



# Novos Equipamentos ao Serviço do Controlo de Produtos Enológicos

A. César Silva Ferreira – [ferreira@esb.ucp.pt](mailto:ferreira@esb.ucp.pt)  
Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa  
- Portugal -

---

---

---

---

---

---

---

---



## Objectivo:

Contributo das novas Tecnologias na aferição da Autenticidade do Vinho: Estratégias, Riscos e Oportunidades.

❖ A Ionização a pressão atmosférica: Selectividade e Sensibilidade

Caracterização por um número reduzido de atributos

❖ Análise Multivariada : “Anatomia do Vinho”

Caracterização por um elevado número de atributos

9/27/10

ALABE

2

---

---

---

---

---

---

---

---



## Autenticidade...

*“ Se desejares saber se ao teu vinho foi ou não adicionada água, usa uma taça pequena de marfim. Encha-a com o vinho que pensas ter sido adulterado. Caso tenha sido adicionado água, o vinho será absorvido pela taça ficando só a água pois uma taça de marfim não retém o vinho...”*

Marcus R. Cato, De Agricultura, (234-149 B.C.)



---

---

---

---

---

---

---

---



## Definição do dicionário

### Autenticidade é ...

... "Qualidade do que é conforme à verdade ; veracidade ;" ... "Qualidade de uma obra que comprovadamente pertence ao autor a que é atribuída " ...

In Porto Editora Dic 2007

9/27/10

ALABE

4

---

---

---

---

---

---

---

---



## Definição do dicionário

### Autenticidade é ...

... " **Qualidade** do que é conforme à verdade ; veracidade ;" ... "**Qualidade** de uma obra que comprovadamente pertence ao autor a que é atribuída " ...

In Porto Editora Dic 2007

9/27/10

ALABE

5

---

---

---

---

---

---

---

---



## Qualidade tecnológica

Conjunto de parâmetros físico-químicas, que permitem distinguir o produto e que senão respeitados inviabilizam o seu Consumo !



---

---

---

---

---

---

---

---

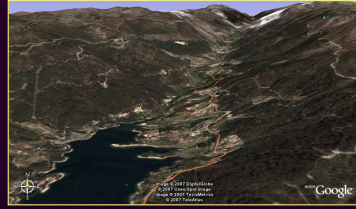


## Qualidade "tecnológica" do vinho:

Etapas na definição dos parâmetros típicos do produto

1- Identificar :  
Cartografia

2 - Quantificar :  
Topografia



---

---

---


---

---

---

---

---

Qualidade tecnológica 

Autenticidade...



9/27/10

ALABE

8

---

---

---


---

---


---

---

---

Qualidade tecnológica : Detectores 

Química do vinho...




---

---

---

---

---

---

---


---

9/27/10

ALABE

10

Química do vinho...



UV-Visível :  
Absorção Molecular

---

---

---

---

---

---

---


9/27/10

ALABE

11

Qualidade tecnológica : Detectores

Química do vinho...



Fluorescência

---

---

---

---

---

---

---


9/27/10

ALABE

12

Qualidade tecnológica : Detectores

Química do vinho...



Infra-Vermelho

---

---

---

---

---

---

---

Supressão Ruído : Cromatografia



Fase Estacionaria

*Fase Móvel*

Fase Estacionaria

**separar da matriz...**

9/27/10 ALABE 13

---

---

---

---

---

---

---

---

Sensibilidade

Supressão Ruído : Cromatografia



Fase Estacionaria

*Fase Móvel*

Fase Estacionaria

**Gradiente na : Melhor Separação**

9/27/10 ALABE 14

---

---

---

---

---

---

---

---

Sensibilidade

Supressão Ruído : Cromatografia



**Maior Sensibilidade**



9/27/10 ALABE 15

---

---

---

---

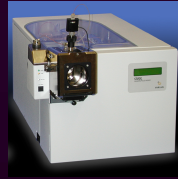
---

---

---

---

## Detecção por Espectrometria de Massa :



- Alta selectividade
- Elevada sensibilidade

9/27/10

ALABE

16

---

---

---

---

---

---

---

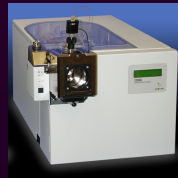
---

## Cadeia de Análise: MS



Separação

Ionização



Detecção

Interpretação

9/27/10

ALABE

17

---

---

---

---

---

---

---

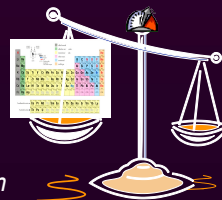
---

## MS : O que é ?



*“Um sistema analítico que permite determinar o peso molecular de substâncias químicas...*

*... por separação de fragmentos iónicos em função do seu rácio massa-carga ( $m/z$ )”*



9/27/10

ALABE

18

---

---

---

---

---

---

---

---

... Introduzir uma partícula iónica num campo magnético e/ou eléctrico para a separação de íons !!!

Encontrar um processo de separação de íons para um átomo ou uma molécula (ionização)  
 raio de curvatura relativa ao quociente *massa/carga*...

Ion Source    Mass Analyzer    Detector

9/27/10    ALABE    19

---

---

---

---

---

---

---

---

Ionização : GC

Substâncias voláteis...

↓

**EI: Impacto Electrónico**

9/27/10    ALABE    20

---

---

---

---

---

---

---

---

Ionização : GC

**EI: Impacto Electrónico**

$ABCD + e^- \rightarrow ABCD^{+*} + 2e^- \dots \rightarrow DBC^{+*}$   
 (~70 eV ; 6700 kJ/mol)

$A^+ + BCD^+$      $A^+ + BCD^{+*}$      $D^{+*} + BC^+$   
 $AB^+ + CD^+$      $CD^+ + AB^+$      $D^+ + BC^+$   
 $C + D^+$      $C^+ + D$      $A^+ + B$      $A + B^+$

... FRAGMENTAÇÃO

---

---

---

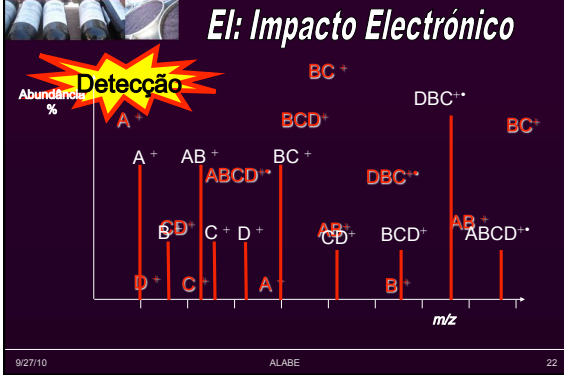
---

---

---

---

---




---

---

---

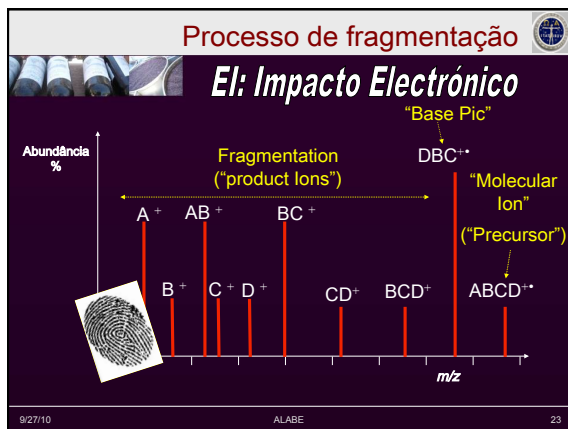
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

... como aceder ao potencial do MS em substâncias NÃO voláteis...

?????

---

---

---

---

---

---

---

---



# Como Introduzir Carga ?????

---

---

---

---

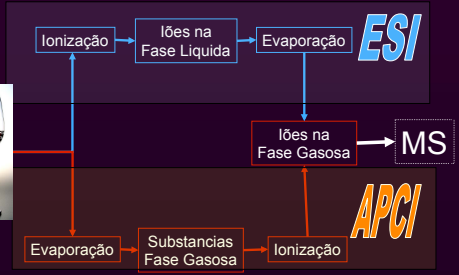
---

---

---

---

## Ionização : LC



---

---

---

---

---

---

---

---

# Electrospray Ionization ESI

---

---

---

---

---

---

---

---

**John Fenn** and co-workers first published the successful ionization of large synthetic polymers (PEGs), and subsequently proteins, using the electrospray ionization (ESI) technique in the late 1980's while working at Yale University. Fenn's work built on that of Malcolm Dole from Northwestern University in the late 1960's. Fenn added a counter-current dry gas to assist with the drying of the electrosprayed droplets that greatly assisted in the formation and detection of ions.

9/27/10 ALABE 28

---

---

---

---

---

---

---

---

### Etapas no Processo Electrospray

Transferência de íons da superfície das gotas  
 Redução do tamanho da Gota  
 Evaporação rápida do Solvente  
 Explosões Reperidas sem calor devido a forças de Coulomb (nissão)  
 "Analyser" ...

Capilar +/- 4 kV

9/27/10 ALABE 29

---

---

---

---

---

---

---

---

### Etapas no Processo Electrospray

**"Explosão Coulômbica"**  
 Provoca...  
**"Spray"** de partículas carregadas

Agulha Spray  
 Cone de "Taylor"  
 Gotículas pequenas  
**Alta Densidade de Cargas**  
 Gotículas tamanho Intermédio  
 Gotas grandes não carregadas (solvente)

9/27/10 ALABE 30

---

---

---

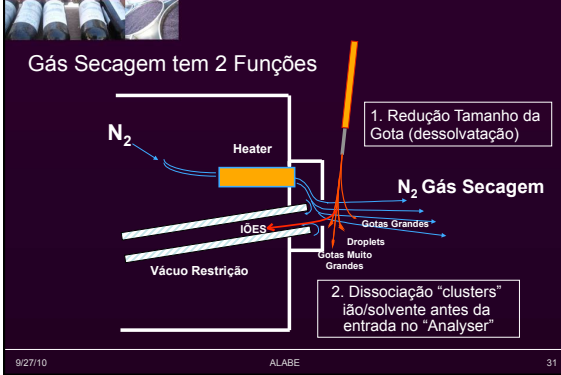
---

---

---

---

---




---

---

---

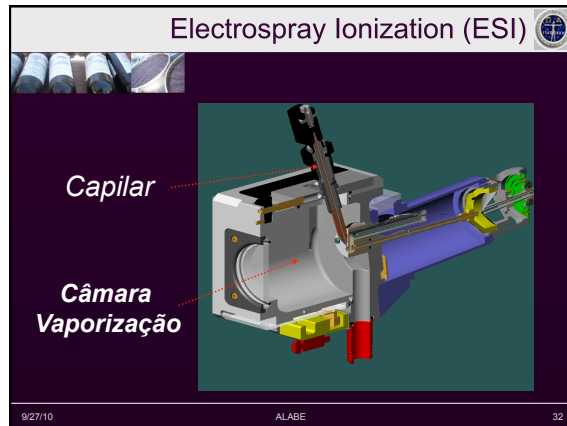
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

## F.M. : Escolha polaridade e pH

Det. modo (+)	• Amostras Base (peptidos arginina, Lisina...)		
	• Diminuir pH	Acido acético Acido Fórmico Acido Trifluoracético	pH (3-4) pH (2-3) pH (1-2)
• pH Fase móvel 2 unidades < pKa Amostra			
Det. modo (-)	• Amostras Acidas (peptidos aspart., glutamato...)		
	• Aumentar pH	Hidróxido de Amónia	pH (8-10)
• pH Fase móvel 2 unidades > pKa Amostra			

**Amostras Neutras : APCI**

9/27/10 ALABE 34

---

---

---

---

---

---

---

---

## Atmospheric Pressure Chemical Ionization APCI

9/27/10 ALABE 35

---

---

---

---

---

---

---

---

### Aplicações APCI ?

- SIM SE Moléculas pequenas não-polares ou moderadamente polares
- SIM SE Moléculas com heteroátomos.
- NÃO SE amostras carregadas em solução
- NÃO SE amostras termo instáveis ou fotossensíveis

9/27/10 ALABE 36

---

---

---

---

---

---

---

---



- Vaporiza Rapidamente fase móvel

---

---

---

---

---

---

---

---



### Etapas no Processo APCI

- Vaporiza Rapidamente fase móvel
- Ionização moléculas de solvente pela descarga corona

---

---

---

---

---

---

---

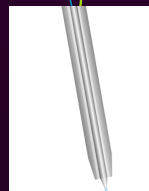
---



### Vaporização APCI

- Etapa #1: Nublização
  - Nebulização aumenta o rácio  $\frac{\text{Área}}{\text{Volume}}$

Líquido Gás : Nublização




---

---

---

---

---

---

---

---

Gás Secagem  
 Líquido  
 Gás : Nublização  
 Tubo quartzo  
 Fluxo Gás Quente Vortex

- APCI : é uma reacção na fase gasosa
- Analito deve estar disponível na forma molecular estável na fase gasosa
- Componentes da matriz podem sofrer evaporação destrutiva
- Evaporação depende de Gás Auxiliar muito Quente

9/27/10 ALABE 40

---

---

---

---

---

---

---

---

### "Declustering" com o Gás Secagem

Vaporização  
 Agulha "Corona"  
 Gás N<sub>2</sub> Secagem  
 Solvente & Iões  
 Iões  
 Fluxo do gás de secagem APCI< ESI

9/27/10 ALABE 41

---

---

---

---

---

---

---

---

### Ionização e Câmara de APCI

Os gases de Nublização e auxiliar além da fase móvel e moléculas no estado gasoso entram na câmara APCI

Agulha "Corona"  
 Ionização Química Ocorre entre a agulha Corona e o Spray

9/27/10 ALABE 42

---

---

---

---

---

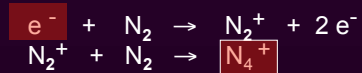
---

---

---



Inicia-se a Ionização com impacto de electrões da agulha corona nos gases abundantes neutros abundante...




---

---

---

---

---

---

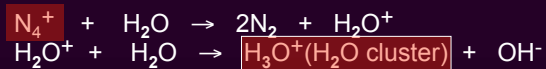
---

---

### Processo Ionização APCI



Cascata de reacções de transferência de carga para a fase móvel exemplo da H<sub>2</sub>O...




---

---

---

---

---

---

---

---

### Processo Ionização APCI



Cascata de reacções de transferência de carga da H<sub>2</sub>O para Solvente Orgânico metanol...




---

---

---

---

---

---

---

---



## Cascata de reacções de transferência de carga para o Analito...



9/27/10

ALABE

46

---

---

---


---

---

---

---

---



### Reacções Ião-Molécula APCI

## Mediação do Solvente

- ◆ Ião (+) APCI
  - Transferência de Protão (Ganho) :  $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{M} \rightarrow (\text{M}+\text{H})^+ + \text{H}_2\text{O}$ 
    - também ...  $\text{CH}_3\text{OH}_2^+, \text{CH}_3\text{CNH}^+, \text{NH}_4^+$        $\text{N}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
  - Ligação de Aducto :  $\text{NH}_4^+ + \text{M} \rightarrow (\text{M}+\text{NH}_4)^+$        $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4$ 
    - também ...  $\text{CH}_3\text{OH}_2^+, \text{CH}_3\text{CNH}^+, \text{H}_3\text{O}^+$
  - Troca de Carga:  $\text{CH}_3\text{CN}^+ + \text{M} \rightarrow \text{M}^+ + \text{CH}_3\text{CN}$
- ◆ Ião (-) APCI
  - Transferência de Protão (Perda) :  $\text{OH}^- + \text{M} \rightarrow (\text{M}-\text{H})^- + \text{H}_2\text{O}$ 
    - também ...  $\text{CH}_3\text{O}^-, \text{CH}_2\text{CN}^-$
  - Ligação de Aducto :  $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{M} \rightarrow (\text{M}+\text{CH}_3\text{COO})^-$ 
    - também ...  $\text{Cl}^-, \text{HCOO}^-$
  - Captura de Electrão

9/27/10

ALABE

47

---

---

---


---

---

---

---

---



### Iões Reagentes em Fase Reversa

- Sem Aditivos (aquosa/orgânica):
  - APCI (+)                      -  $[\text{CH}_3\text{OH}_2]^+$
  - APCI (-)                      -  $\text{O}_2^-$
- Com Aditivos, Ião mais fraco do reagente é o dominante...
  - APCI (+)                      -  $\text{NH}_4^+$
  - APCI (-)                      -  $\text{CH}_3\text{COO}^-$
- A acidez (ou bas.) relativa na fase gasosa é crítica em CI

---

---

---

---

---

---

---

---

## Autenticidade...

9/27/10

ALABE

49

---

---

---

---

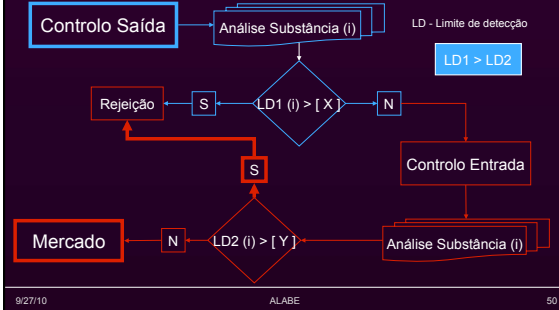
---

---

---

---

## Riscos...



9/27/10

ALABE

50

---

---

---

---

---

---

---

---

## Autenticidade

### Exemplos Adulteração de Bebidas Alcoólicas

- Adição de ingredientes mais baratos (água, açúcar, álcool)
- Adição de Corantes e Aromatizantes
- Adição de outros compostos com "actividade sensorial": Glicerol
- "Blending" com produtos mais baratos
- Indicação de Idade
- Origem Geográfica

---

---

---

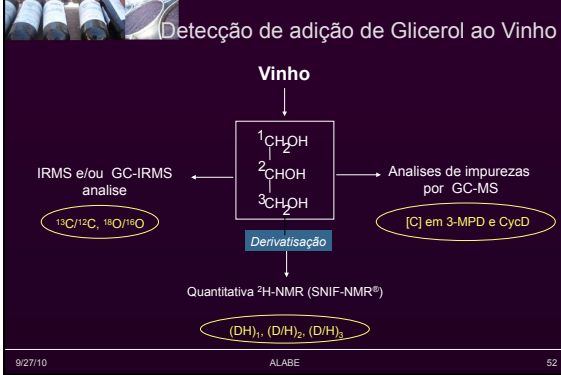
---

---

---

---

---




---

---

---

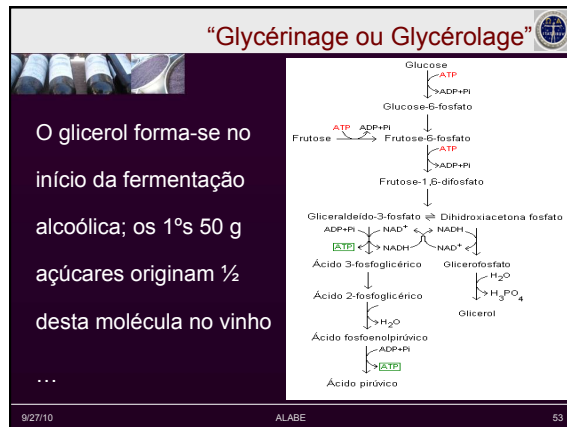
---

---

---

---

---




---

---

---

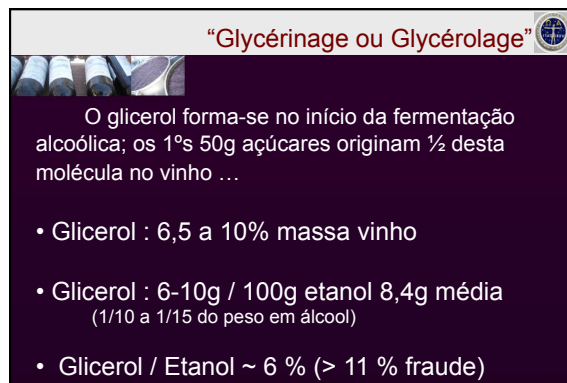
---

---

---

---

---




---

---

---

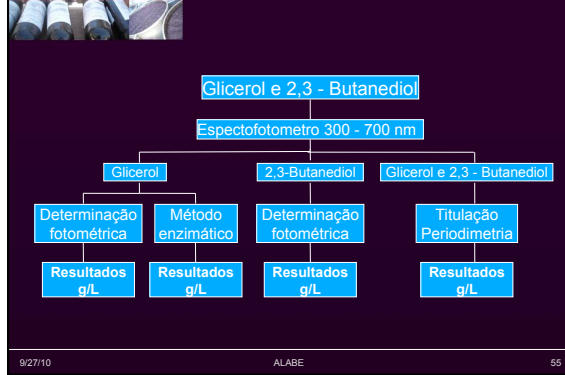
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### Diglicerina Cíclica: 3-MPD e CycD

*Adição de glicerol produzido a partir de gordura e/ou de petróleo contém o metoxi-1,2-propanediol (3-MPD) e glicerol dicíclico.*

*Estes compostos são inexistentes no vinho.*

9/27/10 ALABE 56

---

---

---

---

---

---

---

---

### Diglicerina Cíclica: 3-MPD e CycD

COCC(O)CO 3-Metoxi-propanediol (3-MPD)

OCC1OC(O)CO1 OCC1OC(O)CO1 cis,trans-2-hidroximetil-1,4-dioxepane

OCC1OC(O)CO1 OCC1OC(O)CO1 cis,trans-2,5-bis-hidroximetil-1,4-dioxane

OCC1OC(O)CO1 OCC1OC(O)CO1 cis,trans-2,6-bis-hidroximetil-1,4-dioxane

---

---

---


---

---

---

---

---



- “Salting out” : Adição de  $K_2CO_3$ ;
- Extração Líquido - Líquido : Éter dietílico;
- Análise por GC-MS numa coluna polar (FFAO/ CW20M);
- Detecção por espectrometria de massa
  - Selected-ion monitoring (SIM) mode : Q
  - Full Scan : ITD
  - Quantificação  $m/z=57$

9/27/10 ALABE 58

---

---

---

---


---

---

---

---

### Método análise 3-MPD e CycDs : GCMS



```

    graph TD
      A[10 ml Vinho Padrão Interno] --> B[Adição 10 g K2CO3]
      B --> C[Solução a 20 °C num banho água]
      C --> D[Adicionar 1 mL Éter dietílico]
      D --> E[Agitar 5 min]
      E --> F[Centrifugar a Solução a 4000 rpm ;5 min]
      F --> G[GCMS]
      G --> H[GCMS]
  
```

9/27/10 ALABE 59

---

---

---

---


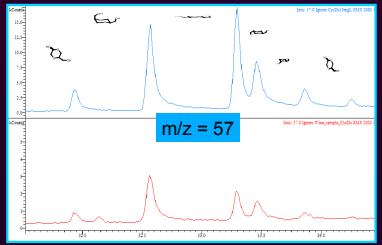
---

---

---

---

### Método análise 3-MPD e CycDs : GCMS

Referência 4.0 mg/L

$m/z = 57$

Vinho Contaminado 1.4 mg/L

---

---

---

---

---

---

---

---

# Desenvolvimento Método Quantificação de 3-MPD e CycDs por LC-MSMS ESI (+)

---

---

---

---

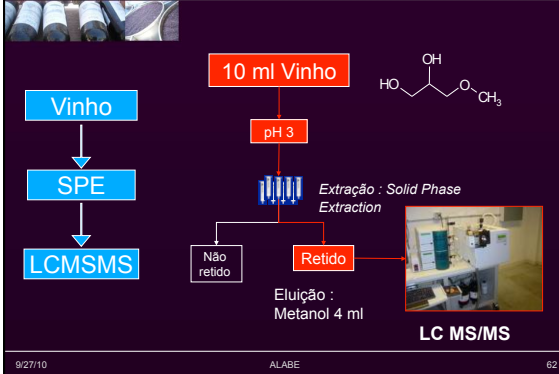
---

---

---

---

## Método análise 3-MPD e CycDs : LCMSMS




---

---

---

---

---

---

---

---

## Método análise 3-MPD e CycDs : LCMSMS

Instrument parameters	3-MPD	CycDs
Polarity	Positive	Positive
API drying gas	19 psi at 250 °C	19 psi at 350 °C
API chamber temperature	50 °C	50 °C
API nebulizing gas	Air 51 psi	Air 51 psi
Capillary voltage	+ 20 V	+ 20 V
Q2 collision cell pressure	Argon 1.30 mtorr	Argon 1.30 mtorr
Collision energy (V)	-5.0 V	-5.0 V
LC flow	0.3 ml/min	0.3 ml/min
Mobile phase	MetOH/H <sub>2</sub> O (80/20 v/v)	MetOH/H <sub>2</sub> O (80/20 v/v)
Scan time	0.2 sec.	0.2 sec.
Needle voltage	4500 V	4500 V
Shield voltage	600 V	600 V
Detector voltage	Positive Extended Dynamic Range	Positive Extended Dynamic Range
Precursor ion (m/z)	107	149

---

---

---

---

---

---

---

---

**3-MPD**

• Vinho Branco

• Intervalo Concentração 0,1 - 1,4 mg/L;

COC(O)CO

**[3-MPD] = 0,30 mg/L**

Curva Calibração

9/27/10 ALABE 64

---

---

---

---

---

---

---

---

**Método análise 3-MPD e CycDs : LCMSMS**

**CycDs**

• Vinho Branco

• Intervalo Concentração 0,1 – 2, mg/L

OCC1OC(O)C(O)C1O

**[CysDs] = 1,43 mg/L**

9/27/10 ALABE 65

---

---

---

---

---

---

---

---

**Métodos 3-MPD e CycDs : Comparação**

		Limite de Detecção	
		3-MPD	CycDs
GC-MS	130 min PA DS	0,10 mg/L	0,05 mg/L
LC-MS	20 min PA DS	0,03 mg/L	0,05 mg/L

**10 vezes menor!**

tempo →

9/27/10 ALABE 66

---

---

---

---

---

---

---

---

**Antocianinas da uva**

**Antocianina da baga de sabugueiro**

**Malvidina-glucósido**

**Cianidina-sambubiosido**

9/27/10 ALABE 67

---

---

---

---

---

---

---

---

**Castas « non-Vitis vinifera »**

- Híbridos Tintos (Ribéreau-Gayon, 1954)
  - Malvidin-3,5-diglucoside
- Híbridos brancos
  - antranilato de metilo (Power et Chesnut, 1921)
  - o-aminoacetofenona (Acree *et al.*, 1990)
  - Furaneol (Rapp *et al.*, 1980)

9/27/10 ALABE 68

---

---

---

---

---

---

---

---

**Malvidina diglucosideo (OIV)**

**Método de referência (OIV):**

- Malvidin diglucosideo, oxida-se na presença de ácido nítrico;
- Emite uma cor verde viva (fluorescente) quando exposta a uma luz ultravioleta;
- A intensidade da cor fluorescente é medida pela comparação com a fluorescência de uma solução titulada com sulfato de quinino.

9/27/10 ALABE 69

---

---

---

---

---

---

---

---



# Qualidade da Uva

9/27/10 ALABE 73

---

---

---

---

---

---

---

---

# Processamento Multivariado: Vis-NIR

## Qualidade da Uva

9/27/10 ALABE 74

---

---

---

---

---

---

---

---

# Processamento Multivariado: Vis-NIR

## Qualidade da Uva

9/27/10 ALABE 74

---

---

---

---

---

---

---

---

**Análise do espectro**

O Que é Sinal ? O que é Ruído ?

Vamos comparar 1 a 1 ??

3648 variáveis diferentes... em 50 espectros

$$C = \frac{n!}{[(n-p)! * p!]}$$

9/27/10 ALABE 76

---

---

---

---

---

---

---

---

**Processamento Multivariado: Algoritmo**

**Análise do espectro**

Aquisição do Espectro

Filtrar Erros de Sinal/Luz Externa

Correcção de ângulo e posição

Espectro Corrigido

Análise Multivariada

Determinar o primeiro valor próprio da matrix por decomposição de valores singulares, ...

Sensor Matemático Sinal

9/27/10 ALABE 77

---

---

---

---

---

---

---

---

**Processamento Multivariado: Vis-NIR**

**Redução de dimensões e categorização : HPLC**

Correcção: Invariantes ao ângulo e Posição de Fibra Óptica

Cada ponto é um Espectro

9/27/10 ALABE 78

---

---

---

---

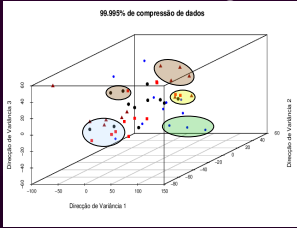
---

---

---

---

**Redução de dimensões e categorização : HPLC**



99.99% de compressão de dados

Inclusão de mais um Eixo:  
Maior Resolução

9/27/10 ALABE 79

---

---

---

---

---

---

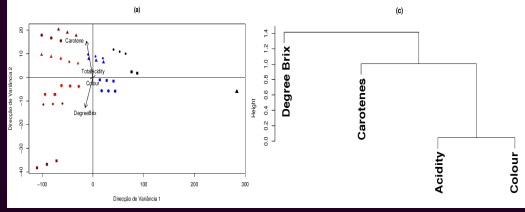
---

---

**Processamento Multivariado: HPLC**

**Redução de dimensões e categorização : HPLC**

Relação com dados químicos...



9/27/10 ALABE 80

---

---

---

---

---

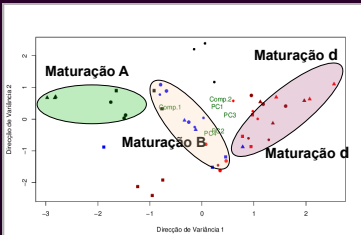
---

---

---

**Processamento Multivariado: FUSÃO**

**FUSÃO**



Descriminação das Diferentes Maturações!

9/27/10 ALABE 81

---

---

---

---

---

---

---

---

**Idade do vinho do Porto**





**GC-FID**

9/27/10 ALABE 82

---

---

---

---

---

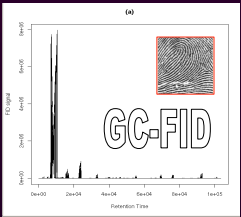
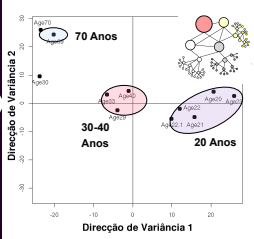
---

---

---

**Processamento Multivariado : FID**

**Redução de dimensões e categorização : FID**

9/27/10 ALABE 83

---

---

---

---

---

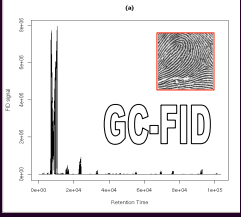
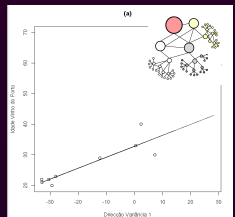
---

---

---

**Processamento Multivariado : FID**

**Calibração**

9/27/10 ALABE 84

---

---

---

---

---

---

---

---

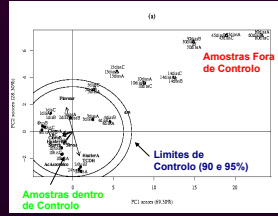


# Carta de Controle Multivariado

Sensores Quantitativos

Sensores Inferenciais

Sensores Categóricos



---

---

---

---

---

---

---