	5
EIL A	26	23	3	9	Amostra 16	30	34	4	14
EIL H	49	46	3	9	Amostra 15	34	38	4	14
EIL H	79	75	4	16	EIL B	70	69	1	0
EIL A	54	50	4	16	EIL A	46	40	6	35
Amostra F	71	68	3	9	Amostra 17	29	28	2	2
Amostra 2	82	85	3	9	EIL B	88	84	4	19
Amostra 12	33	32	1	1	Amostra 16	41	45	4	13
EIL A	53	48	5	25	Amostra 17	28	29	1	0
EIL A	76	70	6	36	EIL B	84	82	2	3
Amostra 9	35	37	2	3	Amostra 15	38	40	1	2
EIL F	29	24	4	19	Amostra 18	21	23	2	3
Amostra 9	36	30	6	30	EIL E	66	65	1	1
Amostra 10	28	34	6	32	EIL C	71	73	2	5
Amostra A	25	27	2	4	EIL C	74	74	1	1
EIL A	25	29	4	18	EIL C	72	74	2	3
Amostra 9	17	14	3	7	Amostra 25	30,8	27,8	3	9
Amostra 10	34	33	2	3	EIL C	72	70,1	2	4
Amostra A	10	12	2	3	EIL D	51	47	4	13
Lote V. Tinto	17	16	0	0	Amostra24	69	71	1	2
Lote V. Tinto	18	18	0	0	Amostra21	59	58	0	0
Amostra 10	28	23	5	24	Amostra 22	102	103	1	1
EIL A	13	14	1	2	Amostra 25	68	69	1	1
Amostra A	12	11	1	2	Amostra 21	29	28	1	1
Amostra 13	17	13	5	21	Amostra 21	25	31	6	32
Amostra 14	14	15	1	2	Amostra 24	41	43	2	4
Amostra 10	49	46	3	12	Amostra 25	43	37	6	30
EIL A	38	39	1	1	Amostra 26	32	31	1	2
Amostra A	38	37	1	1	Amostra 28	77	76	1	2
Amostra 13	42	38	3	11	Amostra 29	26	27	0	0
Amostra 14	39	44	5	25	Amostra 30	30	30	0	0
EIL A	42	38	4	18	Amostra 31	30	31	1	1
Amostra 13	18	18	0	0	Amostra 40	11	11	0	0

**Tabela E.12 – Determinação da repetibilidade para o TCA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho.**

AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>	AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>
EIL G	5	5	0	0	Amostra 17	9	8	2	3
EIL H	5	5	0	0	EIL A	3	2	0	0
Amostra 2	1	1	0	0	Amostra 16	2	3	2	2
Amostra 11	1	1	0	0	Amostra 17	5	5	1	0
EIL A	11	10	1	1	EIL B	5	5	0	0
EIL A	7	6	1	1	Amostra 15	5	2	3	9
EIL A	12	11	1	1	EIL B	4	4	0	0
EIL A	11	11	0	0	Amostra 18	-	-	0	0
EIL G	6	6	0	0	EIL E	10	8	1	2
EIL H	6	6	0	0	EIL G	4	2	3	7
EIL G	3	2	0	0	EIL C	4	4	0	0
EIL H	3	2	1	0	EIL C	5	5	0	0
EIL A	9	8	1	1	EIL C	3	3	0	0
Amostra 12	9	9	0	0	EIL C	4	4	0	0
EIL D	8	6	3	6	Amostra 19	3	3	0	0
EIL E	13	15	2	4	Amostra 21	3	3	0	0
Amostra 2	2	2	0	0	Amostra 22	3	3	0	0
Amostra 12	2	1	2	2	Amostra 23	3	3	1	0
EIL E	14	13	1	1	Amostra 24	3	3	0	0
EIL G	7	7	0	0	Amostra 25	3	3	0	0
EIL A	11	11	0	0	EIL C	2	2	0	0
EIL E	16	14	2	4	EIL D	5	6	0	0
EIL A	10	10	0	0	EIL A	8	10	2	4
EIL G	5	4	0	0	Amostra 24	1	2	0	0
Amostra 9	3	4	1	1	Amostra 21	2	1	0	0
Amostra 10	3	3	0	0	Amostra 22	1	1	0	0
Amostra A	4	4	0	0	Amostra 25	1	1	0	0
EIL F	4	5	1	1	Amostra 21	2	3	0	0
Amostra 9	3	4	1	0	Amostra 22	2	2	0	0
Amostra 10	4	3	1	1	Amostra 24	2	2	0	0
Amostra A	5	4	1	1	Amostra 25	2	2	0	0
Lote V. Tinto	1	1	0	0	Amostra 21	3	3	0	0
Lote V. Tinto	5	5	0	0	Amostra 22	3	4	1	1
EIL A	6	7	0	0	Amostra 24	3	3	0	0
Amostra 13	6	6	0	0	Amostra 25	3	3	0	0
Amostra 14	7	8	0	0	Amostra 26	2	2	0	0
Lote V. Tinto	-	-	0	0	Amostra 27	2	2	0	0
Lote V. Tinto	-	-	0	0	Amostra 28	2	2	0	0
Amostra 16	2	-	2	3	Amostra 29	2	2	0	0
EIL B	4	5	1	1	Amostra 30	2	2	0	0
EIL A	8	7	2	4	Amostra 31	2	2	0	0
Amostra 40	5	7	1	1					

**Tabela E.13 – Determinação da repetibilidade para o TBA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho.**

AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>	AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>
EIL G	4	3	1	1	Amostra 18	1	3	1	2
EIL H	5	5	0	0	EIL C	3	5	2	2
Amostra 2	5	4	1	1	EIL C	4	4	0	0
Amostra 12	5	3	2	3	EIL C	5	5	0	0
EIL A	13	15	1	2	Amostra 19	2	2	0	0
EIL A	18	20	2	4	Amostra 21	1	2	1	1
Amostra 10	6	5	2	4	Amostra 22	1	2	1	1
EIL F	2	4	2	3	Amostra 23	2	3	1	2
Amostra A	2	5	3	8	Amostra 24	-	-	0	0
EIL F	4	6	2	4	Amostra 25	4	3	1	0
Amostra 9	0	0	0	0	EIL C	5	5	0	0
Amostra 10	4	5	2	2	EIL D	6	4	2	4
EIL F	4	6	2	4	EIL F	1	1	0	0
EIL A	5	7	2	5	Amostra 24	-	-	0	0
Amostra 9	2	4	2	5	Amostra 25	-	-	0	0
Amostra 10	2	1	1	1	Amostra 22	-	-	0	0
Lote V. Tinto	5	7	2	3	Amostra 25	-	-	0	0
EIL A	8	7	2	2	Amostra 21	2	3	0	0
Amostra 13	6	5	1	1	Amostra 22	4	3	1	0
Amostra 14	7	9	2	4	Amostra 24	4	4	0	0
Lote V. Tinto	3	6	3	6	Amostra 25	3	3	0	0
Lote V. Tinto	-	-	0	0	Amostra 21	4	4	0	0
EIL A	11	10	1	0	Amostra 22	4	4	0	0
Amostra 16	11	10	1	2	Amostra 24	4	3	2	3
Amostra 15	10	12	2	4	Amostra 25	4	2	2	5
EIL B	11	11	0	0	Amostra 26	5	5	0	0
EIL A	3	2	2	2	Amostra 27	5	5	0	0
EIL B	4	3	1	0	Amostra 28	6	6	0	0
Amostra 17	6	6	0	0	Amostra 29	6	6	0	0
EIL B	6	5	1	1	Amostra 30	5	6	1	1
Amostra 15	5	5	0	0	Amostra 31	5	6	1	1
EIL B	3	3	0	0	Amostra 40	11	9	2	5

**Tabela E.14 – Determinação da repetibilidade para o TeCA, segundo a fórmula de cálculo proposta pela OIV, em amostras de vinho.**

AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>	AMOSTRA	[C1] (ng/L)	[C2] (ng/L)	$w_i$  C1-C2  (ng/L)	$w_i^2$ (C1-C2) <sup>2</sup>
Amostra 11	5	5	0	0	Amostra 18	1	1	0	0
EIL A	5	5	0	0	EIL E	7	7	0	0
Amostra 2	6	6	0	0	EIL G	6	6	0	0
EIL A	1	2	2	3	EIL C	7	9	2	3
EIL A	0,3	0,3	0	0	EIL C	3	3	0	0
Amostra 12	4	5	0	0	EIL C	4	4	0	0
EIL D	6	6	0	0	EIL C	4	5	1	0
EIL F	7	5	2	5	Amostra 19	4	4	1	0
Amostra 2	6	5	2	3	Amostra 21	4	4	1	1
EIL A	5	8	3	7	Amostra 22	4	4	1	0
EIL E	6	6	0	0	Amostra 23	4	5	1	0
EIL E	4	3	1	0	Amostra 24	4	4	0	0
EIL G	4	3	1	1	Amostra 25	4	4	1	0
EIL A	4	4	0	0	EIL C	3	4	1	0
EIL E	5	4	1	1	EIL D	2	1	1	0
EIL G	7	5	2	3	EIL E	2	1	0	0
EIL A	5	7	1	1	Amostra 24	1	1	0	0
EIL F	1	1	0	0	Amostra 21	1	1	0	0
Amostra 9	2	3	0	0	Amostra 22	-	-	0	0
Amostra 10	2	3	1	0	Amostra 25	-	-	0	0
EIL F	4	5	1	0	Amostra 21	4	4	0	0
Amostra 10	5	4	1	1	Amostra 22	5	5	1	0
Amostra 9	6	5	1	0	Amostra 24	4	4	0	0
Amostra A	6	4	2	4	Amostra 25	5	4	1	1
Amostra 9	3	1	2	4	Amostra 21	1	3	2	5
Amostra 10	2	3	1	1	Amostra 22	3	3	0	0
Amostra A	1	0	1	0	Amostra 24	3	5	1	2
Lote V. Tinto	6	6	0	0	Amostra 25	2	1	1	0
Amostra 13	10	12	3	6	Amostra 26	-	-	0	0
Amostra 14	9	11	2	4	Amostra 27	-	-	0	0
Lote V. Tinto	2	2	0	0	Amostra 28	2	-	2	3
EIL A	13	11	2	2	Amostra 29	-	-	0	0
Amostra 15	8	8	0	0	Amostra 30	-	1	1	1
EIL B	20	18	2	4	Amostra 31	2	1	0	0
EIL B	1	2	1	1	Amostra 40	4	1	2	6

Tabela E.15 – Teores dos diversos contaminantes nas amostras de 2011 analisadas.

Amostras	Concentração calculada				
	4-EP (µg/L)	4-EG (µg/L)	TCA (ng/L)	TBA (ng/L)	TeCA (ng/L)
<b>Amostra 1</b>	74	50	-	-	-
<b>Amostra 2</b>	289	107	4,9	3,1	7,6
<b>Amostra 3</b>	611	90	0,0	2,4	7,0
<b>Amostra 4</b>	93	30	0,0	2,9	7,8
<b>Amostra 5</b>	272	78	4,8	0,0	4,4
<b>Amostra 6</b>	601	149	-	-	-
<b>Amostra 7</b>	59	32	-	-	-
<b>Amostra 8</b>	75	47	-	-	-
<b>Amostra 9</b>	531	124	4,9	0,0	8,1
<b>Amostra 10</b>	736	147	0,0	3,9	7,2
<b>Amostra 11</b>	177	52	7,3	0,0	13,3
<b>Amostra 12</b>	205	77	0,0	6,2	12,1

Tabela E.16 – Teores dos diversos contaminantes nas amostras de 2012 analisadas.

Amostras	Concentração calculada				
	4-EP (µg/L)	4-EG (µg/L)	TCA (ng/L)	TBA (ng/L)	TeCA (ng/L)
Amostra 13	554	29	6,1	5,4	11,1
Amostra 14	626	41	7,6	7,7	10,1
Amostra 15	299	36	2,6	7,9	7,7
Amostra 16	295	34	1,7	10,2	16,5
Amostra 17	230	38	8,5	4,5	0,0
Amostra 18	313	51	0,0	0,0	0,0
Amostra 19	320	75	6,0	2,9	4,1
Amostra 20	496	86	0,0	2,8	3,3
Amostra 21	264	71	4,5	5,1	6,1
Amostra 22	675	137	5,0	5,5	8,4
Amostra 23	297	51	5,9	5,1	9,3
Amostra 24	448	94	5,1	6,3	8,5
Amostra 25	646	92	5,6	5,6	7,5
Amostra 26	342	30	4,0	9,7	0,0
Amostra 27	495	100	4,1	7,3	5,2
Amostra 28	674	150	4,0	7,2	5,1
Amostra 29	275	70	4,1	8,2	10,3
Amostra 30	314	80	4,0	8,6	5,4
Amostra 31	328	81	4,0	9,8	6,5
Amostra 32	621	70	0,0	3,1	4,9
Amostra 33	271	74	3,4	2,6	0,0
Amostra 34	471	78	3,3	3,4	4,9
Amostra 35	1881	164	0,0	0,0	0,0
Amostra 36	844	76	0,0	22,1	8,1
Amostra 37	386	89	0,0	0,0	9,0
Amostra 38	225	52	0,0	0,0	7,0
Amostra 39	428	80	0,0	0,0	6,9
Amostra 40	423	67	0,0	2,9	7,3
Amostra 41	346	81	0,0	4,6	7,5
Amostra 42	92	30	0,0	3,4	8,3
Amostra 43	168	41	0,0	3,4	7,8
Amostra 44	136	34	0,0	2,9	7,3
Amostra 45	769	215	0,0	2,6	7,6
Amostra 46	0	59	4,8	0,0	0,0
Amostra 47	565	64	0,0	0,0	9,4
Amostra 48	844	150	4,6	0,0	7,8
Amostra 49	241	59	4,7	0,0	7,4
Amostra 50	0	30	5,7	5,3	10,6

