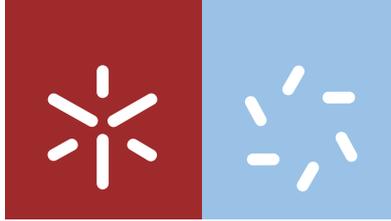


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Carolina Isabel Cerqueira de Macedo

**Desenvolvimento e validação de um método
para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Carolina Isabel Cerqueira de Macedo

**Desenvolvimento e validação de um método
para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob orientação da
Dra. Ana Oliveira e Doutora Ana Paula Bettencourt

DECLARAÇÃO

Nome: Carolina Isabel Cerqueira de Macedo

Título da Dissertação de Mestrado:

Desenvolvimento e validação de um método para a caracterização de vinhos por HPLC-DAD

Orientadores:

Dra. Ana Oliveira e Doutora Ana Paula Bettencourt

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SECOMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Quero agradecer especialmente às minhas orientadoras, Professora Doutora Ana Paula Bettencourt e Dra. Ana Oliveira, pela competência científica e acompanhamento, pela disponibilidade e generosidade revelada ao longo de todo o trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Agradeço ao Instituto dos Vinhos do Douro e Porto I.P. em particular ao Engenheiro Bento Amaral, Engenheiro Tomás Simões, Engenheira Natália Ribeiro pela oportunidade de desenvolver este projeto com todo o equipamento e material necessário à sua execução.

A todos os colegas de trabalho, em especial ao Sr. Nuno Carvalho e D.^a Ana Cidade pela disponibilidade prestada sempre que necessário e ao Sr. Paulo Pereira, Conceição Mota, Fernanda Lima e D.^a Graça Barbosa pela companhia e carinho demonstrado.

Um agradecimento especial á Professora Doutora Cecília Azevedo, professora do Departamento de Matemática da Universidade do Minho, pela análise estatística dos resultados.

Aos meus amigos e ao Miguel, por me apoiarem e incentivarem nas alturas mais difíceis. Um agradecimento especial à Andréa e à Cristina pela companhia, ajuda e amizade ao longo deste percurso.

Por último, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, á minha irmã e a minha avó, pelo apoio incondicional, incentivo, amor, paciência, e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo.

A todos o meu sincero Obrigada.

Resumo

Os compostos fenólicos e aldeídos furânicos permitem melhorar a qualidade organolética da maior parte dos vinhos e bebidas espirituosas. Além disso, os compostos fenólicos têm despertado interesse por parte da comunidade científica devido à sua potencial atividade antioxidante. Existem evidências de que as bebidas que sofrem envelhecimento, em recipientes de madeira, possam ter na sua composição teores mais elevados destes compostos.

O presente trabalho teve como objetivo a otimização e validação de um método analítico de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), acoplado com detetor de rede de díodos (DAD) para a quantificação de ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos licorosos (vinho do Porto e vinho moscatel), vinhos (vinho, vinho espumante e vinho frisante), bebidas espirituosas (rum, *whisky*, calvados) e aguardentes destinadas à elaboração do vinho do Porto.

O método otimizado envolve injeção direta da amostra, uma eluição por gradiente usando como solventes água, metanol e ácido fórmico e um fluxo de eluição de 1,3 mL/min. Este método exibe a grande vantagem de apresentar uma boa separação e quantificação dos compostos sem necessidade de preparação de amostra, e ser capaz de quantificar 10 compostos em apenas 12 minutos. O método de análise apresenta um bom desempenho, alta seletividade, boa linearidade, e limiares analíticos satisfatórios. O método é preciso, em condições de repetibilidade e precisão intermédia, e exato com recuperações entre 93 e 101 %.

O tempo de envelhecimento em madeira para vinhos do Porto revelou ser um fator importante para a sua composição, resultando num aumento dos teores dos aldeídos furânicos (5-metil-furfural, 5-hidroxi-metil-furfural e furfural) do ácido vanílico e do siringaldeído. Os vinhos tintos do Douro não apresentam diferenças significativas no teor destes compostos, quando se compara vinhos que referenciam ter estado em contacto com a madeira com aqueles que não estiveram. Os vinhos brancos de denominação de origem protegida Douro que contactaram com madeira apresentam uma concentração mediana de fufural e 5-metilfurfural mais elevado que os que não estiveram em contacto com madeira.

Abstract

Phenolic compounds and furanic aldehydes allow to improve the organoleptic quality of the most wines and spirits. In addition, the phenolic compounds have attracted interest from the scientific community due to its potential antioxidant activity. There are evidences that alcoholic beverages aged in wood containers, can have higher levels of these compounds in its composition.

The aim of the present work is the optimization and validation of an analytical method to quantify furanic aldehydes, phenolic aldehydes and phenolic acid in Port and Douro wines and in spirits using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with a Diode-Array Detector (DAD).

The optimized method involves direct injection of the sample in the system, gradient elution using water, methanol and formic acid as solvent and flow rate of 1.3 mL/min. A considerable advantage of this method is the good separation and quantification of the compounds of interest which is achieved without the need of a sample preparation step, and the quantification of ten compounds in less than 12 minutes. The method exhibited good linearity, high sensitivity, and satisfactory analytical limits. The method is precise in conditions of repeatability and intermediate precision, and is accurate with recoveries between 93 and 101 %.

The Port wine aging time in wood reveals to be an important factor for its composition, resulting in an increase of furanic aldehydes (5-methylfurfural, 5-(hydroxymethyl)furfural and furfural), vanillic acid and syringaldehyde levels. Red wines from Douro with protected designation of origin, don't show significant differences in the amount of these compounds. Douro white wines which have contacted with wood present higher furfural and 5-methylfurfural levels compared to those that were not in contact with wood.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice	ix
Índice de tabelas.....	xi
Índice de figuras.....	xv
Lista de abreviaturas e siglas	xix
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1. Instituto dos Vinhos do Douro e Porto.....	3
1.2. Vinho do Porto.....	4
1.3. Bebidas espirituosas	6
1.4. Processos de envelhecimento	7
1.5. Componentes da madeira	8
1.6. Reações químicas entre os componentes da madeira e vinho/bebida espirituosa.....	10
1.7. Compostos fenólicos e derivados furânicos.....	11
1.7.1. Ácidos fenólicos	12
1.7.2. Aldeídos fenólicos.....	13
1.7.3. Aldeídos furânicos	13
1.7.4 Compostos fenólicos presentes na uva.....	14
1.8 Importância do estudo	15
1.9 Técnicas analíticas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos	17
Capítulo 2: Materiais e Métodos.....	25
2.1 Reagentes e Solventes.....	27
2.2 Preparação das soluções	28
2.2.1 Solução hidroalcoólica a 50 % e 40 %.....	28
2.2.2 Soluções padrão de calibração	28
2.2.3 Soluções padrão de verificação	29
2.2.4 Fase móvel.....	30
2.3 Amostras.....	30
2.3.1 Recolha das amostras.....	30
2.3.2 Preparação da amostra	30

2.4	Equipamento de método de análise	31
2.5	Condições cromatográficas	32
2.6	Identificação e quantificação dos picos cromatográficos	33
Capítulo 3: Resultados e Discussão		35
3.1	Otimização do método	37
3.1.1	Gradiente	39
3.1.2	Volume de amostra injetado	40
3.1.3	Fluxo de eluente	41
3.1.4	Desdobramento do pico do ácido gálico	41
3.2	Validação do método.....	43
3.2.1	Curva de calibração	43
3.2.2	Linearidade	44
3.2.3	Sensibilidade.....	45
3.2.4	Limites analíticos do método de ensaio: Limites de deteção e de quantificação.....	45
3.2.5	Precisão	48
3.2.6	Avaliação da exatidão do método	55
3.2.7	Comparações de métodos.....	61
3.2.8	Controlo de qualidade	64
3.2.9	Cálculo de Incertezas.....	66
3.3	Análise de amostras reais.....	67
3.4	Resultados estatísticos	69
3.4.1	Vinho do Porto.....	69
3.4.2	Vinhos do Douro.....	87
Capítulo 4: Conclusão.....		93
Capítulo 5: Referências bibliográficas		97
Anexos		107

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Exemplos de bebidas alcoólicas (origem envelhecimento e título alcoométrico) ^{5,6}	6
Tabela 1.2 Concentração média de aldeídos furânicos nos extratos de madeira sob efeito da temperatura empregue no tratamento térmico (mg/L) ⁴²	14
Tabela 1.3 Métodos apresentados na literatura para quantificação de compostos fenólicos, usando HPLC como técnica analítica	21
Tabela 2.1 Reagentes utilizados e especificações do fabricante.....	27
Tabela 2.2 Gama de concentrações utilizadas para cada analito nos padrões de calibração	29
Tabela 2.3 Volumes utilizados para a preparação dos padrões de calibração em balões volumétricos de classe A 25,00 ± 0,04 mL	29
Tabela 2.4 Condições cromatográficas do método desenvolvido	32
Tabela 2.5 Gradiente utilizado na análise por HPLC; Solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v); Solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v).....	32
Tabela 3.1 Condições iniciais et Canas 2003 ⁹⁴	37
Tabela 3.2 Gradiente inicial et Canas 2003 ⁹⁴	38
Tabela 3.3 Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos analitos por HPLC-DAD	44
Tabela 3.4 Valores de sensibilidade do método para a análise dos 10 compostos por HPLC-DAD	45
Tabela 3.5 Limites de deteção e quantificação estimados, a partir das retas de calibração traçadas, para a determinação de cada um dos analitos por HPLC-DAD.....	46
Tabela 3.6 Valores para o cálculo da precisão do valor de Llq (limite de quantificação), onde S_{FI} é desvio padrão da precisão intermédia, \bar{x} é a média dos resultados.	47
Tabela 3.7 Coeficiente de variação das áreas dos picos dos 10 analitos nos Padrões 1 e 5, em condições de repetibilidade	49
Tabela 3.8 Coeficiente de variação dos tempos de retenção dos 10 analitos nos Padrões 1 e 5, em condições de repetibilidade	50
Tabela 3.9 Coeficientes de variação determinados em condições de repetibilidade e precisão intermédia de soluções padrões contendo todos os analitos em estudo a 2 níveis de concentração (PlimQ e P5v)	51
Tabela 3.10 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise de diferentes amostras de vinho do Porto	52

Tabela 3.11 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise diferentes amostras de bebidas espirituosas.....	53
Tabela 3.12 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise de padrões preparados em matriz de vinho do Porto.....	55
Tabela 3.13 Resultados obtidos nos ensaios de recuperação realizados para os 10 analitos em três níveis de concentração diferentes e seis matrizes distintas.....	57
Tabela 3.14 Resultados obtidos para avaliação da exatidão do método a partir do uso de materiais de referência.....	59
Tabela 3.15 Resultados dos intervalos admissíveis pela OIV para avaliar a exatidão do método e valores de z-score obtidos para a análise do material de referência.....	60
Tabela 3.16 Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de análise de furfural, com base em ensaios interlaboratorias realizados com diferentes matrizes.....	60
Tabela 3.17 Resultados do teste t-student para comparação dos métodos de quantificação do 5-hidroximetilfurfural, para uma probabilidade de 95% e n-1 graus de liberdade.....	62
Tabela 3.18 Resultados do teste t-student para comparação dos métodos de quantificação do furfural para uma probabilidade de 95% e n-1 graus de liberdade.....	63
Tabela 3.19 Estimativas de incertezas calculadas para os 10 compostos em análise.....	66
Tabela 3.20 Frequências de cada categoria de vinhos do Porto utilizadas no estudo estatístico.....	70
Tabela 3.21 Tabela resumo dos dados estatísticos obtidos para os aldeídos furânicos (mg/L).....	72
Tabela 3.22 Tabela resumo dados estatísticos obtidos para os dos ácidos fenólicos (mg/L).....	74
Tabela 3.23 Tabela resumo dos dados estatísticos obtidos para os dos aldeídos fenólicos (mg/L).....	76
Tabela 3.24 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com indicação de idade 10 e 20 anos, mg/L.....	80
Tabela 3.25 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com indicação de idade 30 e 40 anos, mg/L.....	81
Tabela 3.26 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com mais de 40 anos, mg/L.....	81
Tabela 3.27 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto da categoria colheita, mg/L.....	84
Tabela 3.28 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto <i>Vintage</i> e LBV, mg/L.....	86

Tabela 3.29 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto <i>Tawny</i> e <i>Ruby</i> anos, mg/L	86
Tabela 3.30 Frequências das amostras utilizadas, que permaneceram, ou não, em madeira, no estudo da caracterização dos vinhos do Douro	87
Tabela 3.31 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinho tinto do Douro, com e sem estágio em madeira, mg/L.....	88
Tabela 3.32 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinho branco do Douro, com e sem estágio em madeira, mg/L.....	89
Tabela I Valores de concentração em mg/L de 5-hidroximetilfurfural em amostras de vinho e bebidas espirituosas analisadas por diferentes métodos	107
Tabela II Valores de concentração em mg/L de furfural em amostras de vinho e bebidas espirituosas analisadas por diferentes métodos	109
Tabela III: Cálculos para incerteza combinada e incerteza expandida para os resultados de ácido gálico.....	116

Índice de figuras

Figura 1.1 Edifício do IVDP, I.P., no Porto.....	4
Figura 1.2 Diferentes categorias do Vinho do Porto em função do envelhecimento em garrafa e madeira ¹	5
Figura 1.3 Fotografia das Caves do Vinho do Porto ¹⁰	7
Figura 1.4 Esquema geral da composição química da madeira ^{21,22}	9
Figura 1.5 Representação química do polímero de celulose.	9
Figura 1.6 Representação química da lenhina	10
Figura 1.7 Estrutura base de um composto fenólico.adaptado ³²	11
Figura 1.8 Esquema dos diferentes grupos de compostos fenólicos adaptado ^{32,35,36}	12
Figura 1.9 Ácidos fenólicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado de ³⁸	13
Figura 1.10 Aldeídos fenólicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado de ³⁹	13
Figura 1.11 Aldeídos furânicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado ⁴³	14
Figura 1.12 Evolução dos compostos fenólicos de baixo peso molecular em função do tempo de envelhecimento em vinhos ⁵⁷	17
Figura 2.1 Filtração da amostra diretamente para o vial do HPLC.....	31
Figura 2.2 Sistema cromatográfico líquido de alta eficiência, marca Agilent Technologies do sector de cromatografia líquida do IVDP.IP.....	32
Figura 3.1 Cromatograma obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Volume de amostra injetado 20 µL; fluxo de 1 mL/min (restantes condições apresentadas na tabela 3.1 e 3.2)	38
Figura 3.2 Cromatograma obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Volume de amostra injetado 20 µL; fluxo de 1mL/min; eluição com gradiente linear. 39	39
Figura 3.3 Cromatograma obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm e 320 nm; eluição com gradiente; fluxo de 1.3 mL/min; volume de amostra injectado 10 µL (A) 20 µL (B); (restantes condições apresentadas na tabela 3.2)	40
Figura 3.4 Cromatogramas obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm e 320 nm; volume de amostra injetado 10 µL; eluição com gradiente; fluxo de 1mL/min (A); 1.3 mL/min (B) (restantes condições apresentadas na tabela 3.2).	41

Figura 3.5 Cromatogramas obtidos da análise por HPLC de uma soluções padrão do ácido gálico detetado a 280 nm (restantes condições na tabela 3.1 e 3.2), preparados em solução hidroalcoólica a 75 % A); e em solução hidroalcoólica a 40% B).....	42
Figura 3.6 Cromatogramas evidenciando o desdobramento do pico do ácido gálico em diferentes amostras detetado a 280nm A) aguardente (v/v) 70 % B) whisky (v/v) 40 % C) vinho do Porto (v/v) 20 % (condições de análise encontram-se descritas na tabela 3.1 e 3.2)	42
Figura 3.7 Curvas de calibração obtidas para os ácidos e aldeídos fenólicos e derivados furânicos. Curva A 5-hidroximetilfurfural; Curva B ácido gálico, furfural, e ácido ferúlico; Curva C 5-metilfurfural, ácido vanílico, ácido siríngico, Siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído	43
Figura 3.8 Esquema do procedimento utilizado para a avaliação da precisão intermédia fazendo variar o analista	54
Figura 3.9 Representação gráfica dos resultados de 5-hidroximetilfurfural obtidos pelo método desenvolvido (HPLC-Agilant 1200) em função dos resultados obtidos com o método já implementado no IVDP (HPLC-Gilson)	63
Figura 3.10 Representação gráfica dos resultados de furfural obtidos pelo método desenvolvido (HPLC-Agilant 1200) em função dos resultados obtidos com o método já implementado no IVDP, I.P. (GC).....	64
Figura 3.11 Cartas de controlo relativa à análise dos padrões extremos do composto 5-hidroximetilfurfural.	65
Figura 3.12 Cromatograma obtido da análise por HPLC de uma amostra de <i>whisky</i> A) 280 nm B) 320 nm (condições utilizadas descritas na tabela 3.1 e 3.2).....	67
Figura 3.13 Cromatograma obtido da análise por HPLC de uma amostra de vinho do Porto Tawny com 30 anos A) 280nm B) 320 nm (condições utilizadas descritas na tabela 3.1 e 3.2).....	68
Figura 3.14 Valores de concentração em mg/L das diferentes classes de compostos nas diferentes bebidas espirituosas analisadas.	69
Figura 3.15 Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os aldeídos furânicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.....	71
Figura 3.16 Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os ácidos fenólicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.....	73
Figura 3.17 Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os aldeídos fenólicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.	75
Figura 3.18 Correlação entre a concentração de 5-hidroximetilfurfural e furfural (mg/L) em vinhos do Porto	76
Figura 3.19 Diagramas de extremos e quartis para comparar os três grupos de vinhos do Porto em relação aos aldeídos furânicos (mg/L)	78
Figura 3.20 Diagramas de extremos e quartis para comparar os três grupos de vinhos em relação ao ácido vanílico, siringaldeído e ácido siríngico.....	79

Figura 3.21 Comparação dos teores de aldeídos furânicos através de diagramas de extremos e quartis para vinhos do Porto com diferentes idades	82
Figura 3.22 Comparação dos teores de ácido siríngico e ácido gálico através de diagramas de extremos e quartis para vinhos do Porto com diferentes idades.....	83
Figura 3.23 Gráficos que correlacionam o ano de colheita do vinho do Porto com os teores de 5-hidroximetilfurfural (A); e furfural (B).....	85
Figura 3.24 Diagramas de extremos e quartis do 5-metilfurfural e do ácido vanílico para os dois grupos de vinho tinto do Douro	88
Figura 3.25 Diagramas de extremos e quartis do 5-metilfurfural e do ácido vanílico para os dois grupos de vinho branco do Douro.....	90
Figura I: Cartas de controlo do composto ácido gálico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L....	111
Figura II: Cartas de controlo do composto furfural para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	113
Figura III: Cartas de controlo do composto 5-metilfurfural para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	113
Figura IV: Cartas de controlo do composto ácido vanílico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	114
Figura V: Cartas de controlo do composto ácido siríngico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	114
Figura VI: Cartas de controlo do composto siringaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	115
Figura VII: Cartas de controlo do composto ácido ferúlico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	115
Figura VIII: Cartas de controlo do composto coniferaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	116
Figura IX: Cartas de controlo do composto sinapaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L.....	116
Figura X: Comparação dos 3 grupos de vinhos do Porto através de diagramas de extremos e quartis para o ácido gálico, ácido ferúlico, coniferaldeído e sinapaldeído.....	117
Figura XI: Comparação dos diferentes vinhos com indicação de idade através de diagramas de extremos e quartis para o ácido vanílico, siringaldeído e ácido ferúlico.....	117
Figura XI: Comparação dos diferentes vinhos com indicação de idade através de diagramas de extremos e quartis para o coniferaldeído e sinapaldeído.....	118

Lista de abreviaturas e siglas

AD	Aguardente
BIPEA	<i>Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques</i>
CIRDD	Comissão interprofissional da Região Demarcada do Douro
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detetor de rede de díodos (<i>Diode array Detector</i>)
ER	Erro relativo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High Performance liquid Chromatography</i>)
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IVDP I.P.	Instituto dos Vinhos do Douro e Porto Instituto Publico
IVP	Instituto do Vinho do Porto
LBV	<i>Late Bottled Vintage</i>
Ldd	Limite de deteção
Ldq	Limite de quantificação
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass spectrometry</i>)
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
P1v	Padrão 1 de verificação
P3v	Padrão 3 de verificação
P5v	Padrão 5 de verificação
PlimQ	Padrão limite de quantificação
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Capítulo 1

Introdução

No presente capítulo será feita uma breve apresentação do Instituto dos Vinhos do Douro e Porto, I.P., empresa onde foi desenvolvida a presente dissertação, assim como um enquadramento teórico sobre o tema.

Será ainda apresentado o estado da arte relativamente a métodos analíticos descritos na literatura para a determinação, em vinhos e bebidas espirituosas, dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos, e qual a influência que o envelhecimento em madeira pode ter em relação ao teor destes compostos.

Este trabalho teve como objetivo principal a otimização de um método para análise de compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinho licoroso (vinho do Porto e vinho moscatel), vinho (vinho, vinho espumante e vinho frisante), bebidas espirituosas (rum, *whiskey*, calvados) e aguardente destinada a elaboração do vinho do Porto, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor de rede de díodos (DAD). Os compostos fenólicos analisados foram: ácido gálico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido ferúlico, siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído. Foram ainda analisados três aldeídos furânicos, nomeadamente o 5-hidroximetilfurfural, o furfural e o 5-metilfurfural. Aplicaram-se ferramentas de controlo de qualidade de forma a validar o método utilizado e os resultados obtidos. Este trabalho teve ainda como objetivo caracterizar os diferentes tipos de vinhos e verificar se o teor dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos, em vinhos, está relacionado com o tempo de envelhecimento em barricas de madeira.

1.1. Instituto dos Vinhos do Douro e Porto

No ano de 1933 foi fundado o Instituto do Vinho do Porto (IVP) com o objetivo de fiscalizar a qualidade do produto, garantir a sua origem de maneira a combater a fraude e falsificações nos mercados externos, e ainda promover a expansão do Vinho do Porto. Mais tarde, em 1995 foi adotado um modelo de gestão interprofissional das denominações de origem do Porto e do Douro em que o Estado continuava presente, através do Instituto do Vinho do Porto, que se constituiu numa comissão interprofissional – Comissão Interprofissional da Região Demarcada do Douro (CIRDD) - em que tanto a agricultura como o comércio estavam representados de igual forma.

O Instituto dos Vinhos do Douro e Porto, I. P. (IVDP) surge em 2003 como organização institucional em que a gestão das denominações de origem Porto e Douro

e da indicação geográfica Duriense foram atribuídas a um único organismo de carácter público, mas dotado de autonomia administrativa e financeira e património próprio. O IVDP, I.P. é uma instituição portuguesa, tratando-se de um organismo central com jurisdição sobre todo o território nacional. Tem sede em Peso da Régua e dispõe ainda de um serviço desconcentrado, a delegação do Porto (figura 1.1).



Figura 1.1: Edifício do IVDP, I.P., no Porto

O IVDP, I. P. tem por missão promover o controlo da qualidade e quantidade dos vinhos do Porto, regulamentando o processo produtivo, bem como a proteção e defesa das denominações de origem Douro e Porto e indicação geográfica Duriense.

O laboratório do IVDP,I.P. encontra-se integrado no Sistema Português da Qualidade, desde 1994, pela Acreditação junto do IPAC, de acordo com as disposições contidas no documento NP EN ISO/IEC 17025: 2005 para diversos ensaios. As determinações que se executam no laboratório utilizam métodos oficiais de análises, no entanto devido à especificidade dos vinhos licorosos, diversos métodos de análise foram adaptados e avaliados, constituindo métodos internos¹.

1.2. Vinho do Porto

O vinho do Porto distingue-se dos vinhos comuns pelas suas características particulares, sendo designado como um vinho licoroso ou fortificado. É produzido na Região Demarcada do Douro, sob condições específicas¹, considerado como um vinho clássico na Europa². O seu fabrico consiste na paragem da fermentação do mosto pela adição de aguardente vínica (benefício ou aguardentação), possuindo no final teores alcoólicos elevados, geralmente compreendido entre 19 -22 % volume alcoólico ¹.

Se por um lado a vindima marca o início da vida do vinho do Porto o envelhecimento marca a origem dos diferentes estilos deste vinho, e consoante o tipo de vinho que se pretende obter este está mais ou menos anos a estagiar em recipientes de madeira. Além das castas usadas no fabrico do vinho poderem ser diferentes, a seleção, a vinificação e o armazenamento de cada vinho é feita de forma diferente, resultando vinhos com características e sabores descritos como “extraordinários”³.

Os vinhos podem ser agrupados de duas formas, aqueles cujo processo de envelhecimento ocorre em madeira e aqueles que envelhecem em garrafa. No caso do Vintage ou dos Late Bottled Vintage (LBV), o envelhecimento faz-se inicialmente em casco de madeira. Durante 2-3 anos no caso dos Vintage, e durante 4-6 anos no caso dos LBV. Apesar disso, estes vinhos são depois engarrafados e o seu envelhecimento é feito em garrafa. Todos os restantes tipos de vinhos do Porto são envelhecidos em condições de oxidação, sendo menos acentuada no caso dos Ruby (que preservam assim a cor tinta mais ou menos intensa e o vigor dos vinhos novos), e mais acentuada no caso dos Tawny, Colheitas e Vinhos com Indicação de Idade ^{1,2,4}. Na figura 1.2 é apresentado um esquema que mostra o tempo de envelhecimento dos diferentes vinhos em madeira e garrafa.

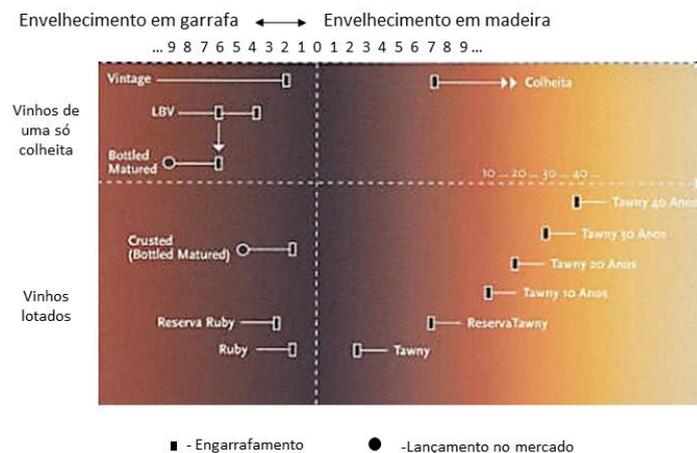


Figura 1.2 Diferentes categorias do Vinho do Porto em função do envelhecimento em garrafa e madeira ¹.

Dois terços dos vinhos do Porto são armazenados em madeira, sendo que a madeira mais utilizada é o carvalho português, no entanto tem sido igualmente

empregue o castanheiro e madeiras exóticas. Apenas 10 % do vinho do Porto é armazenado em cubas de aço inoxidável e betão revestido ¹.

1.3. Bebidas espirituosas

Bebidas espirituosas são bebidas alcoólicas cujo título alcoométrico mínimo é de 15%⁵. Tratando-se de bebidas com características organoléticas específicas, e sendo obtidas por diferentes processos, existe uma variada gama deste tipo de bebidas. Na tabela 1.1 são apresentadas algumas das bebidas espirituosas, a sua origem, assim como o teor alcoólico e o tempo de envelhecimento em madeira.

Tabela 1.1 Exemplos de bebidas alcoólicas (origem envelhecimento e título alcoométrico) ^{5,6}

Bebida	Origem	Envelhecimento	Título alcoométrico (%)
Gin	Obtida por aromatização de álcool etílico de origem agrícola dotado das características organoléticas adequadas com bagas de zimbro (<i>Juniperus communis L.</i>)	-	≥ 37,5
Whisky	Destilação de um mosto de cereais maltados	≥ 3 Anos em barricas de madeira	≥ 40
Aguardente vínica	Obtida exclusivamente por destilação de vinho ou de vinho aguardentado	-	≥ 37,5
Brandy	Obtida a partir de aguardentes vínicas, envelhecida	≥ 1 Ano em barricas de madeira de carvalho	≥ 36
Cognac	Destilada exclusivamente a partir de vinhos brancos, produzida em França	Envelhecido em barricas de carvalho	40 - 43
Armagnac	É uma aguardente vínica francesa produzida na Gasconha, proveniente de vinhos de uma grande variedade de castas	Envelhecido em barricas de carvalho	≈ 40
Calvados	Bebida produzida à base da maçã, da qual é extraída a sidra, e posteriormente sofre um processo de fermentação e destilação	Envelhecido em barricas de carvalho num período mínimo de 2 anos	40 - 45

O *Cognac* e *Armagnac* são bebidas provenientes de destilados v\u00ednicos da regi\u00e3o de Fran\u00e7a, no entanto tratam-se de bebidas diferentes. Distinguem-se pelo processo de destila\u00e7\u00e3o, o uso de diferentes castas, solo e condi\u00e7\u00f5es climat\u00e9ricas⁷.

1.4. Processos de envelhecimento

De acordo com o Parlamento Europeu e o Conselho da Uni\u00e3o Europeia, define-se envelhecimento ou maturaç\u00e3o como sendo uma “opera\u00e7\u00e3o que consiste em deixar que se desenvolvam naturalmente, em recipientes adequados, certas rea\u00e7\u00f5es que conferem a uma bebida espirituosa qualidades organol\u00e9ticas que esta n\u00e3o possu\u00eda anteriormente.”⁵ Este processo provoca, tanto em vinhos como em bebidas espirituosas, uma influ\u00eancia ben\u00e9fica sobre o seu perfil arom\u00e1tico e perfil gustativo ⁸. Normalmente, s\u00e3o usados recipientes feitos em madeira, uma vez que durante o processo de envelhecimento podem ocorrer modifica\u00e7\u00f5es f\u00edsico-qu\u00edmicas e sensoriais na bebida, resultantes da extra\u00e7\u00e3o e degrada\u00e7\u00e3o de diversos componentes da madeira. Nos \u00faltimos anos, a investiga\u00e7\u00e3o sobre este tema tem reca\u00eddo sobre a utiliza\u00e7\u00e3o de aparas de madeiras em vez da utiliza\u00e7\u00e3o de barricas convencionais⁸, isto porque este \u00faltimo processo torna-se bastante dispendioso e demorado⁹. \u00c9 not\u00f3rio em v\u00e1rios estudos que independentemente da tecnologia implementada o objetivo principal \u00e9 evoluir a qualidade da bebida, tanto no vinho como nas bebidas espirituosas⁸. A figura 1.3 mostra um dos locais de armazenamento do vinho do Porto, com barricas de madeira, situado em Vila Nova de Gaia¹⁰.



Figura 1.3 Fotografia das Caves do Vinho do Porto¹⁰

1.5. Componentes da madeira

A madeira tem sido a matéria-prima usada para o envelhecimento de várias bebidas alcoólicas¹¹. Vários autores evidenciam que a espécie¹² e geografia da madeira^{11,13,14}, bem como as operações de tanoaria (secagem e tratamentos térmicos)^{15,16} são fatores que influenciam profundamente as características organolépticas das bebidas. Em geral, a madeira de carvalho americano é mais rica do que a madeira do carvalho europeu face aos teores de compostos fenólicos de baixo peso molecular¹⁷. Em relação às diferentes espécies de madeira, Ana B. Cerezo e colaboradores¹² apontam que vinhos envelhecidos em diferentes barricas de madeira podem apresentar diferentes teores de compostos fenólicos. Ao comparar a composição de vinhos envelhecidos em madeira de carvalho, castanheiro, cerejeira e acácia, os resultados evidenciaram que existem diferenças significativas entre os diferentes vinhos. A madeira de carvalho é a mais utilizada para o processo de envelhecimento da aguardente e vinhos, contudo, existem outras espécies de madeira que também poderão ser usadas, nomeadamente o castanheiro. Existem ainda outras espécies que estão em estudo, como é o caso da madeira da cerejeira (*Prunus avium*)^{12,18-20}.

De uma forma geral, a madeira é constituída por dois grandes grupos de compostos químicos: os compostos de elevada massa molecular, que dizem respeito a grande parte da composição da madeira, e em menores quantidades os compostos de baixa massa molecular²¹. Na figura 1.4 está representado um esquema geral da composição da madeira.

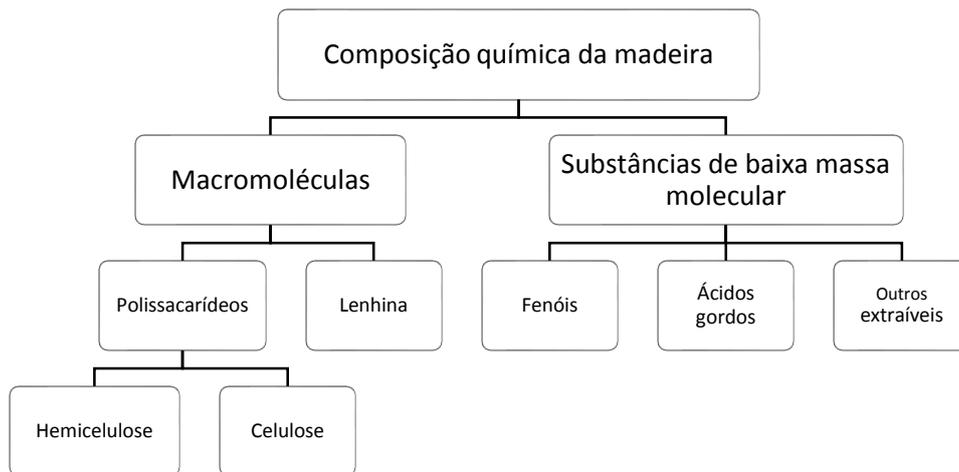


Figura 1.4 Esquema geral da composição química da madeira ^{21,22}

Os compostos de alta massa molecular correspondem a três grandes polímeros insolúveis: celulose, hemicelulose e a lenhina ²³.

A celulose é o componente maioritário e principal da parede celular, representando cerca de 40-45 % do peso seco da madeira²². Quimicamente, trata-se de um homopolissacarídeo de cadeia linear, como se pode ver na figura 1.5, constituído exclusivamente por moléculas de glucose unidas entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). A sua estrutura molecular confere à celulose certas propriedades tais como: hidrofiliçidade, quiralidade, degradabilidade e uma ampla variabilidade química iniciada pela alta reatividade dos grupos hidroxilo (OH). O grau de polimerização na madeira é tipicamente entre 300 e 1700 unidades ²⁴. Os produtos de degradação da celulose aparecem na bebida em maior concentração quando a madeira sofre pré tratamento térmico. As hexoses são responsáveis pelo aumento do teor do 5-hidroximetilfurfural e do 5-metilfurfural, componentes aromáticos desejáveis em bebidas alcoólicas envelhecidas^{25,26}.

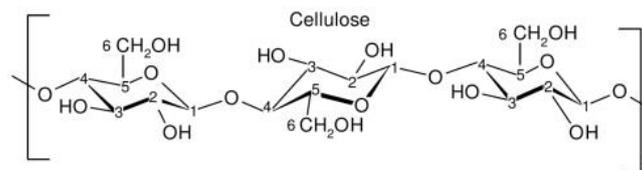


Figura 1.5 Representação química do polímero de celulose.

Contrariamente à celulose, a hemicelulose é um polímero heteropolissacarídeo, sendo por isso composto por grupos distintos de polissacarídeos com estruturas mais ou menos ramificadas. São polissacarídeos que podem ser facilmente hidrolisados em monómeros que os constituem, nomeadamente por hexoses (D-glucose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-Xilose e L-arabinose) e ácidos urónicos²⁷. O tratamento térmico a que a madeira é sujeita conduz à formação de furfural a partir das pentoses constituintes das hemiceluloses^{26,28}.

A lenhina é normalmente o segundo componente maioritário cerca de 30 %, trata-se de uma macromolécula sintetizada por via radicalar a partir de três álcoois p-hidróxi-cinâmicos precursores: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A complexidade e heterogeneidade da lenhina resulta do facto de não existirem unidades repetidas de forma regular, contrariamente ao que acontece na celulose. Está representada na figura 1.6 a estrutura química da lenhina.

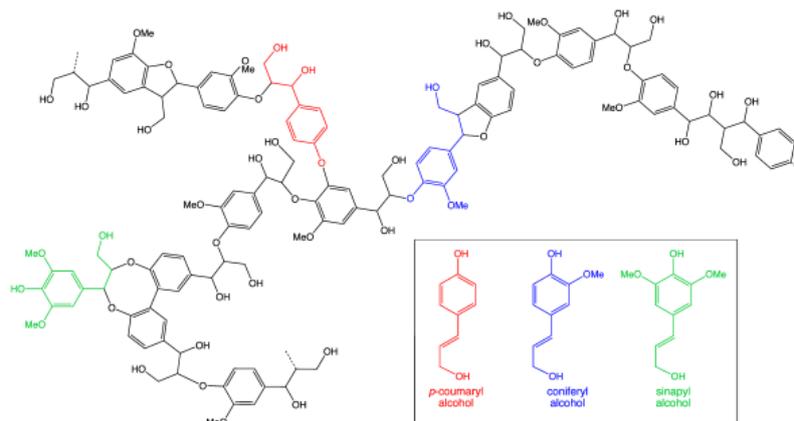


Figura 1.6: Representação química da lenhina

1.6. Reações químicas entre os componentes da madeira e vinho/bebida espirituosa

Durante o envelhecimento ocorrem variadas reações que se tornam responsáveis pelas alterações que ocorrem nas bebidas alcoólicas. Embora alguns dos mecanismos ainda não tenham sido totalmente esclarecidos²⁹, aceita-se que os principais fenómenos do envelhecimento das bebidas sejam os seguintes:

- Extração direta dos compostos da madeira – dependente de fatores externos como o tipo, tamanho e pré-tratamento da madeira, humidade, temperatura, teor alcoólico da bebida e tempo de envelhecimento;
- Degradação das macromoléculas que constituem a madeira (celulose, hemicelulose e lenhina). Esta degradação é devida maioritariamente ao aquecimento dos barris de madeira, formando compostos com propriedades que lhe confere bastante solubilidade em soluções hidroalcoólicas, em contacto com a bebida são transferidas para a mesma ao longo do tempo;
- A evaporação dos componentes voláteis ²¹;
- Reações químicas entre os compostos do destilado (reações de oxidação-redução, reações de Maillard, polimerizações, esterificações, acetilações e hidrólises)³⁰.

1.7. Compostos fenólicos e derivados furânicos

São vários os compostos orgânicos que podem ser extraídos da madeira, tais como: hidratos de carbono, compostos voláteis, aldeídos furânicos e compostos fenólicos.^{18,31}

Os compostos fenólicos constituem uma vasta variedade de compostos, que têm despertado um grande interesse nos últimos tempos à comunidade científica, devido ao seu poder antioxidante. De uma maneira muito geral, designam-se os compostos fenólicos como sendo substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxilo. Podem, ainda, conter outros substituintes na sua estrutura, tais como, açúcares ou ácidos orgânicos, possuindo estrutura variável e sendo assim multifuncionais. Na figura 1.7 é apresentada a estrutura base dos compostos fenólicos.

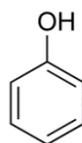


Figura 1.7: Estrutura base de um composto fenólico. adaptado ³²

São conhecidos milhares de compostos fenólicos que podem ser divididos em diversas classes, de acordo com a sua estrutura química (flavonóides e não-flavonóides).

Na figura 1.8 estão representadas resumidamente as diferentes classes. Quando extraídos a partir de matéria vegetal, estes compostos, demonstram ter propriedades antioxidantes^{33,34}.

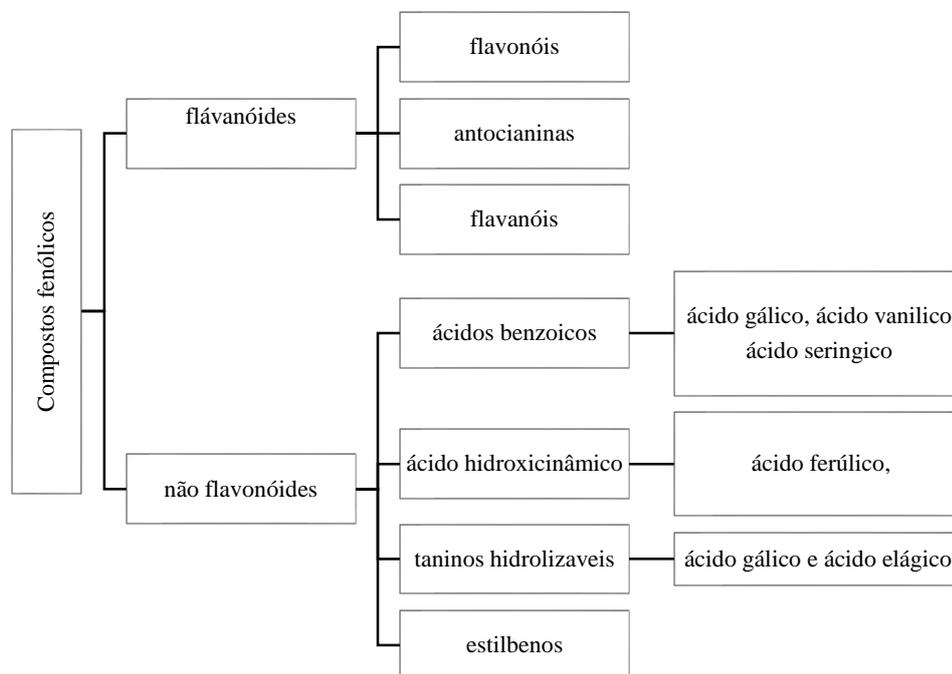


Figura 1.8: Esquema dos diferentes grupos de compostos fenólicos adaptado ^{32,35,36}

Tendo em conta o âmbito do trabalho, será dada especial atenção aos compostos extraíveis da madeira, nomeadamente aos compostos fenólicos de baixo peso molecular e aos aldeídos furânicos.

1.7.1. Ácidos fenólicos

Ácidos fenólicos são metabolitos secundários distribuídos pelo reino vegetal. O termo ácido fenólico em geral refere-se a fenóis que possuem como grupo funcional o ácido carboxílico (COOH). Estes ocorrem naturalmente e podem ser divididos em diferentes grupos, porque embora possuam o mesmo esqueleto de base, o número e as posições dos grupos hidroxilo no anel aromático são distintos ³⁷. Pertencem ao grupo dos ácidos benzóicos, os ácidos que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁), sendo os ácidos fenólicos os mais simples encontrados na natureza. A este grupo pertencem o ácido gálico, o ácido vanílico e o ácido siríngico. O segundo grupo é formado pelo ácido cinâmico, possuindo nove átomos de carbono (C₆-C₃), no qual o ácido ferúlico se

enquadra³⁸. Na figura 1.9 encontram-se as estruturas moleculares dos exemplos dados para cada um dos grupos.

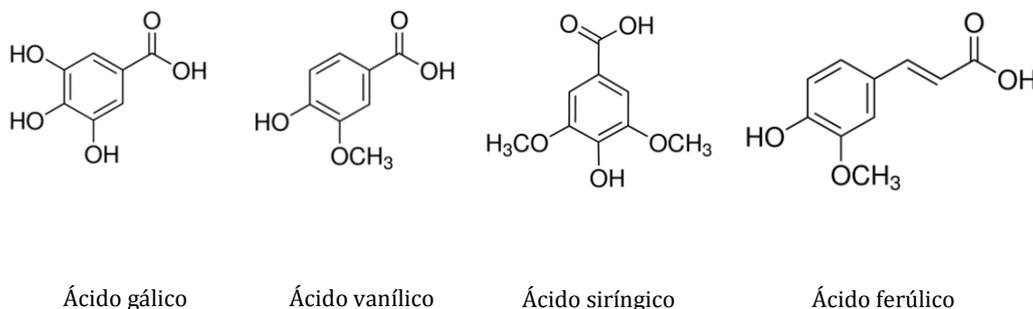


Figura 1.9: Ácidos fenólicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado de³⁸

1.7.2. Aldeídos fenólicos

Os aldeídos fenólicos são estruturalmente semelhantes aos ácidos fenólicos, mas em vez de possuírem na sua estrutura um grupo ácido carboxílico (COOH), possuem um grupo aldeído (CHO). Os aldeídos fenólicos podem ser classificados pelo número de átomos de carbono, em benzóicos (C₆-C₁) e em cinâmicos (C₆-C₃). No grupo dos benzaldeídos encontram-se a vanilina e o siringaldeído. O coniferaldeído e o sinapaldeído agrupam-se no grupo dos cinamaldeídos^{37,39}. Na figura 1.10 estão representadas as estruturas moleculares dos aldeídos fenólicos.

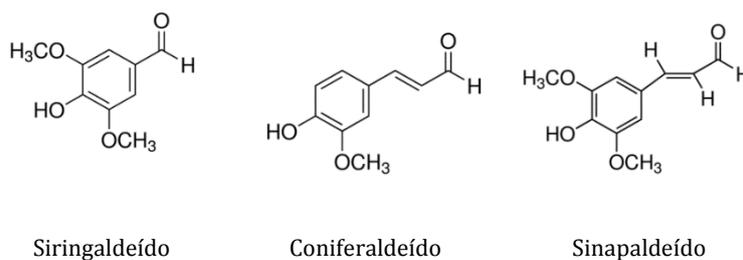


Figura 1.10: Aldeídos fenólicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado de³⁹

1.7.3. Aldeídos furânicos

Os aldeídos furânicos são compostos heterocíclicos que contêm um anel furânicos na sua estrutura base. Alguns autores^{40,41} relatam que apenas existe uma pequena quantidade destes compostos nas diversas madeiras, no entanto o tratamento térmico que estas sofrem fazem com que haja um aumento da sua concentração devido

às reações de Maillard. Na figura 1.11 estão apresentados os aldeídos furânicos que são mais frequentes nos vinhos. Na tabela 1.2 são apresentados os teores de aldeídos furânicos presentes na madeira de acordo com a temperatura utilizada no seu tratamento térmico. Estes resultados são provenientes de um estudo feito por Sara Canas, verificando que a temperatura empregue influencia os teores destes três compostos⁴².

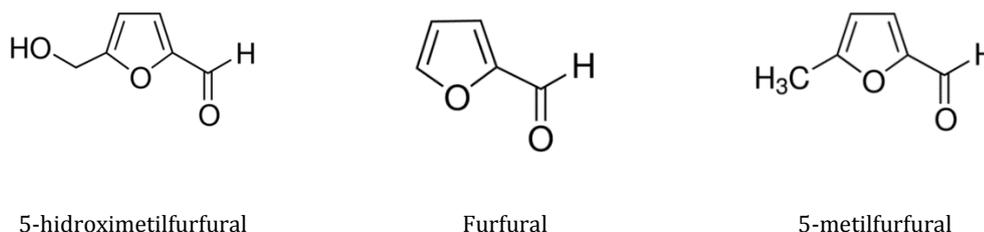


Figura 1.11: Aldeídos furânicos retratados ao longo do trabalho. Adaptado ⁴³

Tabela 1.2 Concentração média de aldeídos furânicos nos extratos de madeira sob efeito da temperatura empregue no tratamento térmico (mg/L)⁴²

Composto	Sem queima	Temperatura da queima	
		120-125°C	150-155°C
5-hidroximetilfurfural	nd	17,14	14,53
Furfural	nd	32,42	42,29
5-metilfurfural	nd	2,56	2,90

nd – não detetado

1.7.4 Compostos fenólicos presentes na uva

Os compostos fenólicos podem ser encontrados em vegetais, frutos e plantas medicinais⁴⁴. As uvas, por exemplo, contêm compostos não flavonóides principalmente na polpa, enquanto os compostos flavonóides estão localizados nas películas, grainhas e engaço⁴⁵.

Muitos estudos têm quantificado os compostos fenólicos em vinha (*Vitis vinifera* L.), tais como flavonoides e ácidos fenólicos (ácido ferúlico)⁴⁶. Há ainda na literatura relatos de que as uvas muscadínea (*Vitis rotundifolia*) possuem na sua composição compostos hidroxibenzóicos (ácido gálico), ácido elágico, resveratrol e flavonoides⁴⁷. Recentemente houve uma pesquisa sobre a composição fenólica do bagaço de uva obtido a partir da *Vitis vinifera* L. onde foi possível quantificar teores de ácido gálico e ácido sirínico entre outros compostos polifenólicos, sem que o vinho tivesse sofrido qualquer tipo de envelhecimento⁴⁸. Outro exemplo de estudo foi realizado por Miriam

e colaboradores⁴⁹ em sumo de uvas (brancas e tintas). Estes autores detetaram teores de ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico e ácido ferúlico nestes sumos. Apesar de existirem estudos onde foram avaliados vinhos tintos quanto ao teor de compostos fenólicos, nenhum dos estudos encontrados menciona se os vinhos foram sujeitos a um processo de envelhecimento em recipientes de madeira, e por esse motivo não se sabe de onde provêm esses teores totais quantificados, se da uva se da madeira.

1.8 Importância do estudo

O vinho sempre desempenhou um papel importante em quase todas as civilizações, seja por ser uma bebida com sabor e personalidade própria, ou pelos seus benefícios para a saúde. As descobertas ao longo dos anos sobre as propriedades do vinho despertam cada vez mais interesse sobre a comunidade científica, de forma a desvendar os seus potenciais efeitos⁵⁰. Os seguintes compostos: ácido gálico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido ferúlico, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural e furfural não têm limites de concentração estabelecidos pela legislação portuguesa. No entanto o caderno de especificações para vinho do Porto refere que no caso do 5-hidroximetilfurfural “Os vinhos com direito á denominação de origem Porto, com idade inferior ou igual a cinco anos aquando o seu engarrafamento, devem apresentar um teor em 5-hidroximetilfurfural menor ou igual a 15 mg/L, exceto os vinhos com a menção tawny que não devem ultrapassar os 25 mg/L”. No caso do furfural, há necessidade de quantificar este parâmetro em bebidas espirituosas para satisfazer requisitos de exportação de alguns países. Estes dois fatores, aliados ao interesse em caracterizar cada vez melhor a composição dos diferentes tipos de vinho contribuiu para que o IVDP, I.P. decidisse otimizar e validar um método capaz de determinar de forma rápida e simples alguns compostos fenólicos e aldeídos furânicos. Estes compostos merecem interesse uma vez que podem atuar como antioxidantes, ou então, porque fornecem às bebidas características organoléticas que a enriquecem.

É de conhecimento comum que o consumo irresponsável e excessivo de álcool é prejudicial, trazendo graves consequências para a saúde e as implicações graves a nível sociais. No entanto, ao longo das últimas três décadas foram sendo acumuladas evidências de que o consumo moderado, especialmente de vinhos tintos, poderia ser

benéfico para a saúde. Esses benefícios referem-se a uma melhoria ou prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, demência ou declínio cognitivo⁵¹. Van Leeuw e C. Kevers estudaram a capacidade antioxidante de vários vinhos tintos e concluíram que existe uma correlação significativa entre a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos⁵². Outros estudos evidenciam ainda que o vinho tinto apresenta maior teor em compostos fenólicos quando comparado com vinho branco e vinho rosé, e o mesmo resultado é obtido para a capacidade antioxidante^{45,53}. Recentemente foi publicado um estudo onde demonstra que, de facto, compostos presentes no vinho do Porto *Tawny* 20 anos têm alguma capacidade para eliminar radicais e demonstra também algumas propriedades antiproliferativas, e alguma bioatividade em todas as linhas celulares cancerígenas testadas neste estudo⁵⁴⁻⁵⁶.

Para além do poder antioxidante, os compostos fenólicos de baixo peso molecular oferecem à bebida características aromáticas e gustativas muito apreciadas pelos seus consumidores⁵⁷. Vários estudos^{11,58} indicam que as características organolépticas dos vinhos, que contactam com a madeira, possuem um carácter distinto, relativamente aos produtos enológicos que não estagiam em madeira. Estes compostos fornecem ao vinho aromas distintos. Por exemplo, o furfural fornece à bebida um aroma semelhante a “frutos verdes”, o 5-hidroximetilfurfural possui um aroma semelhante a caramelo e o 5-metilfurfural aroma a caril, em vinhos licorosos da Madeira⁵⁹. Em relação aos aldeídos fenólicos, para o siringaldeído o aroma é descrito como sendo semelhante ao da baunilha⁶⁰. Os ácidos fenólicos produzem uma adstringência e uma ligeira amargura no vinho⁶¹.

A evolução dos compostos fenólicos de baixo peso molecular em vários produtos enológicos durante o seu processo de envelhecimento têm sido estudados por vários autores^{12,30,62,63}. Em 2004, M. del Alamo Sanza e colaboradores⁵⁷ estudaram a evolução de compostos fenólicos de baixo peso molecular em vinhos, em função das diferentes espécies de madeira, e em função de diferentes tempos de envelhecimento. Os autores verificaram que o tempo de envelhecimento foi o principal fator para as mudanças de concentração dos compostos. Constataram um aumento nos níveis de ácido gálico e ácido ferúlico. O teor de ácido vanílico apresentou uma tendência decrescente no período de envelhecimento, a figura 1.12 ilustra a evolução destes compostos no vinho em função dos anos de envelhecimento.

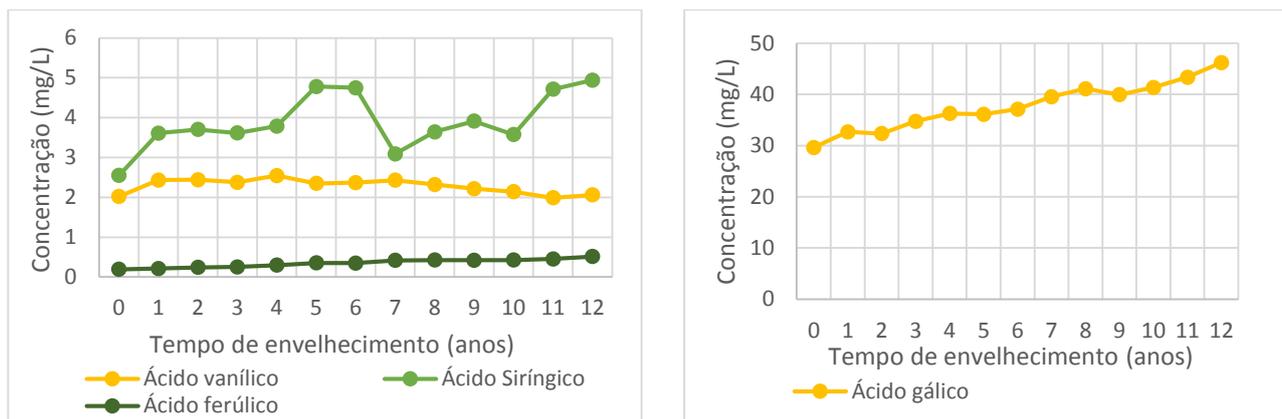


Figura 1.12: Evolução dos compostos fenólicos de baixo peso molecular em função do tempo de envelhecimento em vinhos⁵⁷

No mesmo ano, J.S. Câmara e colaboradores⁵⁹ estudaram a evolução de alguns compostos furânicos em função do tempo de envelhecimento, em vinhos fortificados da região da Madeira. Observou-se um crescimento significativo na concentração destes compostos, com destaque para o furfural, 5-hidroximetilfurfural e 5-metilfurfural. Os resultados dos coeficientes de correlação calculados para a relação entre a concentração de furfural, 5-hidroximetilfurfural e 5-metilfurfural e o tempo de envelhecimento foram 0,921, 0,916 e 0,906, respectivamente, demonstrando assim um comportamento linear destes compostos ao longo do tempo durante o envelhecimento.

1.9 Técnicas analíticas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos

A determinação de compostos fenólicos em vinho é normalmente realizada por métodos cromatográficos, nomeadamente cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em combinação com diferentes detetores, UV-Vis⁶⁴⁻⁶⁶, ou espectrometria de massa (MS)^{67,68}. Existem ainda outras técnicas analíticas que têm sido utilizadas para analisar compostos fenólicos em vinhos e bebidas espirituosas, como métodos espectrofotométricos^{69,70}, métodos eletroquímicos⁷¹⁻⁷³, biossensores⁷⁴⁻⁷⁶ e a técnica de eletroforese capilar⁷⁷⁻⁷⁹.

Os métodos espectrofotométricos podem ser usados para a determinação de compostos fenólicos em vinhos sendo métodos acessíveis, poucos dispendiosos e proporcionando medições rápidas. Apresentam no entanto desvantagens, como por exemplo baixa seletividade⁶⁹ e nenhuma especificidade, quantificando por isso todos os

grupos fenólicos presentes na amostra³². A. Escarpa e M.C. González⁷⁰ verificaram que os teores de compostos fenólicos obtidos por métodos espectrofotométricos podem ser sobrestimados devido à presença de interferentes.

Têm sido propostos diferentes métodos eletroquímicos para a caracterização de polifenóis em vinho, tendo como base o facto de praticamente todos os compostos polifenólicos presentes no vinho serem eletroquimicamente ativos⁸⁰. As propriedades antioxidantes destes compostos estão relacionadas com a sua capacidade de doar elétrons, por isso, estes compostos podem ser oxidados em potenciais moderados⁸¹. Existem métodos já testados que envolvem a utilização de voltametria cíclica⁷¹ e voltametria diferencial com impulsos com este objetivo^{72,73}. O conhecimento do potencial redutor é de grande interesse, pois compostos fenólicos oxidados podem afetar negativamente a qualidade dos vinhos³².

Como alternativa, os biossensores têm sido propostos como ferramentas analíticas eficientes para a deteção de compostos fenólicos. Gamella M, Campuzano S, e colaboradores em 2006⁷⁴ desenvolveram um biossensor que utiliza a enzima Lacase, com o objetivo de quantificar compostos fenólicos em vinhos. Os mesmos autores descrevem que o procedimento de preparação da amostra é simples e que o método apresenta um bom desempenho, no entanto este biossensor só é capaz de quantificar dois compostos⁷⁴. Mais recente, Seul-Ki Kim e colaboradores⁷⁵ desenvolveram um biossensor microbiano para analisar compostos fenólicos em vinhos capaz de fornecer respostas satisfatórias, ampla faixa linear, alta sensibilidade, e boa estabilidade. Existem diversos outros trabalhos na literatura que retratam estudos que utilizam biossensores para a deteção de compostos fenólicos em vinhos^{76,82,83}. Apesar dos biossensores apresentarem vantagens relativamente a outras técnicas (ex.: HPLC), também apresentam desvantagens, uma vez que a matriz do vinho é bastante complexa podendo existir interferentes que alteram o valor da resposta⁸², para além de que, alguns biossensores determinam o total de polifenóis⁷⁵.

Nos últimos anos, a eletroforese capilar foi estabelecida como uma ferramenta versátil robusta para análise de alimentos. Esta técnica fornece alta eficiência, um tempo de análise curto, requer uma quantidade mínima de amostra, tem um baixo consumo de solventes e tem vários modos de separação adequados para um grande número de analitos⁸⁴. Em 2012, um grupo de investigadores da Universidade de Barcelona

desenvolveu um método usando a técnica de eletroforese capilar para a quantificação simultânea de 20 polifenóis, incluindo o ácido síringico, o ácido gálico, o ácido vanílico e o ácido ferúlico⁷⁹. As amostras de vinhos foram introduzidas no equipamento sem qualquer tipo de pré-tratamento, e todos os compostos eram analisados num tempo inferior a 25 minutos, no entanto no início de cada sequência de análises o capilar tem de ser condicionado, o que demora cerca de 120 minutos. No mesmo ano, Ballus e colaboradores⁷⁷ analisaram pela mesma técnica 16 compostos fenólicos em vinhos produzidos na América do Sul. Como o método pode ser pouco sensível e as quantidades destes compostos em vinhos pode ser reduzida, os autores procederam a uma pré-concentração de amostra. O método permite realizar uma análise rápida, com baixo consumo de reagente e com elevada fiabilidade analítica.

Fábio de Souza Dias e colaboradores⁷⁸ defendem que eletroforese capilar é um método simples, versátil e de baixo custo no que diz respeito à análise de compostos fenólicos. Entre outros compostos fenólicos o ácido gálico e ácido síringico foram quantificados por esta técnica com limites de deteção baixos, 0,14 e 0,22 mg/L, respetivamente. Apesar das vantagens desta técnica a amostra necessita de preparação antes da injeção, as amostras de vinho foram previamente sujeitas a um processo de extração líquido-líquido⁷⁸. Existem na literatura outros estudos^{85,86} onde é empregue a eletroforese como técnica de separação obtendo de igual forma resultados satisfatórios, no que diz respeito a análise de compostos fenólicos em amostras de vinho, no entanto quando se comparam estes resultados com os obtidos por HPLC, a eletroforese capilar apresenta menor sensibilidade devido aos pequenos volumes que são injetados⁶⁷.

Os compostos voláteis, tais como vanilina e siringaldeído⁸⁷, furfural e 5-metilfurfural⁸⁸ podem ser analisados por cromatografia gasosa, uma técnica com elevada capacidade de separação, e quando combinado com espectrometria de massa esta técnica revela alta sensibilidade e seletividade. Apesar da cromatografia gasosa ser uma técnica cromatográfica bastante empregue para análise de ácidos fenólicos e aldeídos fenólicos³², a amostra pode requerer uma derivatização química (tornando os compostos mais voláteis através da metilação dos grupos hidroxilo), para além de processos de extração, isolamento e *clean-up*⁸⁹.

Nos últimos anos, a técnica analítica cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido muito utilizada na separação e caracterização de compostos fenólicos.

Existem diversas vantagens na utilização desta técnica em matrizes de origem biológica. O HPLC é atualmente a técnica mais utilizada para a separação de compostos fenólicos em vinhos⁶⁴. Na tabela 1.4 estão apresentados os diferentes métodos de análise de compostos fenólicos, encontrados na literatura, que usam como técnica analítica o HPLC.

A análise de uma amostra de vinho pode ser realizada por injeção direta⁹⁰ ou apenas com filtração através de uma membrana porosa^{35,65,91-94}. Existem ainda, outros métodos publicados em que o pré-tratamento da amostra inclui uma extração líquido-líquido^{95,96} ou uma extração de fase sólida^{68,97}.

No caso da análise de compostos fenólicos é principalmente utilizada a cromatografia de fase reversa, que consiste numa fase estacionária apolar (C₈; C₁₈) e uma fase móvel polar (metanol; acetonitrilo; água etc.). Por outro lado, o tipo de eluição empregue (eluição isocrática ou eluição por gradiente) é dependente da composição polifenólica da amostra, no entanto a maioria dos estudos publicados utiliza eluição por gradiente⁹⁸.

No que se refere ao sistema de deteção acoplado ao HPLC, a deteção dos compostos fenólicos por absorção na região do UV-Vis^{64-66,99} ou por espectrometria de massa (MS) são os mais comuns na literatura^{84,98}. Como muitos dos compostos fenólicos presentes no vinho possuem características que possibilitam a absorção na região de UV-Vis são facilmente detetados com um detetor de rede de díodos (DAD - *diode array detector*)⁹⁰, que proporciona a identificação de pico através da aquisição de espectros contínuos durante a separação em diferentes comprimentos de onda⁸⁴. No entanto o detetor MS releva capacidade de monitorizar centenas de compostos em uma única análise, fornecendo uma identificação inequívoca e informação estrutural com base na fragmentação dos compostos⁶⁸.

Tabela 1.3 Métodos apresentados na literatura para quantificação de compostos fenólicos, usando HPLC como técnica analítica

Analitos	Amostra	Preparação de amostra	Tipo e temperatura da coluna	Fase móvel / fluxo/ volume injetado	Deteção, comprimento de onda (λ)	Ref:
Ácido gálico; 5-hidroximetilfurfural; furfural; ácido vanílico; ácido siríngico; siringaldeído	<i>Brandy Jerez</i>	Filtração com membrana de porosidade 0,45 μm	LiCrospher C ₁₈ (250 X 4 mm, 5 μm) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: metanol/ácido acético/ H ₂ O (5:2:93,v/v/v) B: metanol/ácido acético/ H ₂ O (90:2:8;v/v/v) Volume inj. 50 μL Fluxo 1ml/min	DAD, 280 nm	⁹¹
Ácido gálico; furfural; ácido vanílico; ácido siríngico; siringaldeído; ácido ferúlico; coniferaldeído; outros	Vinhos fortificados	Injeção direta	Spherisorb S5 ODS2 C ₁₈ (250 x 4 mm, 5 μm) 25 °C	Eluição por gradiente; A: H ₂ O /ácido fórmico (98:2; v/v) B: 700 ml metanol (com 2 % ácido fórmico) + 300 mL de eluente A Volume inj. 20 μL Fluxo 1ml/min	DAD 280 nm; 320 nm	¹⁰⁰
Ácido gálico; ácido vanílico; outros	Vinho tinto	Filtração com membranas de celulose 0,40 μm	Synergy 4 μ hydro RP80A (250 x 3,0 mm, 4 μm) 35 °C	Eluição por gradiente A: H ₂ O / ácido acético (98:2;v/v) B: Acetonitrilo Volume inj. 20 μL Fluxo 0,5 mL/min	DAD 280 nm e 320 nm	⁹²
Ácido gálico; ácido vanílico; ácido ferúlico; ácido siríngico	Vinho de arroz	As amostras foram centrifugadas e filtradas através de uma membrana de poli (fluoreto de vinilideno) 0,45 μm	Shim-pack VP-ODS C ₁₈ (250 mmx4.6 mm,5 μm) 38 °C	Eluição por gradiente A: H ₂ O + ácido acético (98:2,v/v) B: Acetonitrilo Volume inj. 20 μL Fluxo 1,0 mL/min	UV-Vis 200-400 nm	⁶⁴
Ácido gálico; 5-hidroximetilfurfural; furfural; 5-metilfurfural; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido ferúlico; siringaldeído; coniferaldeído; sinapaldeído	Bebidas espirituosas	A OIV recomenda filtrar as amostras com uma membrana de porosidade 0,45 μm	Coluna RP C ₁₈ com partículas 5 μm	Eluição por gradiente A: H ₂ O+ ácido acético (99,5:0,5,v/v) B: 1Metanol Volume inj. 10 ou 20 μL Fluxo 1,0 mL/min	Recomenda um detector DAD	OIV ⁶⁵

Analitos	Amostra	Preparação de amostra	Tipo e temperatura da coluna	Fase móvel / fluxo/ volume injetado	Deteção, comprimento de onda (λ)	Ref:
Ácido gálico; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido ferúlico	Vinho Branco	As amostras foram centrifugadas durante 20 min e filtradas com membranas de poli (fluoreto de vinilideno) 0,45 μ m. Depois são concentradas para remoção do etanol	Nucleosil 120 C18 (250 \times 4 mm, 5 μ m) 40 °C.	Eluição por gradiente A :H ₂ O+ ácido acético (pH=2,65) B: Acetonitrilo+ Eluente A (80:20,v/v) Volume inj. 100 μ L Fluxo 1,5 mL/min	DAD 280 nm, 320nm	⁹⁹
Ácido gálico; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido ferúlico	Vinho Branco	Filtradas através de filtro de porosidade 0,45 μ m (Millipore) Ajustar pH para 2,5 e diluir com fase móvel (1:9,v/v)	SpherisorbODS-2 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: H ₂ O + ácido sulfúrico (pH 2,5) B: Metanol Volume inj. 20 μ L Fluxo: 0,7 mL/min	DAD 278 nm	¹⁰¹
Ácido gálico	Vinhos Tinto de Espanha	Filtradas através de membrana de porosidade 0,45 μ m (Millipore)	ODS hypersil (250 \times 4 mm, 5 μ m) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: acetato de etilo B: Metanol C: H ₂ O Volume inj. 20 μ L Fluxo: 0,4 mL/min (até aos 5 min); 0,5 mL/min	UV-Vis 280 nm	⁶⁶
Ácido gálico; ácido vanílico; ácido siríngico; siringaldeído; ácido ferúlico	Vinhos tintos e brancos	O pH das amostra é ajustado para 2 (com pequenas quantidades de ácido clorídrico 0,1M)	Nova-Pak C18 (150 \times 3.9 mm, 4 μ m) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: Metanol + ácido acético +H ₂ O (10:2:88, v/v/v) B Metanol + ácido acético +H ₂ O (90:2:8, v/v/v) Volume inj.: Não indicado Fluxo: 1 mL/min	DAD 278 nm, 360 nm	¹⁰²
Ácido gálico; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido ferúlico	Vinhos de arroz	O pH das amostras foi ajustado para 2,0 Extração em fase sólida Filtradas através de membrana de porosidade 0,2 μ m	Shim-PACK ODS-XR (75 \times 3,0 mm, 2 μ m) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: H ₂ O + ácido fórmico (98:2 v/v) B: Metanol + H ₂ O (50:50, v/v) + ácido fórmico 0,2% Volume inj.: 20 μ L Fluxo: 0,3 mL/min	MS	⁶⁸

Analitos	Amostra	Preparação de amostra	Tipo e temperatura da coluna	Fase móvel / fluxo/ volume injetado	Deteção, comprimento de onda (λ)	Ref:
Ácido gálico e ácido siríngico	Vinhos Tintos	O pH das amostras foi ajustado para 2,0 Extração em fase sólida	Eclipse XDB C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) 40 °C.	Eluição por gradiente A: ácido fórmico (0,2%) B: metanol C: H ₂ O Volume inj.: 20 μ L Fluxo: 1 mL/min	UV-Vis 280 nm e 323 nm	97
Ácido gálico; 5-hidroximetilfurfural; furfural; 5-metilfurfural; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido ferúlico; siringaldeído; coniferaldeído, sinapaldeído	Brandy	Filtradas através de membrana de porosidade 0,45 μ m (Millipore)	Lichrospher RP18 (250 x 4 mm, 5 μ m) 40 °C	Eluição por gradiente A: H ₂ O + ácido fórmico (98:2,v/v) B: Metanol H ₂ O + ácido fórmico (70:30:2,v/v/v) Volume inj.: 20 μ L Fluxo: 1 mL/min	UV-Vis 280 nm, 320 nm	94
Ácido gálico; ácido siríngico e ácido ferúlico	Vinho Tinto	Extração líquido-líquido com éter etílico	ODS-Hypersil RP (200 x 2,1 mm, 5 μ m) Temperatura não indicada	Eluição por gradiente A: H ₂ O + ácido fórmico (19:1,v/v) B: Metanol Volume inj.: não referenciado Fluxo: 0,3 mL/min	DAD 280 nm e 320 nm	95
Ácido gálico; ácido vanílico; siringaldeído; ácido siríngico; ácido ferúlico	Vinho	Ajustar pH da amostra com solução de HCl (0,1 M) Extração líquido-líquido com éter etílico Filtração com membranas de porosidade 0,45 μ m	Nova-Pak C18 (150 x 3,9 mm, 4 μ m)	Eluição por gradiente A: Metanol + H ₂ O + ácido fórmico (10:88:2,v/v/v) B: Metanol + H ₂ O + ácido fórmico (90:8:2,v/v/v) Volume inj.: não referenciado Fluxo: 1 mL/min	DAD 280 nm	96

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Neste capítulo serão descritos os procedimentos utilizados para a determinação de ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos, e aldeídos furânicos em vinhos licorosos vinhos e bebidas espirituosas, por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com detetor DAD (*diode array detector*).

2.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes utilizados encontram-se descritos na tabela 2.1 bem como o grau de pureza e marca de cada reagente.

Tabela 2.1 Reagentes utilizados e especificações do fabricante

Compostos	Pureza (%)	Marca
Ácido gálico monohidratado	99,0	Sigma-Aldrich
Ácido vanílico	98,9	Fluka
Ácido siríngico	98,3	Sigma
Ácido ferúlico	99,8	Aldrich
Siringaldeído	99,4	Aldrich
Coniferaldeído	98,0	Sigma-Aldrich
Sinapaldeído	98,0	Sigma-Aldrich
5-hidroximetilfurfural	99,0	Sigma-Aldrich
Furfural	98,3	Fluka
5-metilfurfural	99,5	Aldrich
Metanol	99,8	Fisher Chemical
Ácido fórmico	99,0	Chem-Lab
Etanol	99,5	Fisher Chemical

A água desionizada ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação *Millipore Milli-Q System*.

2.2 Preparação das soluções

2.2.1 Solução hidroalcoólica a 50 % e 40 %

A solução hidroalcoólica a 50 % (ou a 40 %) foi preparada num balão volumétrico de 1000,0 ± 0,4 ml, usando uma proveta para medir 500 ml (ou 400 mL) de etanol e perfazendo o volume com água ultrapura.

2.2.2 Soluções padrão de calibração

Foram preparadas em balões volumétricos de 100,0 ± 0,1 mL soluções mãe individuais de todos os ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos em solução hidroalcoólica a 50 %. As soluções mãe foram preparadas por dissolução do sólido de cada composto comercialmente adquirido com a exceção do composto 5-metilfurfural. Sendo este último preparado a partir de uma diluição de 45 µL de padrão comercial num balão volumétrico de 100,0 ± 0,1 ml. A concentração das soluções mãe para todos os analitos é da ordem dos 500 mg/L.

Os padrões de calibração foram preparados por diluição das soluções mãe em solução hidroalcoólica a 40 %. Como ilustrado na figura 2.1, estes padrões de calibração são uma mistura de todos os analitos, de maneira a diminuir o gasto de eluentes e tempo de análise. Na tabela 2.2 estão descritas as gamas de concentração utilizadas na preparação dos padrões de cada analito, e na tabela 2.3 estão indicados os volumes utilizados para preparar cada padrão. Todas as soluções foram guardadas no frigorífico a uma temperatura média de 6 °C e protegidos da luz.

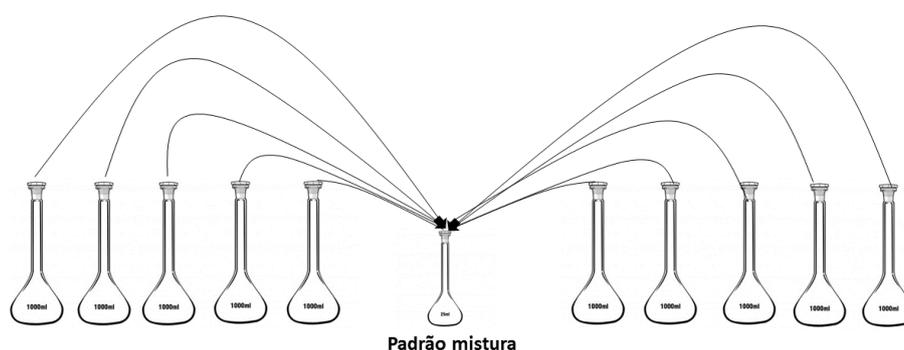


Figura 2.1: Representação esquemática do procedimento para a preparação dos padrões de calibração

Tabela 2.2 Gama de concentrações utilizadas para cada analito nos padrões de calibração

Composto	Gama de concentrações (mg/L)
5-hidroximetilfurfural	5,94 - 198,00
Furfural	1,39 - 41,76
Siringaldeído	1,98 - 39,62
Ácido vanílico	1,96 - 39,28
Ácido gálico	4,96 - 99,24
Coniferaldeído	0,98 - 29,49
Sinapaldeído	0,92 - 36,68
5-metilfurfural	0,40 - 9,96
Ácido siríngico	1,00 - 30,15
Ácido ferúlico	1,01 - 40,24

Tabela 2.3 Volumes utilizados para a preparação dos padrões de calibração em balões volumétricos de classe A 25,00 ± 0,04 mL

Composto	Volume inicial (µl)					
	PlimQ	P1	P2	P3	P4	P5
HMF	100,00 ± 0,07	150,0 ± 0,4	300,0 ± 0,4	1200,0 ± 2,3	3700,0 ± 2,3	5000,0 ± 8,2
Furfural	40,00 ± 0,05	50,00 ± 0,04	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	1500,0 ± 2,3
Siringaldeído	21,00 ± 0,05	100,00 ± 0,07	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	2000,0 ± 2,3
Ácido vanílico	50,00 ± 0,04	100,00 ± 0,07	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	2000,0 ± 2,3
Ácido gálico	200,0 ± 0,4	150,0 ± 0,4	250,0 ± 0,4	1200 ± 2,3	2000,0 ± 2,3	2500,0 ± 2,5
Coniferaldeído	70,00 ± 0,04	50,00 ± 0,04	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	1500,0 ± 2,3
Sinapaldeído	60,00 ± 0,04	50,00 ± 0,04	250,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	1500,0 ± 2,3	2000,0 ± 2,3
5-metilfurfural	30,00 ± 0,05	20,00 ± 0,05	50,00 ± 0,04	100,00 ± 0,07	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4
Ácido siríngico	40,00 ± 0,05	50,00 ± 0,04	250,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	1500,0 ± 2,3
Ácido ferúlico	50,00 ± 0,04	50,00 ± 0,04	200,0 ± 0,4	500,0 ± 0,4	1000,0 ± 0,4	2000,0 ± 2,3

HMF-5-hidroximetilfurfural

2.2.3 Soluções padrão de verificação

Foram preparadas soluções padrão de verificação, com o objetivo de avaliar a estabilidade do método. O procedimento utilizado foi idêntico ao usado para a preparação das soluções de calibração. Prepararam-se novas soluções mães de concentração 500 mg/L em balões volumétricos de 100,0 ± 0,1 mL em solução hidroalcoólica a 50 %. De seguida foram preparadas por diluição da solução mãe de cada composto três padrões de diferentes concentrações. Preparou-se um padrão em que a

concentração de cada analito era aproximadamente o valor de limite de quantificação, e por esse motivo foi designado como PlimQ, preparou-se ainda um padrão com concentração intermédia (P3V) e um padrão de concentração mais elevada (P5V). Os volumes iniciais de solução mãe utilizados para a preparação destas soluções de verificação foram os descritos na tabela 2.3.

2.2.4 Fase móvel

A fase móvel é constituída por 2 eluentes que são preparados separadamente. O eluente A foi preparado com água ultrapura e ácido fórmico numa proporção de 98:2 (em volume), respetivamente. O eluente B é constituído por metanol, água ultrapura e ácido fórmico na proporção 70:28:2 (em volume), respetivamente.

2.3 Amostras

2.3.1 Recolha das amostras

Diariamente dão entrada no IVDP, I. P. amostras para análise correspondentes a diferentes tipos de vinhos (aguardentes, bebidas espirituosas, espumantes, vinhos licorosos e vinho). Na fase de validação do método selecionaram-se para análise amostras de diferentes matrizes e concentrações. Das amostras que davam entrada no laboratório escolheram-se as de um determinado tipo, de forma a reunir-se o número de amostras necessárias para a caracterização do vinho

Foram recolhidas cerca de 20 amostras de vinho do Porto de diferentes tipos e em dias diferentes, de forma aleatória, das seguintes categorias *Tawny*, *Vintage*, *LBV*, *Colheita*, *Ruby*, Indicação de idade (*Tawny* 10, 20, 30, 40 e mais de 40 anos).

De vinhos do Douro foram recolhidos e analisados cerca de 50 vinhos brancos e 73 vinhos tintos, tendo em consideração o facto de terem estado ou não em contacto com madeira.

2.3.2 Preparação da amostra

Todas as amostras foram filtradas através de uma membrana de *Nylon* de porosidade 0,45 µm (figura 2.1) e analisadas por injeção direta no sistema de HPLC. As amostras que ultrapassaram a gama de trabalho dos diferentes analitos foram sujeitas

a diluição e analisadas novamente. Para a diluição era utilizada uma solução hidroalcoólica a 40 % em balões volumétricos de classe A.

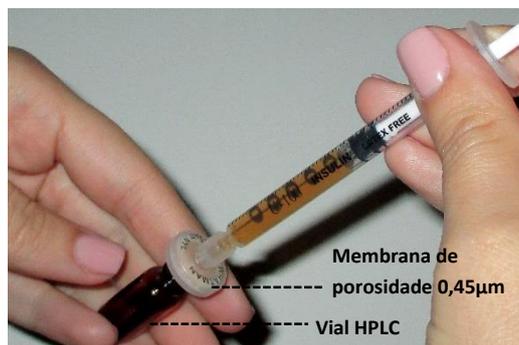


Figura 2.1 Filtração da amostra diretamente para o vial do HPLC

2.4 Equipamento de método de análise

Os equipamentos utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram os seguintes:

- Sistema cromatográfico líquido de alta eficiência, marca *Agilent Technologies*, modelo 1200, equipado com bomba quaternária, forno de coluna, injetor automático e detetor de rede de díodos (*DAD*) da marca *Hewlett Packard (HP)* modelo 1322A, apresentado na figura 2.2. O sistema de aquisição e tratamento dos dados foi realizado pelo *software* CHEM versão B.02.01 da *Agilent Technologies*.
- Coluna cromatográfica *Kinetex Evo C18*, de fase reversa, com 5 µm de porosidade, 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro e pré-coluna *UHPLC EVO C18* 4,6 mm de diâmetro
- Banho de ultrassons marca *Bandelin Sonorex Digitec* com controlo de tempo e temperatura
- Sistema de ultrapurificação de água, marca *Millipore*, modelo *Milli-Q*
- Balança analítica *Mettler Toledo* modelo ML 204/01 com uma incerteza expandida de 0,000083 g.



Figura 2.2: Sistema cromatográfico líquido de alta eficiência, marca *Agilent Technologies* do sector de cromatografia líquida do IVDP.IP

2.5 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas assim como o gradiente de eluição utilizado encontram-se escritos nas tabelas 2.4 e 2.5 respetivamente.

Tabela 2.4 Condições cromatográficas do método desenvolvido

Condições	
Fluxo de eluente	1,3 mL/min
Volume injetado	10 μ L
Temperatura da coluna	40 °C
Comprimento de onda	280 \pm 10 nm e 320 \pm 10 nm
Eluente A	Água/ ácido fórmico (98:2 v/v)
Eluente B	Metanol/ água/ ácido fórmico (70:28:2 v/v/v)

Tabela 2.5 Gradiente utilizado na análise por HPLC; Solvente A – água/ácido fórmico (98:2 v/v); Solvente B – metanol/água/ácido fórmico (70:28:2 v/v/v)

Tempo (min)	% A	% B
0	98	2
4	80	20
15	55	45
18	20	80
23	20	80
24	100	0
28	100	0

2.6 Identificação e quantificação dos picos cromatográficos

A identificação dos ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos foi efetuada por comparação dos seus tempos de retenção com os de padrões individuais injetados nas mesmas condições. A determinação foi feita a 2 comprimentos de onda, 280 nm e 320 nm. O 5-hidroximetilfurfural, furfural, 5-metilfurfural, o ácido gálico, o ácido vanílico, e o ácido siríngico foram determinados ao comprimento de onda de 280 nm, o ácido ferúlico, o siringaldeído, o coniferaldeído e o sinapaldeído foram determinados a 320 nm. Para cada cromatograma obtido, procedeu-se à integração das áreas dos picos correspondentes a cada composto.

2.7 Métodos estatísticos

No tratamento estatístico dos resultados foi utilizado o Software R versão 3.2.1 e o Microsoft Excel 2013. Para o estudo foram utilizadas 155 amostras de vinhos do Porto e 126 amostras de vinho do Douro. Ao longo do trabalho teve-se em consideração o número de amostras recolhidas para uma dada categoria, de modo a existir um número idêntico.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Nesta secção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos pelo método descrito no capítulo anterior, assim como a otimização e validação do mesmo, sendo aplicadas ferramentas de controlo de qualidade. Será também avaliado o desempenho do método recorrendo a amostras utilizadas em circuitos interlaboratoriais. Para os analitos 5-hidroximetilfurfural e furfural, serão ainda comparados os resultados obtidos pelo novo método com os obtidos com métodos já validados e utilizados pelo IVDP, I.P..

Por último, serão apresentados os resultados das amostras de vinhos analisados bem como tratamento estatístico, com o objetivo de caracterizar os diferentes tipos de vinho, assim como, avaliar se existe algum tipo de correlação entre os vinhos envelhecidos em recipientes de madeira e os teores destes compostos na composição do vinho.

3.1 Otimização do método

Como método de referência para a análise dos compostos referidos anteriormente, utilizou-se o método descrito por Sara Canas ⁹⁴. No entanto, nestas condições, cada análise tem uma duração de 65 minutos, assim, um dos objetivos deste estudo foi reduzir o tempo de corrida. Para tal, alterou-se as dimensões da coluna de 250 mm × 4,0 mm para 150 mm × 4,6 mm, e consequentemente foram alteradas as condições cromatográficas indicadas no artigo.

Numa fase inicial, usaram-se as condições descritas no artigo de referência ⁹⁴ mas com a coluna de 150 mm × 4,6 mm. Injetou-se uma solução padrão contendo os 10 analitos, de maneira a verificar, se a resolução e a seletividade dos picos eram adequadas. Na tabela 3.1 encontram-se as condições usadas nesta fase inicial e na tabela 3.2 é descrito o gradiente utilizado.

Tabela 3.1 Condições iniciais et Canas 2003 ⁹⁴

Condições	
Fluxo de eluente	1 mL/min
Volume injetado	20 µL
Temperatura da coluna	40 °C
Comprimento de onda	280 ± 10 nm e 320 ± 10 nm
Eluente A	Água/ ácido fórmico (98:2 v/v)
Eluente B	Metanol/ água/ ácido fórmico (70:28:2 v/v/v)

Tabela 3.2 Gradiente inicial et Canas 2003 ⁹⁴

Gradiente	
Tempo (min)	Eluente B (%)
3	0
25	40
43	60
55	60
60	80
65	80

A figura 3.1 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise de uma solução padrão mistura de todos os analitos, a dois comprimentos de onda, 280 e 320 nm. É possível visualizar na figura 3.1 A) que os picos dos primeiros dois analitos, ácido gálico e 5-hidroximetilfurfural, respetivamente, surgem mal resolvidos e sobrepostos. Os restantes picos apresentam um perfil assimétrico. Por sua vez, os quatro analitos que absorvem a um comprimento de onda de 320 nm (figura 3.1 B) apresentam um perfil cromatográfico razoável.

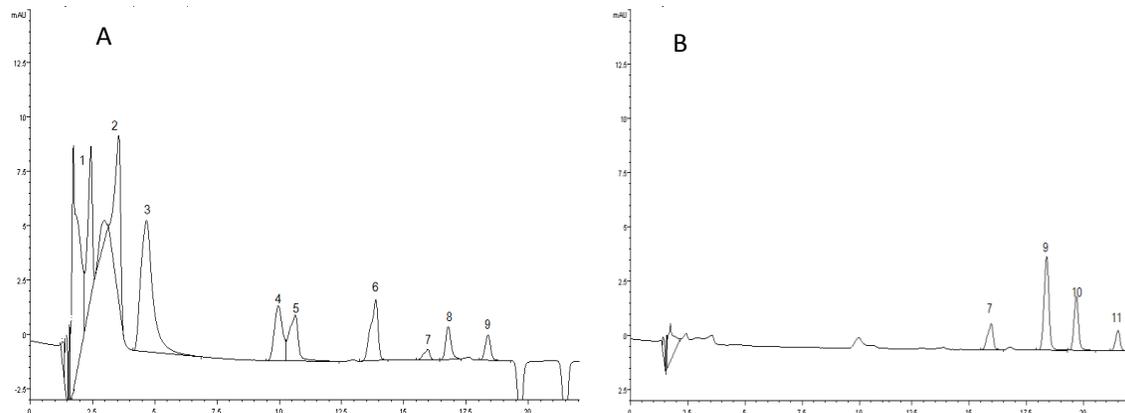


Figura 3.1 Cromatogramas obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Volume de amostra injetado 20 μ L; fluxo de 1 mL/min (restantes condições apresentadas na tabela 3.1 e 3.2) 1-ácido gálico; 2- 5- hidroxi-metil-furfural; 3- furfural; 4- 5-metil-fufural; 5- ácido vanílico; 6- ácido siríntrico; 7- siringaldeído; 9-ácido ferúlico; 10- coniferaldeído; 11-sinapaldeído

O passo seguinte consistiu na otimização do método. As condições alteradas de maneira a melhorar a resolução dos picos foram: o gradiente, o fluxo e o volume de amostra injetado.

3.1.1 Gradiente

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos analitos começou-se por utilizar uma eluição por gradiente linear, usando como eluentes os que se encontram referenciados na tabela 2.1. O gradiente consistiu em passar de 0 % de eluente B (MeOH / H₂O/ HCOOH, 70:28:2) para 80 % de B em 20 minutos. Injetou-se uma solução padrão contendo os 10 analitos, e verificou-se que todos os picos são eluídos até aos 12 minutos, reduzindo bastante o tempo de cada corrida, como se pode observar na figura 3.2. No entanto, nestas condições o pico do ácido gálico desdobra-se em dois picos, e o pico do 5-hidroxiacetilfurfural surge com fraca resolução. Outro problema refere-se ao facto dos picos do 5-metilfurfural e do ácido vanílico se encontrarem bastante próximos, o que dificulta a sua quantificação.

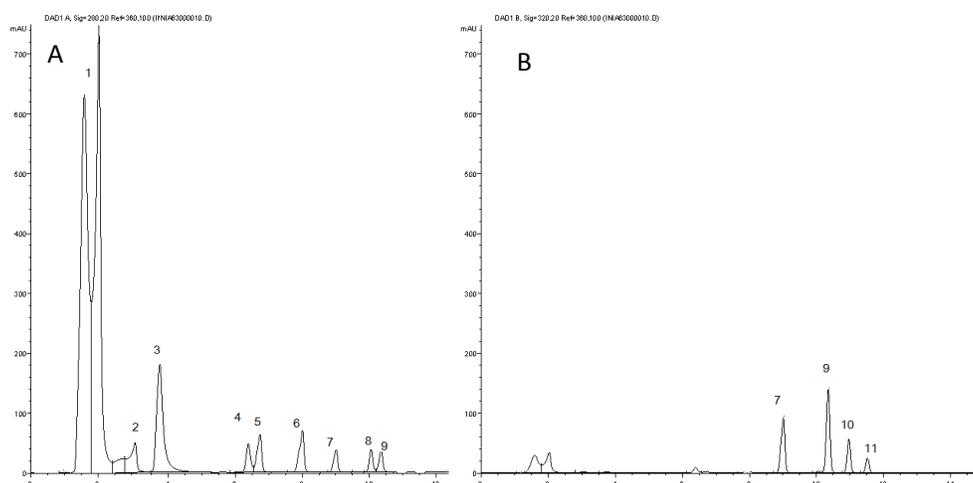


Figura 3.2 Cromatograma obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com deteção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Volume de amostra injetado 20 µL; fluxo de 1mL/min; eluição com gradiente linear. 1-ácido gálico; 2- 5-hidroxiacetilfurfural; 3- furfural; 4- 5-metil-furfural; 5- ácido vanílico; 6- ácido siríngico; 7- siringaldeído; 9-ácido ferúlico; 10- coniferaldeído; 11-sinapaldeído

A partir deste método criaram-se rampas de gradiente formando assim o gradiente final. Na tabela 2.3 do capítulo 2 está apresentado o gradiente que foi utilizado para a validação do método e análise de amostras.

3.1.2 Volume de amostra injetado

O volume de amostra injetado foi outro parâmetro a ter em atenção, para tal fizeram-se corridas injetando volumes de 10 μL e 20 μL . Com a diminuição do volume de amostra de 20 μL para 10 μL resultou um cromatograma que apresenta uma boa separação de quase todos os picos. Os dois conjuntos de cromatogramas encontram-se apresentados na figura 3.3.

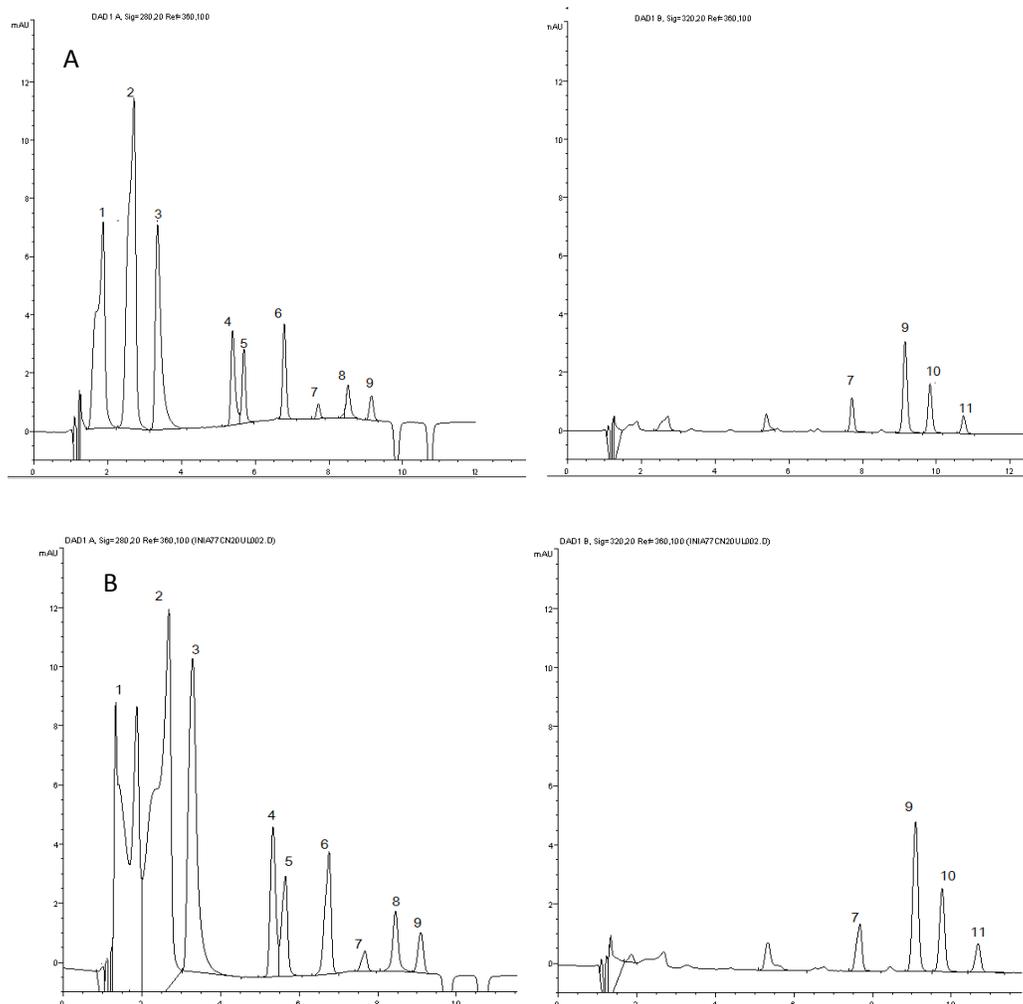


Figura 3.3 Cromatograma obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com detecção a 280 nm e 320 nm; eluição com gradiente; fluxo de 1.3 mL/min; volume de amostra injectado 10 μL (A) 20 μL (B); (restantes condições apresentadas na tabela 3.2) 1-ácido gálico; 2- 5-hidroximetilfurfural; 3- furfural; 4- 5-metil-fufural; 5- ácido vanílico; 6- ácido síringico; 7- siringaldeído; 8- o-vanilina; 9-ácido ferúlico; 10- coniferaldeído; 11-sinapaldeído

3.1.3 Fluxo de eluente

O fluxo de eluente foi alterado de 1 mL/min para 1,3 mL/min, na figura 3.4 é possível verificar que os cromatogramas apresentam um perfil semelhante, sendo a única diferença os tempos de retenção dos analitos. Uma vez que, com um fluxo de 1.3 min/mL os analitos apresentavam tempos de retenção mais baixos optou-se por usar este fluxo.

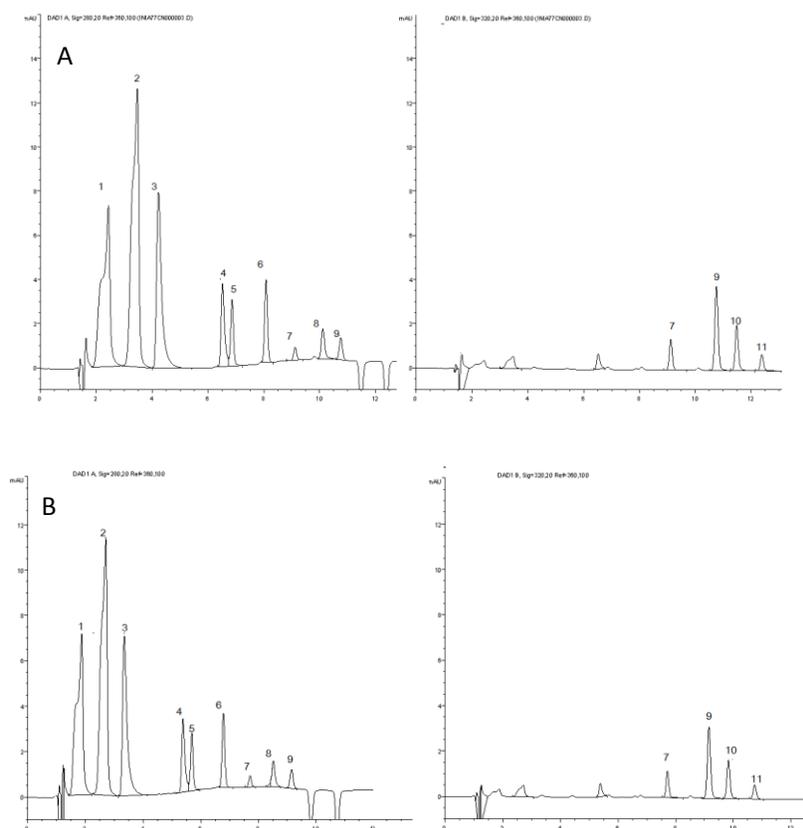


Figura 3.4 Cromatogramas obtidos da análise por HPLC de uma solução padrão contendo os 10 analitos com detecção a 280 nm e 320 nm; volume de amostra injetado 10 μ L; eluição com gradiente; fluxo de 1mL/min (A); 1.3 mL/min (B) (restantes condições apresentadas na tabela 3.2). 1-ácido gálico; 2- 5- hidroxi-metil-furfural; 3- furfural; 4- 5-metil-furfural; 5- ácido vanílico; 6- ácido siríngico; 7- siringaldeído; 9-ácido ferúlico; 10- coniferaldeído; 11-sinapaldeído

3.1.4 Desdobramento do pico do ácido gálico

Ao longo da otimização do método foi possível verificar que o pico do ácido gálico não é simétrico em nenhum dos cromatogramas apresentados. Verificou-se que o pico do ácido gálico em soluções com teores elevados de etanol se alterava. Assim, preparou-se padrões em solução

hidroalcoólica a 75 % (v/v) e observou-se um pico desdobrado. Na figura 3.5 estão apresentados dois cromatogramas que foram obtidos a partir de análises a soluções padrão de ácido gálico, onde a variável é apenas a percentagem de etanol no solvente de preparação do padrão 5 do ácido gálico.

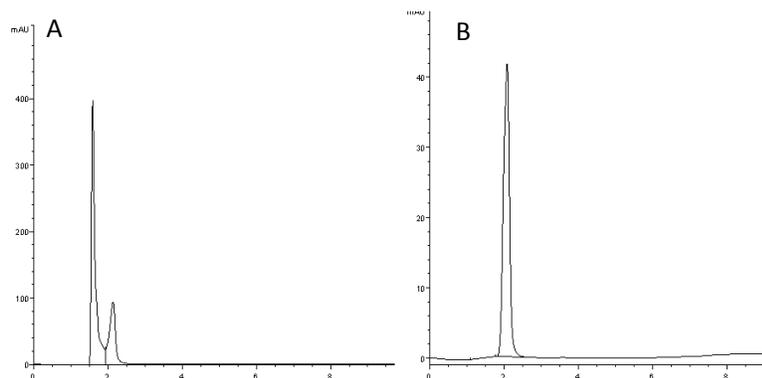


Figura 3.5 Cromatogramas obtidos da análise por HPLC de uma soluções padrão do ácido gálico detetado a 280 nm (restantes condições na tabela 3.1 e 3.2), preparados em solução hidroalcoólica a 75 % A); e em solução hidroalcoólica a 40 % B)

Podemos ainda comprovar este facto comparando resultados de amostras com diferentes teores alcoólicos. Na figura 3.6 é evidente que o pico com melhor perfil foi obtido para a análise da amostra de vinho do Porto.

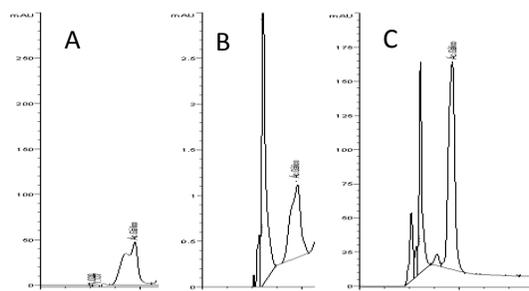


Figura 3.6 Cromatogramas evidenciando o desdobramento do pico do ácido gálico em diferentes amostras detetado a 280nm A) aguardente (v/v) 70 %; B) whisky (v/v) 40 %; C) vinho do Porto (v/v) 20 % (condições de análise encontram-se descritas na tabela 3.1 e 3.2)

Para verificar se o desdobramento do pico influencia a área do pico obtido, analisaram-se duas soluções de ácido gálico com a mesma concentração, mas preparadas com solução hidroalcoólica

com diferentes teores de etanol. Comprovou-se que área total não era afetada pelo desdobramento do pico. Além disso, apesar da autora do artigo de referência, Sara Canas, não relatar este desdobramento, é possível verificar este fenômeno através da visualização do cromatograma do artigo⁹⁴.

3.2 Validação do método

3.2.1 Curva de calibração

Para a construção das curvas de calibração foram utilizadas cinco soluções padrão, mistura de diferentes concentrações contendo na sua composição os 10 analitos em estudo. Para os padrões de maior e menor concentração fizeram-se 10 injeções de cada padrão, e para os padrões intermédios fizeram-se 4 injeções.

As curvas de calibração obtidas para os 10 compostos estão representadas na figuras 3.7.

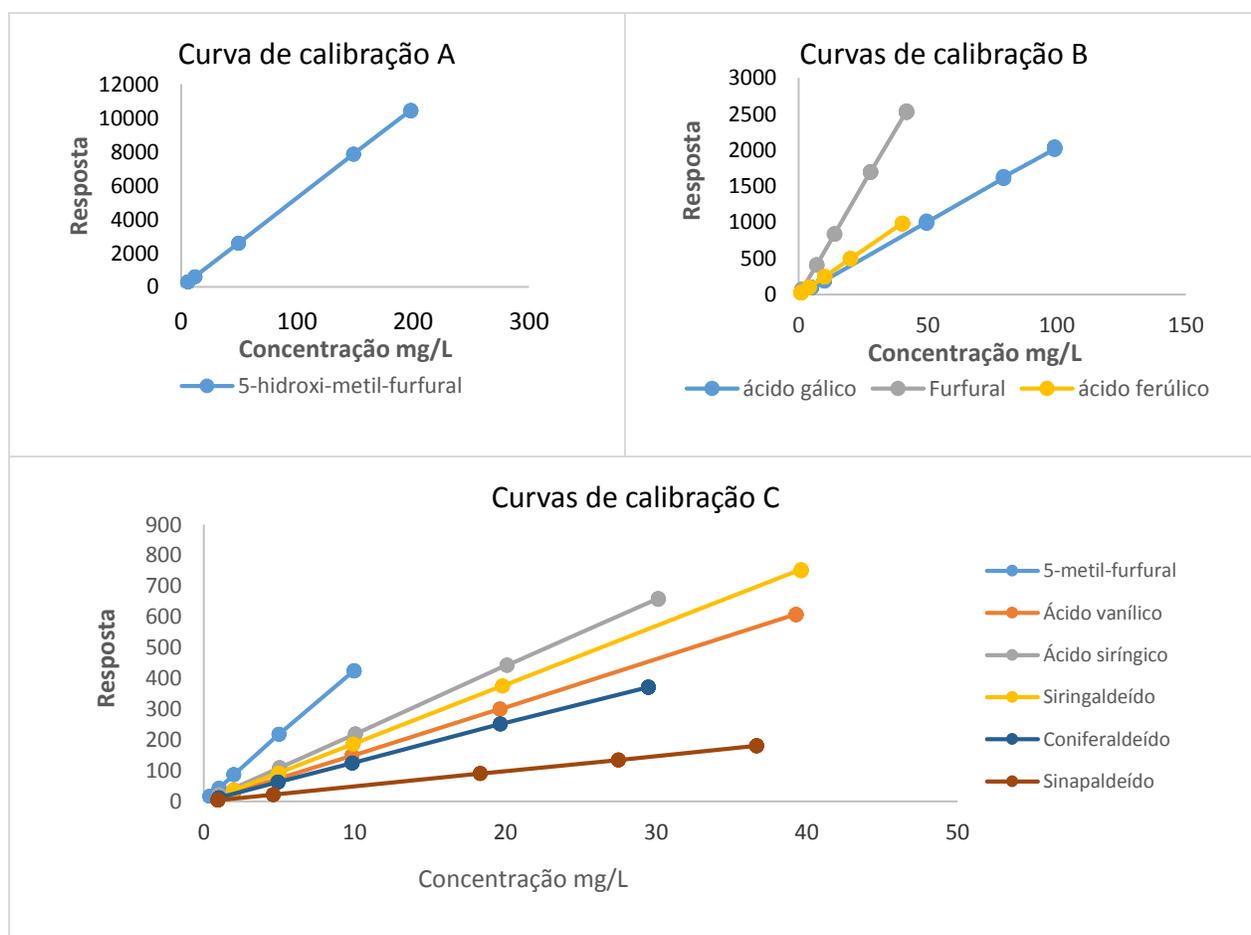


Figura 3.7 Curvas de calibração obtidas para os ácidos e aldeídos fenólicos e derivados furânicos. Curva A 5-hidroximetilfurfural; Curva B ácido gálico, furfural, e ácido ferúlico; Curva C 5-metilfurfural, ácido vanílico, ácido síringico, Siringaldeído, coniferaldeído e sinapaldeído

As equações das retas de calibração obtidas, bem como o coeficiente de determinação (r^2) de cada uma das retas encontram-se apresentadas na tabela 3.3

De forma a avaliar a qualidade das retas obtidas para os diferentes analitos, foi calculada a incerteza associada ao declive, bem como a incerteza associada à ordenada na origem.

De acordo com a tabela 3.3 verifica-se que os resultados são satisfatórios, uma vez que os valores de coeficiente de determinação são muito próximos de 1, e todos os compostos apresentam um erro de declive inferior a 1 %. Quanto à ordenada de origem, o intervalo de confiança apenas inclui o ponto (0;0) para alguns dos compostos, como é o caso do ácido siríngico, do ácido ferúlico, do coniferaldeído e do sinapaldeído. A maior parte das curvas de calibração dos compostos não inclui o ponto (0,0), e este fenómeno pode estar relacionado com o ruído instrumental, no entanto, John W. Dolan afirma que não devemos forçar a reta a passar no ponto de origem, uma vez que este procedimento pode aumentar o erro de medição.¹⁰³

Tabela 3.3 Parâmetros das retas de calibração efetuadas para a determinação de cada um dos analitos por HPLC-DAD

Analito	Equação da reta de calibração	r^2
Ácido gálico	$A = (20,512 \pm 0,057) C - (9,3 \pm 3,7)$	0,99996
5-hidroxiacetilfurfural	$A = (52,815 \pm 0,055) C - (7,4 \pm 6,7)$	0,999994
Furfural	$A = (60,93 \pm 0,10) C - (9,8 \pm 2,6)$	0,99998
Ácido vanílico	$A = (42,65 \pm 0,17) C + (1,15 \pm 0,95)$	0,99991
5-metilfurfural	$A = (15,493 \pm 0,027) C - (1,99 \pm 0,61)$	0,99998
Ácido siríngico	$A = (21,856 \pm 0,039) C + (0,28 \pm 0,72)$	0,99998
Siringaldeído	$A = (18,980 \pm 0,014) C - (0,68 \pm 0,34)$	1,00000
Ácido ferúlico	$A = (24,443 \pm 0,043) C + (0,89 \pm 1,00)$	0,99998
Coniferaldeído	$A = (12,607 \pm 0,040) C + (0,69 \pm 0,72)$	0,99994
Sinapaldeído	$A = (4,935 \pm 0,010) C - (0,12 \pm 0,24)$	0,99997

3.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da visualização dos gráficos obtidos, e através do coeficiente de determinação de cada gráfico. Os valores de determinação obtidos para todos os gráficos foram superiores a 0,9999. Verificou-se que todos os compostos apresentam linearidade na gama de trabalho estudada, uma vez que o critério mínimo aceitável

para o valor de coeficiente de correlação (r) estabelecido pelo guia relacre 2013 para métodos de quantificação é de 0,995.¹⁰⁴

3.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método ser capaz de distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Este parâmetro é definido como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nestas zona de concentrações. Uma vez que temos somente equações de primeiro grau, a sensibilidade corresponde ao declive¹⁰⁴. Na tabela 3.4 encontram-se os valores de sensibilidade do método para a análise dos diferentes compostos.

Tabela 3.4 Valores de sensibilidade do método para a análise dos 10 compostos por HPLC-DAD

Analito	Sensibilidade (ppm ⁻¹)
Ácido gálico	20,51
5-hidroxi metilfurfural	52,82
Furfural	60,93
Ácido vanílico	42,65
5-metilfurfural	15,49
Ácido siríngico	21,85
Siringaldeído	18,98
Ácido ferúlico	24,44
Coniferaldeído	12,61
Sinapaldeído	4,93

Através dos valores de sensibilidade descritos na tabela 3.4 verifica-se que o método é mais sensível para a análise de certos analitos, destacando-se o furfural e o 5-hidroxi metilfurfural, e ainda, mas com um valor de sensibilidade ligeiramente inferior, para o ácido vanílico.

3.2.4 Limiares analíticos do método de ensaio: Limites de deteção e de quantificação

O limite de deteção (Ldd) corresponde ao valor mínimo de concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar do ruído com um determinado nível de confiança. O limite de quantificação (Ldq) é a menor concentração de analito que pode ser determinada com um determinado nível de precisão e exatidão. Estes parâmetros foram estimados a partir dos parâmetros das retas de calibração dos compostos em estudo utilizando as equações 1 e 2,

respetivamente. Os valores dos limites de deteção e quantificação obtidos para os 10 compostos encontram-se detalhados na tabela 3.5.

$$Ldd = \frac{3,3S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 1}$$

$$Ldq = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 2}$$

Em que $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração, e b ao declive.

Obtiveram-se valores de limites de deteção relativamente baixos se tivermos em atenção o mínimo de concentração destes compostos obtidos em amostras de brandy num estudo já realizado pela investigadora Sara Canas da Estação Vitivinícolas Nacional ⁹⁴. O mesmo acontece com os limites de quantificação. Os dois analitos para os quais se obtiveram valores de Ldd e Ldq mais elevados foram o ácido gálico e o 5-hidroximetilfurfural.

Tabela 3.5 Limites de deteção e quantificação estimados, a partir das retas de calibração traçadas, para a determinação de cada um dos analitos por HPLC-DAD

Analito	Ldd (ppm)	Ldq (ppm)
Ácido gálico	1,28	3,92
5-hidroximetilfurfural	0,99	3,01
Furfural	0,32	0,97
5-metilfurfural	0,18	0,55
Ácido vanílico	0,30	0,93
Ácido siríntrico	0,24	0,75
Siringaldeído	0,14	0,42
Ácido ferúlico	0,33	1,02
Coniferaldeído	0,43	1,30
Sinapaldeído	0,36	1,10

Analisando os dados da tabela 3.5 verifica-se que os limites de quantificação do ácido gálico, do 5-hidroximetilfurfural, do furfural, do ácido siríntrico, e do siringaldeído são inferiores à concentração do padrão de calibração de menor concentração.

Conforme a IPAC o valor calculado para o Ldq deve ser verificado experimentalmente¹⁰⁵. Dependendo da matriz os limites de aceitação podem ser alterados. A OIV (*Organisation*

Internationale de la Vigne et du Vin) sugere que para matrizes de vinhos o valor máximo de desvio permitido é de 60 % do Ldq, dando origem às duas desigualdades seguintes ¹⁰⁶.

$$\bar{x} - 2.S_{Fi} \geq Ldq - 60\%.Ldq \quad \text{Equação 4}$$

$$\bar{x} + 2.S_{Fi} \leq Ldq + 60\%.Ldq \quad \text{Equação 5}$$

Onde \bar{x} é o valor médio das concentrações obtidas para uma solução padrão preparada com concentrações semelhantes aos limites de quantificação, para os diferentes analitos em condições de precisão intermédia, S_{Fi} é o desvio padrão da precisão intermédia, Ldq é o valor calculado pela equação 2, e 60 % é a percentagem sugerida pela OIV.

Para verificar o valor teórico obtido para do Ldq foram analisados padrões de todos os analitos com uma concentração próxima do Ldq (PLimQ), em duplicado durante 5 dias consecutivos. Através da visualização da tabela 3.6 pode-se verificar que todos os limites de quantificação dos analitos ($\bar{x} \pm 2.S_{Fi}$) em estudo ses encontram-se dentro do intervalo estabelecido pela OIV ($Ldq \pm 60\% Ldq$). Concluindo-se assim que os valores teóricos do Ldq calculados pela equação 2 foram confirmados experimentalmente.

Tabela 3.6 Valores para o cálculo da precisão do valor de Ldq (limite de quantificação), onde S_{Fi} é desvio padrão da precisão intermédia, \bar{x} é a média dos resultados.

Analito	$\bar{x}-2S_{Fi}$	$\bar{x}+2S_{Fi}$	Ldq - 60% Ldq	Ldq + 60% Ldq
Ácido gálico	3,51	4,01	1,57	6,27
5-hidroximetilfurfural	3,06	3,11	1,20	4,82
Furfural	1,31	1,42	0,39	1,52
5-metilfurfural	0,53	0,64	0,22	0,88
Ácido vanílico	1,10	1,24	0,34	1,49
Ácido siríngico	0,85	1,09	0,30	1,20
Siringaldeído	0,17	0,43	0,17	0,67
Ácido ferúlico	0,94	0,97	0,61	1,63
Coniferaldeído	0,92	0,93	0,52	2,08
Sinapaldeído	0,90	0,98	0,44	1,76

3.2.5 Precisão

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Este parâmetro é importante pois possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise¹⁰⁷. No presente estudo a precisão do método de análise foi verificada em termos de repetibilidade e precisão intermedia em padrões e amostras reais. Os resultados de ambos os parâmetros serão apresentados em termos de coeficiente de variação (CV) utilizando as equações 6 e 7.

$$CV_r(\%) = \frac{s_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

$$CV_R(\%) = \frac{s_{Ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde s_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade, s_{Ri} é o desvio padrão da precisão intermedia e \bar{x} é o valor médio dos valores obtidos.

3.2.5.1 Avaliação da repetibilidade das medidas das áreas dos picos e tempos de retenção.

A precisão das áreas dos picos e tempos de retenção são importantes parâmetros para medições qualitativas e quantitativas no HPLC.

A precisão das áreas dos picos, em condições de repetibilidade, está relacionada com o mecanismo de injeção automático, e com o sistema de bombas quaternárias¹⁰⁸.

Outro parâmetro importante é a repetibilidade nos tempos de retenção para os diferentes analitos, uma vez que, para eluição das substâncias por gradiente, deve ser levado em consideração o tempo de residência da fase móvel que pode resultar em variações nos tempos de retenção, comprometendo a resolução, sobretudo das primeiras substâncias eluídas.¹⁰⁹

Para avaliação de ambos os parâmetros analisou-se, em condições de repetibilidade, $n = 10$, as duas soluções padrão, P1 e P5, correspondentes aos pontos extremos da gama de concentrações para os 10 analitos.

Com base no valor médio da área de cada pico, e o desvio padrão correspondente, determinaram-se os coeficientes de variação (CV) apresentados na tabela 3.7. Os valores de CV obtidos são todos inferiores a 0,5 %, concluindo-se que existe uma excelente repetibilidade instrumental, uma vez que este valor é muito inferior ao sugerido pela LabCompliance¹⁰⁸ e por Shabir¹¹⁰ que é 1 %.

Tabela 3.7 Coeficiente de variação das áreas dos picos dos 10 analitos nos Padrões 1 e 5, em condições de repetibilidade

	Área do pico do P1	CV _r (%)	Área do pico do P5	CV _r (%)
Ácido gálico	95,26 ± 0,20	0,21	2027,0 ± 9,5	0,47
5-hidroximetilfurfural	310,85 ± 0,62	0,20	10441 ± 14	0,14
Furfural	74,80 ± 0,28	0,37	2531,4 ± 5,2	0,21
5-metilfurfural	16,775 ± 0,076	0,45	424,77 ± 0,55	0,13
Ácido vanílico	29,778 ± 0,069	0,23	607,24 ± 0,76	0,13
Ácido siríngico	21,784 ± 0,073	0,34	658,2 ± 1,0	0,16
Siringaldeído	37,364 ± 0,051	0,14	751,4 ± 1,2	0,16
Ácido ferúlico	24,527 ± 0,033	0,14	983,3 ± 1,7	0,17
Coniferaldeído	12,238 ± 0,018	0,15	371,28 ± 0,74	0,20
Sinapaldeído	4,390 ± 0,031	0,71	181,07 ± 0,44	0,24

Foi também determinado o valor médio dos tempos de retenção para cada pico, e o desvio padrão correspondente, obtendo-se os coeficientes de variação (CV) apresentados na tabela 3.8. Analisando os resultados apresentados na tabela 3.8 verificou-se que existe repetibilidade nos tempos de retenção obtidos para todos os compostos, para ambos os padrões. Os tempos de retenção de todos os analitos em estudo apresentam um baixo valor de coeficiente de variação, apresentando para todos os analitos valores inferiores a 0,26 % (valor bastante abaixo do máximo de CV sugerido pela LabCompliance que é 0,5 %)¹⁰⁸. Pode-se ainda observar que os tempos de retenção, assim como os coeficiente de variação respectivos, são ligeiramente inferiores no padrão 5 para todos os compostos

Tabela 3.8 Coeficiente de variação dos tempos de retenção dos 10 analitos nos Padrões 1 e 5, em condições de repetibilidade

	Tempo de retenção do P1 (min)	CV _r (%)	Tempo de retenção do P5 (min)	CV _r (%)
Ácido gálico	2,0133 ± 0,0013	0,064	2,00569 ± 0,00082	0,0023
5-hidroximetilfurfural	2,9857 ± 0,0041	0,14	2,967 ± 0,0015	0,052
Furfural	3,6104 ± 0,0095	0,26	3,5833 ± 0,0015	0,042
5-metilfurfural	5,914 ± 0,010	0,17	5,8582 ± 0,0035	0,060
Ácido vanílico	6,209 ± 0,010	0,17	6,1715 ± 0,0031	0,051
Ácido siríngico	7,374 ± 0,016	0,22	7,3295 ± 0,0053	0,073
Siringaldeído	8,430 ± 0,020	0,23	8,3680 ± 0,0067	0,080
Ácido ferúlico	10,020 ± 0,024	0,24	9,9503 ± 0,0063	0,063
Coniferaldeído	10,794 ± 0,026	0,24	10,7132 ± 0,0073	0,068
Sinapaldeído	11,667 ± 0,029	0,25	11,5778 ± 0,0081	0,070

3.2.5.2 Repetibilidade e precisão intermedia da concentração em padrões

Neste estudo, procedeu-se à realização de 10 injeções (n= 10) das soluções padrão extremos (P1mQ e P5v) em condições de repetibilidade. Determinou-se a concentração de cada analito por interpolação na curva de calibração correspondente e calculou-se a média das concentrações, o desvio padrão correspondente e o coeficiente de variação.

Para o estudo da precisão intermédia dos padrões foram utilizadas soluções padrão de verificação, analisadas em diferentes dias (n≥ 28) sob condições idênticas. Na tabela 3.9 são apresentados os valores de repetibilidade e precisão intermédia na forma de coeficiente de variação.

Em termos de repetibilidade os resultados para todos os analitos são bastante satisfatórios, encontrando-se todos com percentagens inferiores a 1 %. Como seria de esperar as percentagens de precisão intermédia apresentam um valor numérico superior, no entanto todos os valores são igualmente aceitáveis, uma vez que laboratório considera valores aceitáveis até 10 % para coeficiente de variação (CV).

Tabela 3.9: Coeficientes de variação determinados em condições de repetibilidade e precisão intermédia de soluções padrões contendo todos os analitos em estudo a 2 níveis de concentração (PlimQ e P5v)

	Concentração (mg/L)	Repetibilidade CV_r (%)	Precisão intermédia CV_R (%)
Ácido gálico	4,94 ± 0,13	0,21	4,10
	100,0 ± 1,3	0,49	2,83
5-hidroximetilfurfural	3,0778 ± 0,0063	0,21	1,10
	184,8 ± 1,8	0,14	1,43
Furfural	1,407 ± 0,021	0,36	0,95
	42,61 ± 0,45	0,22	1,98
5-metilfurfural	1,341 ± 0,056	0,34	4,35
	10,42 ± 0,14	0,13	1,86
Ácido vanílico	1,211 ± 0,045	0,37	3,73
	40,80 ± 0,42	0,13	1,76
Ácido sirínico	1,016 ± 0,041	0,36	1,58
	29,48 ± 0,25	0,16	1,67
Siringaldeído	0,4348 ± 0,0057	0,14	2,39
	41,14 ± 0,38	0,17	1,79
Ácido ferúlico	0,9602 ± 0,0052	0,15	1,00
	40,91 ± 0,31	0,18	1,81
Coniferaldeído	0,948 ± 0,011	0,16	1,11
	31,19 ± 0,31	0,21	2,25
Sinapaldeído	0,957 ± 0,024	0,74	1,21
	37,71 ± 0,39	0,26	2,09

Todos os valores de desvio padrão foram obtidos sob condições de repetibilidade

3.2.5.3 Repetibilidade e precisão intermedia em amostras reais

Para determinar a precisão intermédia em amostras reais, foram efetuadas uma série de ensaios ($n = 14$), com replicados ($p = 3$) a várias amostras de diferentes matrizes. Dentro da categoria dos vinhos do Porto foram feitas análises a um LBV, a um *Tawny*, a uma Colheita de 1995 e a um vinho com indicação de idade (*Tawny* + 40 anos). Foram também analisadas duas aguardentes e três bebidas espirituosas (*Armagnac*, *Cognac* e um *Whisky*). Nem todas as amostras continham na sua composição todos os analitos, e em alguns casos os valores de

concentração foram inferiores ao Ldq, sendo que para estes casos não foram calculados os respetivos coeficiente de variação.

Na tabela 3.10 estão apresentados os resultados do estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para vinhos do Porto, assim como a gama de concentrações encontrada nas amostras utilizadas para este estudo. Os valores destes dois parâmetros de avaliação estão apresentados em forma de coeficientes de variação.

Tabela 3.10 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise de diferentes amostras de vinho do Porto

	Concentração (mg/L)	Repetibilidade CVr (%)	Precisão intermédia CVR (%)
Ácido gálico	11,50 - 40,49	0,94	1,70 - 2,67
5-hidroximetilfurfural	3,42 - 78,14	1,82	1,23 - 9,50
Furfural	2,61 - 13,16	3,16	4,75 - 12,10
5-metilfurfural	n.d	n.d	n.d
Ácido vanílico	9,18 - 14,66	2,99	5,73 - 11,95
Ácido siríngico	16,01 - 17,32	1,67	2,75 - 6,21
Siringaldeído	2,24 - 6,12	4,58	4,619 - 21,74
Ácido ferúlico	n.d	n.d.	n.d
Coniferaldeído	n.d	n.d.	n.d
Sinapaldeído	n.d	n.d	n.d

n.d- não detetado

Verificou-se que para todos os analitos o valor de repetibilidade é inferior a 5 %, mostrando que o método apresenta boa repetibilidade para os analitos encontrados nas amostras de vinho do Porto estudadas.

Os resultados obtidos a nível de precisão intermédia são aceitáveis para todos analitos (inferiores a 10 %) e apenas o siringaldeído apresentou para uma das amostras um valor de CV superior a 15 %. Verifica-se ainda que nas três categorias de vinho utilizadas (LBV, *Tawny*, Colheita 1995 e + 40 anos) não foram quantificados o 5-metilfurfural, o ácido ferúlico, o coniferaldeído e o sinapaldeído.

Também foi estudada a repetibilidade e a precisão intermédia em bebidas espirituosas. Na tabela 3.11 estão apresentados os resultados, e verifica-se que das amostras utilizadas para o estudo, nenhuma apresentou na sua composição valores de 5-metilfurfural e de ácido ferúlico. Os resultados apresentados na tabela 3.11 revelam que mais uma vez os valores de coeficiente de variação para a repetibilidade são inferiores ou iguais a 5 % e por isso encontram-se dentro dos parâmetros aceites pelo laboratório. Os coeficientes de variação de precisão intermédia foram igualmente aceites pelo laboratório ($\leq 15\%$).

Ao comparar as duas tabelas (3.10 e 3.11) verificamos que os resultados de precisão intermédia são semelhantes, com a exceção dos resultados para o ácido gálico, obtendo-se melhores resultados de precisão intermédia no caso das amostras de vinho do Porto. Este facto pode ser explicado com o referido anteriormente na otimização do método (secção 3.1.4). Uma vez que existe desdobramento do pico do ácido gálico em amostras com elevados teores de etanol (como é o caso das bebidas espirituosas), é necessário uma integração manual, o que pode eventualmente levar a uma maior variabilidade nos resultados.

Tabela 3.11 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise diferentes amostras de bebidas espirituosas

	Concentração (mg/L)	Repetibilidade CV _r (%)	Precisão intermédia CV _R (%)
Ácido gálico	1,28 - 15,69	3,01	7,35 - 11,40
5-hidroximetilfurfural	3,46 - 15,84	5,04	2,91 - 11,60
Furfural	6,86 - 13,56	3,30	5,85 - 13,42
5-metilfurfural	n.d	n.d	n.d
Ácido vanílico	13,56	2,10	6,57
Ácido siríngico	1,82 - 2,71	4,30	6,89 - 10,43
Siringaldeído	1,19 - 15,69	3,31	6,68 - 12,32
Ácido ferúlico	n.d	n.d	n.d
Coniferaldeído	1,02 e 1,90	4,99	8,99 - 10,75
Sinapaldeído	1,064 e 4,266	4,93	9,95 - 13,31

n.d- não detetado

Os vinhos do Porto utilizados para o presente estudo não apresentaram na sua composição teores de 5-metilfurfural, ácido ferúlico, coniferaldeído e sinapaldeído não permitindo a avaliação da precisão da sua determinação em amostras de vinho.

Assim, para avaliar a precisão do 5-metilfurfural e do ácido ferúlico preparou-se duas soluções padrão destes compostos em matriz de vinho do Porto que abrangessem toda a gama de concentração, uma vez que estes dois analitos não estão presentes na composição dos vinhos do Porto e bebidas espirituosas analisadas.

A solução mãe foi preparada por um só analista, cada solução padrão filha foi preparada em quadruplicado por três analistas diferentes, realizando-se assim 12 análises. O esquema seguinte (figura 3.8) pretende ilustrar de uma forma mais simples o procedimento executado para o estudo da precisão intermédia. A repetibilidade foi avaliada analisando 10 vezes a mesma solução intermédia.

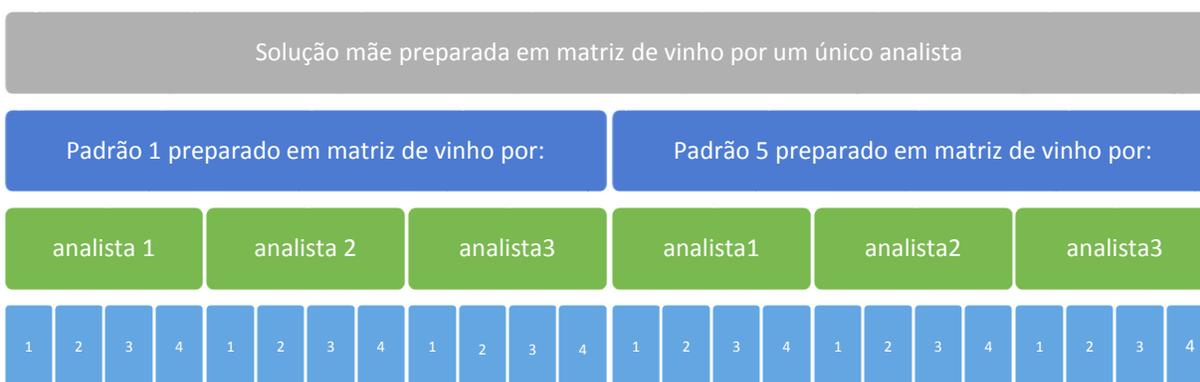


Figura 3.8 Esquema do procedimento utilizado para a avaliação da precisão intermédia fazendo variar o analista

Na tabela 3.12 então apresentados os valores dos coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia.

Tabela 3.12 Valores de repetibilidade e precisão intermédia obtidos para a análise de padrões preparados em matriz de vinho do Porto

	Concentração (mg/L)	Repetibilidade CV_r (%)	Precisão intermédia CV_R (%)
5-metilfurfural	1,028 ± 0,068	1,94	6,64
	11,80 ± 0,27	0,08	2,25
Ácido ferúlico	1,421 ± 0,074	5,74	5,21
	31,1 ± 1,2	0,07	3,87

É possível verificar pelos dados apresentados na tabela 3.12 que os valores dos CV são aceitáveis. Os valores de CV de repetibilidade são inferiores a 5 %, com a exceção do ácido ferúlico para concentrações menores. Em termos de precisão intermédia todos os analitos apresentam coeficientes de variação inferiores a 10 %.

3.2.6 Avaliação da exatidão do método

A exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Para avaliar a exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação, análises a amostras utilizadas em circuitos interlaboratoriais e comparação dos métodos.

3.2.6.1 Ensaios de Recuperação

Uma das possíveis fontes de erro neste tipo de análises é o efeito de matriz, assim este deve ser avaliado através da realização de ensaios de recuperação. Este processo consiste na fortificação das amostras com quantidades conhecidas do analito. Através da equação 7 foram calculadas as percentagens de recuperação para cada analito.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde, C_1 é a concentração na amostra fortificada, C_2 é a concentração na amostra e C_3 é a concentração da fortificação.

Para avaliar o efeito matriz na determinação dos 10 analitos, fizeram-se ensaios de recuperação em amostras de vinho e bebidas espirituosas. Para este ensaio as amostras

selecionadas foram: um vinho do Porto (LBV), um vinho tinto do Douro, um espumante do Douro, um *Cognac* e duas aguardentes. Algumas das amostras selecionadas não tinham na sua composição todos os analitos antes da fortificação. Para este estudo foram utilizados três níveis de concentração diferentes que correspondem aos padrões (PlimQ, P3v e P5v), fez-se quatro réplicas em cada nível ($p= 4$). Na tabela 3.13 encontram-se os resultados obtidos para as recuperações nas matrizes analisadas, assim como a média das percentagens de recuperação de todas as matrizes e respetivo desvio padrão.

As taxas médias de recuperação obtidas encontram-se entre 93 e 101 %. Estas percentagens são satisfatórias, uma vez que se encontram dentro do intervalo 80-110 %, intervalo estipulado pelo LabCompliance para esta gama de concentrações¹¹¹. No entanto para alguns casos não foi possível calcular a recuperação, uma vez que os valores se encontram abaixo do limite de quantificação. Os valores que se encontram na tabela 3.13 assinaladas com ^{a)} são valores que apesar de se encontrarem abaixo do limite de quantificação apresentam resultados satisfatórios. Na parte inferior da tabela estão apresentadas as médias de recuperação de todos os analitos para uma dada matriz. A matriz que apresentou melhor médias de recuperação foi o *Cognac*.

Os analitos que apresentaram melhores resultados de recuperações foram o ácido siríngico e o siringaldeído, estes resultados podem estar diretamente relacionados com o facto ambos os analitos apresentarem picos intensos, e por isso são mais facilmente diferenciados do resto da matriz.

Assim, pode-se verificar que o método não apresenta efeitos de matriz significativa para as matrizes em questão, e a sua seletividade é elevada na gama de concentração analisada para quase todos os analitos em estudo.

Tabela 3.13 Resultados obtidos nos ensaios de recuperação realizados para os 10 analitos em três níveis de concentração diferentes e seis matrizes distintas

Analito	Fortificação mg/L	Recuperação (%)						Média
		Cognac	LBV	AD	AD	Tinto- Douro	Espumante	
Ácido gálico	1,98	86	106	95	99 ^a	87	<Ldd	96,7 ± 5,3
	27,72	93	93	95	94	101	100	
	45,7	99	97	99	97	98	105	
5-hidroximetilfurfural	2,04	101	96	101	104 ^a	<Ldd	103	97,4 ± 6,1
	30,34	100	95	99	101	83	101	
	91,99	101	96	100	100	88	100	
Furfural	0,73	98	<Ldd	94	99	99 ^a	108	97,4 ± 7,3
	6,99	94	93	92	100	83	107	
	21,31	110	91	100	100	86	102	
5-metilfurfural	0,17	100 ^{a)}	<Ldd	106	100	90	<Ldd	96 ± 10
	1,17	105	<Ldd	99	90	78	77	
	5,13	96	95	100	96	115	100	
Ácido vanílico	1,02	104	<Ldd	111	99	104	74	99,7 ± 8,8
	4,34	94	n.d	106	103	105	91	
	20,59	96	110	99	101	96	102	
Ácido siríngico	0,45	98	115	102	103	102	95	99,9 ± 4,6
	4,86	97	106	99	99	98	96	
	14,7	98	98	99	98	97	98	
Siringaldeído	1,01	105	107	102	102	<Ldd	103	101,3 ± 2,5
	5,09	100	106	100	100	99	101	
	20,35	99	100	99	99	100	100	
Ácido trans- ferúlico	0,5	101	92	92	90	93	89	93,3 ± 3,4
	5,01	94	91	97	92	89	89	
	20,4	97	95	97	96	91	93	
Coniferaldeído	0,48	97	<Ldq	94	92	83	93	94,1 ± 5,1
	4,97	96	89	97	98	87	93	
	15,15	99	103	97	98	88	96	
Sinapaldeído	0,49	101	116	95	101	99	86	97,6 ± 6,6
	9,53	98	93	99	100	88	101	
	18,89	99	93	99	99	89	101	
	\bar{x}	99,2	98,8	98,5	98,6	92,7	96,6	
	s	4,7	8,3	4,2	3,8	8,3	7,7	

n.d – pico não detetado no comatograma, <Ldd inferior ao limite de deteção, <Ldq inferior ao limite de quantificação

3.2.6.2 Ensaio interlaboratoriais

Além dos ensaios de recuperação, a exatidão do método foi avaliada através da participação em um ensaio interlaboratorial, no qual todos os participantes analisaram a mesma amostra fornecida pela entidade organizadora (BIPEA). Para avaliação dos resultados através do procedimento sugerido pela OIV, os mesmos devem estar de acordo com as seguintes desigualdades (equações 8 e 9)¹⁰⁶.

$$x_{ref} + EMA > \bar{x} + 2s \quad \text{Equação 8}$$

$$x_{ref} - EMA < \bar{x} - 2s \quad \text{Equação 9}$$

Onde \bar{x}_{ref} é o valor de referência fornecido pela entidade organizadora, EMA é o valor máximo admissível fornecido igualmente pela entidade organizadora, \bar{x} é o valor médio experimental de concentração e s é o desvio padrão obtido pelo laboratório.

Outra forma de avaliar os resultados é calculando o erro relativo (ER) através da equação 10¹⁰⁴.

$$ER(\%) = \frac{|x_{ref} - \bar{x}|}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Para avaliar o desempenho do método calculou-se também o Z-score (equação 11).

$$z = \frac{\bar{x} - A}{s} \quad \text{Equação 11}$$

Sendo, \bar{x} o valor de concentração obtido pelo laboratório, A é o valor aceite como verdadeiro e s é o desvio definido pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial (EMA).

A amostra analisada tem como matriz uma bebida espirituosa, mais propriamente Calvados, tendo na sua composição quase todos os analitos em estudo, com exceção do ácido ferúlico. Para tal avaliação procedeu-se como aconselhado pelo OIV fazendo-se 5 análises em duplicado durante 5 dias consecutivos. Na tabela 3.14 é possível comparar os resultados obtidos pelo método desenvolvido com os resultados valores de referência, bem como o erro relativo (ER). O número de laboratórios participantes nestes ensaios variou entre 13 e 17, dependendo do analito a quantificar.

Tabela 3.14 Resultados obtidos para avaliação da exatidão do método a partir do uso de materiais de referência.

Analito	Concentração _{lab} (mg/L)	x_{ref} (mg/L)	Erro relativo (%)
Ácido gálico	4,19 ± 0,24	4,02 ± 0,36	4,4
5-hidroximetilfurfural	12,108 ± 0,084	12,60 ± 0,26	3,9
Furfural	3,64 ± 0,10	3,6 ± 0,1	1,8
5-metilfurfural	0,102 ± 0,004	0,26 ± 0,03	60,8
Ácido vanílico	0,705 ± 0,049	0,60 ± 0,09	17,5
Ácido siríngico	1,050 ± 0,058	1,02 ± 0,08	3,3
Siringaldeído	1,767 ± 0,030	1,67 ± 0,08	5,8
Coniferaldeído	0,307 ± 0,024	0,32 ± 0,02	4,1
Sinapaldeído	0,349 ± 0,014	0,37 ± 0,03	5,7

O guia relacre 2013 sugere que o ER deverá ser menor que 5 %, no entanto cabe a cada laboratório definir o seu grau de exigência. Os resultados obtidos indicam-nos que os erros relativos para a determinação do ácido gálico, do 5-hidroximetilfurfural, do furfural, do ácido siríngico, do siringaldeído, do coniferaldeído e do sinapaldeído são satisfatórios. Obtendo-se para os analitos, 5-metilfurfural e ácido vanílico, valores de ER superiores a 5 %, no entanto a concentração de referência destes dois analitos encontram-se abaixo do limite de quantificação. Apesar disso, o procedimento utilizado pelo OIV¹⁰⁶ para a avaliação deste parâmetro afirma que se os resultados ($\bar{x} \pm 2s$) se encontram dentro do intervalo estipulado ($x_{ref} \pm EMA$) existe exatidão nos resultados. Assim, foram calculados os intervalos admissíveis estando os resultados apresentados na tabela 3.15.

Analisando os resultados apresentados na tabela 3.15, verifica-se que todos os analitos se encontram dentro do intervalo estipulado, à exceção do 5-metilfurfural.

Determinaram-se também os valores de Z-score, que estão apresentados na tabela 3.15. Os valores deste parâmetro são todos inferiores a 1, concluindo-se que o método apresentou um desempenho satisfatório

Tabela 3.15 Resultados dos intervalos admissíveis pela OIV para avaliar a exatidão do método e valores de z-score obtidos para a análise do material de referência

Analito	Concentração ^{lab} (mg/L)	$\bar{x}_{ref} + EMA$	$\bar{x} + 2s$	$\bar{x} - 2S$	$\bar{x}_{ref} - EMA$	Z-score
Ácido gálico	4,19 ± 0,24	5,63	4,71	3,69	2,41	0,111
5-hidroximetilfurfural	12,108 ± 0,084	15,12	12,28	11,93	10,08	0,195
Furfural	3,64 ± 0,10	4,10	3,86	3,42	3,10	0,078
5-metilfurfural	0,102 ± 0,004	0,46	0,11	0,09	0,06	0,79
Ácido vanílico	0,705 ± 0,049	0,90	0,80	0,61	0,30	0,95
Ácido siríngico	1,050 ± 0,058	1,43	1,17	0,94	0,61	0,083
Siringaldeído	1,767 ± 0,030	2,34	1,83	1,71	1,00	0,15
Coniferaldeído	0,307 ± 0,024	0,52	0,36	0,26	0,12	0,065
Sinapaldeído	0,349 ± 0,014	0,57	0,38	0,32	0,17	0,11

\bar{x}_{ref} : Valor de referência; EMA: valor máximo admissível; x: valor do laboratório; s: desvio padrão; ER: erro relativo

Foram ainda utilizadas neste estudo amostras de bebidas espirituosas existentes no IVDP, I.P. e provenientes de circuitos interlaboratoriais para análise de outros métodos. Analisaram-se cinco amostras distintas cuja matrizes variaram entre um armagnac, um Gin, um brandy, um whisky e uma aguardente. O procedimento utilizado consistiu em análises em duplicado sob condições de precisão intermédia (n=5). Nestas amostras foi apenas quantificado o furfural, uma vez que era o único analito que possuía uma concentração de referência.

Na tabela 3.16 estão apresentados os resultados do laboratório, o valor de referência enviado pela entidade organizadora, e os desvios padrões respetivos. É apresentado também o erro relativo assim como o intervalo de valores admissível. O número de participantes neste ensaio variou entre 9-16 laboratórios.

Tabela 3.16 Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método de análise de furfural, com base em ensaios interlaboratoriais realizados com diferentes matrizes.

Matriz	Concentração ^{lab} (mg/L)	\bar{x}_{ref} (mg/L)	ER (%)	$\bar{x}_{ref} + EMA$	$x + 2S$	$x - 2S$	$\bar{x}_{ref} - EMA$	Z-score
Armagnac	0,692 ± 0,012	0,67 ± 0,10	3,28	1,17	0,72	0,67	0,17	0,044
Gin	0,11960 ± 0,00084	0,00	-	0,50	0,12	0,12	-0,50	0,24
Brandy	1,501 ± 0,022	1,65 ± 0,15	9,03	2,15	1,54	1,46	1,15	0,29
Whisky	7,151 ± 0,040	7,55 ± 0,28	5,28	8,68	7,24	7,07	6,42	0,35
Aguardente	6,422 ± 0,023	6,27 ± 0,55	2,42	7,21	6,44	6,41	5,33	0,16

\bar{x}_{ref} : Valor de referência; EMA: valor máximo admissível; x= valor do laboratório; s = desvio padrão; ER: erro relativo

Consultando a tabela 3.16 verificamos que apenas um dos resultados apresenta um ER superior a 5 %, o que nos indica que os resultados são exatos, ou seja os valores experimentais são próximos dos valores de referência. Apenas o erro relativo da análise do furfural no Brandy ultrapassou os 5 %, no entanto, os valores encontram-se dentro do intervalo estipulado. Concluindo então que todos os ensaios interlaboratoriais deram resultados aceitáveis. Para verificar o desempenho do método foi também calculado o z-score (tabela 3.16), e os valores resultantes apontam um desempenho satisfatório em todas as análises.

3.2.7 Comparações de métodos

Uma vez que no IVDP, I.P. já existem métodos validados para a quantificação do 5-hidroximetilfurfural e do furfural, e estão atualmente implementados nos laboratórios de cromatografia líquida e cromatografia gasosa respetivamente, comparou-se os resultados obtidos para a análise de várias amostras pelo método em estudo e pelos métodos implementados.

3.2.7.1 Comparação de métodos para a quantificação do 5-hidroximetilfurfural

A determinação do 5-hidroximetilfurfural é feita por HPLC com detetor UV a 284nm uma coluna de fase reversa C18 *waters Spherisorb S10 ODS2* 4,6 x 250 mm. Em semelhança ao método desenvolvido neste trabalho, este método também utiliza um gradiente de eluição, com uma fase móvel constituída por água e metanol.

Foram analisadas 59 amostras (57 vinhos do Porto, um Mostatel e um armagnac) pelos dois métodos. No método desenvolvido as análises foram feitas em duplicado. No anexo B estão apresentados todos os resultados e respetivos desvios padrão.

Uma vez que se trata da comparação de dois métodos e as amostras utilizadas como amostras testes possuem concentração de analito diferentes utilizou-se o teste t para amostras emparelhadas (equação 12).

$$t_{cal} = \frac{|\bar{d}|}{s_d / \sqrt{n}}$$

Equação 12

Onde \bar{d} é a diferença das dos médias valores obtidas pelos dois métodos, s_d o desvio padrão das diferenças dos resultados de ambos os métodos e n o número de observações. O teste é aplicado para 95 % de confiança e $n-1$ graus de liberdade. Os valores de t calculado (t_{cal}) e tabelado estão descritos na tabela 3.17.

Tabela 3.17 Resultados do teste t-student para comparação dos métodos de quantificação do 5-hidroximetilfurfural, para uma probabilidade de 95% e $n-1$ graus de liberdade

	Valor obtido
t_{cal}	1,98
$t(58,0.05,bilateral)$	2,00
$t_{cal} < t(0.05;58)$	

Como o valor de t calculado é inferior ao valor de t crítico, pode-se concluir que não há diferenças significativas entre os resultados produzidos pelos 2 métodos, para este nível de confiança.

Os resultados obtidos pelos dois métodos podem ser comparados representando graficamente as concentrações de 5-hidroximetilfurfural obtidas pelo novo método em função da sua concentração determinada pelo método já implementado no IVDP (figura 3.9). Graficamente observa-se que os resultados obtidos pelos dois métodos parecem ser equivalentes, apresentando a reta traçada um coeficiente de determinação de 0,997 e ainda um declive de aproximadamente 1 como se pode observar na figura 3.9, indicando-nos assim que existe uma proporcionalidade direta entre os dois métodos. No entanto se tivermos em atenção o valor da ordenada na origem verificamos que é ligeiramente superior a 0, por essa razão concluímos que o método desenvolvido fornece respostas ligeiramente superiores quando comparado com as repostas do método já implementado pelo laboratório.

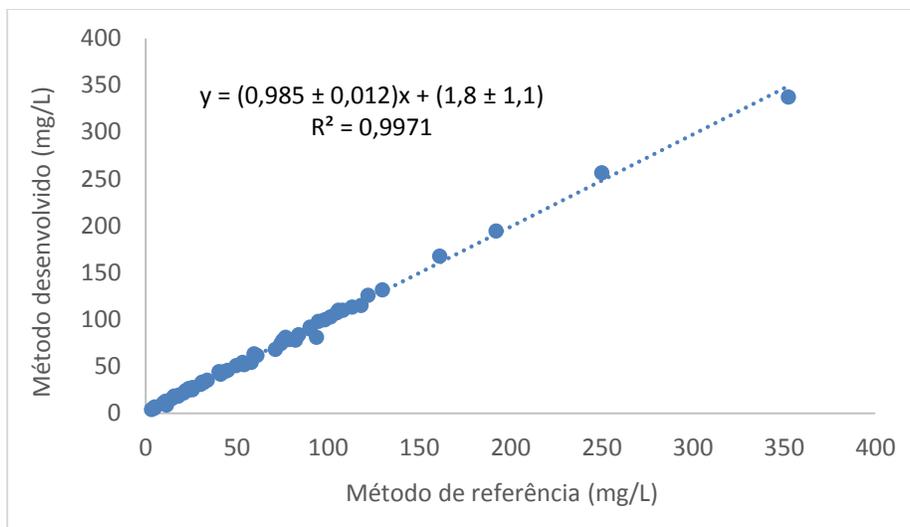


Figura 3.9 Representação gráfica dos resultados de 5-hidroxiacetilfurfural obtidos pelo método desenvolvido (HPLC-Agilant 1200) em função dos resultados obtidos com o método já implementado no IVDP (HPLC-Gilson)

3.2.7.2 Comparação de métodos para a quantificação do furfural

A determinação do furfural no IVDP, I.P. é feita por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama, usando uma coluna CP-Wax 57CB 50 m x 0,25 mm de diâmetro interno. Quando é utilizado este método, no caso de a amostra ser corada terá de ser sujeita a uma destilação antes de ser injetada no cromatógrafo.

Para a comparação dos métodos para a quantificação do furfural o procedimento foi idêntico ao já descrito para o 5-hidroxiacetilfurfural. Neste caso foram analisadas 48 amostras (aguardentes e bebidas espirituosas) pelos dois métodos.

A partir da equação 12 foi calculado o parâmetro t (t_{cal}) para amostras emparelhadas, os resultados encontram-se representados na tabela 3.18.

Tabela 3.18 Resultados do teste t-student para comparação dos métodos de quantificação do furfural para uma probabilidade de 95% e n-1 graus de liberdade

	Valor obtido
t_{cal}	1,22
$t(47;0,05,bilateral)$	2,01
$t_{cal} < t(47; 0,05)$	

Como o valor de $t_{\text{calculado}}$ é inferior ao $t_{\text{crítico}}$ conclui-se que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos com os dois métodos de análise.

Na figura 3.10 está apresentado graficamente os resultados obtidos pelo novo método em função dos resultados obtidos pelo método implementado. Com base na representação obtida é possível observar que há uma maior dispersão dos valores, e isso reflete-se no coeficiente de determinação ($r^2=0,93$). Apesar disso, o valor do declive é 1 e a ordenada na origem passa no ponto (0;0) indicando que os dois métodos conduzem a resultados equivalentes.

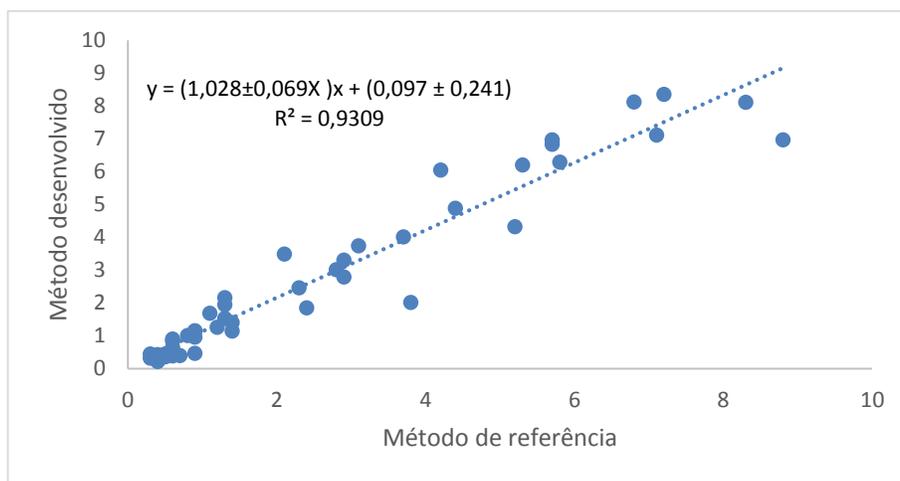


Figura 3.10 Representação gráfica dos resultados de furfural obtidos pelo método desenvolvido (HPLC-Agilant 1200) em função dos resultados obtidos com o método já implementado no IVDP, I.P. (GC)

3.2.8 Controlo de qualidade

As cartas de controlo são frequentemente usadas para controlo de qualidade dos resultados, uma vez que o método não é traçada uma curva de calibração todas as vezes que se analisam novas amostras. Esta ferramenta serve para averiguar se existem anomalias que exijam revisão da curva de calibração, ou de outro parâmetro, que possa estar a influenciar os resultados.

As cartas de controlo foram construídas utilizando dois níveis de concentração, o padrão limite de quantificação (PlimQ), e o padrão de concentração mais elevada (P5v), cujo nome atribuído foi padrões de verificação (ver capítulo 2). Foi determinada a concentração dos padrões

de verificação para cada analito, em duplicado durante um curto intervalo de tempo (n=38), calculando posteriormente a média dos resultados e o respetivo desvio padrão. Ambos os limites (aviso e controlo) foram calculados utilizados as equações 13 e 14 respetivamente.

$$\text{Limite de Aviso Superior} = \bar{x} \pm 5 \% \bar{x}$$

Equação 13

$$\text{Limite de Controlo Superior} = \bar{x} \pm 10 \% \bar{x}$$

Equação 14

No início de cada análise, utilizou-se sempre o padrão limite de quantificação, e no final da análise o padrão de concentração mais elevada, de forma a verificar a validade da curva de calibração durante toda a análise. Os resultados obtidos para estes dois padrões são inseridos na carta de controlo, de maneira a verificar se o processo está sobre controlo, ou seja se estão dentro dos valores pretendidos.

Serão apresentadas neste capítulo, a título de exemplo, apenas as cartas de controlo do padrão 5-hidroximetilfurfural (figura 3.11). As restantes cartas de controlos encontram-se reunidas no anexo C.

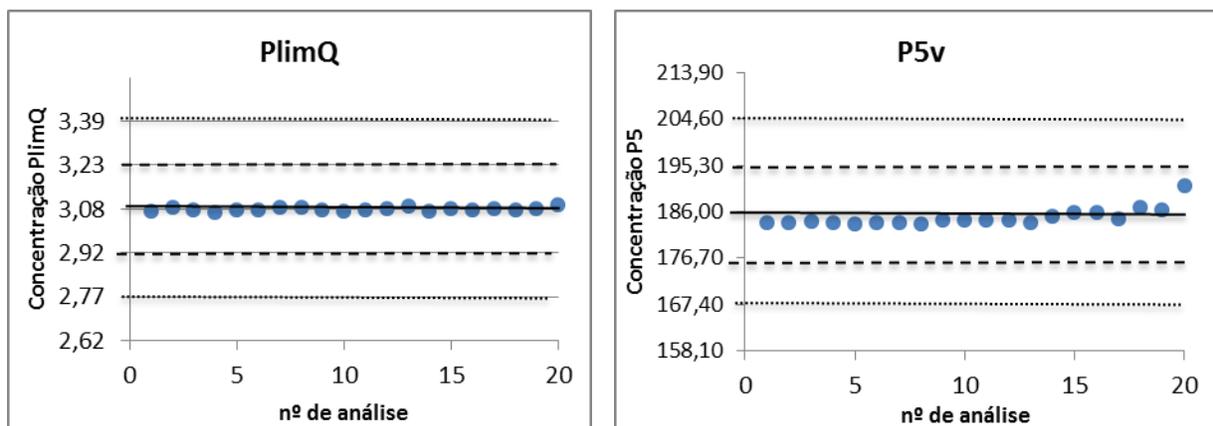


Figura 3.11 Cartas de controlo relativa à análise dos padrões extremos do composto 5-hidroximetilfurfural.

Com base na figura 3.11 é possível verificar que nenhum dos resultados ultrapassou os 10 % para ambos os padrões, indicando-nos que durante as 20 análises realizadas em dias diferentes, os padrões do 5-hidroximetilfurfural mantiveram-se estáveis. Para cartas obtidas com os resultados da análise dos outros analitos verifica-se que, para maior parte dos analitos, não

existem anomalias, concluindo-se que os padrões de verificação assim como a reta de calibração apresentam estabilidade. O mesmo não aconteceu na carta de controlo do padrão de concentração mais baixa do ácido gálico que aparenta degradar-se com o tempo, implicando a utilização de um vial com solução fresca em cada sequência de trabalho.

3.2.9 Cálculo de Incertezas

Um resultado de uma medida não tem significado se não estiver associado a uma incerteza. As incertezas de medição podem ter contribuições do instrumento de medição, do ambiente de análise, do operador, e de outras fontes. Tais incertezas podem ser estimadas usando a análise estatística de um conjunto de medições. Para o presente estudo optou-se por usar os valores de desvio padrão pertencentes às avaliações da precisão intermédia, desta maneira contabilizou-se incertezas para diferentes gamas de concentração e diferentes matrizes. Encontram-se demonstrados na tabela 3.19 as incertezas associadas às análises dos diferentes analitos, em percentagem. No anexo D encontram-se as equações usadas nesta determinação, assim como um exemplo de cálculo.

Tabela 3.19 Estimativas de incertezas calculadas para os 10 compostos em análise

Analito	Incertezas associadas (%)
Ácido gálico	±13
5-hidroximetilfurfural	±13
Furfural	±15
Ácido vanílico	±15
5-metilfurfural	±14
Ácido siríngico	±14
Siringaldeído	±17
Ácido ferúlico	±13
Coniferaldeído	±13
Sinapaldeído	±15

3.3 Análise de amostras reais

Após o método analítico ter sido validado procedeu-se à determinação dos analitos de interesse nas amostras de vinho, aguardentes e bebidas espirituosas. Foram analisadas um total de 390 amostras (178 vinhos do Porto, 140 vinhos do Douro e 72 bebidas espirituosas/aguardentes) de acordo com o procedimento analítico descrito no capítulo 2.

Nas figuras seguintes, 3.12 e 3.13, estão apresentados exemplos dos cromatogramas obtidos durante as análises. Como exemplo, foi selecionado um cromatograma do Vinho do Porto 30 anos e um *Whisky*. É possível verificar que existem diferenças no aspeto dos dois cromatogramas, sendo que o cromatograma que apresenta menos picos corresponde ao *Whisky* (figura 3.12), como seria de esperar, uma vez que o *Whisky* é produzido a partir de uma destilação⁵. Por outro lado, nos cromatogramas obtidos quando se analisa amostras de vinho do Porto verifica-se uma maior complexidade na matriz (figura 3.13).

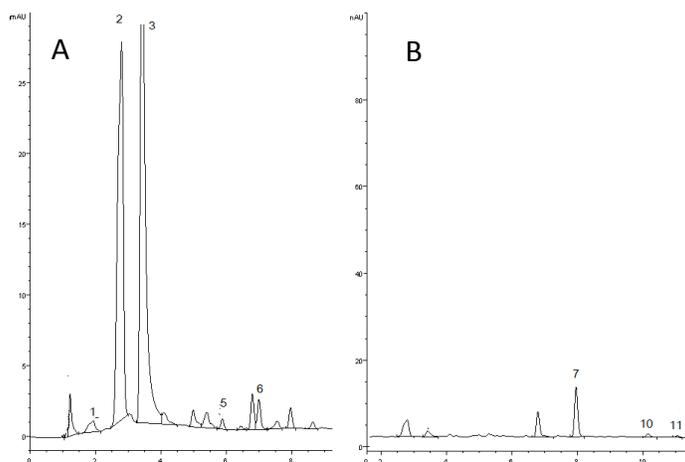


Figura 3.12 Cromatograma obtido da análise por HPLC de uma amostra de *whisky* A) 280nm B) 320 nm (condições utilizadas descritas na tabela 3.1 e 3.2). 1-ácido gálico; 2- 5-hidroximetilfurfural; 3- furfural; 5- ácido vanílico; 6- ácido síringico; 7- siringaldeído; 10-coniferaldeído; 11-sinapaldeído

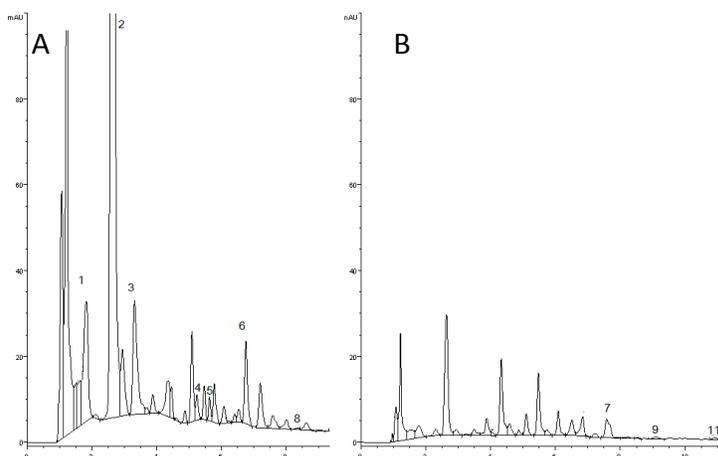


Figura 3.13 Cromatograma obtido da análise por HPLC de uma amostra de vinho do Porto Tawny com 30 anos A) 280nm B) 320 nm (condições utilizadas descritas na tabela 3.1 e 3.2). 1-ácido gálico; 2- 5-hidroximetilfurfural; 3- furfural; 4- 5-metilfufural; 5- ácido vanílico; 6- ácido síringico; 7- siringaldeído; 9-ácido ferúlico;

De acordo com o procedimento previamente descrito, cada amostra foi analisada em replicado e o valor da concentração foi o resultado da média dos dois valores obtidos.

Foram analisadas 4 bebidas espirituosas distintas e para facilitar a análise fez-se a soma dos resultados obtidos agrupando os analitos por classes (ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos). O gráfico apresentado na figura 3.14, pretende mostrar a variação dos 3 grupos de compostos em diferentes bebidas.

Verificou-se que o *Gin* não foi determinado qualquer valor de concentração de nenhum dos analitos, este resultado já era de esperar uma vez que se trata de uma bebida destilada não envelhecida em madeira. Nas restantes bebidas é notório que os teores de aldeídos furânicos são bastantes superiores aos teores de ácidos e aldeídos fenólicos. Uma vez que os aldeídos furânicos provêm da degradação da celulose e da hemicelulose, devido ao tratamento térmico, e sendo estes os componentes maioritários na madeira é normal que os teores destes compostos sejam elevados, comparativamente aos outros. Além disso, é permitido por lei a adição de caramelo nas bebidas com o objetivo de ajustar a cor, tendo como consequência o aumento do teor de 5-hidroximetilfurfural e do 5-metilfurfural⁵. No caso do *Whisky* e *Cognac* os teores de ácidos e aldeídos fenólicos são bastante idênticos, já no caso do *Brandy* e *Armagnac* as concentrações de ácidos fenólicos são mais elevadas. Estas diferenças podem ser causadas pela variabilidade das concentrações dos compostos extraíveis, uma vez que o sistema de

envelhecimento³⁰, a espécie botânica⁹² e a origem geográfica¹⁴ da madeira são fatores bastante importante.



Figura 3.14: Valores de concentração em mg/L das diferentes classes de compostos nas diferentes bebidas espirituosas analisadas.

3.4 Resultados estatísticos

Foram analisadas diversas amostras de vinho do Porto e vinho do Douro de maneira a caracterizar estes vinhos face aos teores de ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos. Este trabalho tem como objetivo, para além da caracterização dos diferentes tipos de vinho, avaliar se existe uma correlação significativa entre os teores destes compostos na composição dos vinhos do Porto e o tempo de estágio em madeira. Procedeu-se do mesmo modo para os vinhos do Douro, no entanto neste caso apenas se considerou se os vinhos tinham estado ou não em contacto com madeira.

A realização deste estudo resultou do facto de não existirem na literatura estudos tão específicos em relação aos vinhos do Porto e Douro.

3.4.1 Vinho do Porto

3.4.1.1 Análise Univariada

O estudo foi iniciado com a realização de uma análise univariada, isto é, cada variável (composto) foi analisada de forma individual e de uma forma descritiva (tendo sido determinados

mínimos; máximos; média etc.). Foram utilizadas 155 amostras de vinho do Porto que foram agrupadas em diferentes categorias para o estudo. Na tabela 3.20 encontram-se as categorias definidas, assim como, as frequências para cada categoria.

Tabela 3.20 Frequências de cada categoria de vinhos do Porto utilizadas no estudo estatístico

Categoria	Indicação de idade	Colheita	Tawny	LBV	Ruby	Vintage
Frequência	48	22	20	20	20	25

Numa primeira fase todos os valores de concentração obtidos, para um dado composto, foram tratados sem especificar qual a categoria do vinho. Foram traçados os histogramas da distribuição das concentrações dos compostos analisados, assim como os diagramas de extremos e quartis.

As variáveis tomaram valores em conjuntos muito diferentes e por consequência as medidas descritivas de localização e dispersão são, também, muito diferentes. No entanto, e quanto à forma, a distribuição das variáveis é assimétrica positiva (mais ou menos vincada), o que significa que a média é superior à mediana em todos os casos. De facto, todas as variáveis têm observações “outliers” à direita, ou seja, valores elevados “anormais”, como veremos adiante..

Na figura 3.15 são apresentados os histogramas e os diagramas de extremos e quartis obtidos para os 3 aldeídos furânicos, 5-hidroximetilfurfural, furfural e 5-metilfurfural. Para estes compostos, os gráficos das distribuições de valores apresentam, mais ao menos, o mesmo aspeto (fig.3.15 A). Com o auxílio dos diagramas de extremos e quartis (figura 3.15 B) é possível visualizar que existem “outliers”, alguns deles severos, que afetam os resultados médios. No caso do 5-hidroximetilfurfural, os três valores “outliers” (figura 3.15 B) pertencem a vinhos com mais de 40 anos de idade. Acontecendo o mesmo para o furfural e para o 5-metilfurfural. Estes resultados vão de encontro a estudos já realizados, confirmando que vinhos com mais idade têm maior concentração de aldeídos furânicos^{59,112,113}.

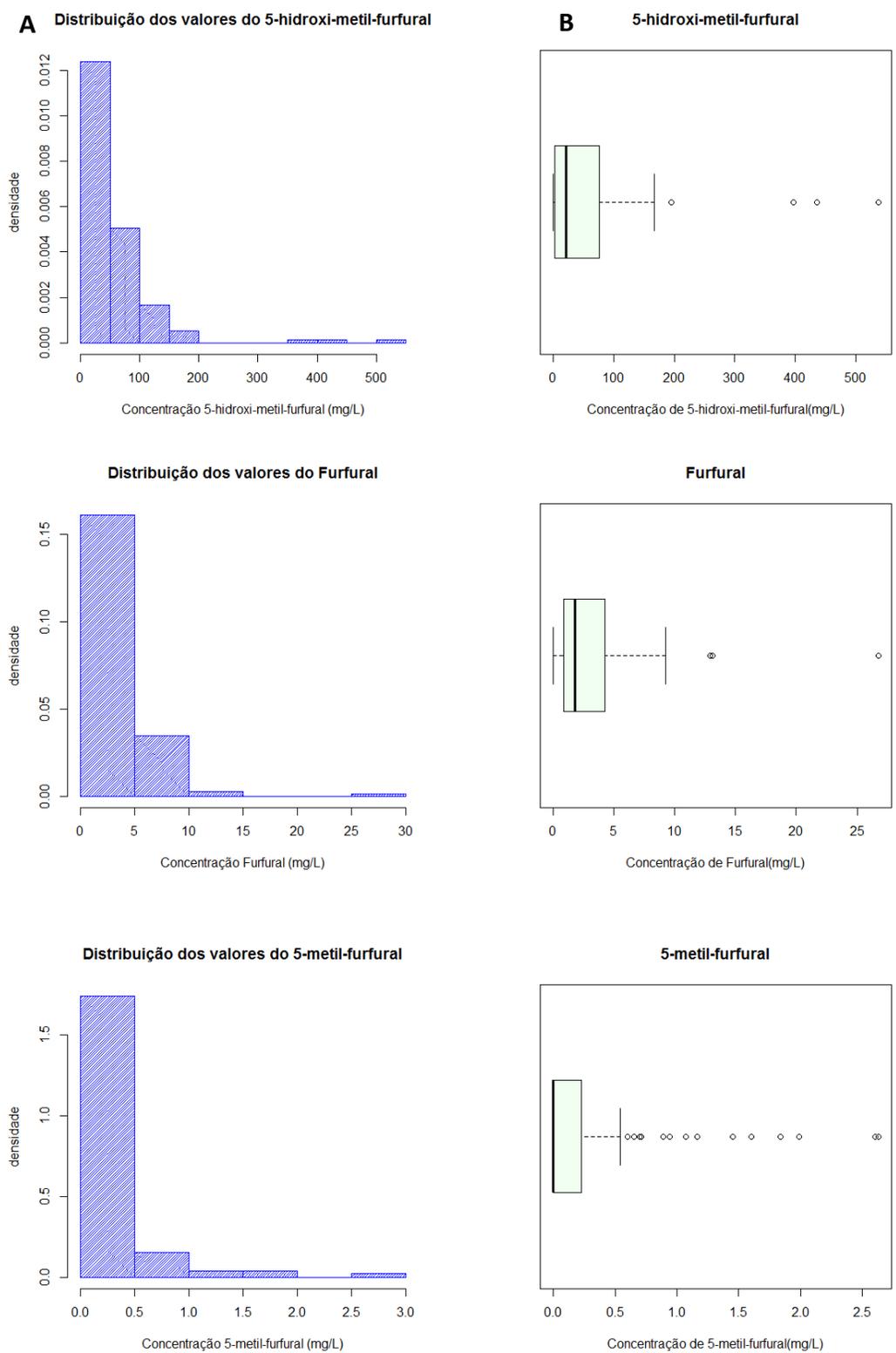


Figura 3.15: Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os aldeídos furânicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.

Na tabela 3.21 encontra-se descrito o resumo dos dados estatísticos obtidos para estes três compostos. O 5-hidroximetilfurfural apresenta um desvio padrão de 72,6 mg/L, e o valor mediano está muito abaixo do valor médio. O furfural apresenta uma média de 2,85 mg/L, com desvio padrão 3,19 mg/L. O 5-metilfurfural apresenta uma média de 0,21 mg/L e uma mediana de 0,0 mg/L. Os vinhos têm valores residuais deste composto e muitas observações indicadas com valor de 0 mg/L são certamente relativas a valores tão baixos que o equipamento não tem sensibilidade para medir, uma vez que o Ldd obtido para o 5-metilfurfural é de 0,55 mg/L. Apenas 25 % dos vinhos apresentam concentrações deste composto superiores ou iguais a 0,23 mg/L. Estes resultados estão de acordo com os resultados relatados por J.S. Câmara e colaboradores^{43,59}, em que vários vinhos apresentam valores de 5-metilfurfural abaixo do Ldd.

Tabela 3.21: Tabela resumo dos dados estatísticos obtidos para os aldeídos furânicos (mg/L)

<i>Todos os estilos de vinho do Porto</i>						
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
5-hidroximetilfurfural	0,0	2,7	20,4	47,7	75,7	537,7
Furfural	0,0	0,8	1,8	2,8	4,2	26,8
5-metilfurfural	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	2,6

Foi efetuado um tratamento estatístico idêntico para os teores de ácidos fenólicos e os gráficos obtidos são apresentados na figura 3.16 e o resumo dos dados estatísticos na tabela 3.22.

Com base nos gráficos, da figura 3.16, verifica-se que os resultados para o ácido gálico revelaram uma maior densidade entre 10 e 20 mg/L comparativamente a outros intervalos de concentração. Quanto aos “outliers” severos foram encontrados cinco vinhos para os quais os teores de ácido gálico se afastam bastante dos restantes. Os vinhos correspondentes a esses valores foram, mais uma vez, vinhos com indicação de idade (+ 40 anos, 20 anos, 30 anos e 40 anos). Os valores de concentração de ácido vanílico nos vinhos apresentam dois “outliers” severos, que correspondem a vinhos com indicação de idade. O ácido siríngico não apresentou “outliers” severos sendo a distribuição de valores simétrica. Por último, o ácido ferúlico apresentou dois valores “outliers”, no entanto estes valores de concentração não pertencem a vinhos que tenham mantido contacto durante vários anos com a madeira.

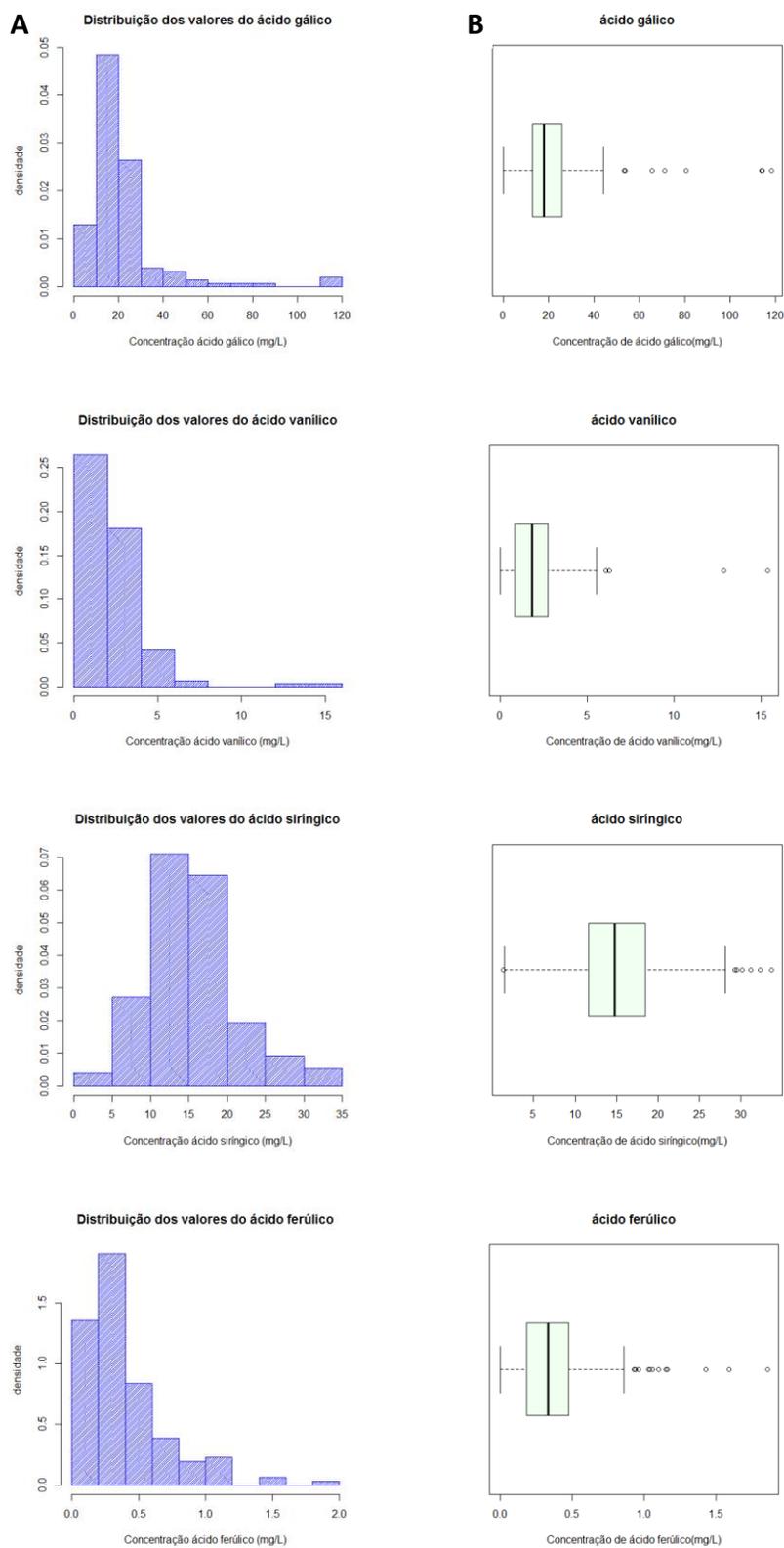


Figura 3.16 Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os ácidos fenólicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.

Tabela 3.22: Tabela resumo dados estatísticos obtidos para os dos ácidos fenólicos (mg/L)

	<i>Todos os estilos de vinho do Porto</i>					
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
Ácido gálico	0,0	13,0	18,0	21,9	25,7	118,4
Ácido vanílico	0,0	0,8	1,8	2,1	2,7	15,4
Ácido siríntrico	1,4	11,6	14,8	15,3	18,5	33,7
Ácido ferúlico	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	1,9

Os gráficos apresentados na figura 3.17, dizem respeito aos resultados obtidos para o tratamento estatístico dos dados relativos aos aldeídos fenólicos. Na tabela 3.23 está descrito o resumo dos dados estatísticos para estes aldeídos. Verifica-se que o siringaldeído apresentou apenas um “outlier” severo, que pertence a um vinho do Porto Ruby. O coniferaldeído apresentou valores muito baixos, e 25 % dos vinhos analisados não apresentam valores de concentração para este composto. O sinapaldeído é também um composto que apresentou valores de concentração muito baixos, com uma média de 0,07 mg/L e uma mediana 0 mg/L, não tendo sido detetado em 75 % dos vinhos analisados. Os “outliers” severos apresentados pelo coniferaldeído e pelo sinapaldeído não surgem apenas numa categoria de Vinho do Porto, sugerindo que a presença destes dois compostos no vinho do Porto não está correlacionada com o tempo de envelhecimento.

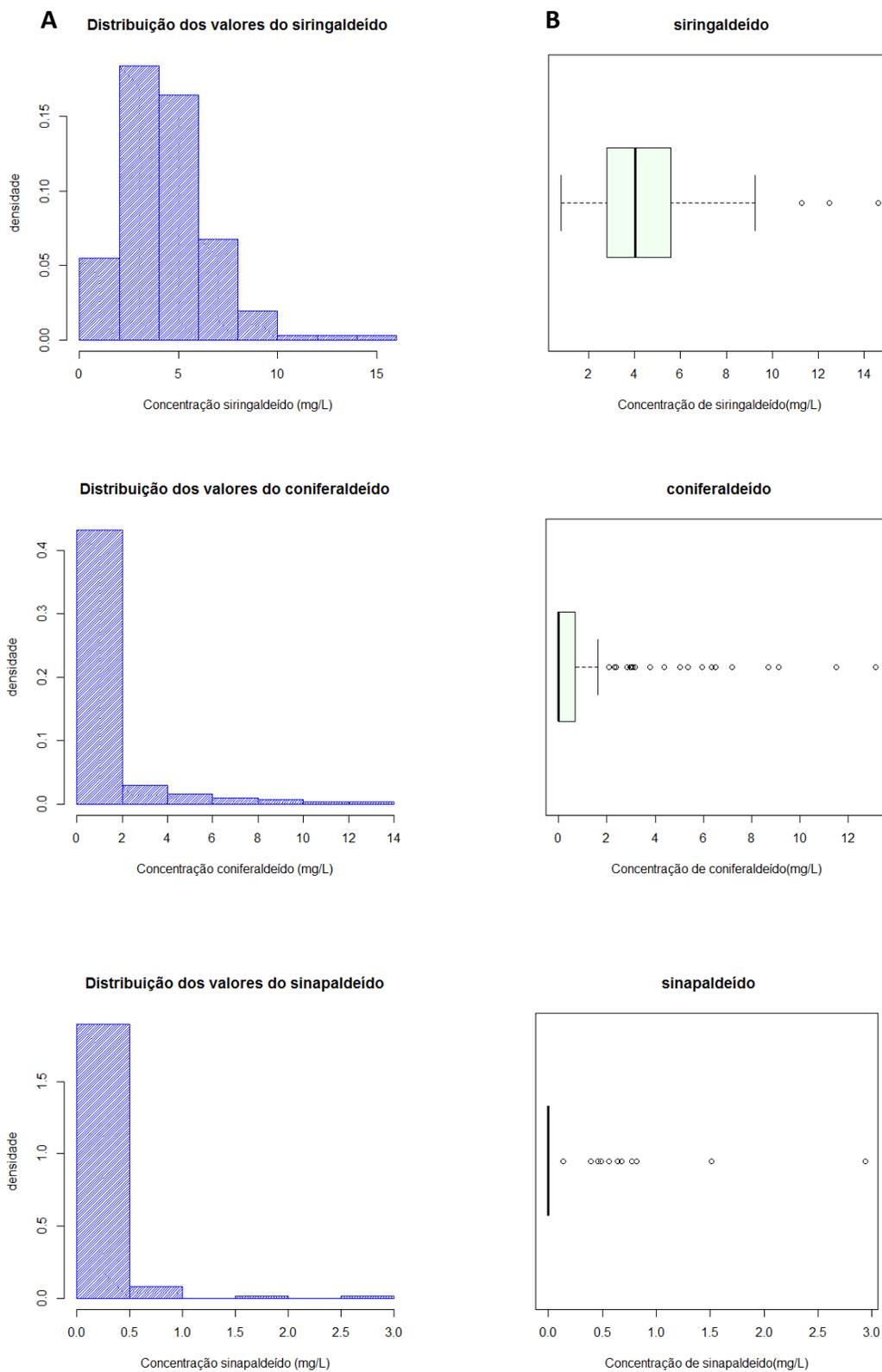


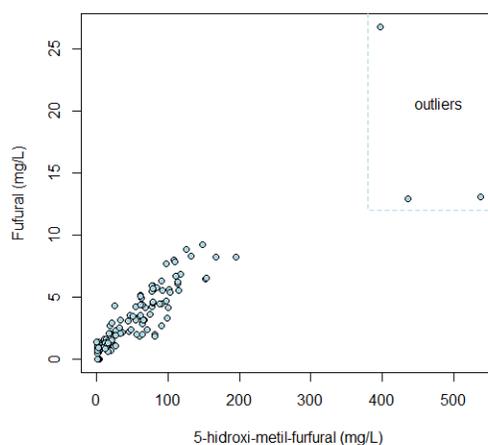
Figura 3.17 Histograma da distribuição das concentrações (A); e diagramas de extremos e quartis (B) para os aldeídos fenólicos nas diferentes amostras de Vinho do Porto.

Tabela 3.23 Tabela resumo dos dados estatísticos obtidos para os dos aldeídos fenólicos (mg/L)

<i>Todos os estilos de vinho do Porto</i>						
	Min	1º Quartil	Mediana	Média	3º Quartil	Max
Siringaldeído	0,8	2,8	4,0	4,4	5,6	14,6
Coniferaldeído	0,0	0,0	0,0	1,0	0,7	13,2
Sinapaldeído	0,0	0,0	0,0	0,07	0,0	2,9

3.4.1.2 Análise Bivariada: Relação entre as variáveis

Posteriormente estudou-se a relação entre os diversos compostos, tendo-se verificado que estes atributos se encontram mais ou menos relacionados dois a dois. Os compostos 5-hidroximetilfurfural e furfural são os que apresentam uma maior correlação linear positiva entre si, como se pode ver no gráfico apresentado na figura 3.18. Este resultado pode estar relacionado com o facto de estes dois aldeídos furânicos se formarem em condições muito semelhantes¹¹². O aumento da concentração de 5-hidroximetilfurfural é acompanhado pelo aumento da concentração de furfural. Para esta associação obteve-se um coeficiente de correlação de 0,88. O mesmo comportamento foi observado por J. S. Câmara e colaboradores⁵⁹ em vinhos da Madeira.

**Figura 3.18** Correlação entre a concentração de 5-hidroximetilfurfural e furfural (mg/L) em vinhos do Porto

3.4.1.3 Comportamento dos compostos nos diferentes grupos de vinhos

Para além da caracterização das diferentes categorias, este trabalho tem como objetivo avaliar se existe uma correlação significativa entre os vinhos que estagiaram mais tempo em madeira, e aqueles que no máximo estagiaram seis anos. Para isso subdividiu-se as amostras de vinho do Porto em três grupos:

Grupo 1 (g1)- Neste grupo estão inseridos os vinhos do Porto de categoria Tawny com indicação de idade, mas que sofreram um processo de envelhecimento em madeira durante pelo menos 10 anos, dando origem aos diferentes conjuntos de vinhos, designados por: 10 anos, 20 anos, 30 anos, 40 anos e mais de (+) 40 anos.

Grupo 2 (g2)- Neste grupo estão agrupados 20 vinhos da categoria colheita, o que significa que estiveram pelo menos sete anos em contacto com a madeira. O vinho mais velho analisado foi uma colheita de 1950 e o mais recente uma colheita de 2007.

Grupo 3 (g3) - Neste grupo estão os vinhos mais jovens, que estiveram menos tempo em recipientes de madeira incluindo os vinhos LBV, Vintage, Rubys e alguns Tawny's (que permaneceram menos tempo, ou seja menos de 10 anos, em contacto com madeira quando comparados aos Tawny's do grupo 1).

Foram construídos diagramas de extremos e quartis para os diferentes grupos. Na figura 3.19 estão apresentados os diagramas obtidos para os aldeídos furânicos. Visualmente verifica-se que o grupo 3 apresenta valores inferiores aos restantes grupos. Para confirmação, foi efetuado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, verificando-se que há diferenças significativas entre as medianas dos diferentes grupos. Foi obtido um *p-value* de $2,2 \times 10^{-16}$ para o 5-hidroximetilfurfural e para o furfural. Sempre que se obtém um *p-value* inferior a 5 % pode-se rejeitar a hipótese nula, por outras palavras, e para este caso concreto, sempre que o *p-value* for inferior a 5 % existem evidências de que hajam diferenças significativas entre os valores medianos de cada composto para os diferentes grupos de vinhos. O mesmo acontece com o 5-metilfurfural, aplicando o mesmo teste obteve-se um *p-value* de $1,1 \times 10^{-5}$.

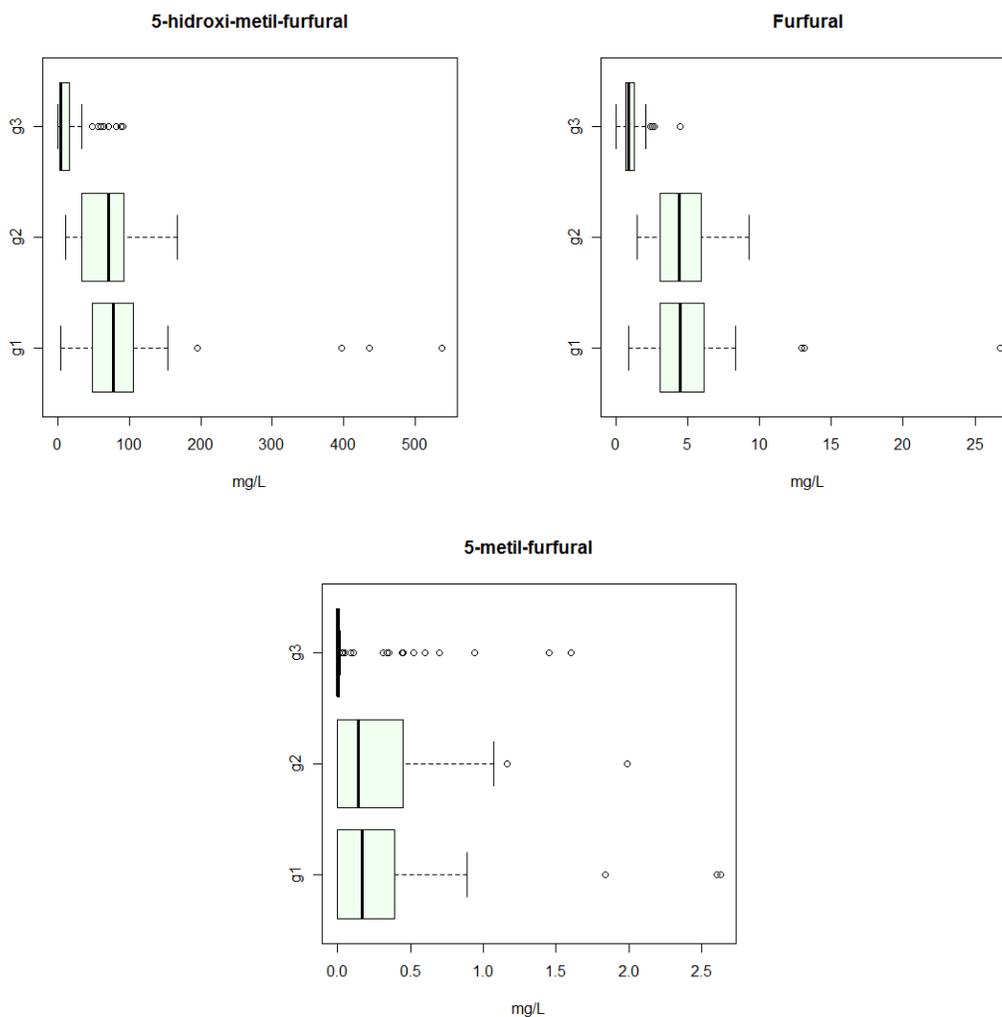


Figura 3.19: Diagramas de extremos e quartis para comparar os três grupos de vinhos do Porto em relação aos aldeídos furânicos (mg/L)

Na figura 3.20 estão apresentados os diagramas obtidos para o ácido vanílico, o siringaldeído e ácido siríngico. Verifica-se que o ácido vanílico e o siringaldeído comportam-se de forma idêntica aos aldeídos furânicos. Ambos os compostos apresentam valores medianos inferiores para o grupo 3, apresentando um *p-value* de $2,9 \times 10^{-9}$ para o ácido vanílico, um *p-value* de $1,1 \times 10^{-2}$ para o siringaldeído, quando foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Pelo contrário, o ácido siríngico apresenta valores mais baixos no grupo 1, distinguindo-se dos outros grupos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis resultou um *p-value* de $1,8 \times 10^{-2}$. No entanto é possível ver através do gráfico da figura 3.20 que, para o ácido siríngico, o grupo 3 apresenta valores muito dispersos.

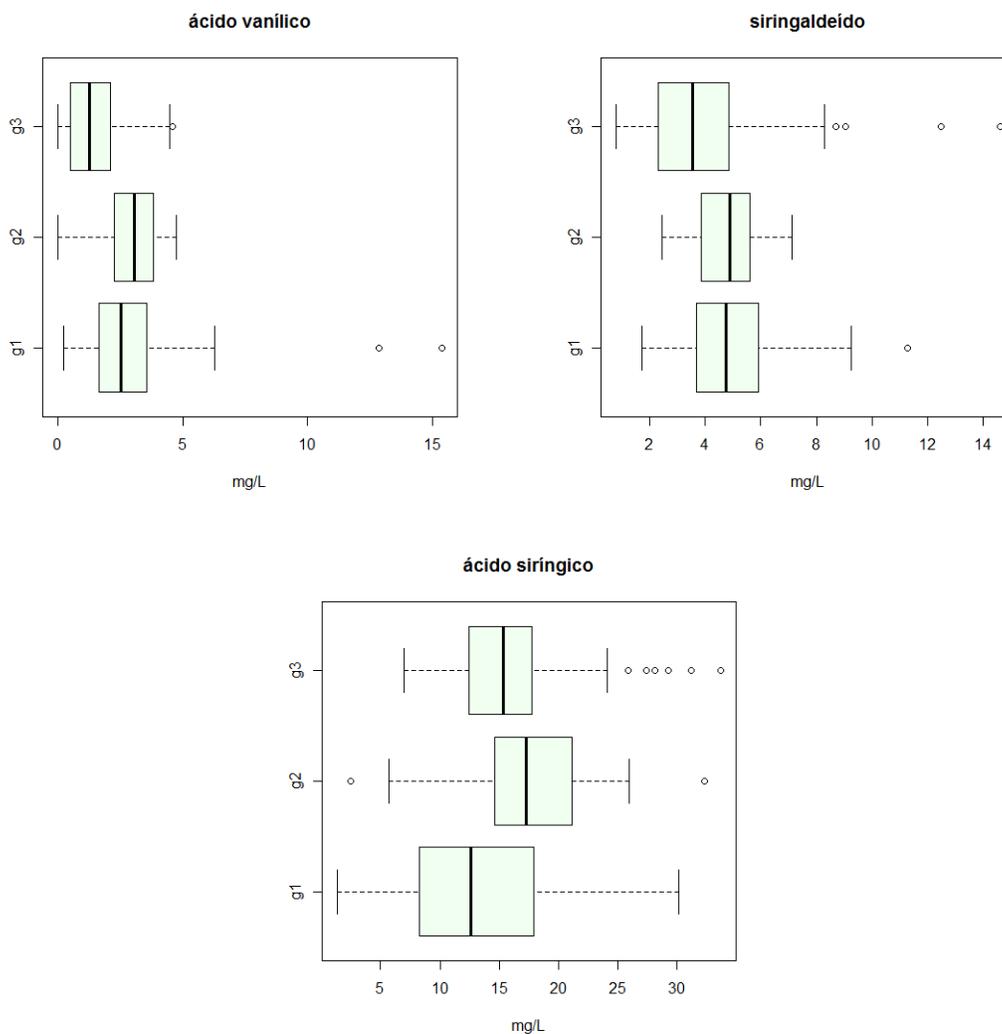


Figura 3.20 Diagramas de extremos e quartis para comparar os três grupos de vinhos em relação ao ácido vanílico, siringaldeído e ácido siríngico.

Foi feito o mesmo tratamento para o ácido ferúlico, o coniferaldeído, o sinapaldeído e o ácido gálico estando os diagramas obtidos apresentados no anexo E. Verifica-se que os três primeiros compostos apresentam grande dispersão no grupo 3, mas as distribuições são idênticas nos 3 grupos. O ácido gálico também apresenta valores medianos idênticos. Através da análise dos dados destes compostos não se conseguem distinguir os grupos.

Em resumo, os grupos 1 e 2 só se distinguem relativamente ao composto ácido siríngico, apresentando valores inferiores de concentração para o grupo 1, e concentrações idênticas no grupo 2 e 3. O grupo 3 distingue-se dos restantes dois grupos com base nos compostos, 5-hidroximetilfurfural, furfural e 5-metilfurfural, apresentando uma distribuição diferente, com

valores medianos mais baixos. Para o ácido vanílico e o siringaldeído, os valores medianos são tendencialmente mais baixos no grupo 3.

Com base nestes resultados e de maneira a caracterizar os diferentes estilos de vinho, decidiu-se estudar individualmente cada um dos grupos anteriormente formados.

- **Grupo 1 (indicação de idade)**

Nas seguintes tabelas, 3.24, 3.25 e 3.26 estão apresentados os valores mínimos e máximos dos diferentes compostos encontrados nos 43 vinhos da categoria indicação de idade, assim como a média, e o desvio padrão.(SD)

Tabela 3.24 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com indicação de idade 10 e 20 anos, mg/L.

	10 Anos				20 Anos			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	10,3	27,7	18,8	5,6	0,0	71,2	23,0	19,1
5-hidroximetilfurfural	8,9	63,5	37,3	19,4	20,5	98,1	60,5	25,7
Furfural	1,3	5,1	2,8	1,2	2,3	5,9	3,9	1,2
5-metilfurfural	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1
Ácido vanílico	0,3	6,1	2,4	1,5	0,2	4,3	2,4	1,2
Ácido siringico	1,4	21,9	9,7	6,2	6,5	19,9	12,7	4,8
Siringaldeído	1,7	7,7	3,9	1,8	2,4	7,1	4,5	1,6
Ácido ferúlico	0,0	0,5	0,3	0,1	0,1	1,6	0,4	0,4
Coniferaldeído	0,0	1,1	0,4	0,4	0,0	1,0	0,2	0,4
Sinapaldeído	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1	0,2

Tabela 3.25 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com indicação de idade 30 e 40 anos, mg/L.

	30 Anos				40 Anos			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	0,0	80,7	23,1	24,4	0,0	113,9	31,0	34,5
5-hidroximetilfurfural	54,3	194,4	105,8	46,0	78,8	153,0	111,6	22,6
Furfural	4,2	8,2	5,8	1,5	4,5	8,3	6,4	1,2
5-metilfurfural	0,1	0,9	0,3	0,3	0,1	0,7	0,4	0,2
Ácido vanílico	1,0	5,6	2,9	1,4	0,2	4,3	2,3	1,2
Ácido siríngico	11,3	29,5	15,2	6,2	6,0	19,4	13,0	4,9
Siringaldeído	3,7	11,3	6,1	2,6	2,6	7,4	4,9	1,5
Ácido ferúlico	0,1	0,6	0,3	0,1	0,0	0,5	0,2	0,2
Coniferaldeído	0,0	0,4	0,1	0,1	0,0	0,6	0,2	0,2
Sinapaldeído	0,0	2,9	0,4	1,0	0,0	1,5	0,2	0,5

Tabela 3.26 Resumo dos dados estatístico dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto com mais de 40 anos, mg/L.

	+ 40 Anos			
	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	0,0	114,4	30,5	43,6
5-hidroximetilfurfural	63,0	537,7	266,4	214,3
Furfural	2,9	26,8	10,8	9,0
5-metilfurfural	0,0	2,6	1,3	1,2
Ácido vanílico	2,0	15,4	6,9	5,8
Ácido siríngico	6,7	21,4	15,5	6,4
Siringaldeído	2,7	8,9	5,4	2,0
Ácido ferúlico	0,1	1,1	0,5	0,4
Coniferaldeído	0,0	0,7	0,2	0,3
Sinapaldeído	0,0	0,7	0,3	0,3

De forma, a comparar os vinhos do Porto de diferentes idades, em relação aos teores dos diferentes compostos, construiu-se diagramas de extremos e quartis. Para os aldeídos furânicos, o diagrama é apresentado na figura 3.21 e verifica-se que quanto mais velho é o vinho mais elevados foram os valores medianos obtidos para destes três compostos. Para confirmar esta afirmação, foi necessário a realização de testes de significância. Os *p-values* confirmaram que existem diferenças significativas entre os teores medianos destes três compostos nos vinhos analisados.

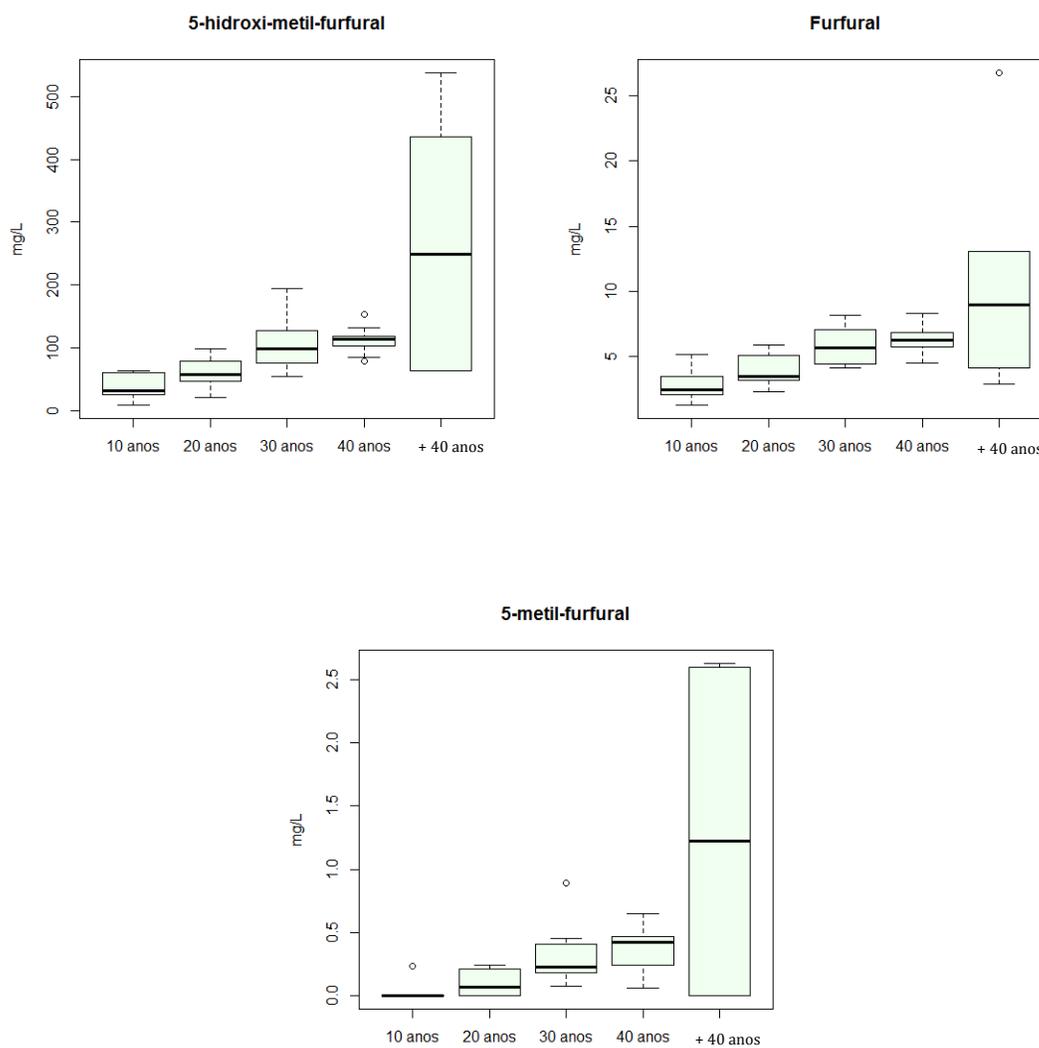


Figura 3.21 Comparação dos teores de aldeídos furânicos através de diagramas de extremos e quartis para vinhos do Porto com diferentes idades

Visualmente o diagrama obtido para o ácido siríngico, apresentado na figura 3.22, parece mostrar um aumento na mediana da concentração consoante a idade do vinho, no entanto quando se aplicou o teste estatístico (Wilcox test) verificou-se que não existem diferenças significativas nas medianas da concentração dos vinhos com 10 anos comparando com os vinhos com 40 anos (p -value 0,12), nem entre os vinhos indicados com 20 e 40 anos (p -value 0,18). Por isso, pode-se concluir que a concentração de ácido siríngico se mantém constante ao longo dos

anos para este tipo de vinho. Para os restantes compostos, verificou-se não existirem diferenças significativas entre as medianas da concentração para os diferentes vinhos analisados. Como exemplo, a figura 3.19 apresenta os diagramas obtidos para o ácido gálico, encontrando-se os restantes no anexo E, figuras XII e XIII.

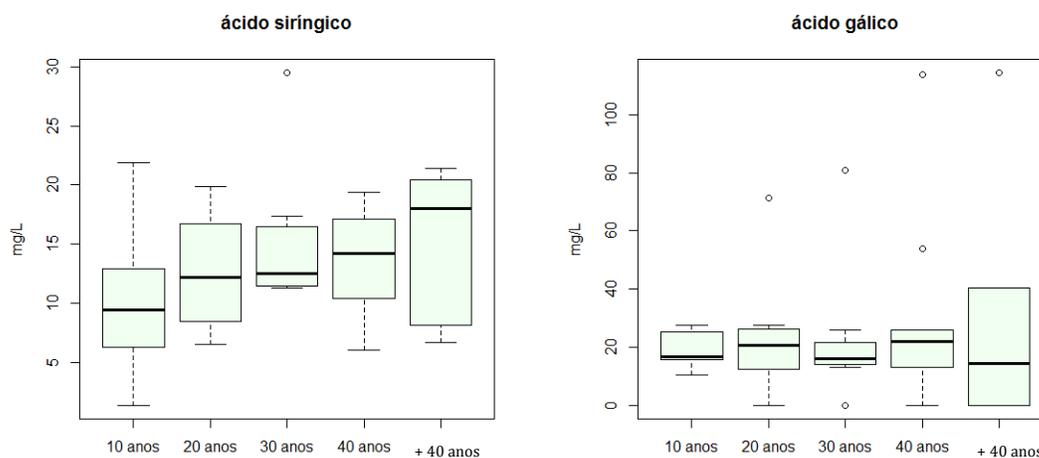


Figura 3.22 Comparação dos teores de ácido siríngico e ácido gálico através de diagramas de extremos e quartis para vinhos do Porto com diferentes idades

Em suma, apenas as medianas das concentrações dos aldeídos furânicos são distintas para esta categoria de vinhos. Através dos restantes compostos não se consegue diferenciar os diferentes vinhos. Um estudo¹⁰⁰ realizado em 1993 demonstrou que compostos fenólicos, tais como, o ácido gálico, o ácido siríngico e o ácido vanílico podem sofrer um aumento de concentração após o engarrafamento, devido à degradação de taninos. Este facto pode influenciar os resultados, e desta maneira não é possível verificar se o envelhecimento em madeira pode, ou não, estar a aumentar a concentração destes compostos no vinho.

- **Grupo 2 (colheita)**

Os resultados obtidos para os vinhos do grupo 2 foram tratados da mesma forma que os resultados do grupo 1. Na tabela 3.27 estão apresentados os valores mínimos e máximos dos

vários compostos quantificados nos 22 vinhos da categoria Colheita, assim como a média, e o desvio padrão (SD).

Tabela 3.27: Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto da categoria colheita, mg/L.

	<i>Colheita</i>				
	Min	Max	Média	Mediana	SD
Ácido gálico	0,0	64,5	20,5	20,3	15,5
5-hidroximetilfurfural	10,7	167,5	71,8	70,0	43,3
Furfural	1,5	9,23	4,56	4,37	2,3
5-metilfurfural	0,0	1,99	0,35	0,14	0,51
Ácido vanílico	0,0	4,73	2,75	3,05	1,41
Ácido siríngico	2,5	32,33	17,0	17,31	6,88
Siringaldeído	2,4	7,12	4,8	4,88	1,29
Ácido ferúlico	0,0	0,59	0,3	0,29	0,16
Coniferaldeído	0,0	1,25	0,2	0,035	0,38
Sinapaldeído	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Foram construídos gráficos da concentração de compostos fenólicos e os anos da colheita do vinho (apresentados na figura 3.23) de maneira a visualizar se há algum tipo de correlação entre estas grandezas. Este estudo foi realizado individualmente para cada composto. Apenas para o 5-hidroximetilfurfural e o furfural foi obtido algum nível de correlação entre o ano da colheita e os teores destes mesmos compostos nos vinhos. Os resultados evidenciaram que quanto mais “velho” é o vinho maior é a concentração destes compostos. Em relação ao 5-hidroximetilfurfural foi obtido um coeficiente de determinação de $r^2= 0,75$ e para o furfural o coeficiente de determinação foi de $r^2= 0,78$.

Para os outros analitos não foi obtida qualquer correlação entre a concentração e o ano da colheita.

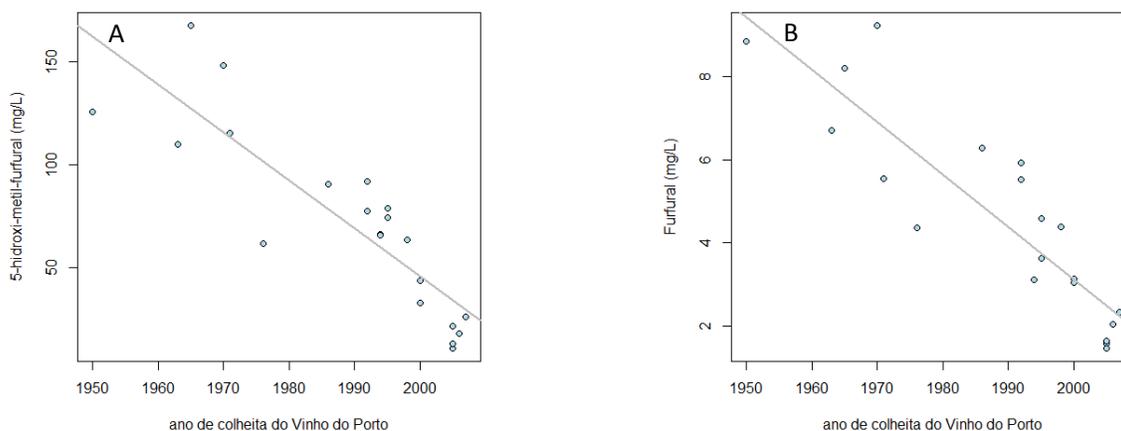


Figura 3.23: Gráficos que correlacionam o ano de colheita do vinho do Porto com os teores de 5-hidroximetilfurfural (A); e furfural (B)

- **Grupo 3 (vintage, LBV, tawny e ruby)**

Foram também construídas tabelas com os parâmetros estatísticos de modo a caracterizar as diferentes categorias de vinho do Porto incluídas neste grupo (LBV, Vintage, Tawny, Ruby). Com base nas tabelas 3.28 e 3.29, verifica-se que o ácido gálico é o composto com o valor de concentração mais elevado em todas as categorias, à exceção do Vintage.. No caso do Vintage o composto que apresenta o valor mais elevado é o 5-hidroximetilfurfural (89,98 mg/L), com um valor de desvio padrão também mais elevado, indicando que na categoria do Vintage existe uma grande dispersão de valores de concentração. Este resultado pode estar associada ao facto de o vinho do Porto Vintage ser um vinho “especial”, que evolui gradualmente durante 10 a 50 anos em garrafa¹. No entanto existe pouca informação sobre envelhecimento do vinho em garrafa e sobre o vinho do Porto Vintage, sendo necessário um estudo mais aprofundado sobre as categorias destes vinhos. O ácido gálico apresentou valores medianos semelhantes para os vinhos Ruby e Tawny. O mesmo foi verificado mas com valores de medianas significativamente superiores para o vinho Vintage e LBV. O ácido siríntrico também apresentou valores de medianas significativamente distintas para os diferentes vinhos. Estas diferenças verificadas tanto para o ácido gálico como para o ácido siríntrico, podem estar relacionadas com o facto dos teores de ambos os compostos variarem consoante o tipo de uva⁵². Estes vinhos apresentaram valores residuais ou valores nulos de sinapaldeído e de 5-metilfurfural. Para os compostos siringaldeído,

ácido ferúlico e coniferaldeído não se observaram diferenças significativas entre as diferentes categorias.

Tabela 3.28: Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto *Vintage* e *LBV*, mg/L.

	<i>Vintage</i>				<i>LBV</i>			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	12,09	53,20	22,43	8,51	11,00	44,04	23,47	8,45
5-hidroximetilfurfural	0,00	89,98	27,67	34,55	0,46	4,26	2,12	0,84
Furfural	0,00	4,44	1,30	1,02	0,00	1,34	0,71	0,33
5-metilfurfural	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido vanílico	0,00	4,49	0,89	1,30	0,00	3,98	1,58	1,00
Ácido siríngico	10,09	33,70	17,51	5,61	12,05	31,16	18,94	5,00
Siringaldeído	1,73	14,62	5,15	3,12	1,38	9,04	3,99	2,05
Ácido ferúlico	0,00	1,86	0,64	0,46	0,00	1,16	0,49	0,38
Coniferaldeído	0,00	13,15	2,30	3,36	0,00	8,69	2,21	2,82
Sinapaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

n.d.–não detetado

Tabela 3.29: Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos do Porto *Tawny* e *Ruby* anos, mg/L.

	<i>Tawny</i>				<i>Ruby</i>			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	9,23	34,04	15,52	6,54	9,10	31,01	15,96	6,27
5-hidroximetilfurfural	5,46	33,17	16,67	7,86	1,19	9,79	3,33	2,15
Furfural	0,61	2,48	1,27	0,50	0,00	1,19	0,74	0,31
5-metilfurfural	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido vanílico	0,00	2,96	1,30	0,80	0,49	4,57	1,61	1,02
Ácido siríngico	7,00	15,85	11,86	2,64	9,01	27,42	14,83	3,89
Siringaldeído	0,80	4,59	2,85	1,05	1,08	8,70	3,72	2,24
Ácido ferúlico	0,00	0,44	0,24	0,16	0,00	0,86	0,32	0,31
Coniferaldeído	0,00	1,62	0,55	0,64	0,00	11,52	0,91	2,71
Sinapaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

n.d.–não detetado

3.4.2 Vinhos do Douro

Para o estudo dos vinhos do Douro foram analisadas 76 amostras de vinhos tintos, e 50 amostras de vinhos brancos, com o objetivo de verificar se existem diferenças entre os vinhos que referem terem estado em contacto com a madeira, dos que não estiveram. Na tabela 3.30 encontram-se discriminado o número de vinhos analisados, assim como as frequências de cada tipo de vinho.

Tabela 3.30 Frequências das amostras utilizadas, que permaneceram, ou não, em madeira, no estudo da caracterização dos vinhos do Douro

Categoria	Vinho Tinto Douro		Vinhos Branco Douro	
	Em madeira	Não esteve em madeira	Em madeira	Não esteve em madeira
Frequência	43	33	25	25

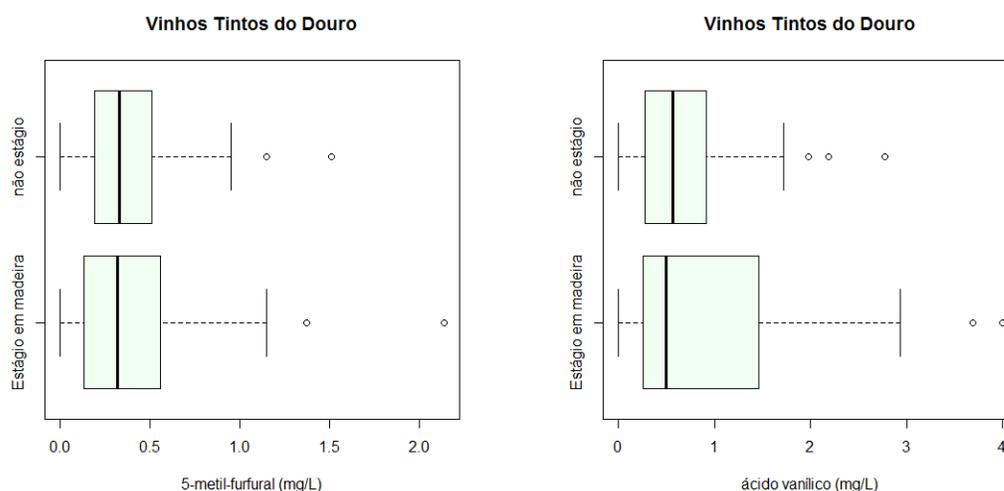
De forma idêntica ao efetuado para o estudo dos vinhos do Porto foi realizada a análise univariada para os dados destes vinhos. Na tabela 3.31 estão apresentados os valores mínimos e máximos, assim como a média, e o desvio padrão, dos vinhos tintos. A partir dos valores obtidos para os desvios padrão verifica-se de imediato que a dispersão de concentrações nestes vinhos não é tão elevada como nos vinhos do Porto. Nestes vinhos não foram detetados teores de coniferaldeído e sinapaldeído. O compostos com concentrações mais elevadas foi o ácido gálico.

Para todos os compostos foram construídos diagramas de extremos e quartis, idênticos aos da figura 3.24, com o objetivo de verificar se existem diferenças significativas entre a composição dos vinhos que estagiaram em madeira e os que não estiveram nessas condições. Para tal, foram ainda empregues testes não paramétricos de medianas. Conclui-se que estes vinhos tintos não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos compostos. Como exemplo, na figura 3.24, encontram-se os diagramas de extremos e quartis do 5-metilfurfural e do ácido vanílico, constatou-se que os restantes diagramas apresentam um perfil muito semelhante.

Tabela 3.31 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinho tinto do Douro, com e sem estágio em madeira, mg/L.

	Vinho Douro Tinto (madeira)				Vinho Douro Tinto (sem madeira)			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	1,34	70,93	30,63	11,14	3,67	50,12	25,49	10,61
5-hidroximetilfurfural	0,00	2,66	0,39	0,53	0,00	3,77	0,33	0,74
Furfural	0,00	2,51	1,12	0,52	0,00	2,00	0,92	0,49
5-metilfurfural	0,00	2,14	0,40	0,42	0,00	3,77	0,33	0,74
Ácido vanílico	0,00	4,00	0,99	1,07	0,00	2,77	0,74	0,69
Ácido siríngico	3,85	23,48	15,55	3,64	5,84	24,33	14,28	4,19
Siringaldeído	1,06	12,01	4,90	3,05	0,49	14,22	4,66	3,43
Ácido ferúlico	1,06	12,01	4,90	3,05	0,49	14,22	4,66	3,43
Coniferaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sinapaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

n.d.–não detetado

**Figura 3.24** Diagramas de extremos e quartis do 5-metilfurfural e do ácido vanílico para os dois grupos de vinho tinto do Douro

Os resultados do vinho branco do Douro foram tratados de igual forma. Na tabela 3.32 encontra-se o resumo dos dados estatísticos, onde são apresentados os valores mínimos, máximos e médios, assim como o respetivo desvio padrão, para os diferentes compostos. Mais uma vez nestas vinhos não se detetou coniferaldeído e sinapaldeído. O composto que apresentou um desvio padrão maior, e por isso, maior dispersão de valores foi o ácido gálico. Comparando as tabelas 3.31 e 3.32 verifica-se que as concentrações médias de ácido gálico e ácido siríngico são bastante mais elevadas nos vinhos tintos face aos vinhos brancos, este resultado vai de encontro ao relato por Neuza Paixa e colaboradores⁴⁵, e Hua Li e colaboradores⁵³.

Tabela 3.32 Resumo dos dados estatísticos dos compostos fenólicos e aldeídos furânicos em vinho branco do Douro, com e sem estágio em madeira, mg/L.

	Vinho Douro Branco (madeira)				Vinho Douro Branco (sem madeira)			
	Min	Max	Média	SD	Min	Max	Média	SD
Ácido gálico	0,98	24,23	4,19	5,12	0,00	10,7	2,64	2,67
5-hidroximetilfurfural	0,00	0,93	0,26	0,37	0,00	3,77	0,44	0,75
Furfural	0,00	4,56	1,05	1,16	0,00	4,61	0,42	0,90
5-metilfurfural	0,00	1,26	0,12	0,29	0,00	2,41	0,44	0,44
Ácido vanílico	0,00	3,45	0,44	1,00	0,00	3,81	0,63	1,30
Ácido siríngico	0,13	3,85	0,91	0,82	0,00	1,69	0,65	0,57
Siringaldeído	0,18	1,84	0,84	0,44	0,00	3,70	0,90	0,82
Ácido ferúlico	0,00	0,60	0,10	0,14	0,00	0,28	0,08	0,11
Coniferaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sinapaldeído	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

n.d.—não detetado

Construíram-se diagramas de extremos e quartis para todos os compostos, comparando desta maneira os vinhos que estagiaram em madeira e aqueles que não estagiaram. Contrariamente ao vinho tinto do Douro, o vinho branco do Douro apresentou dois compostos que apresentam valores de concentração significativamente diferentes, dependendo do vinho ter estado em contacto, ou não, com a madeira. Verificou-se assim, que os vinhos brancos que estagiaram em madeira apresentam medianas de concentrações significativamente mais altas para o 5-metilfurfural (*p-value* de 0,03) e para o furfural (*p-value* de 0,01) quando aplicados testes não paramétricos de medianas. O facto da composição fenólica da uva branca ser bastante inferior à das uvas tintas, aliado ao facto de a fermentação do mosto branco ocorrer na ausência de películas e grainhas, pode estar a contribuir para que pequenas alterações na composição do vinho devido ao contacto com a madeira sejam significativamente notáveis, quando comparadas com os resultados dos vinhos tintos¹¹⁴.

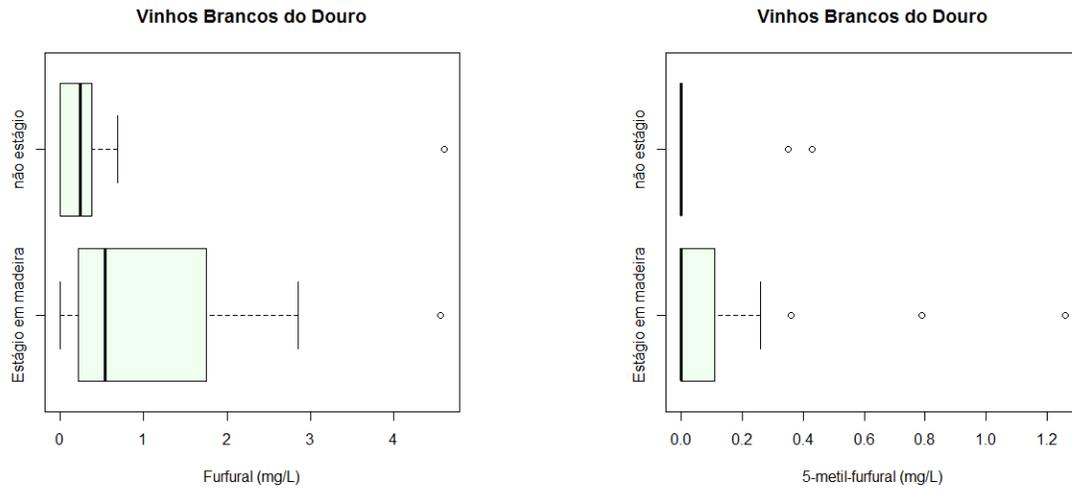


Figura 3.25 Diagramas de extremos e quartis do 5-metilfurfural e do ácido vanílico para os dois grupos de vinho branco do Douro

Capítulo 4

Conclusão

4 Conclusão

No âmbito deste trabalho pretendia-se efetuar a otimização e validação de um método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor de rede de díodos (DAD) para a determinação de ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos e aldeídos furânicos em vinhos licorosos, vinhos, bebidas espirituosas e aguardentes para elaboração do vinho do Porto. Com a alteração do fluxo, gradiente e volume de amostra injetado foi possível otimizar o método de forma a torná-lo mais rápido, e capaz de quantificar 10 compostos em apenas 12 minutos. O método implementado e aqui descrito é simples de executar e não envolve preparação das amostras. Este método mostrou-se eficiente para a separação e quantificação simultânea de ácidos e aldeídos fenólicos, assim como aldeídos furânicos nos diferentes tipos de bebidas estudadas.

A eficiência do método foi confirmada através da validação de vários parâmetros de desempenho, apresentado ampla gama de trabalho e linearidade satisfatórias para todos os compostos em estudo. Os limites de deteção e de quantificação foram apropriados para a quantificação da maioria dos analitos nas amostras analisadas. O método apresenta ainda uma repetibilidade e precisão intermédia satisfatória. Nos ensaios de recuperação realizados, as taxas de recuperação obtidas encontram-se dentro do intervalo estipulado para a gama de concentrações analisada, podendo-se concluir que o método não apresenta efeitos de matriz significativos e que apresenta seletividade para a matriz analisada. Assim, o método pode ser facilmente empregue em análises de rotina, isto é, no controlo de qualidade, de vinhos do Porto e Douro, bebidas espirituosas e aguardentes.

Quanto ao estudo estatístico realizado com o objetivo de relacionar a composição dos vinhos com o tempo de estágio em madeira verifica-se que apenas alguns compostos variam o seu teor de forma significativa consoante o tempo de contacto com madeira. Os vinhos do Porto designados como Tawny's, com indicação de idade, e os vinhos designados como colheita apresentaram valores significativamente mais elevados para os aldeídos furânicos, o ácido vanílico e o siringaldeído. O ácido síringico apresentou um comportamento contrário. Para o vinho tinto do Douro não se verificou nenhuma alteração significativa na sua composição face ao estágio em madeira. No entanto os vinhos brancos do Douro que estagiaram em madeira apresentam um aumento significativo nos teores de furfural e 5-metil-furfural.

Todos os objetivos propostos neste trabalho foram atingidos e com resultados satisfatórios. De salientar que, da revisão bibliográfica realizada para este estudo, se constatou que o método desenvolvido neste trabalho associado à técnica HPLC-DAD, mostrou ter o tempo de análise mais curto, até à data.

Este trabalho tornou-se bastante enriquecedor, uma vez que foi possível colocar em prática conhecimentos teóricos adquiridos durante a formação académica. O facto de ser realizado num ambiente empresarial permitiu adquirir experiência laboratorial, uma maior autonomia e aperfeiçoar competências de investigação.

De modo a que se possa dar continuidade a este estudo e porque existem inúmeros compostos fenólicos na composição do vinho, seria interessante tentar implementar e validar o método para a determinação de mais compostos, nomeadamente a vanilina, a catequina e a epicatequina.

Capítulo 5

Referências Bibliográficas

Bibliografia

1. Instituto dos Vinhos do Douro e Porto. *Disponível em: <http://www.ivdp.pt>*. [consultado a 06 de junho de 2015]
2. Taylor's. what is Port wine? *Disponível em: <http://www.taylor.pt/en/what-is-port-wine/introduction/>* [consultado a 28 de agosto de 2015]
3. Tudo sobre o Vinho do Porto. Disponível em: <http://clubedevinhos.com/artigos/tudo-sobre-vinho-porto>. [consultado a 27 de agosto de 2015]
4. Wines of Portugal. Vinho do Porto. Disponível em: <http://www.winesofportugal.info/pagina.php?codNode=18091&market=1#vintage>. [consultado a 9 de junho de 2015]
5. "Regulamento (CE) Nº 110/2008 de 15 de Janeiro Do Parlamento Europeu E Do Concelho" *Jornal Oficial da União Europeia* (2008); p. 16-39. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0110&qid=1446498752988&from=PT>
6. Sardinha V. "Aguardentes / Brandy / Cognac / Armagnac - Definição" (2012) Disponível em: <http://vinhas-e-vinhos.blogspot.pt/2012/03/aguardentes-brandy-cognac-armagnac.html>. [consultado a 27 de agosto de 2015]
7. Diffordsguide. Armagnac Explained. (2013) Disponível em: <http://www.diffordsguide.com/magazine/2013-03-26/1/armagnac>. [consultado a 16 de junho de 2015]
8. Karvela E, Makris DP, Kefalas P, Moutounet M. Extraction of phenolics in liquid model matrices containing oak chips: Kinetics, liquid chromatography-mass spectroscopy characterisation and association with in vitro antiradical activity. *Food Chem.* 2008;110(1):263-272. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.001.
9. Pérez-Magariño S, Ortega-Heras M, Cano-Mozo E, González-Sanjosé ML. The influence of oak wood chips, micro-oxygenation treatment, and grape variety on colour, and anthocyanin and phenolic composition of red wines. *J Food Compos Anal.* 2009;22(3):204-211. doi:10.1016/j.jfca.2008.09.006.
10. Caves do Vinho do Porto. Disponível em <http://www.cavesvinhodoporto.com/>. [consultado a 21 de outubro de 2015]
11. Frangipane MT, Santis D De, Ceccarelli A. Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips. *Food Chem.* 2007;103(1):46-54. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.070.
12. Cerezo AB, Tesfaye W, Soria-Díaz ME, et al. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *J Food Compos Anal.* 2010;23(2):175-184. doi:10.1016/j.jfca.2009.08.008.
13. De Simón BF, Sanz M, Cadahía E, Martínez J, Esteruelas E, Muñoz a. M. Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chem.* 2014;143:66-76. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.096.

14. Canas S, Silva V, Belchior a P. Wood related chemical markers of aged wine brandies. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2008;23(1):45-52.
15. Caldeira I, Anjos O, Portal V, Belchior a. P, Canas S. Sensory and chemical modifications of wine-brandy aged with chestnut and oak wood fragments in comparison to wooden barrels. *Anal Chim Acta*. 2010;660(1-2):43-52. doi:10.1016/j.aca.2009.10.059.
16. Canas S, Casanova V, Pedro Belchior a. Antioxidant activity and phenolic content of Portuguese wine aged brandies. *J Food Compos Anal*. 2008;21(8):626-633. doi:10.1016/j.jfca.2008.07.001.
17. Chira K, Teissedre P-L. Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel: effect of oak species involved and toasting process. *Eur Food Res Technol*. 2015;240(3):533-547. doi:10.1007/s00217-014-2352-3.
18. De Rosso M, Cancian D, Panighel A, Dalla Vedova A, Flamini R. Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: Volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci Technol*. 2009;43(5-6):375-385. doi:10.1007/s00226-008-0211-8.
19. Fernández De Simón B, Martínez J, Sanz M, Cadahía E, Esteruelas E, Muñoz a. M. Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chem*. 2014;147:346-356. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.158.
20. Sanz M, De Simón BF, Cadahía E, et al. Polyphenolic profile as a useful tool to identify the wood used in wine aging. *Anal Chim Acta*. 2012;732:33-45. doi:10.1016/j.aca.2011.12.012.
21. Mosedale JR, Puech J-L. Wood maturation of distilled beverages. *Trends Food Sci Technol*. 1998;9(3):95-101. doi:10.1016/S0924-2244(98)00024-7.
22. Dietrich Fengel and Gerd Wegener. "Wood — Chemistry, Ultrastructure, Reactions" New york 1989
23. Delgado de la Torre MP, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Comparative profiling analysis of woody flavouring from vine-shoots and oak chips. *J Sci Food Agric*. 2014;94(3):504-514. doi:10.1002/jsfa.6279.
24. Klemm Dieter, Heublein Brigitte FH-P and AB. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew Chemie Int Ed*. 2005;44:3358-3393.
25. Van Boekel M a JS. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol Adv*. 2006;24(2):230-233. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.11.004.
26. Martins SIFS, Jongen WMF, Van Boekel M a JS. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci Technol*. 2000;11(9-10):364-373. doi:10.1016/S0924-2244(01)00022-X.
27. Carvalho W, Carrilha L, Ferraz A, Milagres a. MF. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Quim Nova*. 2009;32(8):2191-2195. doi:10.1590/S0100-40422009000800033.
28. Montastruc L, Ajao O, Marinova M, Do Carmo CB, Domenech S. Hemicellulose biorefinery for furfural production: Energy requirement analysis and minimization. *J Sci Technol For Prod Process*. 2011;1(3):48-53.

29. Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res Int.* 2011;44(5):1115-1126. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.050.
30. Doderó MCR, Sánchez D a G, Rodríguez MS, Barroso CG. Phenolic compounds and furanic derivatives in the characterization and quality control of Brandy de Jerez. *J Agric Food Chem.* 2010;58(2):990-997. doi:10.1021/jf902965p.
31. Anjos O, Carmona C, Caldeira I, Canas S. Variation of extractable compounds and lignin contents in wood fragments used in the aging of wine brandies. *BioResources.* 2013;8(3):4484-4496.
32. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007;66(1):1-9.
33. Anja Rødtjer, Leif H. Skibsted MLA*. Antioxidative and prooxidative effects of extracts made from cherry liqueur pomace. *Food Chem.* 2006;99:6-14.
34. Moure a., Cruz JM, Franco D, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001;72(2):145-171. doi:10.1016/S0308-8146(00)00223-5.
35. Goldberg DM, Hoffman B, Yang J, Soleas GJ. Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):3978-3985. doi:10.1021/jf9811626.
36. Shui G, Leong LP. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2002;977(1):89-96. doi:10.1016/S0021-9673(02)01345-6.
37. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 2003;51(10):2866-2887. doi:10.1021/jf026182t.
38. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr.* 2002;15(1):71-81. doi:10.1590/S1415-52732002000100008.
39. Figueiredo AR, Campos F, de Freitas V, Hogg T, Couto J a. Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol.* 2008;25(1):105-112. doi:10.1016/j.fm.2007.07.004.
40. Caldeira I, Clímaco MC, Bruno De Sousa R, Belchior a. P. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *J Food Eng.* 2006;76(2):202-211. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.008.
41. Cabrita MJ, Barrocas Dias C, Costa Freitas a. Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. French oaks. *South African J Enol Vitic.* 2011;32(2):204-210.
42. Canas S, Belchior a P, Falcao a, Gonçalves J a, Spranger MI, Bruno-de-Sousa R. Effect of heat treatment on the thermal and chemical modifications of Oak and Chestnut wood used in brandy ageing. *Ciência e Técnica Vitivinícola.* 2007;22(1):5-14.
43. Perestrelo R, Silva CL, Câmara JS. Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast analytical strategy based on digitally controlled microextraction by packed sorbent combined with ultrahigh pressure liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2015;1381:54-63. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.020.

44. Zhang B, Cai J, Duan C-Q, Reeves M, He F. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):6978-7014. doi:10.3390/ijms16046978.
45. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem*. 2007;105(1):204-214. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.017.
46. Anđelković M, Radovanović B, Anđelković AM, Radovanović V. Phenolic Compounds and Bioactivity of Healthy and Infected Grapevine Leaf Extracts from Red Varieties Merlot and Vranac (*Vitis vinifera* L.). *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70(3):317-323. doi:10.1007/s11130-015-0496-3.
47. Sandhu AK, Gu L. Antioxidant capacity, phenolic content, and profiling of phenolic compounds in the seeds, skin, and pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) as determined by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J Agric Food Chem*. 2010;58(8):4681-4692. doi:10.1021/jf904211q.
48. Antonioli A, Fontana AR, Piccoli P, Bottini R. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chem*. 2015;178:172-178. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.082.
49. Moreno-Montoro M, Olalla-Herrera M, Gimenez-Martinez R, Navarro-Alarcon M, Rufián-Henares J a. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *J Food Compos Anal*. 2015;38:19-26. doi:10.1016/j.jfca.2014.10.001.
50. Vinho: um tesouro deixado pelas antigas civilizações que surpreende os cientistas. *Cardiolípedes*. 2001;2(nº1):17-19.
51. Santos-Buelga C, González-Manzano S. Wine and health relationships . A question of moderation ? *Ciência Téc Vitiv*. 2011;26(1):33-44.
52. Van Leeuw R, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *J Food Compos Anal*. 2014;36(1-2):40-50. doi:10.1016/j.jfca.2014.07.001.
53. Li H, Wang X, Li Y, Li P, Wang H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chem*. 2009;112(2):454-460. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.111.
54. Oliveira H, Fernandes I, Freitas V De, Mateus N. Ageing impact on the antioxidant and antiproliferative properties of. *FRIN*. 2015;67:199-205. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.034.
55. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols1. *J Nutr*. 2000;130:2073s - 2085s. doi:10.1089/109662000416311.
56. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. 2005;66(17 SPEC. ISS.):2012-2031. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.023.
57. Del Alamo Sanza M, Nevares Domínguez I, Cárcel Cárcel LM, Navas Gracia L. Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. *Anal Chim Acta*. 2004;513(1):229-237. doi:10.1016/j.aca.2003.11.041.
58. Garde-Cerdán T, Ancín-Azpilicueta C. Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(8):438-447. doi:10.1016/j.tifs.2006.01.008.

59. J. Câmara, J. Marques, M. Alves AF. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone Levels in Fortified H Madeira Wines: Relationship to Sugar Content. *J Agric Food Chem.* 2004;52:6765-6769.
60. Michel J, Jourdes M, Le Floch A, Giordanengo T, Mourey N, Teissedre PL. Influence of wood barrels classified by NIRS on the ellagitannin content/composition and on the organoleptic properties of wine. *J Agric Food Chem.* 2013;61(46):11109-11118. doi:10.1021/jf403192y.
61. Ferrer-Gallego R, Hernández-Hierro JM, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: Synergistic effect and modulation by aromas. *Food Res Int.* 2014;62:1100-1107. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.049.
62. Schwarz M, Rodríguez MC, Guillén D a., Barroso CG. Evolution of the colour, antioxidant activity and polyphenols in unusually aged Sherry wines. *Food Chem.* 2012;133(2):271-276. doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.019.
63. Schwarz M, Rodríguez MC, Guillén D a., Barroso CG. Analytical characterisation of a Brandy de Jerez during its ageing. *Eur Food Res Technol.* 2011;232(5):813-819. doi:10.1007/s00217-011-1448-2.
64. Huang Y, Lu W, Chen B, Wu M, Li S. Determination of 13 Phenolic Compounds in Rice Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Anal Methods.* 2015;8(4):825-832. doi:10.1007/s12161-014-9939-y.
65. OIV. *Determination of the principal compounds extracted from wood during ageing of spirit drinks of vitivinicultural origin*; 2009.
66. López M, Martínez F, Del Valle C, Orte C, Miró M. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2001;922(1-2):359-363. doi:10.1016/S0021-9673(01)00913-X.
67. Vanhoenacker, G DeVilliers a, Lazou, K De Keukeleire, D Sandra P. Comparison of High-Performance Liquid Chroma- tography - Mass Spectroscopy and Capillary Electro- phoresis - Mass Spectroscopy for the Analysis of Phenolic Compounds in Diethyl Ether Extracts of Red Wines Extraction of Phenolic Compounds LC-UV-MS High-Per. *Chromatographia.* 2001;54:309-315.
68. Wang Y, Liu Y, Xiao C, et al. Simultaneous Determination of 15 Phenolic Constituents of Chinese Black Rice Wine by HPLC-MS/MS with SPE. *J Food Sci.* 2014;79(6):C1100-C1105. doi:10.1111/1750-3841.12483.
69. Ivanova V, Stefova M, Chinnici F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serbian Chem Soc.* 2010;75(1):45-59. doi:10.2298/JSC1001045I.
70. Escarpa a., Gonzalez MC. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal Chim Acta.* 2001;427(1):119-127. doi:10.1016/S0003-2670(00)01188-0.
71. Kilmartin P a., Zou H, Waterhouse AL. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J Agric Food Chem.* 2001;49(4):1957-1965. doi:10.1021/jf001044u.

72. Šeruga M, Novak I, Jakobek L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chem.* 2011;124(3):1208-1216. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.047.
73. Ziyatdinova G, Kozlova E, Budnikov H. Electropolymerized Eugenol-MWNT-Based Electrode for Voltammetric Evaluation of Wine Antioxidant Capacity. *Electroanalysis.* 2015;27:1660-1668. doi:10.1002/elan.201400712.
74. Gamella M, Campuzano S, Reviejo a. J, Pingarrón JM. Electrochemical estimation of the polyphenol index in wines using a laccase biosensor. *J Agric Food Chem.* 2006;54(21):7960-7967. doi:10.1021/jf061451r.
75. Kim SK, Kwen HD, Choi SH. Fabrication of a microbial biosensor based on QD-MWNT supports by a one-step radiation reaction and detection of phenolic compounds in red wines. *Sensors.* 2011;11(2):2001-2012. doi:10.3390/s110202001.
76. Ebeler WTJ and SE. Tyrosinase biosensor for the measurement of wine polyphenolics. *Am J Enol Vitic.* 2001;52:219-222.
77. Ballus CA, Meinhart AD, de Oliveira RG, Godoy HT. Optimization of capillary zone electrophoresis separation and on-line preconcentration of 16 phenolic compounds from wines produced in South America. *Food Res Int.* 2012;45(1):136-144. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.029.
78. Dias FDS, Klassen A, Tavares MFM, David JM. Fast Determination of Phenolic Compounds in Brazilian Wines from Vale do São Francisco Region by CE. *Chromatographia.* 2013;76(9-10):559-563. doi:10.1007/s10337-013-2399-5.
79. Franquet-Griell H, Checa A, Núñez O, Saurina J, Hernández-Cassou S, Puignou L. Determination of polyphenols in spanish wines by capillary zone electrophoresis. Application to wine characterization by using chemometrics. *J Agric Food Chem.* 2012;60(34):8340-8349. doi:10.1021/jf302078j.
80. Dall'Antonia LH, Archela E. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. *Semin Ciências Exatas e Tecnológicas.* 2013;34(2):193. doi:10.5433/1679-0375.2013v34n2p193.
81. Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules.* 2013;18(1):1076-1100. doi:10.3390/molecules18011076.
82. Gomes S a SS, Nogueira JMF, Rebelo MJF. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens Bioelectron.* 2004;20(6):1211-1216. doi:10.1016/j.bios.2004.05.013.
83. Montereali MR, Seta L Della, Vastarella W, Pilloton R. A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *J Mol Catal B Enzym.* 2010;64(3-4):189-194. doi:10.1016/j.molcatb.2009.07.014.
84. Arribas AS, Martínez-Fernández M, Chicharro M. The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2012;34:78-95. doi:10.1016/j.trac.2011.10.015.
85. Rodríguez-Delgado, Pérez ML, Corbella R, González G, García Montelongo FJ. Optimization of the separation of phenolic compounds by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A.* 2000;871(1-2):427-438.

86. Arce L, Tena MT, Rios A, Valcárcel M. Determination of trans-resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. *Anal Chim Acta*. 1998;359(1-2):27-38. doi:10.1016/S0003-2670(97)00668-5.
87. Allen D, Bui AD, Cain N, Rose G, Downey M. Analysis of free and bound phenolics in wine and grapes by GC-MS after automated SPE. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(30):9869-9877. doi:10.1007/s00216-013-7405-0.
88. Mayr CM, Capone DL, Pardon KH, Black C a, Pomeroy D, Francis IL. Quantitative Analysis by GC-MS/MS of 18 Aroma Compounds Related to Oxidative Off-Flavor in Wines. *J Agric Food Chem*. 2015;63:3394-3401. doi:10.1021/jf505803u.
89. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007;30(18):3268-3295. doi:10.1002/jssc.200700261.
90. Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hermosín-Gutiérrez I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J Food Compos Anal*. 2007;20(7):618-626. doi:10.1016/j.jfca.2007.03.002.
91. Barroso CG, Rodríguez MC, Guillén DA, Pérez-Bustamante JA. Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in Brandy de Jerez by high-performance liquid chromatography-diode array detection with direct injection. *J Chromatogr A*. 1996;724(1-2):125-129. doi:10.1016/0021-9673(95)00985-X.
92. Chinnici F, Natali N, Bellachioma A, Versari A, Riponi C. Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(2):977-984. doi:10.1016/j.lwt.2014.10.029.
93. Cerezo AB, Tesfaye W, Torija MJ, Mateo E, García-Parrilla MC, Troncoso AM. The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chem*. 2008;109(3):606-615. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.013.
94. Canas S, Belchoir a. P, Spranger MI, Bruno-De-Sousa R. High-performance liquid chromatography method for analysis of phenolic acids, phenolic aldehydes, and furanic derivatives in brandies. Development and validation. *J Sep Sci*. 2003;26(6-7):496-502. doi:10.1002/jssc.200390066.
95. Silva LR, Andrade PB, Valentão P, Seabra RM, Trujillo ME, Velázquez E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. *Food Chem*. 2005;89(2):185-189. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.019.
96. Malovaná S, Garcia Montelongo FJ, Pérez JP, Rodriguez-Delgado M a. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2001;428(2):245-253. doi:10.1016/S0003-2670(00)01231-9.
97. Porgalı E, Büyüktünel E. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Res Int*. 2012;45(1):145-154. doi:10.1016/j.foodres.2011.10.025.
98. Escarpa A, Gonzalez MC. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Crit Rev Anal Chem*. 2001;32:57.139. doi:10.1080/20014091076695.

99. BetesSaura C, AndresLacueve C, Lamuela-Raventos M. Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by high-performance liquid chromatography: Changes during vinification. *J Agric Food Chem.* 1996;44:3040-3046. doi:10.1021/jf9601628.
100. Ho P, Hogg T a., Silva MCM. Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines. *Food Chem.* 1999;64(1):115-122. doi:10.1016/S0308-8146(98)00115-0.
101. Benassi MT, Cecchi HM. Method Development for the Simultaneous Determination of Carboxylic Acids, Phenolic Compounds, and Sorbic Acid in White Wines. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 1998;21(4):491-501. doi:10.1080/10826079808001235.
102. Rodríguez-Delgado M a., Malovaná S, Pérez JP, Borges T, García Montelongo FJ. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J Chromatogr A.* 2001;912(2):249-257. doi:10.1016/S0021-9673(01)00598-2.
103. John W. Dolan. Calibration Curves, Part 1: To b or Not to b? *LCGC Eur.* 22(4):190-194.
104. Relacre Guia 13 (2013) -Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.
105. IPAC. (2011). Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos.
106. OIV. *International Code of Oenological Practices.*; 2012:1-286.
107. Cassiano NM, Barreiro JC, Regina L, et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova.* 2009;32(4):1021-1030. doi:10.1590/S0100-40422009000400033.
108. LabCompliance. Testing Precision of Peak Retention Times and Areas of an HPLC .www.labcompliance.com. Published 2001.
109. Thye B, Soares M, Kumar A. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. *Rev Bras Farmácia.* 2011;92(2):44-50.
110. GHULAM A. SHABIR. A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices. 2004:29-37. http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices_0.pdf.
111. Ludwing Hubeer AT. Validation of Analytical Methods. *LabComplicance.* 2001.
112. Pereira V, Albuquerque FM, Ferreira a. C, Cacho J, Marques JC. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. *Food Res Int.* 2011;44(1):71-76. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.011.
113. Silva Ferreira AC, Barbe J-C, Bertrand A. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone: a key odorant of the typical aroma of oxidative aged Port wine. *J Agric Food Chem.* 2003;51(15):4356-4363. doi:10.1021/jf0342932.
114. Abe LT, Mota RV Da, Lajolo FM, Genovese MI. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2007;27(2):394-400. doi:10.1590/S0101-20612007000200032.

Anexos

Anexos

Anexo A: Equações

Definição	Equação		Nº
Forma algébrica da equação de uma reta	$y = bx + a$	Onde: y resposta, b o declive, x o valor da concentração e a ordenada na origem.	15
Desvio padrão residual da curva de calibração	$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$	Onde: n- número de soluções padrão x_i - Valores iniciais do logaritmo da concentrações \bar{x} - Valor médio do logaritmo da concentração	16
Incerteza associada à ordenada na origem	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}; a \pm t_{s_a}$	t- parâmetro t de student, para uma probabilidade de 95 % y_i - Valor da resposta para cada x_i \hat{y}_i - Valor de y estimado, tendo em conta a equação da reta	17
Incerteza associada ao declive	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}; b \pm t_{s_b}$	a – valor de ordenada na origem b – valor de declive	18

Anexo B: Valores de concentração de 5-hidroximetilfurfural furfural obtidos por métodos/aparelhos diferentes

Tabela I: Valores de concentração em mg/L de 5-hidroximetilfurfural em amostras de vinho e bebidas espirituosas analisadas por diferentes métodos

Matriz da amostra	Data	Concentração obtida por HPLC-DAD	Concentração obtida por HPLC-UV	Diferença entre as duas concentrações
Vinho <i>Tawny</i>	23/01/2015	30,92	30	0,92
Colheita 1995	26/01/2015	77,91	82	4,09
Colheita 1996	26/01/2015	256,63	250	6,63
<i>Armagnac</i>	20/02/2015	15,72	14,5	1,22
Moscatel	13/02/2015	51,87	54	2,13
Porto tinto	26/02/2015	99,60	98	1,60
Colheita 1963	09/03/2015	110,05	108	2,05
Colheita 1992	17/03/2015	91,98	90	1,97
Colheita 71	17/03/2015	115,15	118	2,85
Vinho 30 anos	20/03/2015	194,43	192,00	2,43
Vinho 30 anos	31/03/2015	54,30	53	1,30
Vinho 40 anos	31/03/2015	83,86	83,78	0,08
Vinho 20 anos	31/03/2015	90,03	90,01	0,02
Vinho 30 anos	31/03/2015	68,26	70,97	2,71
Colheita 1995	01/04/2015	74,11	73,97	0,13
Vinho 20 anos	01/04/2015	78,58	78,7	0,12
Vinho do Porto branco	01/04/2015	41,56	40,91	0,65
Colheita 2005	10/04/2015	10,73	9,62	1,11
Vinho 10 anos	10/04/2015	63,50	59,31	4,19
Vinho 40 anos	10/04/2015	113,28	113,04	0,23
<i>Tawny</i>	10/04/2015	5,64	4,7	0,94
<i>Tawny</i>	10/04/2015	6,66	4,93	1,73

<i>Tawny</i>	10/04/2015	18,10	15,44	2,66
Vinho 40 anos	10/04/2015	78,84	77,22	1,62
Vinho 10 anos	10/04/2015	61,74	60,9	0,84
Vinho 10 anos	10/04/2015	35,13	33,75	1,38
Colheita 2000	13/04/2015	32,83	31,71	1,12
Vinho 20 anos	13/04/2015	45,86	44,81	1,05
Vinho 40 anos	13/04/2015	102,70	101,17	1,52
Vinho 20 anos	13/04/2015	54,24	57,7	3,46
Colheita 2005	14/04/2015	21,63	20,74	0,89
Vinho 20 anos	14/04/2015	51,02	49,61	1,41
Vinho 10 anos	15/04/2015	25,00	23,74	1,26
Vinho 10 anos	16/04/2015	18,40	17,78	0,61
Tawny tinto	16/04/2015	5,46	4,45	1,01
Vinho 20 anos	16/04/2015	25,00	25,48	0,48
Colheita 1976	17/04/2015	61,64	59,43	2,21
Vinho 40 anos	17/04/2015	131,71	129,62	2,09
Vinho +40 anos	20/04/2015	337,00	352,03	15,03
Vinho 10 anos	20/04/2015	27,59	25,61	1,98
Vinho + 6 anos	20/04/2015	4,10	3,08	1,02
Vintage 1999	20/04/2015	12,20	11,06	1,14
Vinho 10 anos	24/04/2015	8,89	11,29	2,40
Vinho +6 anos	24/04/2015	107,34	104,73	2,61
Vinho + 6 anos	24/04/2015	77,55	75,12	2,42
Vinho 10 anos	24/04/2015	44,45	40,2	4,25
Vinho 20 anos	08/05/2015	97,87	94,57	3,30
Vinho 30 anos	24/04/2015	81,08	93,6	12,52
Vinho 40 anos	24/04/2015	109,81	105,64	4,17
Tawny	28/04/2015	33,17	30,9	2,27
Vinho 30 anos	24/04/2015	81,08	76,68	4,40
Colheita	29/04/2015	125,79	121,79	3,99

<i>Tawny</i>	08/05/2015	19,31	17,88	1,43
Colheita	08/05/2015	167,51	161,05	6,46
Vinho 40 anos	08/05/2015	44,24	43,1	1,14
Colheita	08/05/2015	12,85	10,75	2,10
Colheita	08/05/2015	17,85	15,59	2,26
Vinho do Porto branco	08/05/2015	23,93	21,71	2,22
<i>Tawny</i>	08/05/2015	26,47	23,58	2,89
Vinho +40 anos	03/06/2015	62,96	61,66	1,30
Vinho +6 anos	03/06/2015	9,87	8,23	1,64
Vinho do Porto branco	08/05/2015	23,93	21,71	2,22
<i>Tawny</i>	08/05/2015	26,47	23,58	2,89

Tabela II: Valores de concentração em mg/L de furfural em amostras de vinho e bebidas espirituosas analisadas por diferentes métodos

Matriz da amostra	Data	Concentração obtida por HPLC	Concentração obtida por GC	Diferença entre as duas concentrações
Ensaio-outro produto	29/01/2015	8,12	6,8	1,32
Bebida espirituosa	29/01/2015	2,02	3,8	1,79
Aguardente	29/01/2015	8,11	8,3	0,20
Whisky	02/02/2015	6,97	8,8	1,84
Calvados	02/02/2015	1,69	1,1	0,59
Brandy 40 %	02/02/2015	3,48	2,1	1,38
Whisky	02/02/2015	2,16	1,3	0,86
Rum	02/02/2015	0,84	0,6	0,24
Whisky	02/02/2015	1,95	1,3	0,65
Bebida espirituosa	02/02/2015	4,88	4,4	0,48
Aguardente	02/02/2015	1,15	0,9	0,25
Outro produto	13/02/2015	1,85	2,4	0,55
Bebida espirituosa	18/02/2015	6,28	5,8	0,48
Aguardente	02/03/2015	6,83	5,7	1,13
Porto destilado	04/03/2015	6,05	4,2	1,85

Bebida espirituosa	09/03/2015	1,14	0,9	0,24
Aguardente	13/03/2015	8,35	7,2	1,15
Bebida espirituosa	13/03/2015	2,46	2,3	0,16
Bebida espirituosa	13/03/2015	6,20	5,3	0,90
Bebida espirituosa	19/03/2015	3,74	3,1	0,64
Aguardente	26/03/2015	6,96	5,7	1,26
Aguardente	26/03/2015	1,00	0,8	0,20
Aguardente	26/03/2015	0,44	0,5	0,06
Aguardente	26/03/2015	0,44	0,3	0,14
Bebida espirituosa	26/03/2015	1,53	1,3	0,23
Bebida espirituosa	31/03/2015	4,01	3,7	0,31
Aguardente	31/03/2015	1,26	1,2	0,05
Bebida espirituosa	10/04/2015	3,30	2,9	0,40
Aguardente	13/04/2015	0,42	0,5	0,08
Aguardente	13/04/2015	0,33	0,4	0,07
Bebida espirituosa	20/04/2015	2,79	2,9	0,12
Aguardente	20/04/2015	0,22	0,40	0,18
Aguardente	20/04/2015	0,32	0,30	0,02
Aguardente	29/04/2015	1,40	1,4	0,00
Aguardente	29/04/2015	1,14	1,4	0,27
Aguardente	29/04/2015	0,96	0,9	0,05
Aguardente	13/05/2015	0,39	0,6	0,22
Aguardente	13/05/2015	0,36	0,5	0,15
Aguardente	13/05/2015	0,25	0,4	0,15
Aguardente	13/05/2015	0,22	0,4	0,18
Bebida espirituosa	25/05/2015	0,42	0,4	0,02
Bebida espirituosa	29/04/2015	7,11	7,1	0,01
Aguardente	05/06/2015	0,40	0,7	0,31
Aguardente	05/06/2015	4,32	5,2	0,88
Aguardente	05/06/2015	0,64	0,6	0,04

Aguardente	05/06/2015	0,46	0,9	0,44
Aguardente	05/06/2015	0,90	0,6	0,30
Aguardente	29/06/2015	3,01	2,8	0,21

Anexos C: Cartas de controlo das soluções padrões de verificação (PlimQ e P5v)

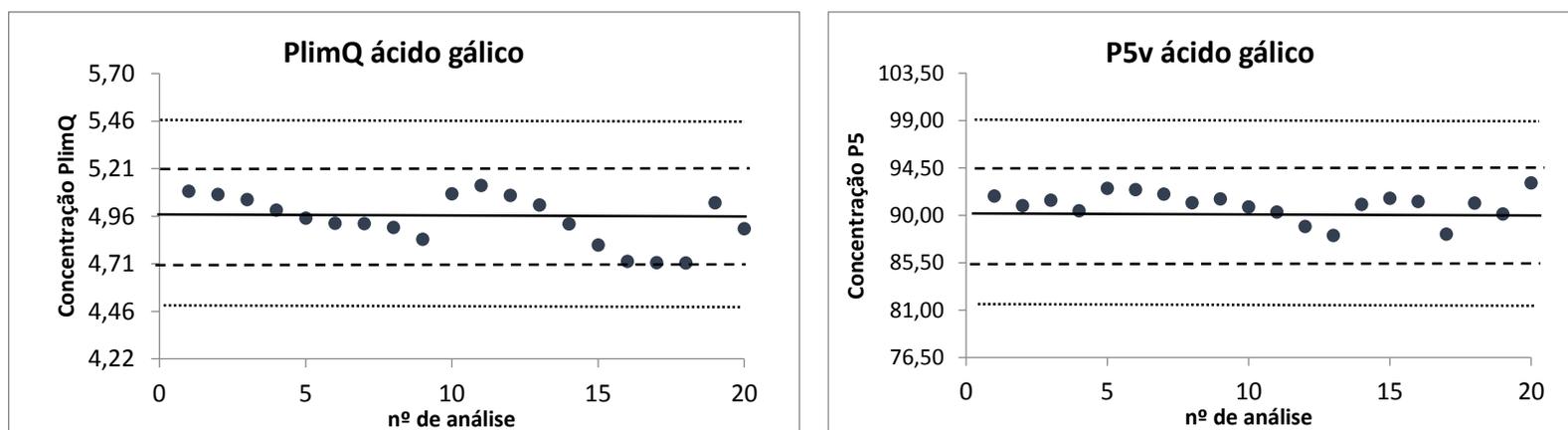


Figura I: Cartas de controlo do composto ácido gálico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

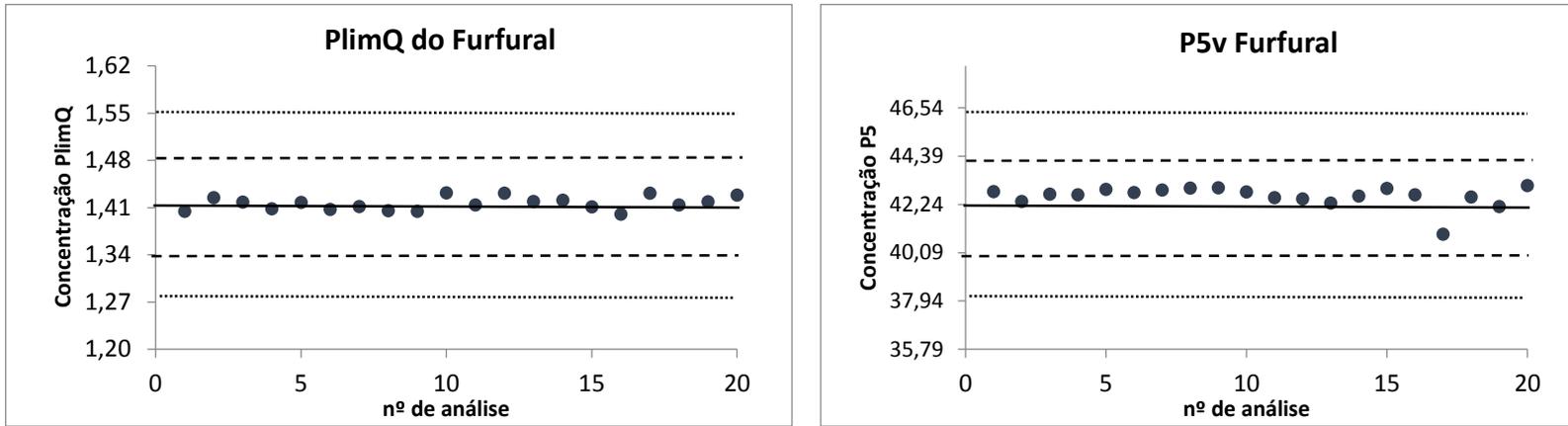


Figura II: Cartas de controlo do composto furfural para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

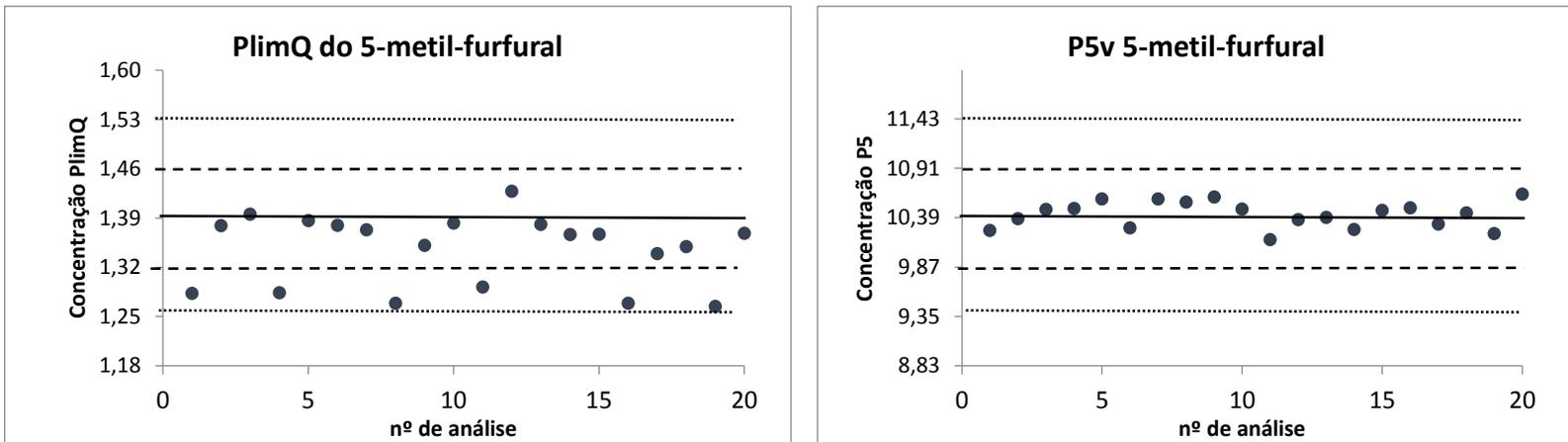


Figura III: Cartas de controlo do composto 5-metil.furfural para os padrões extremos n=20, concentração em mg/L

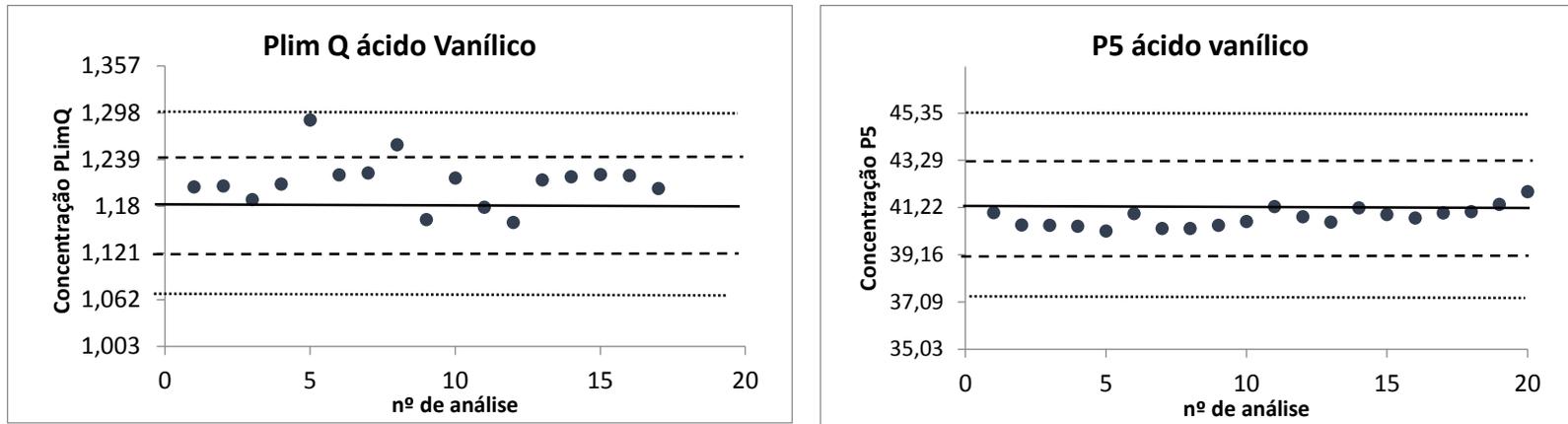


Figura IV: Cartas de controle do composto ácido vanílico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

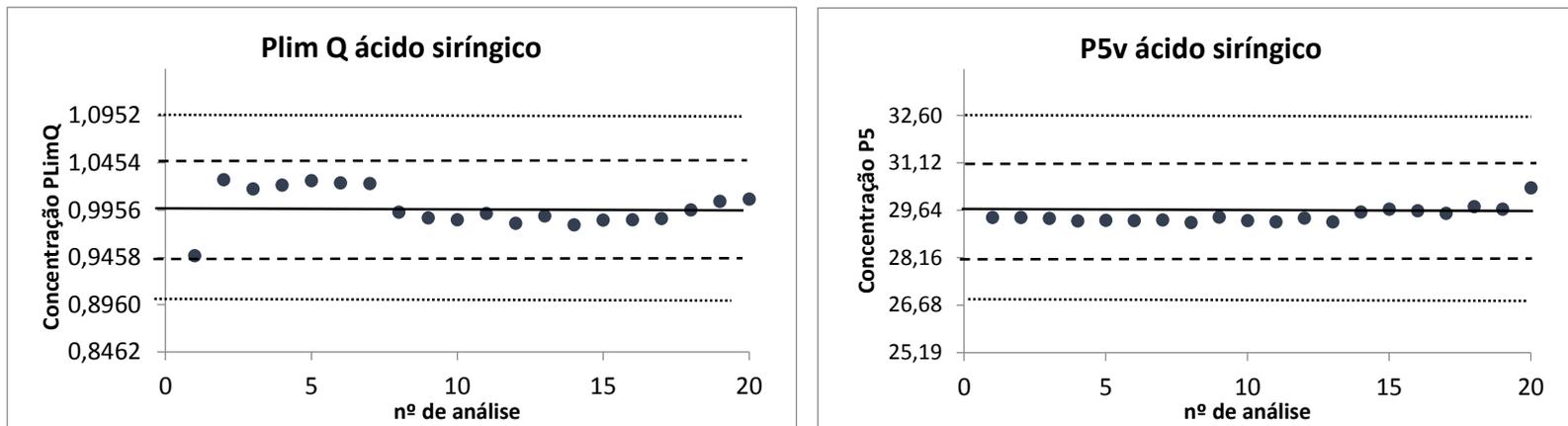


Figura V: Cartas de controle do composto ácido siríntrico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

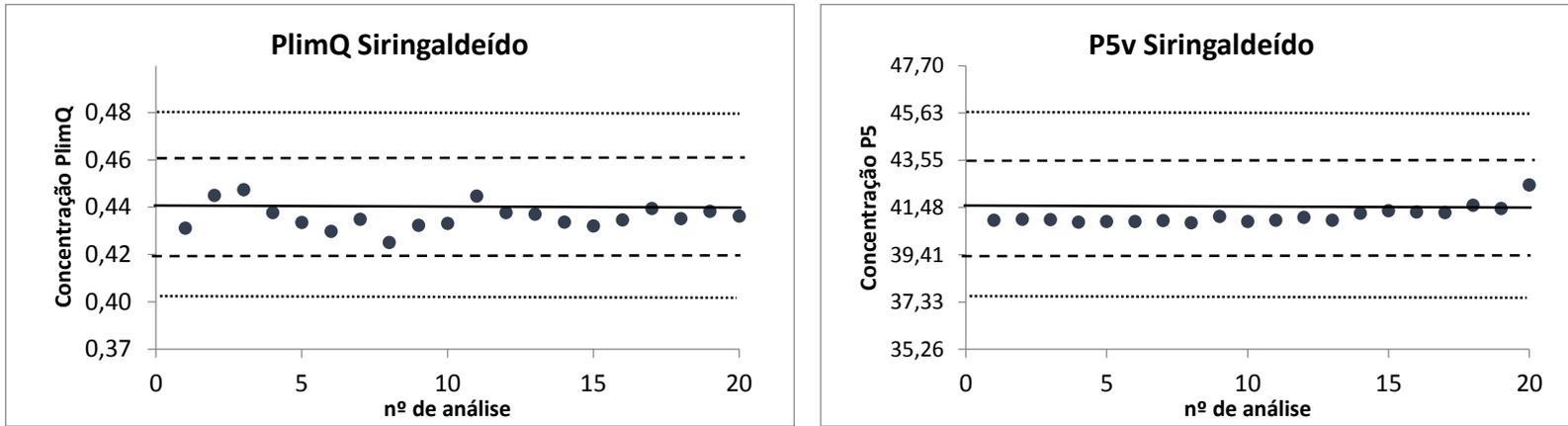


Figura VI: Cartas de controlo do composto siringaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

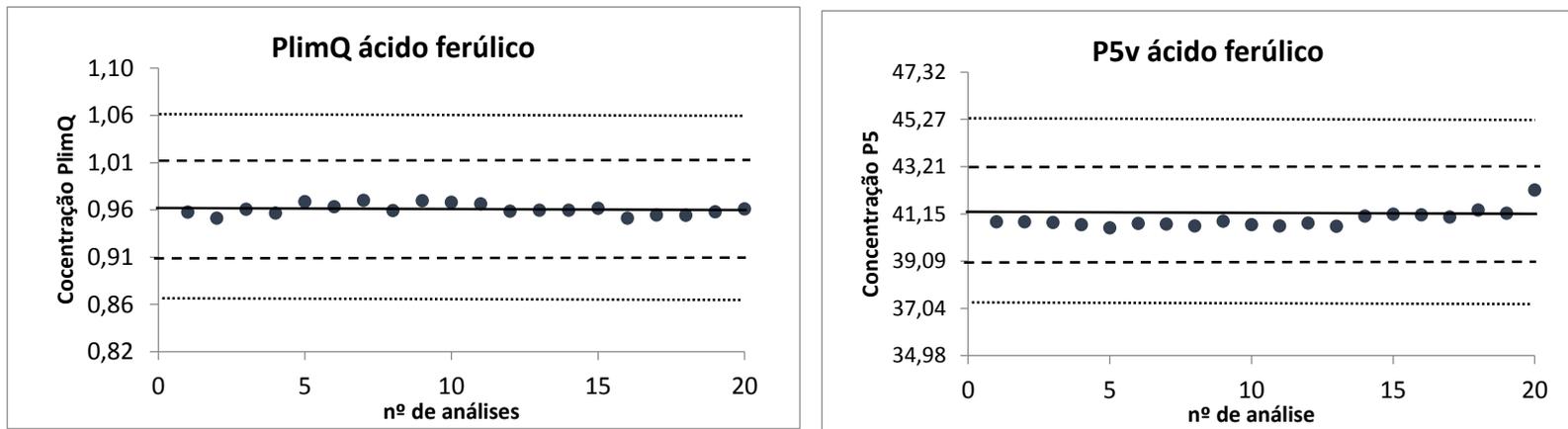


Figura VII: Cartas de controlo do composto ácido ferúlico para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

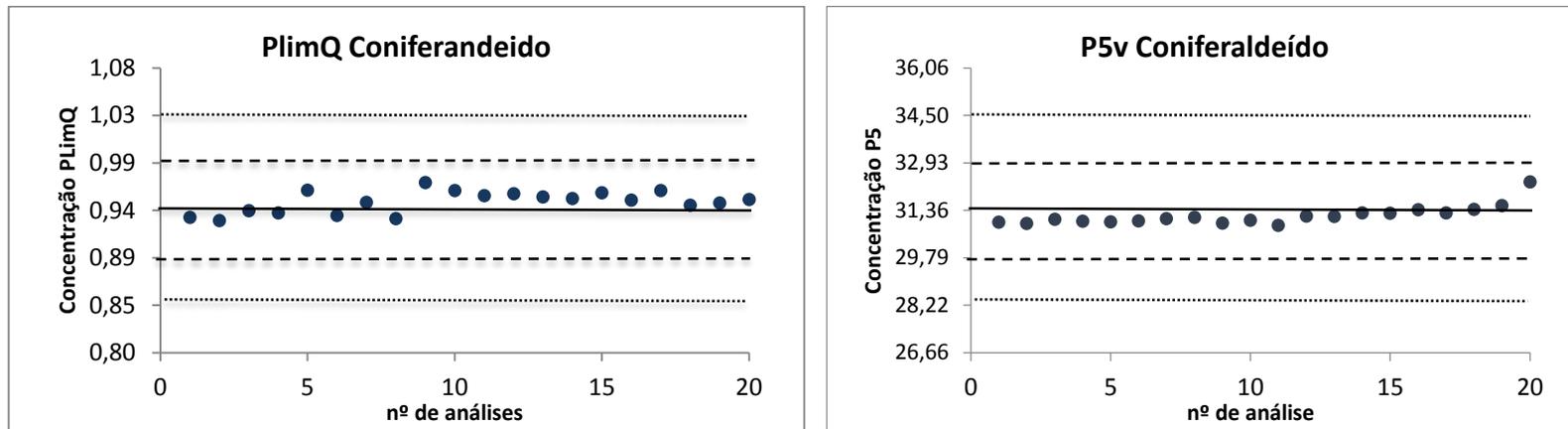


Figura VII: Cartas de controlo do composto coniferaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

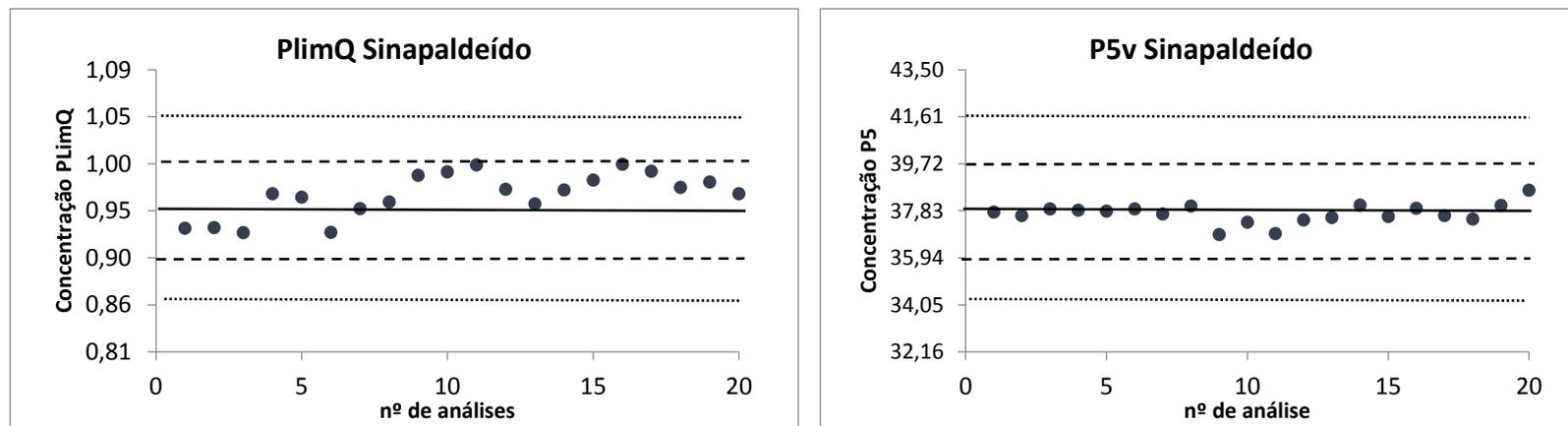


Figura IX: Cartas de controlo do composto sinapaldeído para os padrões extremos; n=20, concentração em mg/L

Anexo D: Cálculo de Incerteza

A incerteza dos resultados foi estimada usando os valores de concentração e desvio padrão respetivos obtidos pelo estudo da precisão intermédia (PI) para os diferentes analitos. A título de exemplo utilizou-se os resultados do ácido gálico.

Tabela I: Cálculos para incerteza combinada e incerteza expandida para os resultados de ácido gálico

mg/l	mg/l		Adimensional	%	%	
Concentração (x)	Desvio padrão PI (s)	$RSD = \frac{s}{x} \times 100$	$u_p = \sqrt{\left(\frac{\text{tolerancia}}{\sqrt{3}}\right)^2 + (RSD)^2}$	$U_{exp} = u * k * 100$	$U_{cat} = \frac{U_{exp}}{x} / 100$	$U_{exp} \times 100$
1,28	0,058	4,53	0,054	10,7	0,14	
4,99	0,29	5,71	0,064	12,8	0,64	
11,5	0,21	1,83	0,034	6,8	0,79	
15,25	0,20	1,34	0,032	6,4	0,97	13
15,69	0,58	3,68	0,047	9,4	1,47	
26,16	0,25	0,94	0,030	6,1	1,59	
40,49	0,48	1,17	0,031	6,2	2,52	

u = Incerteza combinada; U_{exp} = incerteza expandida; U_{cat} = Incerteza calculada; k = fator de expansão ($k=2$); Tolerância = 0,05

Tabela II: Incerteza expandida em percentagem para os resultados dos diferentes analitos

Analito	Ácido gálico	5-hidroximetilfurfural	Furfural	5-metilfurfural	Ácido vanílico	Ácido siríngico	Siringaldeído	Ácido ferúlico	Coniferaldeído	Sinapaldeído
Incerteza (%)	± 13	± 13	± 15	± 15	± 14	± 14	± 17	± 13	± 13	± 15

Anexos E: Gráficos da análise estatística

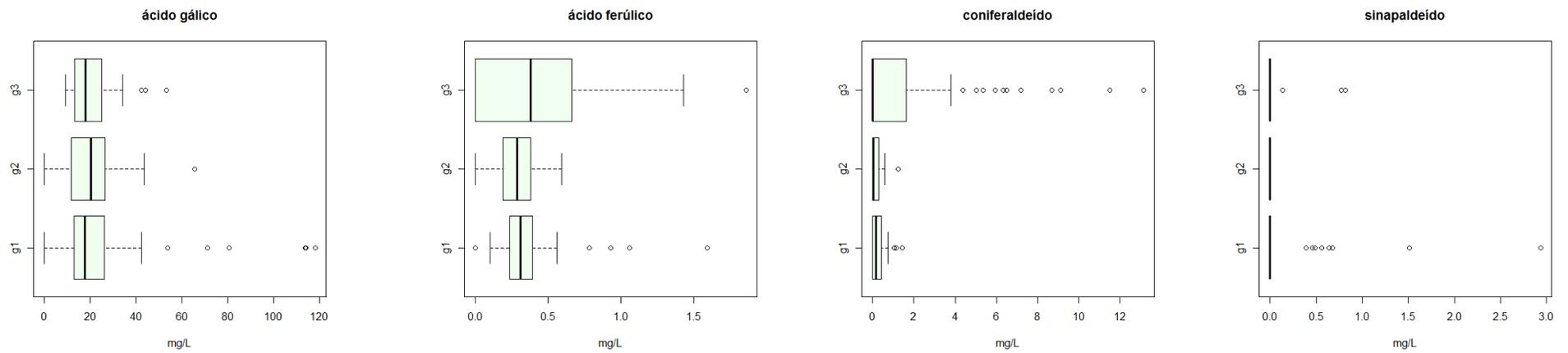


Figura X: Comparação dos 3 grupos de vinhos do Porto através de diagramas de extremos e quartis para o ácido gálico, ácido ferúlico, coniferaldeído e sinapaldeído

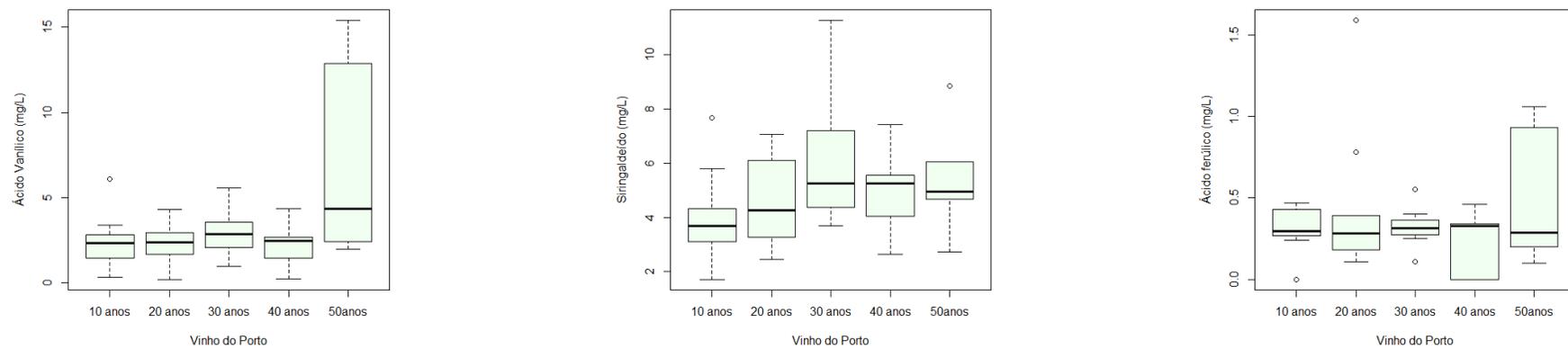


Figura XI: Comparação dos diferentes vinhos com indicação de idade através de diagramas de extremos e quartis para o ácido vanílico, siringaldeído e ácido ferúlico



Figura XI: Comparação dos diferentes vinhos com indicação de idade através de diagramas de extremos e quartis para o coniferaldeído e sinapaldeído