

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

***2,4,6 – Tricloroanisol: validação do método de
análise e estudos de adsorção e dessorção em
rolhas de cortiça***

Dissertação de Mestrado em Enologia

de

Maria Filomena Paiva de Fonseca

Realizado em

Amorim & Irmãos S.A



Orientadora na UTAD: **Prof.^a Doutora Lucinda Reis**

Orientador na Amorim & Irmãos S.A: **Prof. Doutor Miguel Cabral**

Escola de Ciências da Vida e do Ambiente



Vila Real, Julho 2013

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

***2,4,6 – Tricloroanisol: validação do método de
análise e estudos de adsorção e dessorção em
rolhas de cortiça***

Dissertação de Mestrado em Enologia

de

Maria Filomena Paiva de Fonseca

Orientadora na UTAD: **Prof^a Doutora Lucinda Reis**

Orientador na Amorim & Irmãos S.A: **Prof. Doutor Miguel Cabral**

Composição do Júri:

Vila Real, Julho 2013

Agradecimentos

Dirijo as minhas primeiras palavras, ao Prof. Doutor Miguel Cabral, pela oportunidade de ingressar numa empresa como a Amorim & Irmãos, invocando um sincero e especial agradecimento, por todo o apoio e dedicação a este projeto. À Prof.^a Doutora Lucinda Reis, por todo o apoio e amizade ao longo do projeto. Às colaboradoras do I&D, Ana Malheiro, Eliana Reis, Patrícia Oliveira e Salomé Reis, agradeço toda a ajuda prestada, à Ana Malheiro em particular, por todo o acompanhamento e, ajuda ao longo de todo o projeto. Aos colegas de estágio, Miguel China, e Hugo Amorim pelo companheirismo e amizade, durante o estágio. Ao Carlos Costa por todo o carinho e apoio durante estes onze meses. Ao Doutor Paulo Lopes por toda a ajuda prestada na revisão da tese. À Doutora Isabel Roseira pela sua simpatia e pelas palavras amigas. Aos colaboradores do Labcork, por todo o convívio e amizade, querendo expressar um agradecimento especial, ao Paulo Aguiar por toda a ajuda e apoio ao longo de todo o projeto. E a todos os meus professores, quero deixar aqui um louvor pela excelência do ensino, e pela disponibilidade, na ajuda prestada. Finalmente à minha família, pelo apoio incondicional, em especial à minha mãe, por me ouvir nas horas mais difíceis.

Resumo

A cortiça assume uma posição de destaque no contexto da economia portuguesa, pelo volume de exportações e pelo volume de empregabilidade associado. Neste contexto a Amorim & Irmãos, S.A, tem um papel determinante na procura de inovação e qualidade dos seus processos e métodos, melhorando assim a qualidade dos produtos.

Na primeira parte deste projeto de investigação, foi realizada a validação do método analítico de 2,4,6-tricloroanisol, por cromatografia em fase gasosa com o objetivo de assegurar a fiabilidade dos resultados e de verificar o desempenho dos equipamentos, estudando os seguintes parâmetros: gama de trabalho, linearidade, limiares analíticos, precisão, repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e robustez. Em todas as análises foram usados os métodos SPME/GC/ECD e SPME/GC/MS.

A segunda parte do projeto foi destinada, ao estudo da cinética de migração do binómio vinho/rolha e rolha/vinho, tendo como objetivo conhecer a dualidade de transferência do 2,4,6-tricloroanisol podendo assim quantificá-la. Este estudo, reveste-se da maior importância para a empresa, pois permite o esclarecimento da origem da contaminação por 2,4,6-tricloroanisol em garrafas de vinho, que nem sempre está associada à contaminação das rolhas de cortiça.

Palavras-Chave: 2,4,6-tricloroanisol, validação de método, cinética de migração, vinho, rolha.

Abstract

Cork takes a prominent position in the context of the Portuguese economy, by the volume of exports and the volume associated with employability. In this context, Amorim & Irmãos, S.A., has a determinant role in the search of the innovation and in the quality of their processes and methods, thus improving the quality of products.

In the first part of this research project, were studied the following parameters: working range, linearity, analytical thresholds, precision, repeatability, intermediate precision and accuracy, robustness, for internal validation of the analytical method, in order to studying the compound 2,4,6-trichloroanisole and also check the performance of the equipment, ensuring the reliability of the results established in the department of I&D on Amorim & Irmãos, S.A. In all analysis, the methods used were SPME/GC/ECD and SPME/GC/MS.

The second part of the project was aimed at the study of migration kinetics of the binomial wine/cork stopper and cork stopper/wine, aiming to know the dual transfer of 2,4,6-trichloroanisole can thus quantify it. This study has a greatest importance to the company, because it allows clarifying the origin of contamination by 2,4,6-trichloroanisole in bottled wine, which is not always associated to the contamination of cork stoppers.

Key-Words: 2,4,6-trichloroanisole, method validation, migration kinetic, wine, cork stopper.

Declaração

Maria Filomena Paiva de Fonseca declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

(assinar e datar)

Índice

1	Apresentação da Amorim & Irmãos, S. A.....	1
2	Introdução	2
2.1	Composição química da cortiça.....	2
2.2	Fração aromática da cortiça	3
2.3	Anatomia da cortiça	4
2.4	Os diferentes tipos de rolhas de cortiça	5
2.4.1	O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) nas rolhas de cortiça.....	6
2.4.2	A origem dos haloanisóis	8
2.4.3	Mecanismos de formação de haloanisóis	8
2.4.4	Fontes de contaminação das rolhas de cortiça	9
2.4.5	Mecanismos de contaminação do vinho pelas rolhas de cortiça.....	10
2.4.6	Estratégia de prevenção, remoção e controlo de TCA	13
2.5	Enquadramento e contributos do projeto	14
3	Validação do método analítico de 2,4,6-TCA	17
3.1	Fundamentos da validação do método	17
3.1.1	Gama de trabalho/Linearidade	17
3.1.2	Limiares Analíticos: limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)	18
3.1.3	Precisão	19
3.1.4	Exatidão	21
3.1.5	Robustez.....	21
3.2	Material	22
3.3	Métodos	22
3.3.1	Método de análise de 2,4,6-TCA	22
3.4	Metodologia de validação do método de análise de 2,4,6-TCA.....	23
3.5	Resultados de validação do método de análise de 2,4,6-TCA	25
3.5.1	Linearidade	25
3.5.2	Gama de Trabalho	26

3.5.3	Limiares analíticos: limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)	26
3.5.4	Precisão	27
3.5.5	Exatidão	28
3.5.6	Robustez.....	29
3.6	Discussão dos resultados da validação	30
4	Cinética de adsorção e de dessorção de TCA de diferentes rolhas	31
4.1	Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho	31
4.1.1	Materiais.....	31
4.1.2	Métodos.....	31
4.1.3	Resultados.....	32
4.1.4	Discussão dos resultados.....	37
4.2	Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho	38
4.2.1	Materiais.....	38
4.2.2	Métodos.....	39
4.2.3	Resultados.....	40
4.2.4	Discussão dos resultados.....	45
5	Conclusões.....	47
6	Referências.....	48
7	Anexos	51
7.1	Anexo 1 - Procedimento experimental para análises cromatográficas	51
7.2	Anexo 2 - Gama de trabalho	55
7.3	Anexo 3 - Precisão: repetibilidade.....	58
7.4	Anexo 4 - Precisão: precisão intermédia	62
7.5	Anexo 5 - Robustez	65
7.6	Anexo 6 - Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho (rolhas naturais).....	68
7.7	Anexo 7 - Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho (rolhas microaglomeradas)	70

7.8	Anexo 8 - Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho (rolhas naturais)	72
7.9	Anexo 9 - Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho (rolhas microaglomeradas)	74

Índice de figuras

<i>Figura 1 - Roda de aromas da cortiça (Moutinho, 2008).</i>	4
<i>Figura 2 - Cortiça amadia em corte transversal (à esquerda) e tangencial (à direita), onde são visíveis os canais lenticulares que atravessam a cortiça, constituindo a sua porosidade (Graça, 2007).</i>	4
<i>Figura 3 - Diferentes tipos de rolhas de cortiça.</i>	5
<i>Figura 4 - Estrutura química dos diferentes haloanisóis responsáveis pelos desvios organolépticos do vinho (adaptado de Coque et al., 2006).</i>	7
<i>Figura 5- Mecanismo da formação do TCA, por biometilação. (Coque et al., 2006)</i>	9
<i>Figura 6 – Curva de calibração obtida no equipamento de cromatografia ECD2 que representa a linearidade do método.</i>	25
<i>Figura 7 – Curva de calibração obtida no equipamento de cromatografia GC-MS Shimadzu que representa a linearidade do método.</i>	26
<i>Figura 8 - Resultados do último ensaio interlaboratorial onde estão representados os valores de z-score.</i>	29
<i>Figura 9 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 5 ng/L e nas rolhas de cortiça natural, ao longo do tempo de engarrafamento.</i>	34
<i>Figura 10 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 20 ng/L e nas rolhas de cortiça natural, ao longo do tempo de engarrafamento.</i>	35
<i>Figura 11 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 5 ng/L e nas rolhas de cortiça microaglomerada, ao longo do tempo de engarrafamento.</i>	36

Figura 12 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 10 ng/L e nas rolhas de cortiça microaglomerada, ao longo do tempo de engarrafamento..... 37

Figura 13 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas de cortiça natural que possuíam uma contaminação inicial de TCA de 5 ng/L. 41

Figura 14 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas de cortiça natural que possuíam uma contaminação inicial de TCA de 20 ng/L..... 42

Figura 15 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial de TCA inferior a 0,5 ng/L. 43

Figura 16 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial média de TCA de 1,6 ng/L..... 44

Figura 17 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial média de TCA de 6,9 ng/L..... 45

Figura 18 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **5 ng/L**. 68

Figura 19 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **5 ng/L**..... 68

Figura 20 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **20 ng/L**..... 69

Figura 21- Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **20 ng/L**. 69

Figura 22 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **5 ng/L**.
..... 70

Figura 23 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **5 ng/L**..... 70

Figura 24 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **10 ng/L**..... 71

Figura 25 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **10 ng/L**. 71

Figura 26 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 5 ng/L**..... 72

Figura 27 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 5 ng/L**. 72

Figura 28 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 20 ng/L**. 73

Figura 29 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 20 ng/L**. 73

Figura 30 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial de TCA < 0,5 ng/L**. 75

Figura 31- Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial de TCA < 0,5 ng/L**. 75

Figura 32 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 1,6 ng/L**..... 76

Figura 33 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 1,6 ng/L**..... 76

Figura 34 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 6,9 ng/L**..... 77

Figura 35 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 6,9 ng/L**..... 77

Índice de tabelas

Tabela 1 - Limiares de deteção dos principais haloanisóis responsáveis pelos aromas do tipo mofo e bafio nos vinhos. 7

Tabela 2 - Valores médios de TCA, desvio padrão e respectivos coeficientes de variação para cada ponto da reta. 26

Tabela 3 - Resultados da repetibilidade para o ECD2 e o GC-MS Shimadzu. 27

Tabela 4 - Resultados da Precisão Intermédia para as duas amostras em todos os cromatógrafos.. 28

Tabela 5 - Precisão Intermédia global que inclui os resultados de todos os cromatógrafos, amostras e operadores). 28

Tabela 6 - Resultados globais da robustez..... 30

<i>Tabela 7 - Resultados da análise de TCA realizada às soluções simulantes de vinho contaminadas, utilizadas no engarrafamento.....</i>	<i>33</i>
--	-----------

<i>Tabela 8 - Concentração de TCA nas diferentes rolhas de cortiça naturais e microaglomeradas e da solução simulante de vinho utilizadas no engarrafamento.....</i>	<i>39</i>
--	-----------

Notação e Glossário

A (TCA)	Área do pico cromatográfico do 2,4,6-Tricloroanisol	ng/L
A (API)	Área do pico cromatográfico do padrão interno	ng/L

Lista de Siglas

A&I	Amorim & Irmãos
I&D	Investigação e Desenvolvimento
APCOR	Associação Portuguesa de Cortiça
C. E.	Confédération Européenne
CQC	Cork Quality Council
UE	União Europeia
NP	Norma Portuguesa
ISO	Internacional Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
SPME	Microextração em fase sólida
GC	Cromatografia gasosa
ECD	Detetor de captura electrónica
MS	Espectroscopia de massa
PDMS	Polidimetilsiloxano
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ng/L	nanogramas/litro
pg/L	picogramas/litro
µg/L	microgramas/litro
CPOMT	Clorofenol O-metiltransferase
TCA	2,3,6-Tricloroanisol
TeCA	2,3,4,6 - Tetracloroanisol
TBA	2,4,6-Tribromoanisol
PCA	Pentacloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol
d ₅ -TCA	2,4,6-Tricloroanisol deuterado

1 Apresentação da Amorim & Irmãos, S. A.

A Corticeira Amorim SGPS, S.A. (CA SGPS) é a maior empresa mundial de produtos de cortiça e uma das empresas portuguesas mais internacionalizada. Ela está dividida em 5 diferentes áreas de negócios, sendo a das rolhas, Amorim & Irmãos, S. A. (A&I), aquela que maior importância tem para a CA SGPS, representando cerca de 58,2% do seu volume de negócios. Na década de 90, esta unidade de negócios enfrentou o desafio da qualidade e transformou as ameaças em oportunidades. Investiu milhões de euros na instalação de unidades de processamento, equipadas com tecnologia de última geração, e assumiu uma atitude de constante aposta em Qualidade e Investigação & Desenvolvimento. Atualmente vende para 82 países e tem 8 unidades industriais e ainda 18 empresas de distribuição de rolhas de cortiça no exterior, desde a Europa aos mercados emergentes da Ásia, África do Sul, Austrália, Estados Unidos e América do Sul. Atualmente detém uma quota no mercado de 32%, sendo indiscutivelmente a unidade de negócios que maior quota de mercado tem no seio a CA SGPS. No ano 2012 foram vendidas 3,6 mil milhões de rolhas, e o objetivo da empresa é atingir vendas de 4 mil milhões de rolhas em 2015 (Miguel Cabral, comunicação pessoal). Graças a um avanço científico e tecnológico sem precedentes no setor, e a uma abordagem rigorosa na melhoria contínua da gama e da qualidade das rolhas de cortiça, os vitivinicultores têm hoje todas as garantias de *performance*, imagem e qualidade associadas às rolhas Amorim.

2 Introdução

Do revestimento exterior do tronco do sobreiro (*Quercus suber L.*), é extraída a cortiça. Esta árvore cresce nas regiões mediterrânicas tais como Espanha, Itália, França, Marrocos, Argélia e, principalmente em Portugal, onde existem cerca de 716 mil hectares de montado de sobreiro, constituindo uma importante barreira ao avanço da desertificação. É um dos mais ricos ecossistemas existentes, onde sobrevivem diversas espécies animais, demonstrando assim que é possível assegurar a exploração de um recurso natural, sem pôr em causa a sua sustentabilidade e preservação do ecossistema (Pereira *et al.*, 2008). O sobreiro é uma das poucas árvores que possui a capacidade de regeneração da sua casca e uma grande longevidade, vivendo em média 150 a 200 anos, apesar dos muitos descortiçamentos que lhe fazem ao longo da sua existência. No total são feitos aproximadamente cerca de dezasseis descortiçamentos intercalados por períodos mínimos de nove anos (APCOR, 2012).

A produção mundial de cortiça ascende a 201428 toneladas, destacando-se a nível individual Portugal como principal produtor com 49,6% da produção mundial, seguindo-se a Espanha e Marrocos (APCOR, 2012).

A cortiça possui propriedades únicas e inigualáveis; trata-se de um material muito leve (baixa densidade), impermeável a líquidos e a gases, elástico e compressível, sendo um excelente isolante térmico e acústico, de combustão lenta e muito resistente ao atrito. Em simultâneo é um material 100% natural, reciclável e renovável, atributos que maximizam o conceito de sustentabilidade que é cada vez mais valorizado pela sociedade (APCOR, 2012).

2.1 Composição química da cortiça

A cortiça é um tecido suberoso produzido, pelo felogénio do sobreiro, sendo constituída por células mortas, cujas membranas celulares sofrem suberificação (impermeabilização). A estrutura celular do tecido suberoso bem como a composição química das suas paredes são determinantes para as propriedades da cortiça. Quimicamente estas paredes celulares são estruturalmente constituídas por: suberina (45%); lenhina (25%) e os polissacarídeos, celulose e hemicelulose (15%). Os outros 15% são moléculas mais pequenas: os lípidos representam 5 a 8% da cortiça, sendo constituídos maioritariamente (+ 50%) por triterpenos: cerina, friedelina, betulina e ácido betulínico. Esta fração inclui ainda n-alcanos (C_{16} e C_{34}), n-alcanóis (C_{20} a C_{26}), monoácidos, diácidos, hidroxiácidos suberínicos e esteróis. Os

compostos fenólicos representam 6 a 9% do peso seco da cortiça, e incluem compostos fenólicos simples e principalmente poliméricos, tais como taninos, podendo ser extraídos com relativa facilidade por soluções hidroalcoólicas e pelo vinho. As cinzas representam 1 a 2% da cortiça, sendo constituídas maioritariamente por cálcio (+60%), além de fósforo, sódio, potássio e magnésio (Fortes *et al.*, 2006)

2.2 Fração aromática da cortiça

A composição aromática da cortiça tem sido pouco estudada. Entre os compostos aromáticos destacam-se os terpenóides que são compostos de aroma com a função álcool (unidades isoprénicas, ligadas entre si por ligações cabeça-cauda de acordo com o número de carbonos); os álcoois primários (butan-1-ol, o pentan-1-ol, o hexan-1-ol, o octan-1-ol e o dodecan-1-ol) (Castola *et al.*, 2005); os ácidos alifáticos (diácidos e hidroxiácidos gordos), etc (Mazzoleni *et al.*, 1994). No entanto, os principais compostos aromáticos presentes na cortiça são os alquilbenzenos (Ezquerro *et al.*, 2005). Estes compostos resultam da degradação da lenhina e da componente polifenólica da suberina. A descarboxilação e oxidação da lenhina produzem ácido vanílico e a sua subsequente degradação leva à formação do guaiacol, com um aroma a fumo. Relativamente aos furanos, foram identificados na cortiça o furfural, o 5-metilfurfural e o álcool furfurílico. A presença destes compostos está normalmente relacionada com a ocorrência de reações de degradação de açúcares (reação tipo *Maillard*) (Mazzoleni *et al.*, 1994).

Outros compostos aromáticos podem estar presentes na cortiça; contudo, não sendo intrínsecos ao material, são alguns contaminantes associados a desvios organoléticos. Numa tentativa de sistematizar todos os contaminantes que podem estar presentes na cortiça foi elaborada uma roda de aromas da cortiça (Figura 1) (Moutinho, 2008). Nesta roda, os descritores de aromas foram agrupados em famílias, que originaram cinco grupos principais de desvios organoléticos (*off-flavors*) encontrados na cortiça: musgo, químico, vegetal, conífero, e bolor. Destes aromas, aqueles que estão associados com descritores a mofo, bafio e bolor, muitas vezes designados como “gosto a rolha” são os mais importantes e aqueles que eventualmente são passíveis de serem transmitidos ao vinho degradando a sua qualidade sensorial.



Figura 1 - Roda de aromas da cortiça (Moutinho, 2008).

2.3 Anatomia da cortiça

As principais descontinuidades que se encontram na cortiça são os canais lenticulares. Estes canais, que lhe são fisiologicamente intrínsecos atravessam, transversalmente a cortiça apresentando-se, em seção, como orifícios mais ou menos arredondados, os chamados “poros”, constituindo assim a “porosidade” da cortiça (Figura 2).

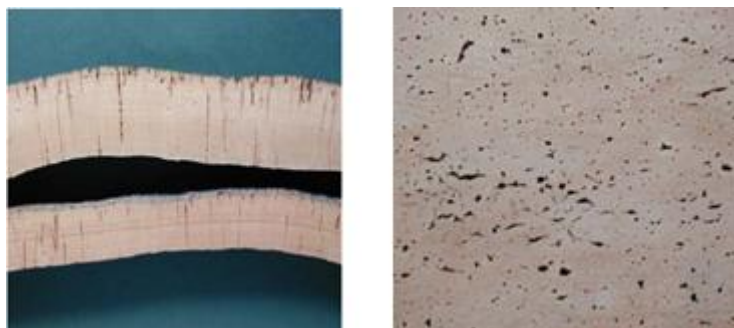


Figura 2 - Cortiça amadia em corte transversal (à esquerda) e tangencial (à direita), onde são visíveis os canais lenticulares que atravessam a cortiça, constituindo a sua porosidade (Graça, 2007).

A primeira cortiça produzida pelo tronco do sobreiro é a “cortiça virgem”. Esta cortiça é atravessada por sulcos profundos que inviabilizam o seu uso nas peças de cortiça natural, como é o caso da rolha, sendo utilizada para produtos de valor acrescentado relativamente mais baixo. A segunda cortiça produzida pelo tronco da árvore, após 9 anos de crescimento, designada por “cortiça secundária”, tem problemas semelhantes aos da cortiça virgem e tem os mesmos destinos industriais. Só a cortiça do terceiro e seguintes descortiçamentos, conhecida por “cortiça amadia”, tem maior homogeneidade e características físico-

mecânicas (após a sua cozedura) apropriadas ao fabrico de rolhas de cortiça (Graça, 2007).

A rentabilidade de todo o processo industrial da cortiça está assim, dependente da qualidade da matéria-prima que lhe deu origem. A análise económica do setor corticeiro mostra aliás, que 25-30% (em massa) da produção de cortiça é usada para a produção de rolhas de cortiça e que corresponde a 70% das mais-valias geradas no setor. O principal setor de comercialização dos produtos de cortiça é a indústria vinícola que absorve 66% de tudo o que é produzido. (APCOR, 2012)

2.4 Os diferentes tipos de rolhas de cortiça

A indústria de cortiça possui diversas gamas de rolhas, disponíveis em inúmeros calibres e formatos, de forma a se adaptarem à enorme diversidade de garrafas e a todo o tipo de vinho. As rolhas de cortiça podem agrupar-se nas seguintes categorias: naturais, técnicas e capsuladas. As rolhas técnicas dividem-se em champanhe, 1+1 ou 0+1 (se tiverem um disco colado em cada topo ou se tiverem apenas um disco colado num dos topos), microaglomeradas e aglomeradas (Figura 3).



Figura 3 - Diferentes tipos de rolhas de cortiça.

As rolhas naturais são produzidas por brocagem das pranchas de cortiça. Estas, após cozedura, são separadas em tiras e brocadas produzindo cilindros de cortiça natural. Cada cilindro é uma rolha inteira, resultante de um processo manual ou semiautomático de grande precisão. As rolhas são separadas mecanicamente e fotografadas por sofisticados computadores que as classificam com base na qualidade visual, isto é, o maior ou menor número de poros que as rolhas apresentam na superfície. Apenas cerca de 25% das pranchas de cortiça produzem rolhas naturais, sendo os restantes aproveitados para o fabrico de granulado de cortiça que é utilizado, entre outras coisas, na produção de rolhas técnicas. Após brocagem, uma amostra estatisticamente significativa de cada lote é sujeita a análise por cromatografia gasosa, um processo altamente sofisticado e eficiente, que visa a

deteção de compostos contaminantes, nomeadamente TCA. As rolhas naturais são polidas, resultando num acabamento limpo e macio e são lavadas numa solução aquosa de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Independentemente dos resultados das análises, todas as rolhas naturais são submetidas a um processo de descontaminação, o ROSA Evolution (Patente nº PT103910, 2007), o que representa uma garantia de qualidade acrescida com enormes vantagens para os produtores de vinho. Após confirmação de que as rolhas cumprem as especificações do cliente, elas são marcadas, a fogo ou tinta e envolvidas por uma fina película de parafina ou silicone, lubrificando-as para facilitar a sua introdução e extração da garrafa.

As rolhas técnicas são produtos manufacturados industrialmente e são constituídos por mais do que uma peça de cortiça coladas entre si por resinas de poliuretano. Estas rolhas são designadas de rolhas de champanhe se tiverem dois discos colados num só topo, rolhas 1+1 se tiverem um disco colado em cada topo, rolhas 0+1 se tiverem apenas um disco colado num dos topos e rolhas aglomeradas ou microaglomeradas se não tiverem discos colados e apresentarem o corpo constituído por grânulos de cortiça colados com a referida cola de poliuretano. Os corpos aglomerados das diferentes rolhas técnicas podem ser fabricados por moldação individual ou extrusão. Estas rolhas técnicas são uma solução económica para assegurar uma vedação de uma garrafa de vinho por períodos de tempo até 24-36 meses. Estes tipos de rolhas são química e mecanicamente muito estáveis e resistentes, e apresentam grande resistência à compressão e torção a que são submetidas nas fases de engarrafamento e extração respetivamente. Ao longo do tempo têm demonstrado serem excelentes vedantes conseguindo manter a necessária concentração de SO_2 livre na garrafa, evitando a oxidação prematura dos vinhos sem, contudo desenvolver aromas de redução desagradáveis (Fernandes, 2007).

2.4.1 O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) nas rolhas de cortiça

As rolhas de cortiça dominaram o mercado mundial de vedantes durante vários séculos, onde tinham uma quota de aproximadamente 100%. No final dos anos noventa, observou-se um decréscimo da utilização de rolhas de cortiça para vedantes de vinho com o aparecimento no mercado de rolhas sintéticas e, posteriormente, cápsulas de rosca. Esta situação está relacionada com o facto de as rolhas de cortiça apresentarem problemas de contaminação dos vinhos com o designado “gosto a rolha”. Esta contaminação resulta da migração de compostos tipos haloanisóis da superfície da rolha, que está em contacto com o vinho, para o vinho.

O haloanisol mais conhecido e mais importante, por representar um problema de grande relevo na indústria corticeira e vitivinícola, é o 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Outros compostos também podem ser ocasionalmente, responsáveis pela contaminação: o 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA) (Figura 4).

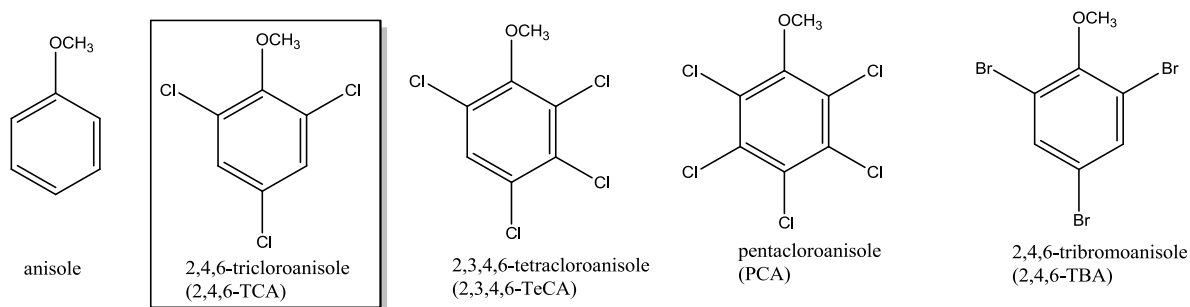


Figura 4 - Estrutura química dos diferentes haloanisóis responsáveis pelos desvios organolépticos do vinho (adaptado de Coque *et al.*, 2006).

Estes compostos possuem um limiar de percepção olfativo muito baixo em solução hidroalcoólica, sendo facilmente transmitidos através do ar e adsorvidos por diferentes materiais (cortiça, cartão, madeira, polímeros, etc). Estes compostos estão associados a descritores aromáticos do tipo mofo, bolor e bafio que modificam e depreciam qualitativamente o aroma normal do vinho.

Na Tabela 1 são apresentados os limiares de deteção dos principais haloanisóis responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos.

Tabela 1 - Limiares de deteção dos principais haloanisóis responsáveis pelos aromas do tipo mofo e bafio nos vinhos.

Composto	Limiar de deteção
2,4,6-TCA	Em água: 30 – 300 pg/L (Curtis <i>et al.</i> , 1974; Griffiths, 1974) Em solução alcoólica (vinho): 1,5 – 3 ng/L (Duerr, 1985)
2,3,4,6-TeCA	Em água: 4 ng/L (Curtis <i>et al.</i> , 1974) Em solução alcoólica (vinho): 15 ng/L (Chatonnet <i>et al.</i> , 2004)
PCA	Composto organoleticamente fraco Limiar de deteção – 10000 ng/L (Chatonnet <i>et al.</i> , 1994)
2,4,6-TBA	Em água: 8 - 30 pg/L (Saxby <i>et al.</i> , 1982; Whitfield <i>et al.</i> , 1997) Em solução alcoólica (vinho): 3 ng/L (Chatonnet <i>et al.</i> , 2004)

2.4.2 A origem dos haloanisóis

Os haloanisóis são compostos que provêm da transformação química dos seus precursores, os halofenóis. Nesta família de compostos os mais representativos são os clorofenóis e os bromofenóis. Os clorofenóis têm sido utilizados intensivamente, nas últimas décadas, como pesticidas e fungicidas, devido ao fato de serem substâncias tóxicas para animais e plantas. Consequentemente tornaram-se num dos grupos mais importantes de contaminantes nos diferentes ecossistemas terrestres. Atualmente, a sua utilização é proibida pela UE, uma vez que são considerados compostos prejudiciais com alguma toxicidade para a saúde humana (Chaudhry *et al.*, 1991).

Ao contrário dos cloroanisóis, alguns bromofenóis são gerados na natureza em elevadas quantidades. Podem ser sintetizados por algas castanhas e estarem presentes em águas residuais provenientes de tratamentos com cloro e na presença de iões brometo. São produzidos em larga escala pelas indústrias químicas como substituto dos clorofenóis (Chatonnet *et al.*, 2004).

Os halofenóis podem ainda ser formados a partir de compostos formados da degradação da lenhina e de açúcares que reagem com átomos de cloro e bromo presentes na natureza, ou então a partir da biodegradação de compostos organo-clorados provenientes do tratamento da madeira, das águas cloradas, etc.

2.4.3 Mecanismos de formação de haloanisóis

A formação de haloanisóis na cortiça permaneceu pouco clara durante bastante tempo, surgindo várias hipóteses para tentar explicar a sua origem, embora atualmente a única origem cientificamente comprovada seja a biometilação dos clorofenóis e bromofenóis (Figura 5).

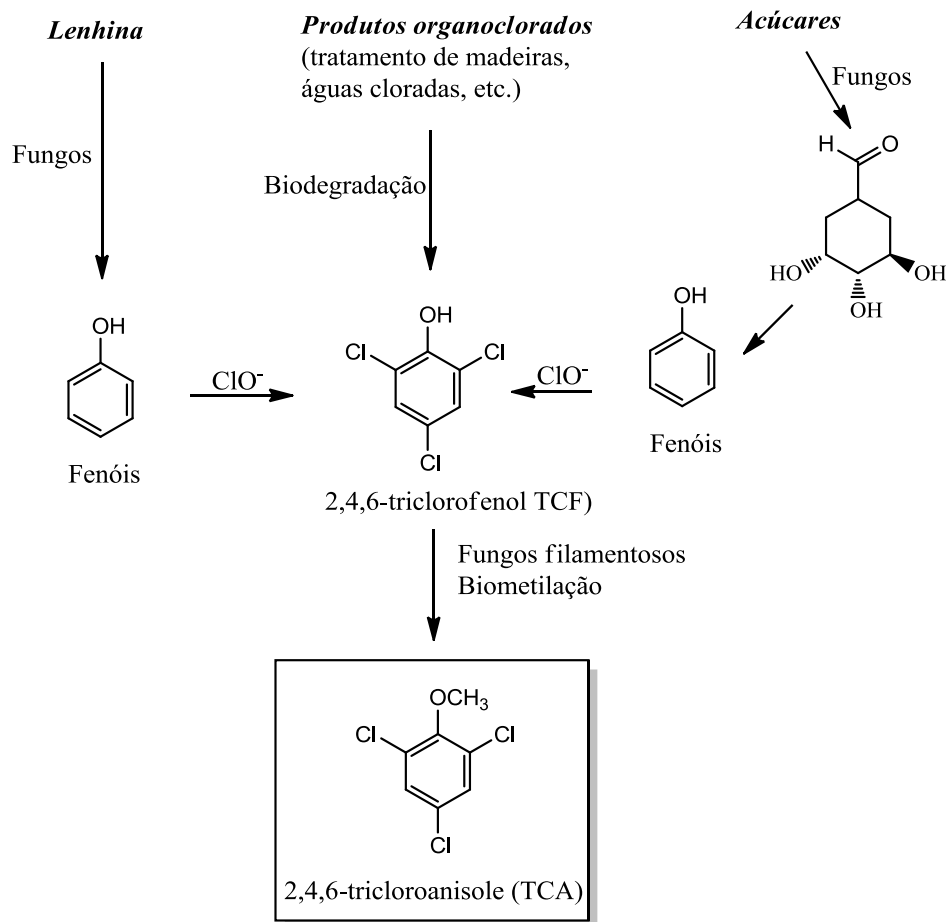


Figura 5- Mecanismo da formação do TCA, por biometilação. (Coque et al., 2006)

A reação de biometilação é quase exclusiva dos fungos filamentosos (como por exemplo, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, etc) que crescem em diferentes materiais tais como a madeira, a cortiça, etc. Esta reação é catalisada por uma enzima denominada clorofenole O-metiltransferase (CPOMT) que converte halofenóis, altamente tóxicos, em haloanisóis, compostos inofensivos ao metabolismo dos microrganismos. (Coque et al., 2006).

2.4.4 Fontes de contaminação das rolhas de cortiça

A rolha de cortiça é geralmente considerada como principal agente contaminante de haloanisóis no vinho, mas estudos recentes mostraram que esta contaminação pode advir de outras fontes, nomeadamente quando do contacto direto do vinho com produtos e atmosferas contaminados (Chatonnet et al, 2004, Capone et al, 1999). A contaminação das rolhas de cortiça pode ser intrínseca, isto é, pode ter ocorrido durante o processo de

crescimento na árvore ou mesmo durante os processos de produção de rolhas ou pode ser extrínseca ocorrendo fruto da adsorção de TCA do ambiente. A rolha de cortiça, assim como outros materiais (plásticos cartão, papel, borracha, etc.), pode adquirir contaminação, por adsorção de TCA existente nos locais de conservação, isto é a rolha, isenta de haloanisóis, adsorve por via aérea estes compostos podendo transmiti-los em seguida ao vinho. (Baker *et al.*, 2001)

Howland *et al.* (1997) e mais tarde Sefton *et al.* (2005), aquando dos estudos efetuados para determinar a localização do TCA em rolhas contaminadas, mostraram que este composto se encontra na costa da cortiça e não tanto na parte interior, não sendo encontradas diferenças significativas entre os anéis de crescimento nem entre a parte central e os extremos da prancha de cortiça. Outros autores mostraram que a localização de cloroanisóis é variável de cortiça para cortiça, podendo mesmo existir variações na mesma prancha e até mesmo na rolha. Várias investigações que analisaram a localização do TCA nos vedantes confirmaram que a sua concentração não é uniforme na superfície da cortiça (Sefton *et al.*, 2005).

Simpson e Sefton (2007) afirmaram que muito do TCA presente nas rolhas de cortiça pode já estar presente nas pranchas de cortiça antes da sua extração, muito embora após esta operação e até ao final da produção de rolhas a contaminação possa ocorrer. A forte presença de TCA nas pranchas de cortiça sugere que o seu precursor (triclorofenol) já se encontra no montado em quantidades significativas, isto devido ao uso excessivo de pesticidas e inseticidas. Embora estas práticas tivessem sido abandonadas no início dos anos 80, os efeitos continuaram a ser sentidos ao longo do tempo. Já em termos conclusivos e segundo os mesmos autores, mesmo que o vedante esteja muito contaminado, se essa contaminação estiver na matriz da rolha não haverá contaminação para o vinho. Apesar dos tratamentos para reduzir o TCA quantificável nas rolhas, só é necessário remover o TCA que pode ser extraível durante o seu tempo de vida da rolha na garrafa.

2.4.5 Mecanismos de contaminação do vinho pelas rolhas de cortiça

A contaminação dos vinhos, com o chamado "gosto a rolha", associada às rolhas de cortiça continua a ser um problema sério para os produtores em todo o mundo, e como consequência para a indústria vitivinícola. A análise de TCA, que é feita à cortiça ao longo de todo o seu processo produtivo, não permite de uma forma prática e direta evitar uma possível contaminação do vinho, mas sabe-se que esta está intimamente ligada com o TCA presente na rolha. Rolhas de cortiça, com TCA normalmente só transmitem uma pequena parte para o vinho (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999). Presumivelmente só quando a

superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto direto com o vinho ou com o *head-space* (câmara de ar acima do vinho), é que se dá a transferência dos cloroanisóis da cortiça para o vinho (Amon *et al.*, 1986; Capone *et al.*, 1999), consequentemente, a localização do TCA na rolha é crítica para haver ou não contaminação do vinho (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999).

Estudos realizados por Capone *et al.* (2002) basearam-se em experiências nas quais o d₅-TCA (TCA de fonte externa) foi adicionado à parte exterior de vedantes de cortiça imediatamente após a sua introdução em garrafas de vinho, ou na parte exterior das rolhas já engarrafadas ao fim de 7 e 21 anos respetivamente. A experiência foi conduzida de forma a determinar se traços de TCA, provenientes de fontes externas, poderiam penetrar nos vedantes de cortiça e, determinar a extensão de tal migração durante o armazenamento de vinho engarrafado. Após armazenamento, as rolhas foram removidas dos vinhos e cortadas em três partes iguais: secção interna (parte em contacto com o vinho); secção central e secção exterior (parte em contacto com a atmosfera, onde o d₅-TCA foi originalmente aplicado). Todas as secções das rolhas bem como os vinhos foram analisados para d₅-TCA, mostrando que ao fim de 36 a 44 meses de conservação não foram encontrados traços de d₅-TCA nos vinhos. É importante referir que o facto de não conseguir descobrir d₅-TCA nos vinhos, não pode ser atribuído a qualquer instabilidade do composto, uma vez que este pode permanecer inalterado em vinho ou em rolha durante vários anos (Capone *et al.*, 1999). Em relação às diferentes secções das rolhas, foi observado que o total de d₅-TCA detetado nestas variava entre 7 a 40% do originalmente adicionado. Por outro lado, a distribuição do d₅-TCA nas diferentes secções das rolhas mostrou que aproximadamente 25% do d₅-TCA migrou além da secção exterior, mas só 3 a 4 ng alcançaram a secção interna da rolha, e nenhum d₅-TCA alcançou o vinho. Segundo este estudo ficou provado que os vedantes de cortiça são excelentes barreiras à transmissão de TCA a partir de fontes externas.

No departamento de I&D da A&I foram realizados estudos internos que mostraram que o 2,4,6-TCA presente no interior das rolhas de cortiça natural, não é suscetível de migrar para o vinho. As rolhas de cortiça naturais e técnicas são barreiras efetivas da migração do TCA para o vinho (Lopes *et al.*, 2011). A contaminação do vinho com TCA só pode ocorrer se a superfície de contacto da rolha estiver contaminada com este composto, resultados que confirmam aqueles obtidos por Capone *et al.* (2002)

Os estudos efetuados por Hervé *et al.* (2000), no laboratório do ETS dos Estados Unidos, tiveram como objetivo principal a elaboração de uma ferramenta confiável para o controlo de qualidade das rolhas de cortiça, entre os quais uma definição de TCA migrável. Foi

estabelecido que o valor de TCA transmitido da rolha para a solução de maceração resulta da combinação da quantidade total de TCA presente na rolha mais a sua respetiva localização e possivelmente as suas propriedades físicas também podem influenciar esta dessorção. Por outro lado, o grau alcoólico da solução também tem influência na maior ou menor quantidade de TCA libertável, uma vez que o TCA é mais extraído da rolha para elevados níveis de álcool. Contudo, os elevados níveis de álcool, traduzem menor volatilização que por sua vez reduz a capacidade de deteção pela fibra SPME. Assim, o teor alcoólico de 10% para a solução etanólica foi estabelecido como um valor ótimo para a deteção do TCA. Num outro estudo foi avaliada a cinética de migração de TCA em macerados de rolhas de cortiça com solução etanólica, verificando-se que ao final de 24 horas de maceração é estabelecido um equilíbrio no macerado, mas há uma fraca correlação do TCA total da rolha e a quantidade de TCA extraída para o macerado, uma vez que aquilo que é extraído para o macerado só corresponde a cerca de 0,05 a 2,0% do TCA total da rolha. Seguidamente, com o intuito de determinar a relação existente entre o TCA no macerado de rolha e o TCA migrável para o vinho, aqueles autores selecionaram rolhas de lotes diferentes com elevada incidência de TCA, que serviram para vedar garrafas de vinho comercial com um grau alcoólico de 10%. O vinho foi previamente analisado e não apresentava vestígios de TCA. Foram armazenadas em posição horizontal e foram analisadas amostras ao longo de um período de tempo de 14 meses. A análise do vinho engarrafado, mostrou uma elevada correlação entre o TCA libertável da rolha individual para o macerado e o nível de TCA no vinho após os 14 meses, tendo-se observado, que o nível de TCA que migrou para o vinho correspondia a 50% do TCA libertável das mesmas rolhas em macerados individuais.

De acordo com os resultados obtidos por Juanola *et al.* (2005), as inconsistências entre a quantidade de TCA presente nas rolhas e nos respetivos vinhos sugerem que a distribuição deste composto na cortiça não é uniforme e que a sua migração pela cortiça é lenta. Quando aqueles autores maceraram uma única rolha numa solução hidroalcoólica (a 12% de EtOH) durante seis dias, verificaram que a percentagem de TCA libertável se encontrava no intervalo 0,5 a 54% quando as rolhas eram contaminadas artificialmente, mas em rolhas contaminadas naturalmente aquele valor era de 4,7%. Em engarrafamentos experimentais a migração de TCA é relativamente baixa (0,6-25%) em resultado da menor superfície de contato (Juanola *et al.*, 2005). Estes estudos concluíram que a presença de TCA na superfície da cortiça em contato com o vinho, a temperatura e o tempo de engarrafamento têm influência na migração deste composto para o vinho.

A complexidade das cinéticas de transferência de TCA da cortiça para o vinho é o propósito do presente projeto tentando elucidar a cinética de migração de TCA através de diferentes tipos de rolhas de cortiça, natural e microaglomerada, usando uma solução simulante de vinho (solução hidroalcoólica, 12% EtOH, com 5 g/L de ácido tartárico e pH ajustado a 3,2).

2.4.6 Estratégia de prevenção, remoção e controlo de TCA

Nas ultimas duas décadas, e uma vez que o 2,4,6 -TCA tem sido o composto mais referido como contaminante dos vinhos, as empresas corticeiras têm desenvolvido ações no combate ao referido composto, que assentam em três estratégias principais: prevenção, descontaminação e controlo de qualidade. Com a implementação do código das práticas rolheiras por parte das empresas produtoras de cortiça foram definidas um conjunto de normas assentes na prevenção da formação de TCA. Para tal, passou a existir mais rigor e rastreabilidade da matéria-prima, melhor arejamento da cortiça e escoamento das águas durante a armazenagem, corte dos calços antes da primeira etapa do processo produtivo, monitorização das rolhas ao longo de todo processo de produção, substituição do hipoclorito de sódio por peróxido de hidrogénio durante a lavagem das rolhas, etc. (Liége, 2006). Estas medidas preventivas constituíram um avanço notável na erradicação deste composto tendo servido como alavanca para os processos de eliminação de TCA que se seguiram. A par das ações preventivas, a A&I aplica ações curativas inovadoras, de patente própria e sem paralelo no mercado. Todas as pranchas indicadas para a produção de rolhas são processadas no sistema de cozedura dinâmico *Convex*, que é um sistema de extração contínua de voláteis, aplicado à água usada na cozedura da cortiça e que impede a contaminação cruzada de TCA entre as várias pranchas. No ano de 1998 foi desenvolvido o processo INOSII, que faz uso da estrutura alveolar única da cortiça para lavar em profundidade as lenticelas, que entram em contacto com o vinho (Patente nº EP1108507, 2001). Os discos para as rolhas técnicas são tratados com este processo exclusivo de lavagem hidrodinâmica. A partir de 2004 a A&I, passou a contar com o sistema ROSA (*Rate of Optimal Steam Application*) (Cabral, 2004) que faz uma destilação de vapor aos granulados de cortiça usados nas rolhas técnicas. Este processo de tratamento é responsável pela remoção de cerca de 80% dos cloroanisóis da cortiça. Para rolhas naturais, fruto da deformação que as rolhas sofrem ao serem tratadas com vapor de água, foi desenvolvido outro processo de descontaminação, denominado ROSA Evolution, que usa o equilíbrio entre tempo, temperatura e humidade para extração de TCA. Este processo patenteado pela A&I (Patente nº DE60306404T, 2004) permite a mesma eficácia do ROSA mas sem deformação das rolhas naturais.

INNOCORK (Cruz, 2007), utiliza uma mistura de água e etanol que promove a rutura de ligações entre o TCA e a matriz da cortiça por ação de uma corrente de ar comprimido. Assim, os contaminantes são extraídos da cortiça, prevenindo a sua readsorção. O processo DIAM patenteado pela OENEO (Lumia *et al.*, 2002) atinge uma eficácia de remoção de 99,8%. Este método recorre a uma tecnologia que utiliza o dióxido de carbono em estado supercrítico para a remoção de TCA em grânulos de cortiça, mas não pode ser aplicado em rolhas de cortiça natural devido às alterações físico-mecânicas provocadas.

O departamento de I&D, da empresa A&I, dispõe de um rigoroso controlo de qualidade, dos seus produtos. Diariamente, são retiradas aleatoriamente rolhas de diferentes lotes, que são analisadas através de um sistema que envolve um processo de extração e análise por cromatografia em fase gasosa (GC), para deteção de TCA (Hérve *et al.*, 2000). Esta técnica baseia-se na quantificação do TCA extraível, na qual as rolhas dessorvem TCA para uma solução hidroalcoólica, atingindo o equilíbrio ao fim de 24 horas. Estes estudos foram realizados pelo ETS, laboratório na Califórnia – USA, e demonstraram que a quantificação do TCA extraível é um indicador fiável da quantidade de TCA no vinho engarrafado.

Ao fim de 24 horas de maceração, é feita a análise da solução hidroalcoólica por microextração em fase sólida (SPME), seguida da análise GC, com deteção por captura de eletrões (ECD), ou por espectrometria de massa (MS) de acordo com a norma ISO-20752 de 2007. Trata-se de um método simples e eficaz na quantificação de TCA, mas apresenta falhas quando é usado no controlo de lotes, pois só são analisadas uma pequena parte das amostras de rolhas quando comparado com o número total de rolhas existentes no lote.

2.5 Enquadramento e contributos do projeto

Numa primeira fase, pretendeu-se realizar a validação do método de análise de TCA. Esta validação é fundamental para a garantia da qualidade dos resultados analíticos de TCA, diariamente produzidos pelo laboratório de I&D da empresa A&I. O domínio de todos parâmetros do método analítico que podem influenciar o resultado final de TCA, em lotes de rolhas, é essencial, pois trata-se de resultados que são uma ferramenta de decisão imprescindível para a utilização das rolhas como vedante de vinhos e outras bebidas.

Paralelamente, a migração de TCA de diferentes tipos de rolhas de cortiça, quando contaminadas, para o vinho é um dado adquirido que é assumido pelos produtores-engarrafadores, mas em parte ainda é desconhecida. A heterogeneidade de contaminação de TCA das rolhas naturais é conhecida, verificando-se uma maior homogeneidade dessa contaminação por parte das rolhas técnicas (aglomeradas). Com este projeto de

investigação pretende-se conhecer a migração das diferentes rolhas de cortiça, caracterizando a cinética de adsorção de TCA pelas rolhas de cortiça a partir do vinho e a cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho. Assim, os resultados obtidos poderão elucidar os mecanismos de contaminação do vinho, permitindo de forma mais consistente, uma avaliação sobre a dinâmica de transferência de TCA da rolha para o vinho e do vinho para a rolha.

Do ponto de vista do enólogo, e de acordo com as uvas que tem ao seu dispor compete-lhe elaborar o melhor vinho, segundo o segmento de consumidores a que se destina por forma assegurar a aceitação por parte destes. Neste sentido importa referir a importância do vedante. Os vitivinicultores podem utilizar a cortiça baseando-se na certeza de que a mesma terá um bom desempenho, independentemente do momento do consumo do vinho, sem correr o risco de oxidação prematura ou odores a sulfureto associados aos outros vedantes com o manuseamento adequado durante e após o engarrafamento, a cortiça é um vedante sem igual, na medida em que em geral os consumidores associam a um vinho de qualidade vedado com rolhas de cortiça natural.

Estudos de mercado independentes demonstram que os consumidores dão, na verdade, importância ao tipo de vedante utilizado e a maioria prefere a cortiça. Os próprios produtores de vedantes alternativos não têm conseguido publicar uma única sondagem aos consumidores em que a cortiça não seja o vedante preferido. Os consumidores associam os vedantes sintéticos a vinhos mais baratos. Tendo em conta que a qualidade da cortiça continua a melhorar e que os problemas associados aos vedantes alternativos se tornam cada vez mais evidentes, estamos confiantes de que a cortiça manterá o seu sólido apoio por parte dos consumidores.

A cortiça também permite a penetração de uma quantidade mínima de oxigénio no vinho após o engarrafamento, o que parece ter um impacto benéfico. Todavia, será necessária mais investigação para se compreender toda a contribuição da cortiça para a evolução do vinho.

Com a introdução das rolhas técnicas, rolhas de champanhe e rolhas Neutrocork a Amorim alargou a gama de produtos de cortiça disponíveis para se adaptarem a cada tipo de vinho e segmento de mercado vinícola. A indústria corticeira tem realizado grandes melhorias a nível do desempenho sensorial, em especial nos últimos cinco anos. No entanto, é verdade que nem todos os produtores cumprem os padrões assumidos por empresas como a Amorim.

Ao adquirirem os seus produtos junto de fornecedores certificados e implementando os seus próprios procedimentos de controlo de qualidade, os vitivinicultores, produtores-engarrafadores, poderão comprar cortiça com a certeza de que existirá um risco mínimo de TCA. Este projecto de investigação forneceu até ao momento uma boa visão da dinâmica de transferência de TCA do binómio vinho-rolha e rolha-vinho de como os diferentes vedantes usados se comportam, em contato com a solução simulante de vinho contaminada, ou quando é a própria rolha a causa da contaminação.

Em última análise, partindo deste estudo, e de outros que virão e com a conjugação de esforços entre universidades, e departamentos de investigação, pretende-se garantir que os resultados dos seus estudos cheguem aos profissionais do sector, para que todos possam usufruir do conhecimento e poderem assim melhorar os seus processos, métodos, e consequentemente os seus produtos.

3 Validação do método analítico de 2,4,6-TCA

No presente capítulo encontra-se descrito de forma detalhada o trabalho desenvolvido e realizado ao longo do projeto de investigação com objetivo da validação do método analítico de 2,4,6-TCA. Este trabalho teve o intuito de auxiliar o laboratório de I&D, da empresa A&I, na tarefa de demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Este trabalho não pretendeu abordar todos os parâmetros aplicáveis às validações de métodos analíticos, mas apenas aqueles que foram considerados como influentes nos resultados de TCA que correspondem à realidade diária do laboratório de I&D.

3.1 Fundamentos da validação do método

A validação de um método analítico é a confirmação, através de exames e de apresentações de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos. A norma NP EN ISO/IEC 17025 (2005) define uma metodologia harmonizada, com validade para a acreditação em Portugal, na Europa e internacionalmente.

Os requisitos mínimos para a validação dependem do tipo de método em causa e, compreendem o estudo dos seguintes parâmetros:

- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Limite de deteção: LD; Limite de Quantificação: LQ);
- Precisão (Repetibilidade; Reprodutibilidade; Precisão Intermédia);
- Exatidão (ensaios interlaboratoriais);
- Robustez.

3.1.1 Gama de trabalho/Linearidade

Segundo a norma ISO 8466-1, a **gama de trabalho** de um método analítico é o intervalo entre a concentração (ou massa) mais baixa e a mais elevada de analito, no qual o método pode ser aplicado. O limite mais baixo desta gama deve ser igual ou maior que o limite de quantificação do método. Para avaliar a gama de trabalho realiza-se o teste de homogeneidade de variâncias: são preparadas 10 réplicas dos padrões de menor e maior concentração, que são analisados independentemente. Posteriormente determinam-se as variâncias associadas (S_1^2 e S_{10}^2) e aplica-se o Teste de Fischer (F).

A aplicação do teste de Fisher para avaliar a homogeneidade de variâncias envolve o cálculo da função PG:

$$PG = S_{10}^2 / S_1^2 \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = S_1^2 / S_{10}^2 \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2$$

Quando o $PG \leq F$, a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada. Se $PG > F$, a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser reduzida de forma a obter $PG \leq F$.

A gama de trabalho deve cobrir a gama de concentrações aplicável para as amostras a analisar. A quantificação requer o conhecimento da relação entre sinais analíticos e a concentração do analito, obtida através de uma calibração: calibração efetuada recorrendo a padrões químicos (e/ou materiais de referência), geralmente por intermédio de uma curva de calibração - a representação gráfica do sinal analítico (y) em função da concentração do analito (c) numa série de padrões, devendo usar-se o método dos mínimos quadrados para efetuar a regressão linear.

Assim, a gama de trabalho foi avaliada pela determinação dos coeficientes de variação das 10 réplicas dos padrões da reta (comunicação pessoal da comissão vitivinícola dos vinhos verdes), que deverá ser inferior a 10%.

A **linearidade** do método corresponde ao intervalo de concentrações onde existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações. Neste teste analisa-se o gráfico da curva de calibração da função linear: $y = bx + a$ e é feito o cálculo do coeficiente de correlação (R^2). Quanto mais próximo de 1 for este coeficiente, melhor o ajustamento dos pontos. Na prática já se considera um bom coeficiente correlação se este for $\geq 0,9995$.

3.1.2 Limiares Analíticos: limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limiares analíticos são determinados a partir do regulamento do IPAC (OGC002). O **limite de deteção (LD)** corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar e que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. Em termos qualitativos, este conceito, corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz mas está isenta de analito.

O **limite de quantificação (LQ)** corresponde à concentração a partir da qual é possível quantificar o analito, sendo o valor determinado exato e preciso.

Como o método envolve a utilização de uma calibração linear, o LD e o LQ são obtidos por:

$$LD = \frac{\left[3,3.S_{y/x} \right]}{b}$$

$$LQ = \frac{\left[10.S_{y/x} \right]}{b}$$

sendo:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual, que para uma regressão do tipo $y = bx + a$ é calculado pela seguinte expressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}}$$

(a: ordenada na origem; b: declive; y_i : razão das áreas cromatográficas do pico de TCA e do pico do padrão interno).

Neste caso, os limites de quantificação são obtidos a partir da gama de trabalho, onde o ponto da reta de menor concentração é considerado limite de quantificação se o coeficiente de variação de 10 réplicas for inferior a 10% (comunicação pessoal da comissão vitivinícola dos vinhos verdes). Por outro lado, o limite de deteção é definido como sendo um terço do limite de quantificação.

3.1.3 Precisão

A **precisão** é determinada pela Norma ISO 5725-1 e avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições bem definidas. Existem alguns parâmetros que definem a precisão: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

A **repetibilidade** de um método, determinada pela Norma ISO 5725-2, é a precisão de ensaio efetuado sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível: mesmo analista, mesmo laboratório.

Para determinar a repetibilidade de um método, efetua-se uma série de medições (maior ou igual a 10) sobre uma mesma amostra, em condições de repetibilidade. A precisão em termos de repetibilidade é expressa como desvio padrão (S_r), variância (S_r^2) ou como coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Para cada nível de concentração, determina-se o desvio padrão da repetibilidade, pela seguinte expressão (ISO 5725-2):

$$Srj = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}}$$

O coeficiente de variação é numericamente igual à razão do desvio padrão da repetibilidade e da média dos valores considerados (coeficiente apresentado em percentagem):

$$CV_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{y}}$$

A **precisão intermédia** (ISO 5725-3) avalia a precisão de um método de ensaio quando aplicado no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: analistas, equipamento, tempo, etc. Esta medida da precisão é reconhecida como sendo a mais representativa da variabilidade do método.

A determinação da precisão intermédia é feita através de um método simplificado e baseia-se na execução de n medições (maior ou igual a 10), em condições pré-definidas, sobre a mesma amostra ou padrões. Por outro lado, o desvio padrão da precisão intermédia, S_{I0} (ISO 5725-3) é determinado pela seguinte expressão:

$$S_{I()} = \sqrt{\frac{\sum (y_k - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

em que, $n = n.^o$ de replicados de uma amostra; y_k =resultados individuais obtidos; \bar{y} = média dos resultados obtidos; S_{I0} = desvio padrão da precisão intermédia e onde os símbolos relativos às condições de precisão a variar podem aparecer em parênteses.

O limite de precisão intermédia, pode ser determinado pela expressão:

$$r = 1,96\sqrt{n} \times S_I$$

O coeficiente de variação é numericamente igual à razão do desvio padrão da precisão intermédia e da média dos valores considerados (coeficiente apresentado em percentagem):

$$CV_I(\%) = \frac{S_I}{\bar{y}}$$

A **reprodutibilidade**, definida pela Norma ISO 5725-2, refere-se à precisão de um método de ensaio aplicado sobre a mesma amostra, fazendo variar o mais possível as condições associadas à medição. A reprodutibilidade pode ser avaliada através dos resultados obtidos por diferentes laboratórios, depois de serem tratados estatisticamente.

3.1.4 Exatidão

A **exatidão** é a concordância entre o valor médio de um conjunto de medições e o valor verdadeiro, ou convencionalmente aceite como verdadeiro, da grandeza que se está a medir. Os processos normalmente utilizados para avaliar este parâmetro são: materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais (EIL) e testes comparativos (TC). No caso concreto em estudo, a avaliação da exactidão foi efectuada através da participação no ensaio interlaboratorial promovido pela CTCOR.

A análise estatística dos resultados do ensaio interlaboratorial é feita através do fator z-score:

$$z\text{-score} = |x_i - X| / s_R$$

sendo:

x_i - média de cada laboratório; X – valor “verdadeiro” e s_R o desvio padrão da reprodutibilidade.

O critério de aceitação ou de rejeição do resultado obtido depende do valor do z score:

- $|z| \leq 2$ o resultado é aceitável;
- $2 < |z| < 3$ o resultado é questionável;
- $|z| \geq 3$ o resultado é insatisfatório.

3.1.5 Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade em permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas, variações nos parâmetros do método normal. Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. A avaliação da robustez pode ser considerada durante a fase de desenvolvimento e, depende do tipo de processo em estudo.

O grau de exigência de validação dos métodos e a sua extensão são variáveis conforme a natureza do método, contudo deverá garantir que o resultado é apropriado ao fim a que se destina.

3.2 Material

Para o projeto de validação do método de análise de 2,4,6-tricloroanisol foram utilizados os seguintes materiais:

- Cromatógrafos: ECD1, ECD2, ECD3, ECD4 e ECD5 (modelos Varian CP3800); ECD6 (modelo Bruker 450- GC), ECD7 (modelo Bruker 436- GC) e GC-MS Shimadzu (modelo QP2010 plus NCI);
- Padrões de análise de TCA: foram usados os padrões de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 ng/L;
- Solução hidroalcoólica a 12% (EtOH);
- Soluções de 2,4,6-TCA de 100 ng/L e 1 µg/L;
- Solução de 2,3,6-TCA de 2 µg/L;
- Solução de d₅-TCA de 2 µg/L;
- Mistura de macerados de amostras de rolhas de cortiça com concentração teórica de TCA de 2,6 ng/L e com gamas de concentrações de TCA de [0,5; 1,0] e [10; 20], ng/L.

3.3 Métodos

3.3.1 Método de análise de 2,4,6-TCA

2,4,6-TCA é um composto volátil passível de contaminar as rolhas de cortiça, e que é quantificado por cromatografia em fase gasosa após maceração das rolhas em solução hidroalcoólica e submetendo esta solução a um microextração em fase sólida.

Uma quantidade de rolhas de cortiça, discos ou granulado é macerado em solução simulante de vinho à temperatura ambiente (ISO 2752). Em casos particulares, a maceração individual de rolhas poderá ser feita de forma parcial, apenas macerando a parte da rolha que está em contacto com a bebida. Coloca-se num frasco de vidro, com capacidade de 60 mL, 20 mL de solução hidroalcoólica a 12% (vol/vol), reveste-se o interior da tampa com papel de alumínio e perfura-se o centro da tampa com um piónés. Seguidamente prende-se

a rolha ao centro da tampa com a ajuda do piónés e fecha-se o frasco com a respetiva tampa, deixando a macerar durante 24 horas, à temperatura ambiente.

Após maceração, pipeta-se 10 mL da solução simulante de vinho para o tubo de cromatografia de 20 mL com ± 3 g NaCl (com esta adição é forçado o equilíbrio dos solúveis para a fase gasosa) e adiciona-se 100 μ L de padrão interno (2,3,6-tricloroanisol ou d_5 -2,4,6-tricloroanisol).

Sempre que se realizam uma série de análises estas devem ser acompanhadas de padrões de concentração conhecida (2 ng/L) e brancos (padrões isentos de contaminante 2,4,6-TCA) para se efetuar um controlo de qualidade dos valores obtidos, detetando contaminações ou problemas no aparelho. Estes padrões devem ser adicionados no início ou no fim de uma série de amostras.

A extração de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é efetuada através do método de microextração em fase sólida por exposição no head-space (SPME) com ajuda de uma fibra utilizada por norma para adsorção de compostos voláteis ou de baixo peso molecular: fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μ m. Após adsorção dos compostos, é realizada a injeção da fibra no injetor onde os mesmos são desorvidos e analisados numa coluna capilar de baixa polaridade.

A deteção e quantificação são feitas por Espectrometria de Massa (MS) em modo SIM ou por captura eletrónica (ECD).

O procedimento experimental para análises cromatográficas (em uso no I&D) está apresentado, detalhadamente, no Anexo 1.

3.4 Metodologia de validação do método de análise de 2,4,6-TCA

A metodologia de validação da análise de 2,4,6-TCA iniciou-se pelo estudo da **linearidade** (3.1.1). Para tal, preparam-se duas retas de calibração para dois equipamentos diferentes (ECD2 e GC- MS Shimadzu). As retas de calibração foram constituídas pelos seguintes pontos: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 ng/L e com padrão interno de concentração 20 ng/L (2,3,6-TCA para o ECD2 e d_5 -TCA para o GC- MS Shimadzu). Posteriormente, prepararam-se dez réplicas de cada um dos pontos da reta de calibração de forma a verificar se os resultados estavam de acordo com os critérios descritos no ponto 3.1.1, isto é, um coeficiente de variação inferior a 10%.

Os estudos dos limiares analíticos (**limite de deteção (LD)** e **limite de quantificação (LQ)**) de cada equipamento foram obtidos a partir dos resultados da gama de trabalho/linearidade em que a menor concentração da reta representa o limite de

quantificação se o coeficiente de variação das 10 réplicas for inferior a 10%. Neste caso, o limite de detecção será um terço do limite de quantificação obtido (3.1.2).

A **precisão** envolveu o cálculo da **repetibilidade** em que se preparam dez réplicas de dois padrões da calibração: um da concentração mais baixa (0,5 ng/L) e outro da concentração mais alta (20,0 ng/L). A análise das dez réplicas destes padrões foi realizada em sete cromatógrafos, seis com detecção por captura de eletrões (ECD's 1, 2, 3, 5, 6 e 7) e outros com detecção por espectrometria de massa (GC-MS Shimadzu). As soluções acima mencionadas foram preparadas pelo mesmo operador e no mesmo dia (condições de repetibilidade).

Para o estudo da **precisão intermédia** foram previamente escolhidos vários macerados de amostras de rolhas de cortiça para preparar duas amostras que deveriam possuir duas gamas diferentes de TCA: amostra A [0,5; 1,0] ng/L e amostra B [10; 20] ng/L. Seguidamente cada operador (num total de 8) preparou oito réplicas de cada amostra (A e B) para serem analisadas nos sete cromatógrafos em estudo (ECD's 1, 2, 3, 5, 6 e 7 e GC-MS Shimadzu). A **exatidão** foi avaliada através da participação num ensaio interlaboratorial.

Este ensaio tem como finalidade a determinação do TCA de macerados de rolhas de cortiça e permite avaliar a exatidão do método utilizado e encontrar problemas associados às condições de funcionamento. Estes macerados são preparados pelo CTCOR (laboratório externo) recorrendo a um tipo de amostra: que é feita a partir de macerações de rolhas. As amostras são enviadas para os laboratórios participantes no ensaio (nomeadamente para o laboratório do I&D) e posteriormente são analisadas em triplicado (por cada tipo de amostra). Finalmente, todos resultados foram enviados para o laboratório responsável pelo ensaio interlaboratorial (CTCOR) para serem tratados estatisticamente e cujo valor obtido do fator z-score determina a aceitação ou de rejeição do resultado.

Finalmente foi avaliada a **robustez** (3.1.5) do método, através da análise cromatográfica (no ECD2) de um macerado de rolhas de cortiça com uma concentração teórica de 2,6 ng/L. A partir desta solução, um operador, realizou os seguintes ensaios:

- **Ensaio A (referência)** - Preparação de dez réplicas da amostra/macerado, utilizando o procedimento normal: 10,0 mL de macerado + adição de 100,0 µL de padrão interno;
- **Ensaio B e C** - Preparação de dez réplicas do macerado utilizando o seguinte procedimento de preparação das amostras: 9,8 e 10,2 mL de macerado + adição de 100 µL de padrão interno (variação do volume de amostra pipetado).

- **Ensaio D e E** - Preparação de dez réplicas do macerado utilizando o seguinte procedimento de preparação das amostras: 10,0 mL de macerado + adição de 95,0 e 105,0 µL de padrão interno (variação do volume de padrão interno adicionado).

3.5 Resultados de validação do método de análise de 2,4,6-TCA

3.5.1 Linearidade

Nas figuras 6 e 7, estão apresentados os parâmetros da curva de calibração do equipamento ECD2 e GC- MS Shimadzu, respectivamente. Verifica-se que existe uma relação linear entre a razão das concentrações (concentração de TCA/concentração do padrão interno) e a razão das áreas cromatográficas (área do pico de TCA/área do pico do padrão interno); os valores dos coeficientes de regressão linear ao quadrado (R^2) foram de (0,9991) e (1,000) para os equipamentos ECD2 e Shimadzu, respectivamente. Este valor indica que o método analítico produz resultados que são diretamente proporcionais à concentração do TCA para as gamas de concentração usada.

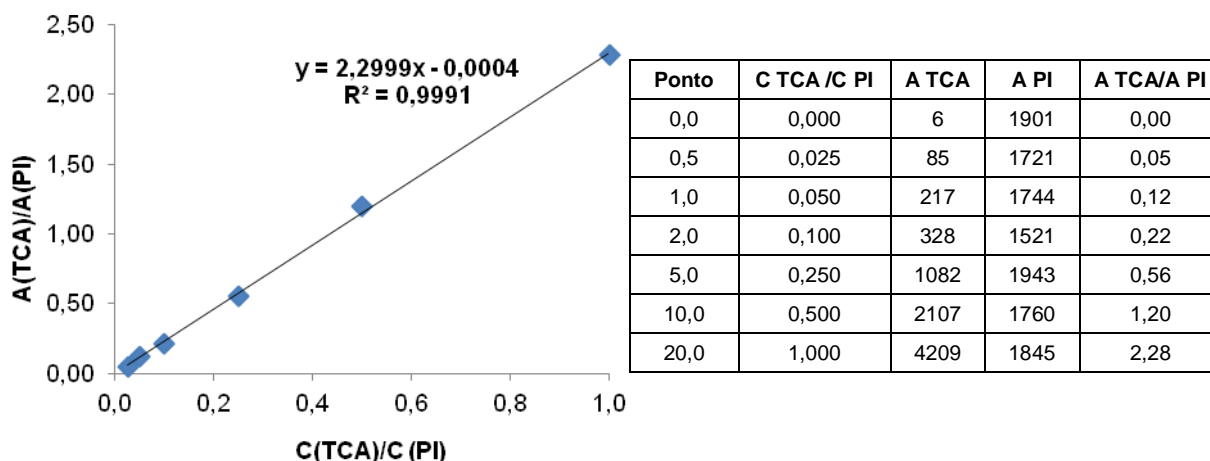


Figura 6 – Curva de calibração obtida no equipamento de cromatografia ECD2 que representa a linearidade do método.

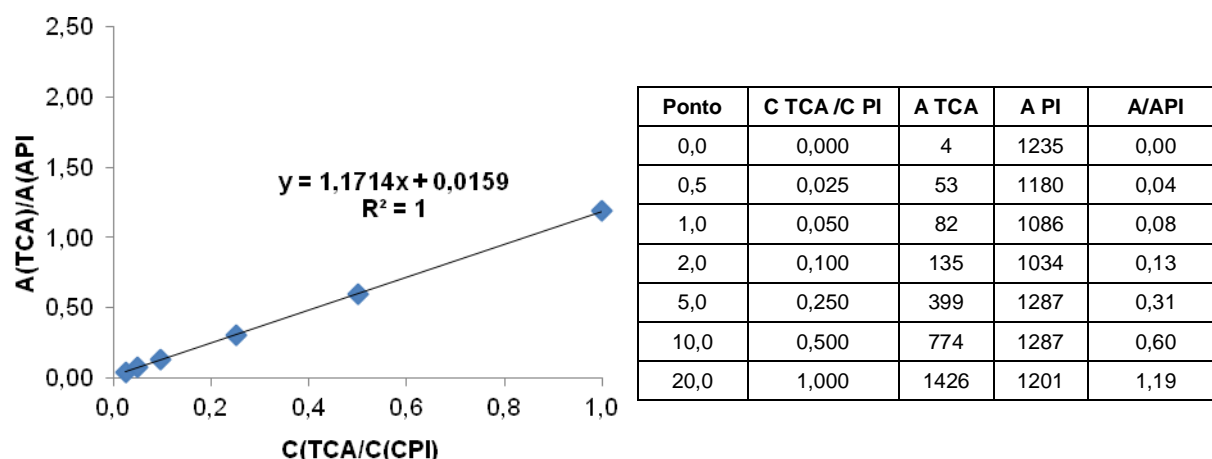


Figura 7 – Curva de calibração obtida no equipamento de cromatografia GC-MS Shimadzu que representa a linearidade do método.

3.5.2 Gama de Trabalho

Para o estudo da gama de trabalho foram analisadas dez réplicas de cada ponto da reta (Anexo 2) e determinados os coeficientes de variação; estes foram inferiores a 10% (Tabela 2). Consequentemente verificou-se que a gama de trabalho pré-determinada é apropriada para a análise de 2,4,6-TCA de amostras que se encontrem neste intervalo de concentrações.

Tabela 2 - Valores médios de TCA, desvio padrão e respetivos coeficientes de variação para cada ponto da reta.

ECD2			
Ponto (ng/L)	TCA médio (ng/L)	D.P	C.V (%)
0,0	0,0	0,04	-
0,5	0,5	0,00	3,7
1,0	1,0	0,10	5,0
2,0	2,0	0,07	4,0
5,0	5,0	0,05	1,1
10,0	10,0	0,41	4,2
20,0	20,0	0,38	1,9

GC- MS SHIMADZU			
Ponto (ng/L)	TCA médio (ng/L)	D.P	C.V (%)
0,0	0,0	0,0	-
0,5	0,5	0,03	6,2
1,0	1,0	0,0	0,4
2,0	2,0	0,03	0,0
5,0	5,0	0,03	0,5
10,0	10,0	0,03	0,3
20,0	20,0	0,03	0,2

3.5.3 Limiares analíticos: limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Através do estudo da gama de trabalho podem ser obtidos os limites de quantificação do método nos equipamentos ECD 2 e GC-MS Shimadzu (Tabela 2). Observou-se que o ponto 0,5 ng/L (ponto da reta de calibração de menor concentração), representa o limite de quantificação do método para os dois equipamentos dado que os coeficientes de variação

correspondentes são inferiores a 10%. Consequentemente, o limite de deteção, que representa um terço do limite de quantificação, é 0,2 ng/L.

3.5.4 Precisão

3.5.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi realizada em duas concentrações diferentes, 0,5 e 20 ng/L. Os resultados obtidos, mostram que os coeficientes de variação das dez réplicas analisadas de ambos os padrões (concentração mais baixa e concentração mais alta) são inferiores a 10% (Tabela 3 e Anexo 3). Assim, pode-se afirmar que o método é repetível nas condições estabelecidas (mesmo operador, mesmo dia de preparação das réplicas e mesmo cromatógrafo).

Tabela 3 - Resultados da repetibilidade para o ECD2 e o GC-MS Shimadzu.

ECD2				GC- MS Shimadzu			
Ponto (ng/L)	TCA médio (ng/L)	D.P	C.V (%)	Ponto (ng/L)	TCA médio (ng/L)	D.P	C.V (%)
0,5	0,5	0,00	3,7	0,5	0,5	0,00	6,2
20,0	19,7	0,4	1,9	20,0	20,0	0,00	0,2

3.5.4.2 Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi obtida através da análise de duas amostras com duas gamas de TCA: amostra A [0,5-1,0] ng/L e amostra B [10; 20] ng/L. A partir de cada amostra, oito diferentes operadores preparam 8 réplicas que foram analisadas em todos os cromatógrafos disponíveis no laboratório de I&D. Embora a validação do método tenha sido totalmente efetuada nos equipamentos ECD2 e GC-MS Shimadzu, alguns parâmetros como por exemplo, a precisão intermédia também foram calculados noutros equipamentos (outros ECD's).

No Anexo 4, estão apresentados todos os resultados individuais dos diferentes equipamentos para as amostras A e B. Na Tabela 4 são apresentados os resultados da precisão intermédia ($S_{i(j)}$) e do limite da precisão intermédia (LPI) para cada um dos cromatógrafos e para as amostras A e B, envolvendo os resultados de todos os operadores. Por outro lado, na Tabela 5 são apresentados os resultados da precisão intermédia ($S_{i(j)}$) e do limite da precisão intermédia (LPI) tendo em conta os resultados de todos os operadores, de todos os cromatógrafos e das duas amostras.

Tabela 4 - Resultados da Precisão Intermédia para as duas amostras em todos os cromatógrafos.

Equipamentos	Amostra A		Amostra B	
	Si ()	LPI	Si ()	LPI
ECD1	0,04	0,12	0,35	0,98
ECD2	0,25	0,71	0,67	1,89
ECD3	0,15	0,41	0,37	1,04
ECD4	0,06	0,17	0,24	0,66
ECD5	0,14	0,41	0,48	1,35
ECD6	0,08	0,24	0,36	1,01
ECD7	0,10	0,29	0,38	1,06
GC- MS Shimadzu	0,10	0,27	0,42	1,20
Global	0,4	1,1	1,6	4,4

Tabela 5 - Precisão Intermédia global que inclui os resultados de todos os cromatógrafos, amostras e operadores).

Precisão Intermédia (ng/L)	Si ()	LPI
	1,1	3,1

Verificou-se que o método de análise de TCA do departamento I&D, da A&I, que envolve a análise de amostras de diferentes gamas de concentração, preparadas por diferentes operadores e em tempos diferentes e analisadas em diferentes cromatógrafos, apresenta um desvio padrão da precisão intermédia global de 1,1 ng/L. Este valor, significa que o método é bastante preciso (quanto menor for o desvio da precisão intermédia, maior é a precisão). Por outro lado, o limite da precisão intermédia é 3,1 ng/L, ou seja, quando uma amostra é preparada por diferentes operadores, em diferentes tempos e analisada em diferentes cromatógrafos, existe uma variação máxima de resultados dessa amostra de 3,1 ng/L.

3.5.5 Exatidão

A Exatidão foi analisada através do último ensaio interlaboratorial, promovido pela CTCOR, e onde o laboratório de I&D da A&I é um dos participantes. Neste ensaio o laboratório do I&D obteve um valor de z-score de 1,0 (Figura 8). Segundo o que está descrito na Norma ISO 5725-2, este resultado permite uma avaliação satisfatória do laboratório do I&D uma vez que o z-score é inferior a 2,0. Este resultado é baseado no cálculo da razão do desvio do erro sistemático ($|X_{I\&D} - \bar{X}|$) pelo desvio padrão da reprodutibilidade (S_R). (CTCOR, Junho 2013).

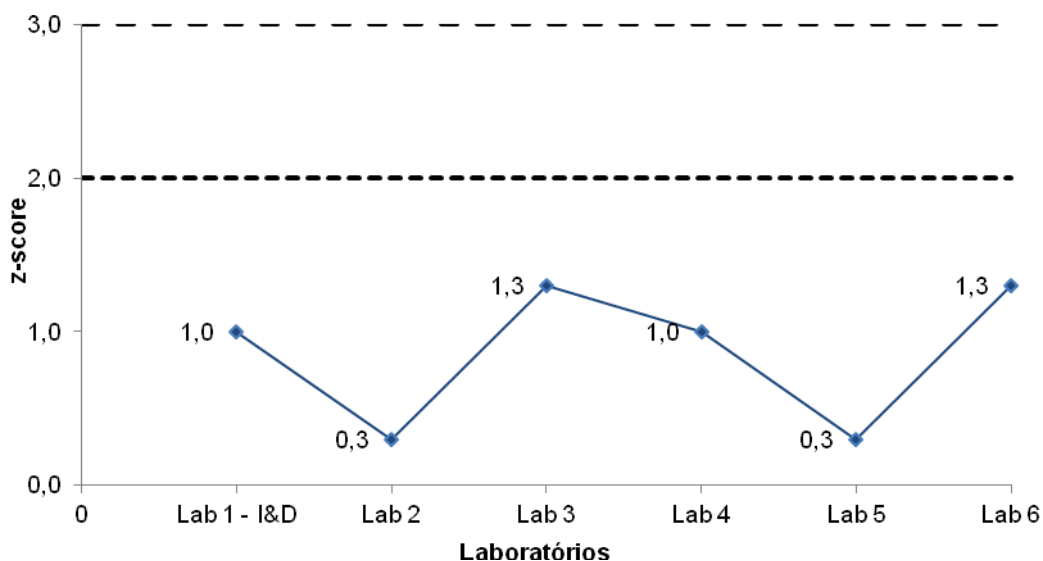


Figura 8 - Resultados do último ensaio interlaboratorial onde estão representados os valores de z-score.

3.5.6 Robustez

Os resultados médios da concentração de TCA, obtidos nos diferentes ensaios, em que se fez variar o volume da solução e do padrão interno, relativamente ao ensaio referência, estão representados na Tabela 6. No Anexo 5 estão apresentados todos os resultados dos ensaios e testes estatísticos efetuados (média das variâncias e o teste t). Pela análise da Tabela 6, verifica-se que o método é robusto uma vez que o coeficiente de variação inferior é inferior a 10%. Por sua vez, os testes estatísticos efetuados (média das variâncias e o teste t) não mostram diferenças significativas nas variações efetuadas de volume de macerado pipetado (Ensaio A e B) nem quando o volume de padrão interno adicionado é 95 µL (Ensaio D). Contudo, quando se adiciona 105 µL de padrão interno (Ensaio E), há diferenças significativas de resultados, pelo que o método não é robusto neste caso (ver resultados do tratamento estatístico no Anexo 5).

Tabela 6 - Resultados globais da robustez.

Ensaio	Média	D.P	C.V%
Ensaio A - referência	3,22 ^a	0,07	2,1
Ensaio B	3,21 ^a	0,25	7,9
Ensaio C	3,25 ^a	0,12	3,7
Ensaio D	3,18 ^a	0,05	1,7
Ensaio E	3,17 ^b	0,03	0,9

Letras diferentes em superescrito na mesma coluna indicam grupos com diferenças estatisticamente diferentes.

3.6 Discussão dos resultados da validação

O objetivo inicial do trabalho foi atingido com a realização da validação do método de analítico de 2,4,6-TCA, utilizado no laboratório do departamento de I&D, da empresa A&I. A validação foi essencial para definir se o método desenvolvido está completamente adequado aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Nesse sentido, a validação foi efetuada através da avaliação de diferentes parâmetros analíticos e que são considerados os mais adaptados à realidade do laboratório - gama de trabalho: 0,5 a 20 ng/L, linearidade do método ao longo de toda a gama de trabalho, limite de detecção: 0,2 ng/L, limite de quantificação: 0,5 ng/L e o método foi considerado exato, preciso e robusto nas condições estabelecidas.

4 Cinética de adsorção e de dessorção de TCA de diferentes rolhas

O objetivo principal deste estudo é avaliar a cinética de adsorção de TCA por diferentes rolhas (cortiça natural e microaglomerado - Neutrocork®) a partir de um vinho previamente contaminado com o dito composto a diferentes concentrações. Este estudo foi planeado para 24 meses, sendo efetuadas análises periódicas ao longo do tempo. Contudo, dada a duração do estágio, só são apresentados resultados para os primeiros 5 meses após o engarrafamento.

4.1 Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho

4.1.1 Materiais

Para o estudo da cinética de migração de TCA em rolhas de cortiça foram utilizados:

- GC-MS Shimadzu (modelo QP2010 plus NCI);
- Solução simulante de vinho: solução hidroalcoólica, 12% EtOH, com 5 g/L de ácido tartárico e pH ajustado a 3,2;
- 120 rolhas naturais e 120 rolhas microaglomeradas Neutrocork® isentas de contaminação com TCA;
- Padrões de controlo para a análise de TCA com 2,0 ng/L;
- Solução hidroalcoólica a 12% vol/vol (EtOH);
- Soluções de 2,4,6-TCA de 100 ng/L e 100 µg/L;
- Solução de d₅-TCA de 2 µg/L, usada como padrão interno.

4.1.2 Métodos

Foram selecionadas **120 rolhas Naturais** (45x24mm) e **120 rolhas microaglomeradas**, Neutrocork®, não contaminadas com TCA, isto é, com valores inferiores a 0,5 ng/L. As concentrações de TCA foram avaliadas da seguinte forma: todas as rolhas acima descritas foram maceradas, parcialmente (parte inferior das rolhas que irá estar em contato com a solução), em solução hidroalcoólica a 12% vol/vol de EtOH durante 24h à temperatura ambiente. Estes macerados foram analisados pelo método cromatográfico descrito no ponto

3.3.1. Os resultados preliminares de análises de TCA às rolhas mostraram que todos os valores estavam abaixo do limite de quantificação do método, isto é 0,5 ng/L.

Todas as 240 rolhas foram devidamente marcadas, identificadas e submetidas a tratamento superfície. As rolhas naturais de cortiça e as rolhas microaglomeradas foram tratadas com uma mistura de silicone e parafina (*Suncork*) e elastómero de silicone (*Bopsil*), respetivamente.

Após 24 horas de estabilização, foi realizado um engarrafamento (20 e 21/12/2012) com **solução simulante de vinho contaminada com diferentes concentrações de TCA**, nomeadamente com **5 e 20 ng/L e 5 e 10 ng/L**, nas garrafas vedadas com **rolhas naturais e Neutrocork®**, respetivamente. Foram utilizadas garrafas com a capacidade de 375 mL e as soluções simulantes de vinho foram, previamente, analisadas para confirmar a contaminação inicial de TCA.

Após engarrafamento as garrafas foram armazenadas em posição horizontal à temperatura ambiente sendo analisadas após diferentes tempos de conservação: 1 semana, 1 e 5 meses após engarrafamento. Em cada um destes períodos, foram selecionadas dez garrafas com a solução simulante por tipo de rolha e gama de contaminação, o que fez um total de 40 amostras por cada período de tempo. Em paralelo, em cada ponto de análise, foram também analisadas quatro garrafas com solução simulante não contaminada por tipo de rolha.

Nos pontos de análises, as rolhas foram extraídas das garrafas com um saca-rolhas e em seguida a parte inferior de cada rolha foi colocada a macerar (maceração parcial), individualmente, em 20 mL de solução hidroalcoólica durante 24h à temperatura ambiente. Após este período, uma amostra de 10 mL de cada macerado foi recolhido e analisado em termos de concentração de TCA, por cromatografia gasosa pelo método descrito no ponto 3.3.1. Em simultâneo foi recolhida uma amostra de 10 mL de cada solução simulante engarrafada que foram submetidas à mesma análise cromatográfica. Estas análises de TCA foram realizadas no GC-MS utilizando o d₅-TCA como padrão interno (20,0 ng/L), padrões de controlo de 2,0 ng/L e a seguinte reta de calibração: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0 ng/L.

4.1.3 Resultados

Os níveis iniciais de TCA de todas as soluções mostraram que a contaminação pretendida foi obtida uma vez que os valores de médios de contaminação ficaram próximos dos valores teóricos (5, 10 e 20 ng/L). As soluções iniciais de controlo não apresentaram

TCA, o que demonstra que o modo operativo de contaminação foi realizado na perfeição (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da análise de TCA realizada às soluções simulantes de vinho contaminadas, utilizadas no engarrafamento

Rolhas	TCA (ng/L)	Solução
Cortiça natural	nd	0,0
	5	4,9
		4,8
		4,9
		4,8
	20	20,5
		20,2
		20,7
		20,3
Microaglomerado	nd	0,0
	5	5,1
		4,9
		5,0
		5,0
	10	9,8
		10,1
		10,0
		9,9

Ao longo do tempo (1 semana, 1 e 5 meses de engarrafamento), observou-se que as soluções e respetivas rolhas das garrafas controlo apresentaram valores de TCA inferiores ao limite de quantificação (0,5 ng/L). Estes resultados confirmam que as rolhas e as soluções simulantes foram controlos efetivos deste ensaio pois não apresentaram qualquer contaminação.

Relativamente, às **soluções contaminadas com 5 ng/L e vedadas com rolhas de cortiça natural**, observou-se uma diminuição média da concentração de TCA nas soluções de cerca de 2,0 ng/L ao final de 1 semana (cerca de 40% em relação ao valor inicial). Após 1 e 5 meses de engarrafamento, esta perda atingiu 2,1 e 3,4 ng/L, respetivamente (cerca de 42% e 68%, respetivamente, em relação ao valor inicial). Em relação aos resultados de TCA, obtidos para as respetivas rolhas (maceração parcial), verificou-se, após uma semana, 1 e 5 meses, uma adsorção de 0,4, 0,7 e 0,3 ng/L, respetivamente (Figura 9). É de realçar que o primeiro e o último valor são inferiores ao limite de quantificação.

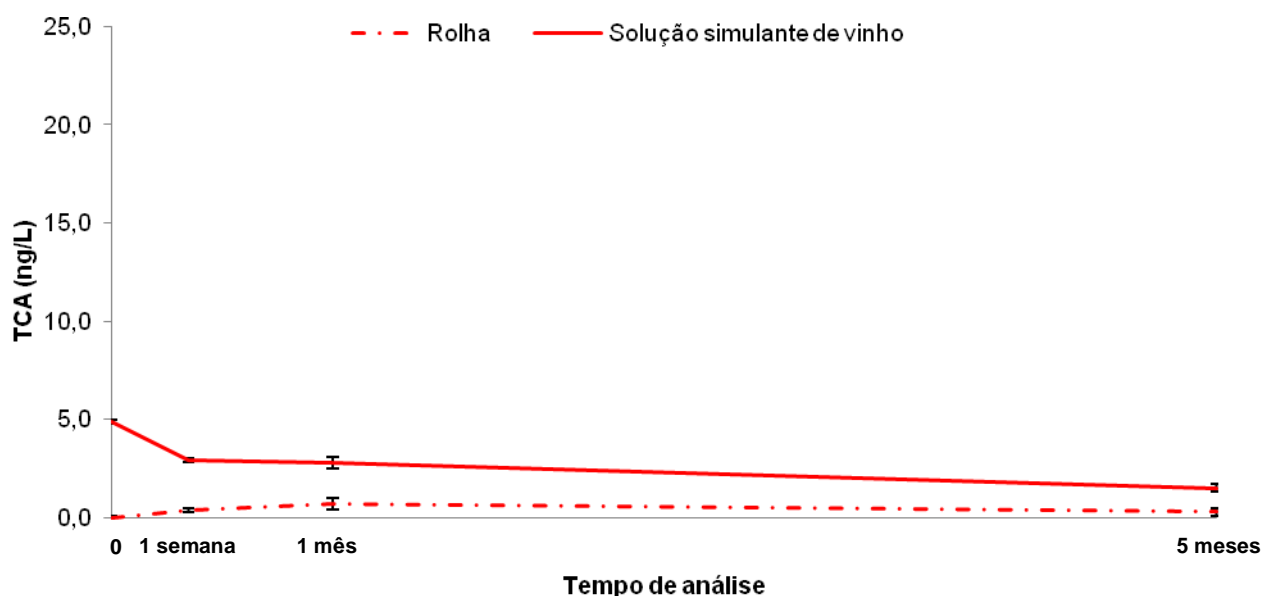


Figura 9 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 5 ng/L e nas rolhas de cortiça natural, ao longo do tempo de engarrafamento.

Analisando os resultados de TCA da **solução simulante de vinho contaminada com 20 ng/L e vedada com rolhas de cortiça natural**, ao longo dos 5 meses de conservação, verificou-se uma diminuição média da concentração de TCA em 5,6 ng/L ao final de 1 semana de engarrafamento (cerca de 28% em relação ao valor inicial). Após 1 e 5 meses de engarrafamento, esta perda, em relação ao valor inicial, foi de 6,5 e 12,3 ng/L, respetivamente (cerca de 33% e 62%, respetivamente, em relação ao valor inicial). Em relação aos resultados de TCA, obtidos para as respetivas rolhas (maceração parcial), verifica-se que após 1 semana, 1 e 5 meses obtiveram-se valores superiores aos iniciais em 1,2; 2,1 e 1,5 ng/L, respetivamente (Figura 10).

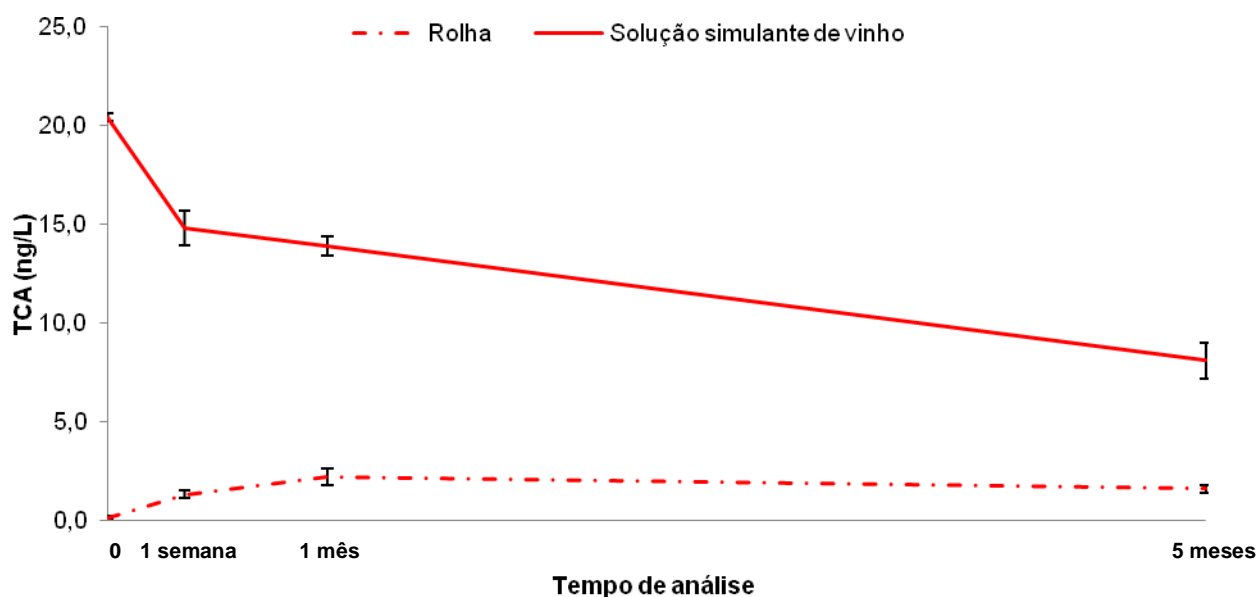


Figura 10 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 20 ng/L e nas rolhas de cortiça natural, ao longo do tempo de engarrafamento.

Os resultados de TCA das **soluções simulantes de vinho vedadas com rolhas Neutrocork® previamente contaminada com 5 ng/L**, mostrou uma diminuição média da concentração de TCA em 2,4 ng/L após 1 semana de conservação (cerca de 48% em relação ao valor inicial) (Figura 11). Após 1 e 5 meses de engarrafamento esta diminuição foi de 2,8 e 4,2 ng/L, respetivamente, (cerca de 56% e 84%, respetivamente, em relação ao valor inicial). Em relação aos resultados de TCA, obtidos para as respetivas rolhas (maceração parcial), verifica-se que ao final de 1 semana, 1 e 5 meses se obtiveram valores superiores aos iniciais em 0,3 ng/L. Estes resultados mostram que para esta concentração de contaminação, as perdas de TCA da solução não se traduzem por um enriquecimento maior de TCA libertável da superfície de contacto das rolhas microaglomeradas.

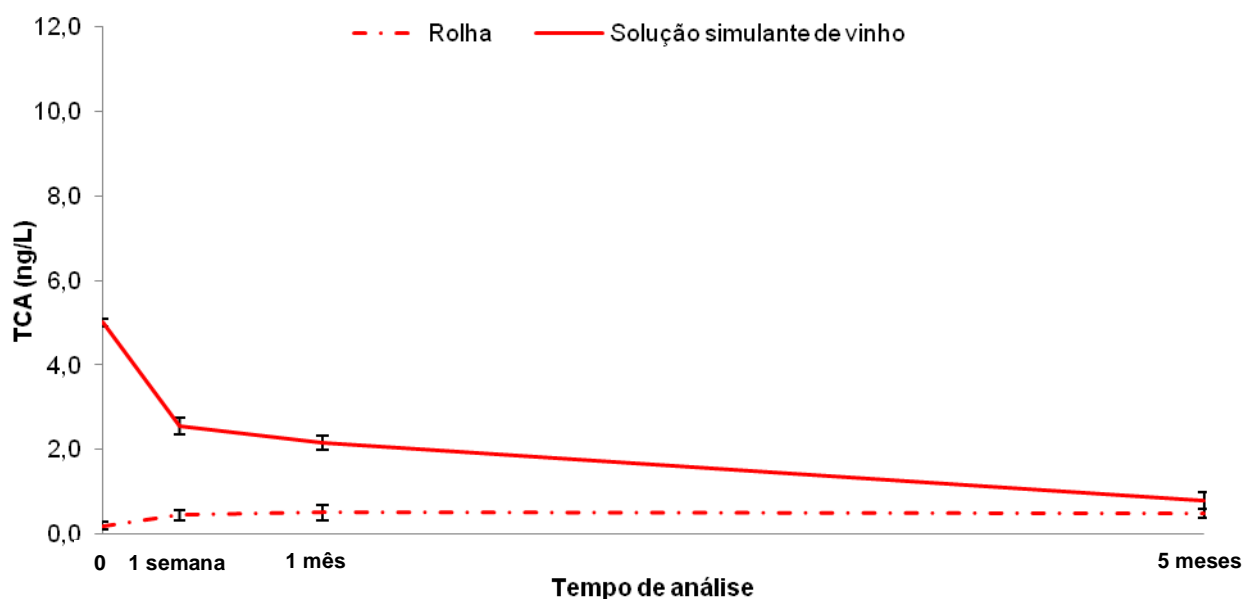


Figura 11 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 5 ng/L e nas rolhas de cortiça microaglomerada, ao longo do tempo de engarrafamento.

Ao longo dos 5 meses de conservação observou-se que o TCA das **soluções simulantes de vinho contaminadas com 10 ng/L** e vedadas com rolhas microaglomeradas, diminuíram em média 3,9 ng/L após 1 semana de engarrafamento (cerca de 39%, em relação ao valor inicial) (Figura 12). Após 1 e 5 meses de engarrafamento, esta diminuição foi de 5,1 e 8,2 ng/L, (cerca de 51% e 82%, respetivamente, em relação ao valor inicial). A superfície em contacto com solução ganhou após 1 semana, 1 e 5 meses, 0,4; 0,8 e 0,4 ng/L de TCA, respetivamente.

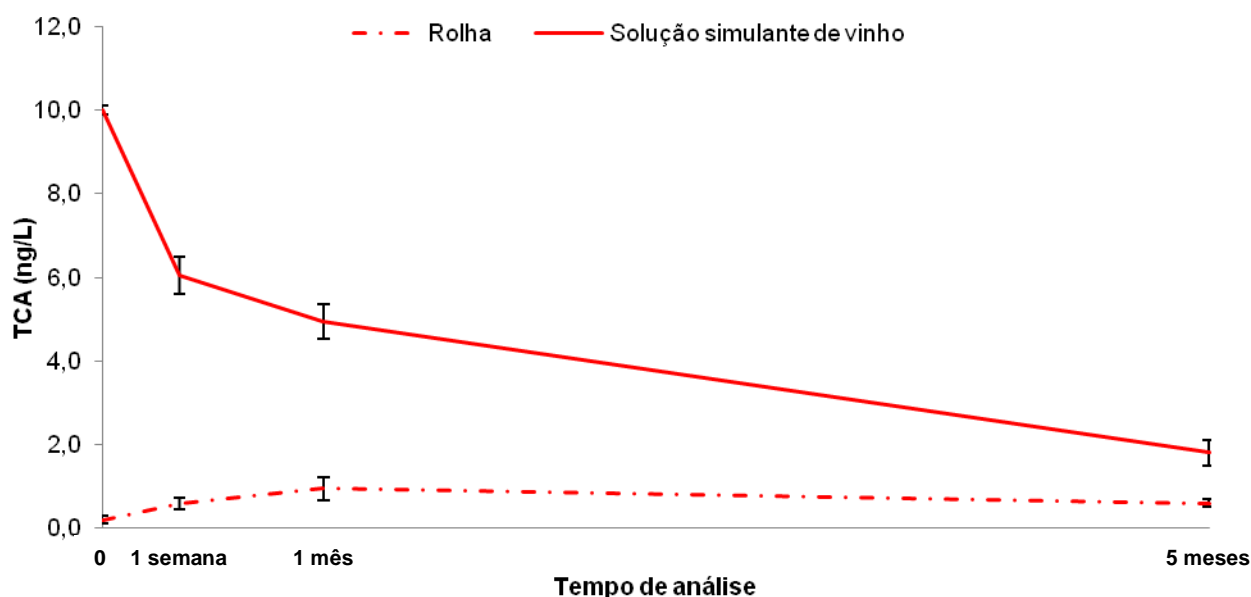


Figura 12 – Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho contaminada com 10 ng/L e nas rolhas de cortiça microaglomerada, ao longo do tempo de engarrafamento.

4.1.4 Discussão dos resultados

Estes resultados mostram que a perda de TCA da solução simulante de vinho não foi compensada com um aumento proporcional de TCA na rolha cortiça natural; esta situação deve-se ao facto da percentagem de TCA extraído da rolha cortiça natural para a solução de maceração ser somente uma pequena parte do que realmente foi absorvido pela rolha (Hervé *et al.*, 2000). No entanto não podemos excluir a possibilidade que tenha havido alguma volatilização do TCA da solução ao longo do processo de engarrafamento e preparação das amostras. É de salientar que para as mesmas gamas de concentrações vai havendo diminuição da concentração de TCA que se acentua no último período de análise. Contudo, quando se faz a comparação entre diferentes rolhas, verificou-se uma maior redução na concentração de TCA nas soluções vedadas com rolhas microaglomerada

(Neutrocork), quando comparadas com aquelas vedadas com cortiça natural. Estes resultados parecem mostrar que as rolhas microaglomeradas possuem uma maior capacidade de adsorção de TCA que as rolhas de cortiça natural. Estes resultados confirmam as observações de Pereira (2011) que mostraram que produtos que possuem colas de poliuretano na sua composição possuem uma elevada capacidade de adsorção de compostos voláteis do tipo TCA (Anjaneyulu, 1990).

4.2 Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho

O objetivo principal deste estudo é avaliar a cinética de migração de TCA da superfície de diferentes rolhas (cortiça natural e microaglomerado) para um vinho que não tivesse TCA na sua composição inicial. Tal como o estudo anterior, este foi planeado para 24 meses sendo efetuadas análises periódicas ao longo do tempo, contudo, dada a duração do estágio só são apresentados resultados para os primeiros 5 meses de conservação.

4.2.1 Materiais

Para o estudo da cinética de migração de TCA em rolhas de cortiça foram utilizados:

- GC-MS Shimadzu (modelo QP2010 plus NCI);
- Solução simulante de vinho: solução hidroalcoólica, 12% EtOH, com 5 g/L de ácido tartárico e pH ajustado a 3,2;
- 150 rolhas naturais e 150 rolhas Neutrocork® com diferentes gamas de contaminação com TCA;
- Padrões de controlo para a análise de TCA com 2,0 ng/L;
- Solução hidroalcoólica a 12% vol/vol (EtOH);
- Soluções de 2,4,6-TCA de 100 µg/L;
- Solução de d₅-TCA de 2 µg/L, usada como padrão interno.

4.2.2 Métodos

Foram selecionadas **150 rolhas naturais** (45x24mm). Destas, 50 tinham TCA não detetável, 50 com contaminações individuais de aproximadamente 5 ng/L e as restantes 50 rolhas com valores de TCA próximos de 20 ng/L.

Relativamente às **rolhas microaglomeradas** foram selecionados 3 grupos de granulado com os seguintes níveis de contaminação: <0,5 ng/L, 6 e 11 ng/L. Estes granulados foram utilizados para produzir rolhas microaglomeradas Neutrocork de acordo com o processo produtivo apresentado no Anexo 9. O objetivo final era obter 50 rolhas microaglomeradas para cada um dos seguintes níveis contaminação: <0,5; 2 e 6 ng/L.

Todas estas rolhas, cortiça natural e microaglomeradas, foram maceradas parcialmente (superfície que iria estar em contacto com a solução engarrafada) em solução hidroalcoólica a 12% vol/vol de EtOH, seguido de análise cromatográfica dos níveis de TCA por SPME-GC-MS. Estas análises foram realizadas para confirmar que os valores de TCA se encontravam dentro das gamas pretendidas. Os resultados dos controlos preliminares mostraram que a contaminação das rolhas de cortiça natural se encontrava dentro dos intervalos previamente determinados (Tabela 8). Já as rolhas microaglomeradas apresentaram algumas discrepâncias relativamente ao inicialmente pretendido pois os valores que deveriam ser em média 2 ng/L foram ligeiramente inferiores; enquanto para valores na ordem de grandeza de 6 ng/L foram ligeiramente superiores (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de TCA nas diferentes rolhas de cortiça naturais e microaglomeradas e da solução simulante de vinho utilizadas no engarrafamento.

Rolhas	Gama de TCA pretendida (ng/L)	Concentrações de TCA(ng/L)		
		Média	Min	Máx
Cortiça natural	<0,5	0,0	0,0	0,1
	5	5,9	3,7	9,0
	20	17,3	11,4	28,6
Microaglomerado	<0,5	0,2	0,0	0,9
	2	1,6	0,8	2,1
	5	6,9	5,7	8,5

(limite de quantificação= 0,5 ng/L)

Após maceração, todas as rolhas foram secas ao ar durante 24h, período após qual as rolhas foram devidamente marcadas, identificadas e submetidas a tratamento superfície. As rolhas naturais de cortiça e as rolhas microaglomeradas foram tratadas com uma mistura de silicone e parafina (*Suncork*) e elastómero de silicone (*Bopsil*), respectivamente.

Após 24 horas de estabilização, foram realizados os engarrafamentos (18/01/2013 e 25/01/2013) dos dois tipos de rolhas com solução simulante de vinho (solução hidroalcoólica, 12% EtOH, com 5 g/L de ácido tartárico e pH ajustado a 3,2). A solução simulante de vinho foi previamente analisada em termos de TCA para garantir que esta não se encontrava contaminada. Em cada garrafa de 375 mL (bordalesa de cor branca) foi colocado 350 mL de solução simulante; estas garrafas foram posteriormente vedadas com as diferentes rolhas de cortiça utilizando uma arrolhadora Bertolazzo Epsilon (Zimella, Itália). Após engarrafamento, todas as garrafas foram armazenadas em posição horizontal à temperatura ambiente sendo analisadas após diferentes tempos de conservação: 1 semana, 1 e 5 meses após engarrafamento. Em cada um destes períodos, foram seleccionadas dez garrafas com a solução simulante por tipo de rolha e gama de contaminação, o que fez um total de 60 amostras por cada período de tempo.

Em cada período de análise pré-definido, as rolhas foram extraídas das garrafas com um saca-rolhas e em seguida a parte inferior de cada rolha foi colocada a macerar (maceração parcial), individualmente, em 20 mL de solução hidroalcoólica durante 24h à temperatura ambiente. Após este período, uma amostra de 10 mL de cada macerado foi recolhido e analisado em termos de concentração de TCA por cromatografia gasosa pelo método de SPME-GC-MS descrito no ponto 3.3.1. Em simultâneo, foram recolhidas amostra de 10 mL de cada solução simulante engarrafada que foram submetidas à mesma análise cromatográfica mencionada acima.

4.2.3 Resultados

Os resultados de TCA da solução simulante de vinho e das rolhas de cortiça natural, para as garrafas de controlo, foram inferiores ao limite de quantificação (0,5 ng/L) após 1 semana, 1 e 5 meses de engarrafamento, não tendo sido detetado TCA em nenhum dos ensaios e garrafas.

Relativamente às **rolhas de cortiça natural contaminadas com cerca de 5 ng/L**, verificou-se uma transferência média, ao final de 1 semana, de 0,7 ng/L de TCA da superfície contaminada da rolha para o simulante de vinho. A migração aumentou durante os 5 meses uma vez que os valores médios de TCA nas soluções foram de 1,0 e 2,0 ng/L após 1 mês e 5 meses, respetivamente. Em relação ao TCA detetado nas rolhas propriamente ditas, observou-se que o TCA libertável após uma semana, 1 e 5 meses eram superiores aos iniciais em 0,5; 0,2 e 3,3 ng/L, respetivamente correspondendo a um aumento relativo, de TCA libertável, de 10%, 4%, e 66% respetivamente. Os valores obtidos foram superiores às concentrações iniciais de TCA dessas mesmas rolhas; contudo, os aumentos observados não foram significativos durante o primeiro mês, estando estes valores dentro do erro associado ao método utilizado. Após 5 meses, observou-se um acréscimo médio de 3,3 ng/L, o que poderá eventualmente ser explicado com o facto da compressão da rolha no gargalo, associado à maior penetração de solução na rolha, ter colocado disponível algum TCA que estaria na proximidade da superfície e que não foi quantificado inicialmente.

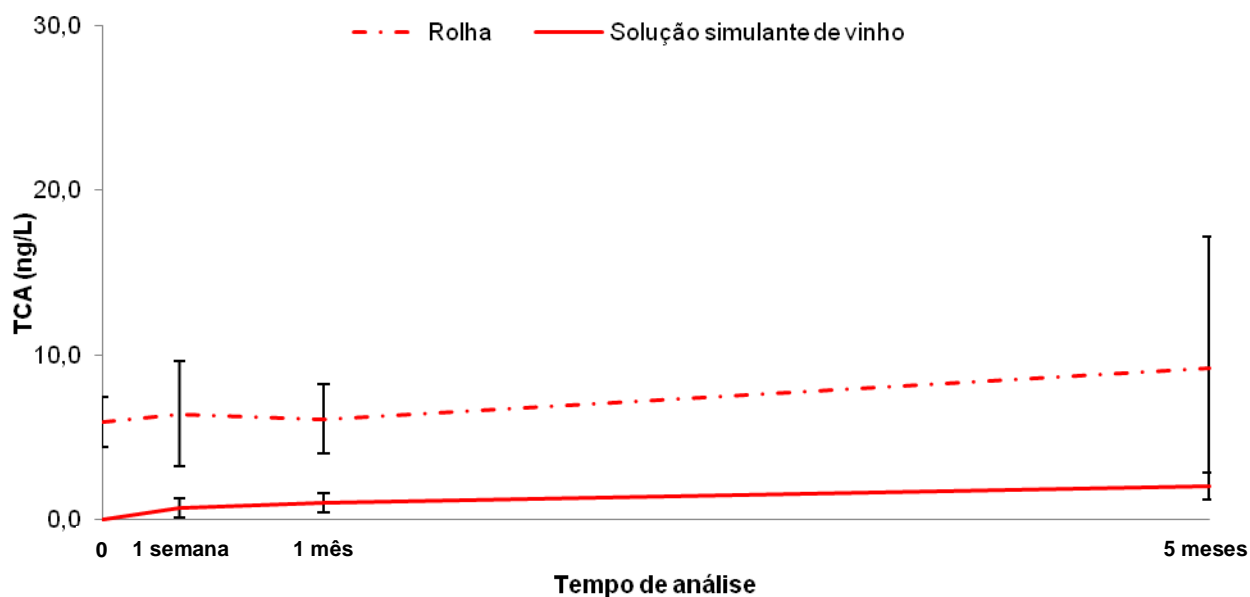


Figura 13 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas de cortiça natural que possuíam uma contaminação inicial de TCA de 5 ng/L.

Analisando os resultados de TCA da solução simulante de vinho, ao longo do tempo de análise (1 semana, 1 e 5 meses de engarrafamento) verificou-se um aumento médio da concentração de TCA nas soluções, vedadas com **rolhas de cortiça natural contaminadas com cerca de 20 ng/L**, em 2,2 ng/L após 1 semana de engarrafamento. Após 1 e 5 meses de engarrafamento este aumento, em relação ao valor inicial, foi de 3,0 e 7,0 ng/L, respetivamente (Figura 14). Estes resultados confirmam aqueles obtidos acima onde também se observa um aumento do nível de TCA relativamente ao quantificado inicialmente. Estas observações confirmam que a compressão da rolha na garrafa afeta a disponibilidade de TCA na superfície da rolha aumentando o nível de TCA libertável das rolhas de cortiça natural.

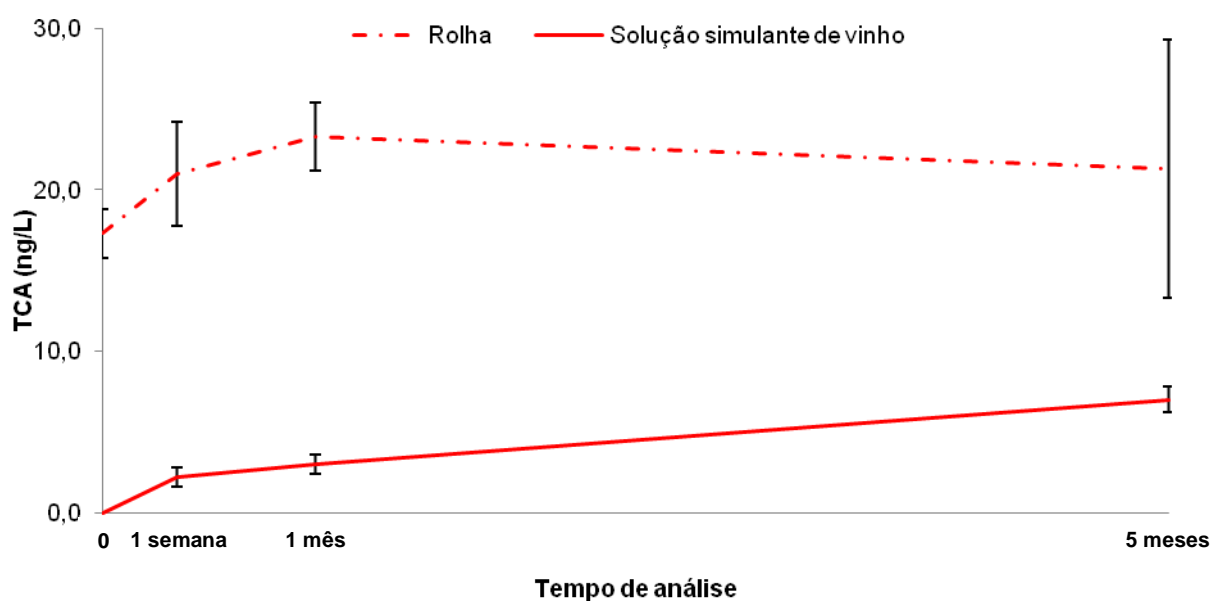


Figura 14 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas de cortiça natural que possuíam uma contaminação inicial de TCA de 20 ng/L.

Relativamente às rolhas **microaglomeradas**, observou-se que a solução simulante de vinho vedadas com rolhas com TCA inferior a 0,5 ng/L, apresentou efetivamente valores de TCA não quantificáveis (inferior a 0,5 ng/L) durante o primeiro mês de conservação. No entanto, após 5 meses de conservação, **a solução** já apresentava uma concentração média de TCA de 0,6 ng/L. Em relação às rolhas (maceração parcial), verificou-se que a partir da primeira semana de conservação, os valores de TCA tornaram-se claramente quantificáveis, em média 0,7 e 0,8 ng/L após o primeiro mês e 5 meses, o que representa um aumento médio, em relação ao valor inicial, de 40% e 80%, respetivamente (Figura 15). Tal como observado para as rolhas de cortiça natural, verificou-se, ao longo do tempo, um aumento progressivo da migração de TCA da rolha para a solução simulante que resultou do facto deste composto ficar mais disponível para migrar. Este facto poderá estar relacionado com a alteração da disponibilidade do TCA devido à compressão da rolha no gargalo, mas também com a maior penetração de simulante na rolha que origina uma maior extração de TCA.

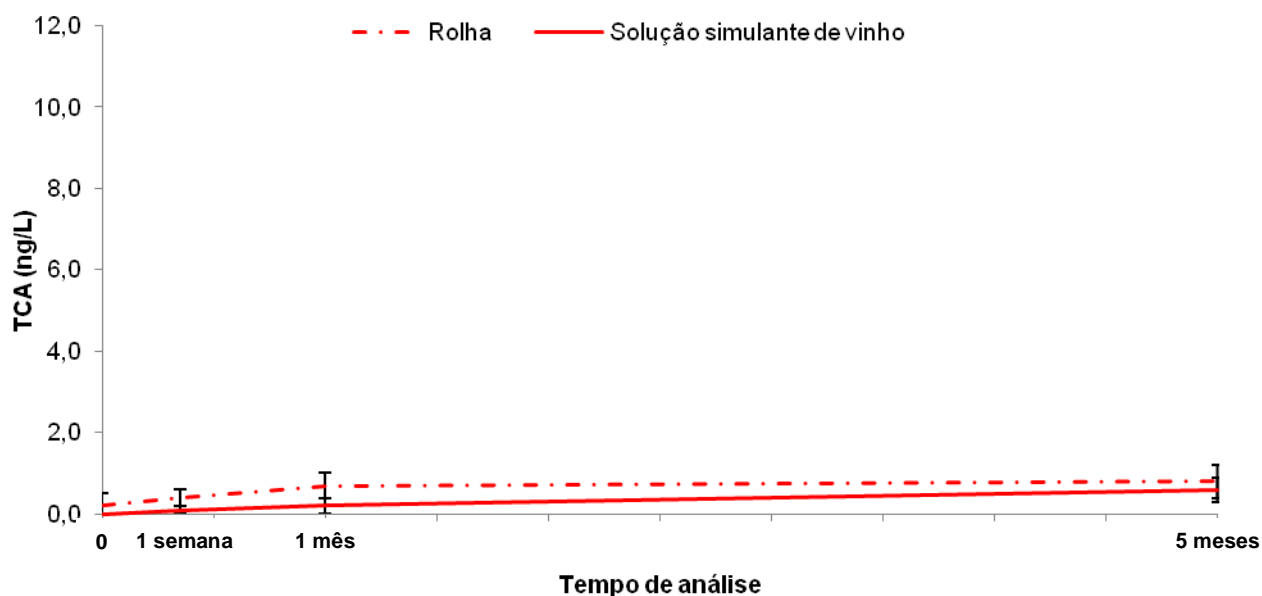


Figura 15 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial de TCA inferior a 0,5 ng/L.

Os resultados das soluções simulantes de vinho vedadas com **rolhas microaglomeradas (contaminadas com valores iniciais médios de TCA de 1,6 ng/L)** mostraram um aumento médio da concentração de TCA em 0,3 ng/L após 1 semana de conservação (Figura 16). Após 1 e 5 meses de engarrafamento, este aumento, em relação ao valor inicial, foi de 0,4 e 0,7 ng/L, respetivamente. Em relação às concentrações de TCA nas rolhas propriamente ditas, verificou-se, após uma semana e 1 mês, valores médios inferiores aos iniciais em 0,2 ng/L (diminuição de 13% em relação ao valor inicial). No entanto, após 5 meses, as rolhas já apresentavam um valor médio superior ao inicial em 0,4 ng/L (aumento de 25%, em relação ao valor inicial) o que está de acordo com os resultados obtidos acima com rolhas microaglomeradas com TCA inicial inferior a 0,5 ng/L.

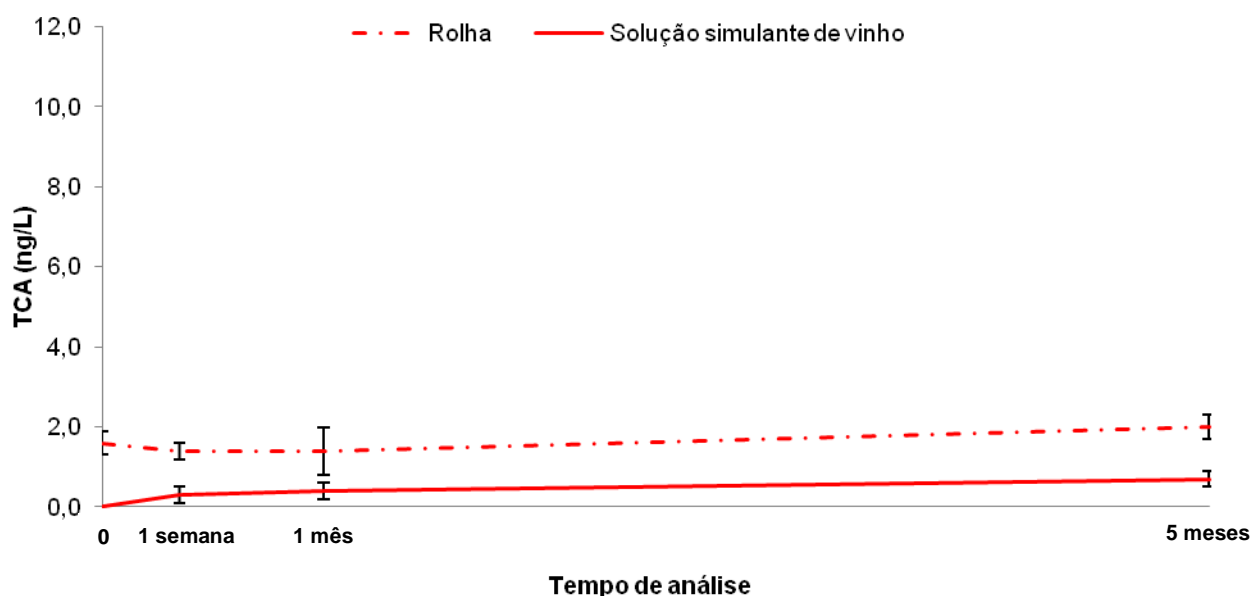


Figura 16 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial média de TCA de 1,6 ng/L.

Relativamente ao ensaio das **rolhas microaglomeradas com maior nível de contaminação** (Figura 17), observou-se um aumento médio da concentração de TCA em 1,1 ng/L após 1 semana de engarrafamento. Após 1 e 5 meses de engarrafamento, as soluções já estavam mais contaminadas, em média, com 1,7 e 3,8 ng/L de TCA, respetivamente. Relativamente às rolhas, verificou-se que após uma semana e 1 mês, os valores eram inferiores aos inicialmente quantificados (mesmas rolhas) em 1,3 e 1,6 ng/L, respetivamente (diminuição de 19 e 23%, respetivamente, em relação ao valor inicial). No entanto, após 5 meses, as rolhas apresentaram em média mais 1,8 ng/L de TCA relativamente ao que tinha sido quantificado no início do ensaio (aumento de 26%, em relação ao valor inicial) (Figura 17).

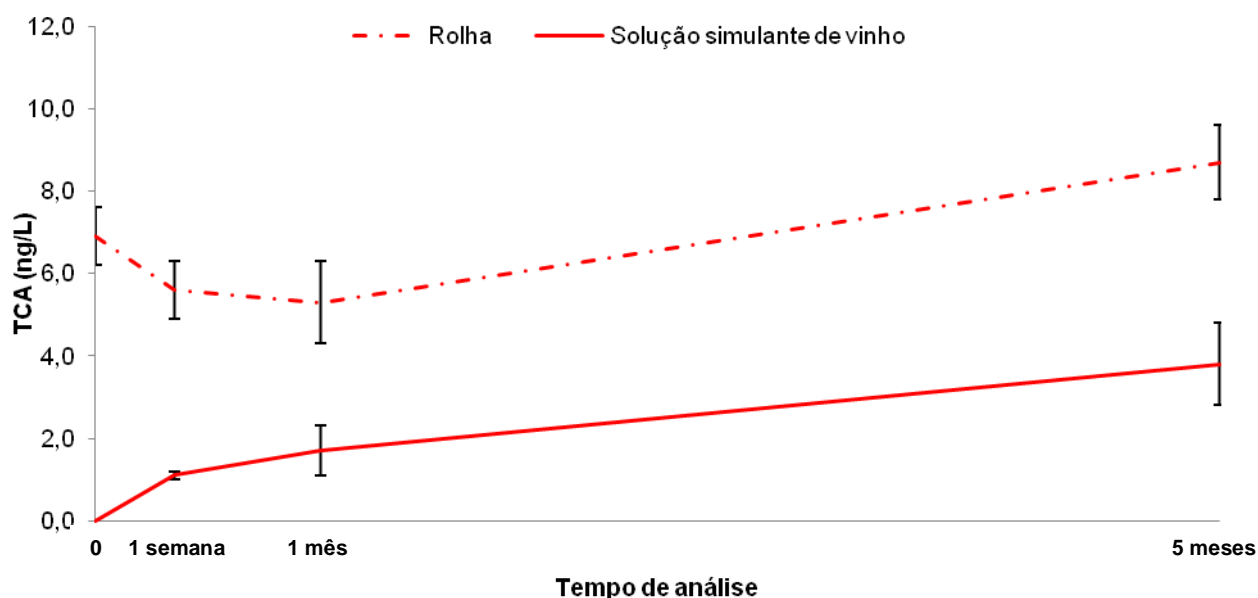


Figura 17 - Evolução da concentração de TCA na solução simulante de vinho e nas rolhas microaglomeradas que possuíam uma contaminação inicial média de TCA de 6,9 ng/L.

4.2.4 Discussão dos resultados

Estes resultados mostram que, na cinética de dessorção de rolhas de cortiça para o vinho e para os diferentes vedantes usados (rolhas de cortiça natural e microaglomerada Neutrocork®), há transferência de TCA da superfície contaminada da rolha para a solução simulante de vinho, nas diferentes contaminações usadas. Os valores obtidos da análise feita à solução, mostraram que ao longo do tempo, há um aumento progressivo da migração de TCA da rolha para a solução simulante que resultou do facto deste composto ficar mais disponível para migrar, confirmando os estudos realizados por Juanola *et al* (2004).

Também foi possível confirmar que o tempo de contacto do vinho com a superfície da rolha contaminada e a temperatura de armazenamento são fatores responsáveis pelo TCA libertável no vinho. Por exemplo, em relação à temperatura este autor observou que a 50 °C o TCA libertável é superior, entre 5-9%, ao extraído à temperatura ambiente. Em relação à análise de TCA das rolhas, verifica-se que as concentrações iniciais de TCA aumentaram, o que poderá eventualmente ser explicado com o facto da compressão da rolha no gargalo, associado à maior penetração de solução na rolha, ter colocado disponível algum TCA que estaria na proximidade da superfície e que não foi inicialmente quantificado.

5 Conclusões

A validação de um método analítico é um aspeto crucial de garantia da qualidade analítica e fiabilidade dos resultados dado por qualquer método. Neste sentido foi possível realizar a validação de um método cromatográfico de análise de TCA utilizado no departamento de I&D da Amorim & Irmãos. Esta validação foi realizada em vários equipamentos (ECD e MS) através da determinação dos diferentes parâmetros e para os quais se obtiveram os seguintes resultados: gama de trabalho (0,5 a 20 ng/L), linearidade ($R^2 = 0,999$ a $1,000$), limite de deteção (0,2 ng/L), limite de quantificação (0,5 ng/L), a repetibilidade permitiu obter coeficientes de variação inferiores a 10% para os equipamentos estudados, Com o estudo da precisão intermédia, verificou-se que o método é preciso e, que se traduziu pelos coeficientes de variação inferiores a 10%, e pelo desvio da precisão intermédia, e respetivo limite, com valores globais respetivos de 3,1 e 1,1 ng/L. A exatidão foi avaliada através da participação em ensaios interlaboratoriais, tendo-se obtido um bom desempenho, com o valor de z-score de 1,0. Por último a robustez, verificando-se que o método é robusto, quando é expresso em termos de desvio padrão, e coeficientes de variação inferiores a 10%.

Os estudos de adsorção de TCA mostraram que ambos os tipos de rolhas de cortiça, principalmente as microaglomeradas, possuem uma capacidade crescente de adsorção de TCA, ao longo do tempo de conservação, a partir de soluções contaminadas, independentemente da concentração de TCA na solução. Contudo, a perda de TCA da solução não se reflete diretamente nas quantidades de TCA libertável absorvido pela superfície das rolhas em contacto com a solução.

A dessorção de TCA de rolhas de cortiça, natural e microaglomerada, para soluções simulantes de vinho aumenta ao longo dos 5 meses de conservação, independentemente do nível de contaminação inicial das rolhas. Os valores de contaminação observados após 5 meses tendem a ser superiores aos valores inicialmente determinados na superfície de contacto das diferentes rolhas. Estes resultados parecem mostrar que a contaminação do vinho, após 1 mês de conservação será superior à contaminação potencial estimada pela análise das rolhas antes de engarrafamento.

6 Referências

- Amon, J.M., Simpson, R. F., *Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance*, Australian Grapegrower and Winemaker, 286, 63-80, 1986.
- Amorim. *Qualidade e I&D*, disponível em <http://www.amorimcork.com> (acedido em 21 de Janeiro 2013).
- Anjaneyulu, Y., *Removal and Recovery of Priority Pollutants Phenols from Industrial Effluents using Polyurethane Foam Medium*, Oil & Chemical Pollution, 7, 349-365, 1990
- APCOR. *Propriedades da cortiça*, disponível em <http://www.apcor.pt/> (acedido em 2 de Dezembro 2012)
- APCOR. Press Kit. APCOR, disponível em <http://www.apcor.pt/userfiles/File/Qualidade.pdf>, 2010 (acedido a 28 de Setembro de 2012).
- Barker, D.A, Capone, D.L., Pollnitz, A.P., Mclean, H.J., Francis, I.L., Oakey, H., Sefton, M.A., *Adsorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 7, 40-46, 2001.
- Cabral, M., *Cork Product Treatment System and Apparatuses by Extraction of compounds of Draggedin water vapour*, WO /2004/014436, 2004.
- Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., Lai, A., Casanova, J., *Extractives of cork (Quercus suber L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts*, Ind. Crops Prod., 21, 65–69, 2005.
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Barker, D.A., McLean, H.J., Pollnitz, A.P., Sefton, M.A., *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 5, 91-98, 1999.
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Sefton, M.A., *Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 8, 196-199, 2002.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. and Labadie, M.D., *Identification and responsibility of 2, 4, 6 -tribromoanisole in musty, corked odors in wine*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1255-1262, 2004.
- Chaudry, G. Rasul, Chapalamadugu, S., *Biodegradation of halogenated Organic Compounds*, Departement of biological Sciences Oakland University, Microbiological Reviews, p.59-79 March 1991.

- Coque, J.J.R., Pérez, E.R., Goswami, M., Martínez, R.F., García, S.C., Rodríguez, M.L.A., Martín, J.F.M., *Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis*, Versão Portuguesa, INBIOTEC, APCOR, Santa Maria de Lamas, Portugal, 2006.
- Cruz, J.P., INNOCORK, US, 79025882, 2007.
- Ezquerro, Ó., Tena, M. T., *Determination of odour-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase microextraction*, J. Chromatogr. A. 1068, 201-208, 2005.
- Fernandes, A. L. M. A. P., *Impacto da rolha de cortiça na composição polifenólica de vinhos tintos engarrafados*, Tese de Mestrado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.
- Fortes, M.A., Rosa, M.E., Pereira, H., *A Cortiça*, 2ªEdição, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2006.
- Graça, José, *Os tipos de cortiça e os produtos da sua transformação industrial*, Departamento de Engenharia Florestal, ISA 1349-017 Lisboa, Portugal, 2007.
- Guia para acreditação de laboratórios químicos (IPAC) – OG002, 2011.
- Guia Relacre 13, *Validação de Métodos Internos de ensaio em análise química*, Associação de Laboratórios acreditados de Portugal, Fevereiro 2000.
- Hervé, E., Price, S., Burns, G., Weber, P., *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for nature corks*, The Cork Quality Council, <http://www.corkqc.com> (Maio 2000).
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulus, D., McLean, H.J., Sefton, M.A., *The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141-145, 1997.
- ISO 20752, *Cork stoppers - Determination of releasable 2,4,6 - trichloroanisol (TCA)*, First Edition, 2007.
- ISO 8466-1, *Water quality: Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Statistical evaluation of linear calibration function*, Part 1, First Edition, 1990.
- ISO 5725-1, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods: general principles and definitions*, Part1, First Edition, 1994
- ISO 5725-2, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*, Part 2, First Edition, 1994

- ISO 5725-3, *Accuracy (trueness and precision) of measurement method: intermediate measures of precision of a standard measurement method*, Part 3, First Edition 1994
- Juanola, R., Subirá, D., Salvadó, J.A.G., *Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine*. European Food Research and Technology, 220, 347-352, 2005.
- Liège, C.E., *Código Internacional das Práticas Rolheiras*, Confédération Européenne du Liège, França, 2006.
- Lopes, P., Marques, J., Cabral, M., et al., *Permeation of d₅-2,4,6-trichloroanisole via vapor phase through different Closures into Wine Bottles*, Am.J.Enol.Vitic, 62:2, 2011.
- Lumia, G., Perre, C., Aracil, J M., *Method for treating cork and extrating organic compounds with a dense fluid under pressure*, EP1216123, 2002.
- Mazzoleni, V., Caldentey, P., Careri, M., Mangia, A., Colagrande, O., *Volatile components of cork used for production of wine stoppers*, Am. J. Enol. Viticult., 45 (4), 401–406, 1994.
- Moutinho, Sérgio, *Colóquio análise sensorial: uma linguagem universal Casa Ferreirinha*, Vila Nova de Gaia, CTCOR, 14 de Novembro de 2008.
- NP EN ISO/IEC 17025 (IPAC), 2005, <http://www.portalqas.pt/acreditacao-de-laboratorios-np-en-isoiec-17025.html> acedido em 12 Outubro 2012.
- Pereira, B. *Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes de vinho*, Tese de Mestrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2011.
- Pereira, J. S., Bugalho, M.C., Conceição, M., *From the cork oak to cork. – A sustainable system*, APCOR, 2008.
- Pollintz, A.P., Pardon, K.H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G.K., Sefton, M.A., *The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 2, 184-190, 1996.
- CTCOR, *Relatório do ensaio interlaboratorial para a determinação de 2,4,6-Tricloroanisol libertável por microextração em fase sólida*, relatório nº 6, 4 junho de 2013.
- Sefton, M.A., Simpson, R.F., *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 226-240, 2005.
- Simpson, R.F., Sefton, M.A., *Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 13, 106-116, 2007.
- http://www.alabe.pt/docs/pt/noticias/pdf/2008/Sergio_Moutinho.pdf acedido em Setembro 2012

7 Anexos

7.1 Anexo 1 - Procedimento experimental para análises cromatográficas

Este anexo é destinado à descrição de todo o procedimento relativo a todas as análises cromatográficas deste projeto em uso no laboratório de I&D da Amorim e Irmãos.

- **Procedimento experimental**

A extração de **2,4,6 - Tricloroanisol (TCA)** é realizada sem modificação da matriz líquida através do método de microextração em fase sólida por exposição no head-space (**SPME**) com ajuda de uma fibra utilizada por norma para absorções de compostos voláteis ou de baixo peso molecular. Os compostos absorvidos são dessorvidos e analisados numa coluna capilar de baixa polaridade (apolar). A deteção e quantificação são feitas por Espectrometria de Massa (**MS**) em modo **SIM** ou por captura eletrónica (**ECD**) para analisar os compostos numa matriz líquida.

- **Material**

- Frasco de 20 mL para amostras com head-space (dimensões: 22,5x75,5mm);
- Capsulas magnéticas de 20 mm com septum de silicone;
- Fibra de polidimetilsiloxane (**PDMS**) de 100 µm;
- Coluna apolar, ex.: **VF5-MS,30M** com fase estacionária de difenil-polidimetilsiloxane (5%-95%).

- **Reagentes**

- Álcool etílico a 96%;
- Água desionizada (tipo I) ou (tipo II);
- Simulante de vinho (solução etanólica a 12%);
- Cloreto de sódio (sal de mesa);
- 2,4,6 Tricloroanisol p.a.;
- 2,3,6 Tricloroanisol p.a.;
- 2,4,6 Tricloroanisol deuterado p.a.

- **Equipamentos**

- GC/MS - Shimadzu-QP2010 plus NCI;
- GC/ECD - Varian CP3800;
- GC/ECD- Bruker 450- GC;
- GC/ECD- Bruker 436- GC.

- **Consumíveis**

- As fibras são submetidas a um condicionamento na 1ª vez em que são utilizadas, durante 30 minutos, a 280 °C.

- **Preparação das soluções de TCA**

Preparação das soluções TCA a partir das soluções mãe

- Pesar 10 mg de 2,4,6-TCA numa balança com 5 décimas á grama $\pm 10 \mu\text{g}$ e dissolver num balão de 100mL com etanol 96%; concentração obtida de 100 mg/L **(solução1)**;
- Pipetar 100 μL da solução 1 e diluir num balão de 100mL com etanol 96%; concentração obtida 100 $\mu\text{g/L}$ **(solução2)**;
- Pipetar 10mL da solução 2 e diluir num balão de 100mL com etanol a 96%; concentração obtida 10 $\mu\text{g/L}$ **(solução 3)**;
- Pipetar 1mL da solução 3 e diluir num balão de 100mL com etanol a 96%;concentração obtida de 1 $\mu\text{g/L}$ **(solução 4)**
- Pipetar 100 μL da solução 2 num balão de 100mL com etanol a 96%; concentração obtida de 100 ng/L **(solução5)**.

Preparação dos Padrões internos

- Pesar 10 mg do **padrão (ex. 2,3,6-TCA para GC-ECD E d_5 -TCA para GC-MS)** numa balança decimal e diluir num balão de 100mL com etanol a 96%;concentração obtida de 100 mg/L **(solução 1)**.
- Pipetar 100 μL dessa solução anterior diluir num balão de 100 mL com etanol a 96%; concentração obtida100 $\mu\text{g/L}$ **(solução2)**.
- Pipetar 2 mLda 2ª solução e diluir num balão de 10mL com etanol a 96%; concentração obtida de 2 $\mu\text{g/L}$ **(solução3)**.

- **Preparação da reta de calibração**

Concentração padrão (ng/L)	Volume de etanol a 96% (mL)	Volume pipetado da solução 4 (μL) de 2,4,6- (TCA)	Volume pipetado de solução 5 μL de 2,4,6- (TCA)	Volume pipetado da solução 3 μL de padrão interno
0,5	10,0	—	50	100,0
1,0		—	100	
2,0		—	200	
5,0		50	—	
10,0		100	—	
20,0		200	—	

- **Procedimento Analítico**

Preparação da amostra

Para a preparação das amostras, pipeta-se 10mL da maceração para o tubo de cromatografia de 20 mL com \pm 3g NaCl (com esta adição é forçado o equilíbrio dos solúveis para a fase gasosa) e adiciona-se 100 μL de padrão interno. De seguida são feitas as seguintes verificações, através de um controlo visual, em todas as amostras: o nível de líquido em cada tubo de cromatografia, observando a sua uniformidade entre tubos; correspondência entre o número de identificação da amostra proveniente das U.I. (unidades industriais) e o número de identificação que consta da etiqueta colada no tubo da cromatografia; verificação das amostras que são colocadas em suportes distribuídas pelos diferentes equipamentos, respeitando as quotas diárias.

No software de cada equipamento é efetuada a listagem das amostras, contendo o código das amostras e o respetivo método de análise. No fim do dia de trabalho é feita a verificação das listas e da posição de cada amostra no suporte.

Adsorção/ dessorção da amostra

Após pré-incubação de 2 minutos, a fibra é exposta no head-space tubo durante 8 minutos, a 50°C com agitação. Os voláteis são termicamente desorvidos da fibra para o injetor do cromatógrafo a 270 °C. A fibra fica no interior do injetor durante 4 minutos, em modo splitless, fechando a válvula após 2 minutos.

Análise cromatográfica

As condições de funcionamento dos equipamentos de cromatografia são variáveis em função das situações encontradas. A título de exemplo são apresentadas as condições mais frequentemente usadas:

- Coluna: fraca polaridade DR₅-MS composta de sílica capilar (comprimento de 30m, diâmetro de 0,25µm;
- Rampa de temperatura:

Temperatura	Razão (mL/min)	Tempo (min)	Tempo Total (min)
90	0	0	0
265	15	0,33	12

- Tempo de estabilização: 30 °C;
- Temperatura do injetor: 270 °C;
- Injeção em modo splitless fechando a válvula aos 2 minutos;
- Fluxo de gás: 20mL/min (até aos 8 min da corrida);
- Gás de arraste: Hélio qualidade 2 com alta pureza;
- Gás de limpeza: azoto qualidade 2 com alta pureza (para o ECD);
- Fluxo de gás na coluna de 1,0 a 1,6 mL/min.

7.2 Anexo 2 - Gama de trabalho

Neste anexo são apresentados os resultados obtidos de todas as réplicas dos pontos da reta referente à **gama de trabalho**, para o ECD2 e para o GC-MS Shimadzu.

- Resultados da gama de trabalho para o ECD2.

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,0	0,0	0,0	2924	0,00
	0,0	0,0	3262	0,00
	0,0	0,0	2318	0,00
	0,0	0,0	2417	0,00
	0,0	0,0	2977	0,00
	0,0	0,0	3022	0,00
	0,0	0,0	3629	0,00
	0,0	0,0	2699	0,00
	0,1	22,0	3087	0,01
	0,1	7,7	2981	0,00
Média	0,0			
D.P.	0,00			
C.V (%)	-			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,3	0,3	108	3065	0,04
	0,3	98	3216	0,03
	0,3	103	3115	0,03
	0,3	113	3320	0,03
	0,3	89	3098	0,03
	0,3	81	2618	0,03
	0,3	80	2353	0,03
	0,3	67	2532	0,03
	0,3	68	2356	0,03
	0,3	81	2784	0,03
Média	0,3			
D.P.	0,02			
C.V (%)	7,0			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,5	0,5	110,1	2091	0,05
	0,5	130,6	2348	0,06
	0,5	114,8	2038	0,06
	0,5	117,3	2064	0,06
	0,5	116,1	2042	0,06
	0,5	137,9	2338	0,06
	0,6	120,8	2192	0,06
	0,5	120,5	2083	0,06
	0,6	97,2	1673	0,06
	0,5	105,4	1905	0,06
Média	1,0			
D.P.	0,0			
C.V (%)	3,7			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
1,0	1,0	228	2047	0,1
	1,1	235	2006	0,1
	1,0	230	1994	0,1
	1,0	235	2103	0,1
	0,9	151	1644	0,1
	0,9	183	1787	0,1
	1,1	222	1914	0,1
	0,9	192	1859	0,1
	1,1	232	1982	0,1
	1,0	252	2310	0,1
Média	1,0			
D.P.	0,1			
C.V (%)	5,0			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
2,0	1,9	385	1802	0,21
	1,8	358	1740	0,21
	1,8	390	1865	0,21
	1,8	409	1976	0,21
	1,8	363	1740	0,21
	1,7	257	1360	0,19
	2,0	322	1435	0,22
	1,8	328	1579	0,21
	1,8	352	1706	0,21
	1,8	362	1752	0,21
Média	1,8			
D.P.	0,07			
C.V (%)	4,0			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
5,0	4,8	2258	4065	0,6
	4,7	2292	4209	0,5
	4,8	2183	3954	0,6
	4,7	2083	3836	0,5
	4,8	2237	4038	0,6
	4,8	2261	4092	0,6
	4,7	2171	4005	0,5
	4,8	2183	3899	0,6
	4,8	2160	3856	0,6
	4,8	2136	3884	0,6
Média	4,8			
D.P.	0,05			
C.V (%)	1,1			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
10,0	9,4	2044	1866	1,10
	10,4	1862	1537	1,21
	10,0	1968	1686	1,17
	9,4	1910	1742	1,10
	9,8	2060	1817	1,13
	9,6	1948	1870	1,04
	9,6	2092	1982	1,06
	9,4	2261	1870	1,21
	10,3	2636	2067	1,28
	10,4	2820	2199	1,28
Média	9,8			
D.P.	0,41			
C.V (%)	4,2			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
20,0	20,2	4878	2076	2,3
	19,1	4942	2220	2,2
	19,8	4346	1883	2,3
	20,2	4382	1860	2,4
	19,6	4410	1930	2,3
	19,9	4591	1975	2,3
	19,6	4816	2105	2,3
	19,9	4873	2097	2,3
	19,1	4432	1988	2,2
	19,9	4613	2000	2,3
Média	19,7			
D.P.	0,38			
C.V (%)	1,9			

- Resultados da gama de trabalho para o GC-MS (Shimadzu).

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,0	0,0	8	1559	0,01
	0,0	8	1246	0,01
	0,0	10	1339	0,01
	0,0	4	1194	0,00
	0,0	10	1130	0,01
	0,0	12	1219	0,01
	0,0	8	1387	0,01
	0,0	11	1211	0,01
	0,0	7	1167	0,01
	0,0	9	1161	0,01
Média	0,0			
D.P	0,00			
C.V (%)	-			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,3	0,3	17	834	0,02
	0,3	23	994	0,02
	0,3	17	1017	0,02
	0,3	17	947	0,02
	0,4	22	1066	0,02
	0,3	20	1114	0,02
	0,3	17	1070	0,02
	0,3	17	918	0,02
	0,3	18	1015	0,02
	0,3	17	970	0,02
Média	0,3			
D.P	0,03			
C.V (%)	10,3			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
0,5	0,5	28	937	0,03
	0,5	21	793	0,03
	0,5	22	869	0,03
	0,4	22	986	0,02
	0,5	25	951	0,03
	0,5	26	909	0,03
	0,5	25	994	0,03
	0,5	24	941	0,03
	0,5	26	965	0,03
	0,5	24	888	0,03
Média	0,5			
D.P	0,03			
C.V (%)	6,2			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
1,0	1,0	56	727	0,08
	1,0	60	813	0,07
	1,0	62	830	0,07
	1,0	66	862	0,08
	1,0	66	864	0,08
	1,0	70	947	0,07
	1,0	68	886	0,08
	1,0	59	790	0,07
	1,0	57	767	0,07
	1,0	65	844	0,08
Média	1,0			
D.P	0,00			
C.V (%)	0,4			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
2,0	2,0	97	728	0,13
	2,0	95	715	0,13
	2,0	111	831	0,13
	2,0	99	741	0,13
	2,1	102	744	0,14
	2,0	96	727	0,13
	2,0	98	733	0,13
	2,0	65	479	0,14
	2,0	99	734	0,13
	2,0	105	776	0,14
Média	2,0			
D.P	0,03			
C.V (%)	0,0			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
5,0	5,0	259	844	0,31
	5,1	268	858	0,31
	5,0	262	853	0,31
	5,0	277	898	0,31
	5,0	296	956	0,31
	5,0	270	870	0,31
	5,0	295	952	0,31
	5,0	290	940	0,31
	5,0	251	813	0,31
	5,0	256	832	0,31
Média	5,0			
D.P	0,03			
C.V (%)	0,5			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
10,0	10,0	571	950	0,60
	10,0	468	782	0,60
	10,0	497	826	0,60
	10,1	527	872	0,60
	10,0	566	944	0,60
	10,0	513	853	0,60
	10,0	444	740	0,60
	10,0	487	808	0,60
	10,0	561	932	0,60
	10,0	572	948	0,60
Média	10,0			
D.P	0,03			
C.V (%)	0,3			

Padrões	C TCA	A TCA	Api	A/Api
20,0	20,0	1009	849	1,19
	20,0	854	718	1,19
	20,0	1023	860	1,19
	20,0	1024	861	1,19
	20,0	859	722	1,19
	20,0	870	731	1,19
	20,0	1031	870	1,19
	20,0	997	839	1,19
	20,0	929	782	1,19
	20,0	890	753	1,18
Média	20,0			
D.P	0,03			
C.V (%)	0,2			

7.3 Anexo 3 - Precisão: repetibilidade

Neste anexo são apresentados, todos os resultados referentes à repetibilidade determinada para os diferentes equipamentos do laboratório do I&D (ECD's 1, 2, 3, 5, 6 e 7 e no GC-MS Shimadzu).

- Resultados de repetibilidade ECD1.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	1362	16943	0,08
	0,4	1405	17791	0,08
	0,5	1320	16147	0,08
	0,5	1455	17503	0,08
	0,5	1382	16783	0,08
	0,5	1463	17246	0,08
	0,5	1570	18266	0,09
	0,5	1175	14685	0,08
	0,5	1194	14938	0,08
	0,5	1287	15833	0,08
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	5,8			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	19,9	22297	11857	1,88
	18,2	28515	16653	1,71
	17,0	24557	15317	1,60
	17,1	27869	17288	1,61
	17,8	28102	16742	1,68
	16,0	26415	17547	1,51
	18,9	28663	16113	1,78
	19,2	31007	17130	1,81
	18,1	31902	18754	1,70
	19,9	30390	16181	1,88
Média	18,2			
D.P	1,3			
CV%	7,1			

- Resultados da repetibilidade no ECD2

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /A pi
0,5	0,5	110	2091	0,05
	0,5	131	2348	0,06
	0,5	115	2038	0,06
	0,5	117	2064	0,06
	0,5	116	2042	0,06
	0,5	138	2338	0,06
	0,6	121	2192	0,06
	0,5	121	2083	0,06
	0,6	97	1673	0,06
	0,5	105	1905	0,06
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	3,7			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /A pi
20,0	20,2	4878	2076	2,35
	19,1	4942	2220	2,23
	19,8	4346	1883	2,31
	20,2	4382	1860	2,36
	19,6	4410	1930	2,29
	19,9	4591	1975	2,32
	19,6	4816	2105	2,29
	19,9	4873	2097	2,32
	19,1	4432	1988	2,23
	19,9	4613	2000	2,31
Média	19,7			
D.P	0,4			
CV%	1,9			

• Resultados repetibilidade ECD3.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	594	10534	0,06
	0,4	494	9635	0,05
	0,5	589	9879	0,06
	0,5	649	11063	0,06
	0,5	663	11998	0,06
	0,5	755	12630	0,06
	0,5	622	10594	0,06
	0,5	654	11415	0,06
	0,4	484	9760	0,04
	0,5	627	11273	0,06
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	8,8			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	20,2	14601	9486	1,54
	19,9	14836	9776	1,52
	19,6	16097	10782	1,49
	19,6	16597	11077	1,50
	19,6	14774	9869	1,50
	20,1	15849	10351	1,53
	19,5	18881	12709	1,49
	19,7	16443	10924	1,51
	19,5	16057	10792	1,49
	19,1	18403	12633	1,46
Média	19,7			
D.P	0,3			
CV%	1,6			

• Resultados repetibilidade ECD5.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	321	3934	0,08
	0,5	307	3735	0,08
	0,5	314	3687	0,09
	0,5	284	3483	0,08
	0,6	364	4051	0,09
	0,5	313	3783	0,08
	0,5	352	4047	0,09
	0,5	370	4267	0,09
	0,5	354	4318	0,08
	0,5	322	3795	0,08
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	7,6			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	21,6	6317	4088	1,55
	20,4	6468	4422	1,46
	20,4	6500	4429	1,47
	20,7	6244	4200	1,49
	20,3	5658	3878	1,46
	20,5	6238	4245	1,47
	20,8	5800	3877	1,50
	20,6	6071	4109	1,48
	20,4	4715	3224	1,46
	19,7	4617	3264	1,41
Média	20,5			
D.P	0,5			
CV%	2,2			

• Resultados repetibilidade ECD6.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	611	7367	0,08
	0,5	604	7664	0,08
	0,5	699	8633	0,08
	0,5	584	7239	0,08
	0,5	528	6683	0,08
	0,5	633	7721	0,08
	0,5	668	8188	0,08
	0,4	648	8698	0,07
	0,5	613	7285	0,08
	0,5	593	7327	0,08
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	8,2			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	20,0	21570	10483	2,06
	20,1	22109	10699	2,07
	20,3	24568	11801	2,08
	19,8	21393	10494	2,04
	19,8	21854	10731	2,04
	19,9	18033	8822	2,04
	20,0	16113	7837	2,06
	20,0	18423	8951	2,06
	19,5	18053	9022	2,00
	19,5	16516	8240	2,00
Média	19,9			
D.P	0,3			
CV%	1,3			

• Resultados repetibilidade ECD7.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	1073	17604	0,06
	0,5	1125	17247	0,07
	0,5	1063	17539	0,06
	0,5	1220	19271	0,06
	0,5	1300	20292	0,06
	0,5	961	15927	0,06
	0,5	1006	16404	0,06
	0,5	1148	17409	0,07
	0,6	1079	15978	0,07
	0,5	997	16082	0,06
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	4,6			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	19,8	24309	11812	2,06
	19,5	23577	11638	2,03
	20,4	22654	10852	2,09
	20,4	24849	11685	2,13
	20,4	25621	12074	2,12
	20,2	21876	10402	2,10
	20,3	22034	10413	2,12
	19,6	24102	11808	2,04
	19,7	25519	12462	2,05
	19,6	22721	11146	2,04
Média	20,0			
D.P	0,4			
CV%	2,0			

• Resultados repetibilidade GC-MS Shimadzu.

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
0,5	0,5	28	937	0,03
	0,5	21	793	0,03
	0,5	22	869	0,03
	0,4	22	986	0,02
	0,5	25	951	0,03
	0,5	26	909	0,03
	0,5	25	994	0,03
	0,5	24	941	0,03
	0,5	26	965	0,03
	0,5	24	888	0,03
Média	0,5			
D.P	0,0			
CV%	6,2			

Padrões	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
20,0	20,0	1009	849	1,19
	20,0	854	718	1,19
	20,0	1023	860	1,19
	20,0	1024	861	1,19
	20,0	859	722	1,19
	20,0	870	731	1,19
	20,0	1031	870	1,19
	20,0	997	839	1,19
	20,0	929	782	1,19
	20,0	890	753	1,18
Média	20,0			
D.P	0,0			
CV%	0,2			

7.4 Anexo 4 - Precisão: precisão intermédia

Neste anexo são apresentados, todos os resultados referentes à precisão intermédia determinada para os diferentes equipamentos do laboratório do I&D com diferentes operadores (um total de 8 operadores diferentes).

- Resultados da precisão intermédia

Cromatógrafo	C _{teórica} (amostra A) = 0,9ng/L*					C _{teórica} (amostra B) = 7,1ng/L**				
	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api
ECD1	1	1,44	3519	22161	0,16	1	5,47	10454	21658	0,48
	2	1,45	3234	20203	0,16	2	6,00	10390	19798	0,52
	3	1,49	3863	23643	0,16	3	5,67	9967	19973	0,50
	4	1,54	3517	21075	0,17	4	5,66	10142	20377	0,50
	5	1,45	3518	22006	0,16	5	5,09	9818	21745	0,45
	6	1,52	3652	22032	0,17	6	5,99	9576	18268	0,52
	7	1,42	3238	20583	0,16	7	5,28	9675	20729	0,47
	8	1,48	3448	21187	0,16	8	6,01	10115	19237	0,53
	Média	1,47				Média	5,65			
	D.P.	0,04				D.P.	0,35			
	CV (%)	2,8				CV (%)	6,2			
ECD2	1	2,13	521	2785	0,19	1	9,19	1747	2813	0,62
	2	2,28	507	2578	0,20	2	9,63	1610	2484	0,65
	3	1,95	586	3323	0,18	3	9,73	1503	2298	0,65
	4	2,15	489	2595	0,19	4	9,04	1440	2352	0,61
	5	1,43	459	3182	0,14	5	8,62	1571	2680	0,59
	6	1,99	472	2641	0,18	6	10,30	1606	2330	0,69
	7	1,97	474	2667	0,18	7	8,94	1658	2739	0,61
	8	1,95	491	2786	0,18	8	8,16	1759	3152	0,56
	Média	1,98				Média	9,20			
	D.P.	0,25				D.P.	0,67			
	CV (%)	12,7				CV (%)	7,3			
ECD3	1	1,7	2344,7	15762	0,15	1	6,17	7938	16351	0,49
	2	1,84	2320,5	14545	0,16	2	5,43	6788	15809	0,43
	3	1,8	2432,1	15571	0,16	3	5,65	6655	14921	0,45
	4	1,76	2557,6	16646	0,15	4	5,79	6603	14457	0,46
	5	1,64	2116,5	14632	0,14	5	5,49	6326	14577	0,43
	6	2,01	3017	17541	0,17	6	5,35	6475	15289	0,42
	7	1,53	2146,3	15741	0,14	7	5,56	6641	15115	0,44
	8	1,67	2336,6	15891	0,15	8	4,88	5491	14153	0,39
	Média	1,74				Média	5,54			
	D.P.	0,15				D.P.	0,37			
	CV (%)	8,3				CV (%)	6,7			

* Amostra A: mistura de 21 amostras com 0,5 < TCA < 1,7 ng/L

** Amostra B: mistura de 21 amostras com 3,5 < TCA < 12,3 ng/L

• Resultados da precisão intermédia (continuação)

Cromatógrafo	C _{teórica} (amostra A) = 0,9ng/L *					C _{teórica} (amostra B) = 7,1ng/L **				
	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api
ECD4	1	1,34	348	2202	0,16	1	4,83	1224	2305	0,53
	2	1,38	346	2128	0,16	2	5,14	1112	1973	0,56
	3	1,37	393	2427	0,16	3	4,97	1179	2159	0,55
	4	1,43	382	2276	0,17	4	5,21	1161	2032	0,57
	5	1,31	323	2081	0,16	5	4,86	1184	2216	0,53
	6	1,48	339	1954	0,17	6	5,20	1118	1959	0,57
	7	1,33	377	2394	0,16	7	4,52	1191	2395	0,50
	8	1,31	324	2093	0,15	8	5,11	1043	1861	0,56
	Média	1,37				Média	4,98			
	D.P.	0,06				D.P.	0,24			
	CV (%)	4,4				CV (%)	4,8			
ECD5	1	1,19	919	6906	0,13	1	4,94	2137	5439	0,39
	2	1,4	1071	7241	0,15	2	5,58	2585	5913	0,44
	3	1,29	980	7012	0,14	3	5,48	2435	5652	0,43
	4	1,39	1071	7306	0,15	4	5,02	868	2177	0,40
	5	1,01	914	7566	0,12	5	5,16	2490	6091	0,41
	6	1,43	1104	7382	0,15	6	5,77	2660	5906	0,45
	7	1,21	1061	7883	0,13	7	5,42	2757	6461	0,43
	8	1,39	1082	7347	0,15	8	6,44	3588	7217	0,50
	Média	1,29				Média	5,48			
	D.P.	0,14				D.P.	0,48			
	CV (%)	11,2				CV (%)	8,8			
ECD6	1	0,51	1370	11138	0,12	1	3,55	5024	11844	0,42
	2	0,55	1400	10981	0,13	2	4,11	4144	8639	0,48
	3	0,54	1289	10202	0,13	3	3,99	4558	9739	0,47
	4	0,61	1380	10386	0,13	4	3,65	4397	10119	0,43
	5	0,39	1216	10895	0,11	5	3,14	3579	9318	0,38
	6	0,61	1465	11008	0,13	6	4,25	4637	9392	0,49
	7	0,46	1462	12351	0,12	7	3,57	4134	9686	0,43
	8	0,64	1344	9894	0,14	8	3,58	4392	10275	0,43
	Média	0,54				Média	3,73			
	D.P.	0,08				D.P.	0,36			
	CV (%)	15,6				CV (%)	9,7			

* Amostra A: mistura de 21 amostras com 0,5 <TCA < 1,7 ng/L

** Amostra B: mistura de 21 amostras com 3,5 <TCA < 12,3 ng/L

• Resultados da precisão intermédia (continuação)

Cromatógrafo	C _{teórica} (amostra A) = 0,9ng/L*					C _{teórica} (amostra B) = 7,1ng/L**				
	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api	Ensaio nº	C(TCA)	ATCA	API	A/Api
ECD7	1	1,42	2027,2	12944	0,16	1	4,59	6860	14129	0,49
	2	1,65	1971,1	10907	0,18	2	5,21	6679	12157	0,55
	3	1,48	2159	13227	0,16	3	5,25	6066	10951	0,55
	4	1,55	2325,4	13557	0,17	4	5,25	5529	9980	0,55
	5	1,36	1985,6	13216	0,15	5	4,48	5554	19725	0,28
	6	1,62	2245,3	12677	0,18	6	5,53	5890	10098	0,58
	7	1,44	2120	13366	0,16	7	4,66	6252	12682	0,49
	8	1,42	1781,9	11356	0,16	8	4,98	5466	10388	0,53
	Média	1,49				Média	4,99			
	D.P.	0,10				D.P.	0,38			
	CV (%)	7,0				CV (%)	7,6			
SHIMADZU	1	1,32	124	1886	0,07	1	5,42	485	1857	0,26
	2	1,20	112	1864	0,06	2	5,29	418	1641	0,25
	3	1,29	131	2032	0,06	3	5,98	408	1419	0,29
	4	1,33	110	1660	0,07	4	6,06	420	1442	0,29
	5	1,3	129	1981	0,07	5	6,15	350	1183	0,30
	6	1,53	133	1754	0,08	6	5,58	443	1648	0,27
	7	1,32	123	1869	0,07	7	4,92	431	1816	0,24
	8	1,26	118	1874	0,06	8	5,43	579	2215	0,26
	Média	1,32				Média	5,60			
	D.P.	0,10				D.P.	0,43			
	CV (%)	7,2				CV (%)	7,6			

* Amostra A: mistura de 21 amostras com 0,5 < TCA < 1,7 ng/L

** Amostra B: mistura de 21 amostras com 3,5 < TCA < 12,3 ng/L~

7.5 Anexo 5 - Robustez

Neste anexo são apresentados, todos os resultados: determinação do coeficiente de variação e testes estatísticos comparativos das diferentes variações com a referência, referentes aos ensaios de robustez determinada para as diferentes variações efetuadas nas condições de preparação das amostras (volume de macerado pipetado – Ensaios B e C; volume de padrão interno adicionado – Ensaios D e E).

- Resultados da robustez (determinação dos coeficientes de variação para cada situação).

Ensaio A	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api	Ensaio B	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
1	3,28	724	2806	0,258	1	3,12	511	2059	0,248
2	3,08	775	3152	0,246	2	3,88	621	2104	0,295
3	3,20	673	2661	0,253	3	3,14	553	2215	0,249
4	3,28	701	2719	0,258	4	3,13	565	2271	0,249
5	3,18	745	2961	0,252	5	3,15	534	2135	0,250
6	3,26	612	2384	0,257	6	3,13	506	2037	0,248
7	3,31	548	2108	0,260	7	3,03	506	2085	0,243
8	3,17	560	2226	0,251	8	3,13	506	2034	0,249
9	3,23	707	2776	0,255	9	3,17	722	2878	0,251
10	3,23	689	2704	0,255	10*	5,35	867	2115	0,410
Média	3,22				Média	3,21			
D.P	0,07				D.P	0,25			
CV%	2,1				CV%	7,9			

*valor aberrante (não incluído nos cálculos)

Ensaio C	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api	Ensaio D	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
1	3,38	578	2189	0,264	1	3,09	528	2142	0,246
2	3,49	635	2347	0,271	2	3,16	686	2739	0,251
3	3,15	654	2617	0,250	3	3,23	564	2911	0,194
4	3,17	672	2674	0,251	4	3,19	656	2596	0,253
5	3,32	718	2754	0,261	5	3,21	692	2729	0,254
6	3,14	692	2776	0,249	6	3,21	599	2360	0,254
7	3,32	651	2497	0,261	7	3,09	725	2939	0,246
8	3,14	818	3282	0,249	8	3,22	665	2615	0,254
9	3,18	697	2765	0,252	9	3,20	671	2648	0,253
10	3,21	574	2260	0,254	10	3,24	701	2743	0,255
Média	3,25				Média	3,20			
D.P	0,12				D.P	0,05			
CV%	3,7				CV%	1,7			

Ensaio E	TCA (ng/L)	A TCA	A PI	A /Api
1	3,13	927	3731	0,249
2	3,13	872	3502	0,249
3	3,19	821	3254	0,252
4	3,19	831	3289	0,253
5	3,14	864	3394	0,255
6	3,21	788	3110	0,253
7	3,19	705	2793	0,253
8	3,19	911	2419	0,377
9	3,16	683	2726	0,251
10	3,17	687	2735	0,251
Média	3,17			
D.P	0,03			
CV%	0,9			

- Resultados da robustez (testes estatísticos comparativos das diferentes variações com a referência).

Teste entre o ensaio A e o B		
F-Test Two-Sample for Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,209
Variance	0,005	0,065
Observations	10	9
df	9	8
F	0,071	
P(F<=f) one-tail	0,00029	
F Critical one-tail	0,30964	
Conclusão:		
Como F< F critical, podemos concluir com 95% de confiança que não há diferenças significativas entre as variâncias.		
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,209
Variance	0,005	0,065
Observations	10	9
Pooled Variance	0,033	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	17	
t Stat	0,157	
P(T<=t) one-tail	0,438	
t Critical one-tail	1,740	
P(T<=t) two-tail	0,877	
t Critical two-tail	2,110	
Conclusão:		
Como t Stat< t critical, podemos concluir com 95% de confiança que <u>não há diferenças significativas entre os métodos</u>		

Teste entre o ensaio A e o C		
F-Test Two-Sample for Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,25
Variance	0,005	0,015
Observations	10	10
df	9	9
F	0,313	
P(F<=f) one-tail	0,04941	
F Critical one-tail	0,31457	
Conclusão:		
Como F< F critical, podemos concluir com 95% de confiança que não há diferenças significativas entre as variâncias.		
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
	Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,25
Variance	0,005	0,015
Observations	10	10
Pooled Variance	0,010	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	18	
t Stat	-0,639	
P(T<=t) one-tail	0,265	
t Critical one-tail	1,734	
P(T<=t) two-tail	0,530	
t Critical two-tail	2,101	
Conclusão:		
Como t Stat< t critical, podemos concluir com 95% de confiança que <u>não há diferenças significativas entre os métodos</u>		

- Resultados da robustez (continuação dos testes estatísticos comparativos das diferentes variações com a referência).

Teste entre o ensaio A e o D			Teste entre o ensaio A e o E		
F-Test Two-Sample for Variances			F-Test Two-Sample for Variances		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,184	Mean	3,222	3,17
Variance	0,005	0,003	Variance	0,005	0,001
Observations	10	10	Observations	10	10
df	9	9	df	9	9
F	1,557		F	5,562	
P(F<=f) one-tail	0,260		P(F<=f) one-tail	0,009	
F Critical one-tail	3,179		F Critical one-tail	3,179	
Conclusão:			Conclusão:		
Como $F < F_{critical}$, podemos concluir com 95% de confiança que não há diferenças significativas entre as variâncias.			Como $F > F_{critical}$, podemos concluir com 95% de confiança que há diferenças significativas entre as variâncias.		
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances			t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
	Variable 1	Variable 2		Variable 1	Variable 2
Mean	3,222	3,184	Mean	3,222	3,17
Variance	0,005	0,003	Variance	0,005	0,001
Observations	10	10	Observations	10	10
Pooled Variance	0,004		Hypothesized Mean Difference	0	
Hypothesized Mean Difference	0		df	12	
df	18		t Stat	2,239	
t Stat	1,387		P(T<=t) one-tail	0,022	
P(T<=t) one-tail	0,091		t Critical one-tail	1,782	
t Critical one-tail	1,734		P(T<=t) two-tail	0,045	
P(T<=t) two-tail	0,183		t Critical two-tail	2,179	
t Critical two-tail	2,101		t Critical two-tail	2,101	
Conclusão:			Conclusão:		
Como $t_{Stat} < t_{critical}$, podemos concluir com 95% de confiança que <u>não há diferenças significativas entre os métodos</u>			Como $t_{Stat} > t_{critical}$, podemos concluir com 95% de confiança que <u>há diferenças significativas entre os métodos</u>		

7.6 Anexo 6 - Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho (rolhas naturais)

As figuras seguintes referem-se aos resultados individuais de cada garrafa, ao longo do tempo de análise de 5 meses, para a solução simulante de vinho com contaminação inicial de 5 e 20 ng/L (Figura 18 e Figura 20, respetivamente) e as respetivas rolhas que inicialmente se encontravam isentas de TCA (Figura 19 e Figura 20, respetivamente).

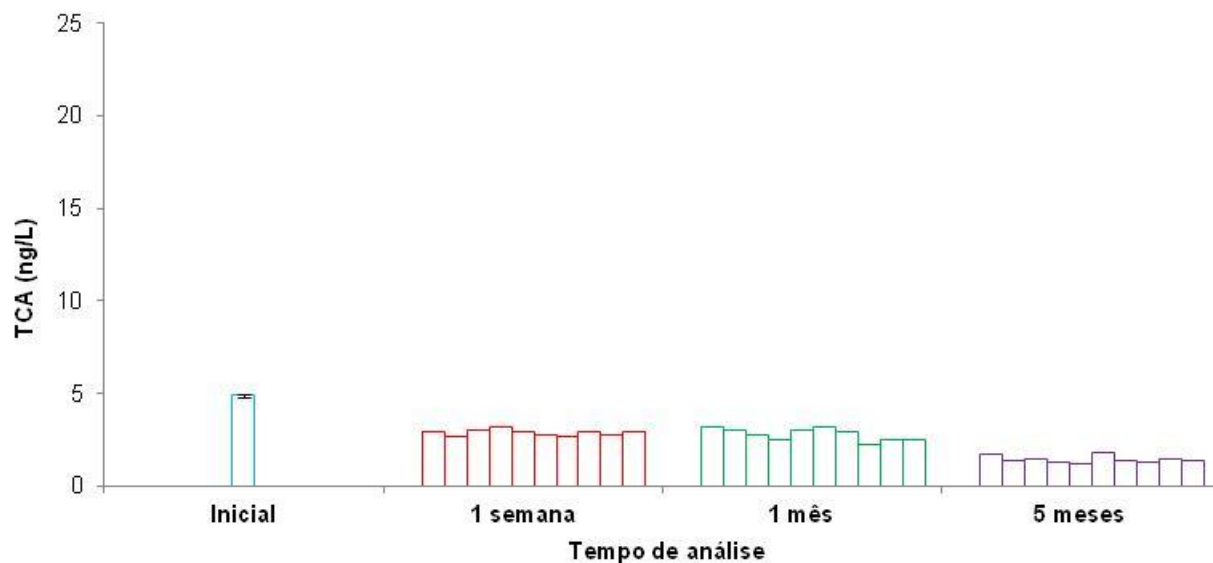


Figura 18 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **5 ng/L**.

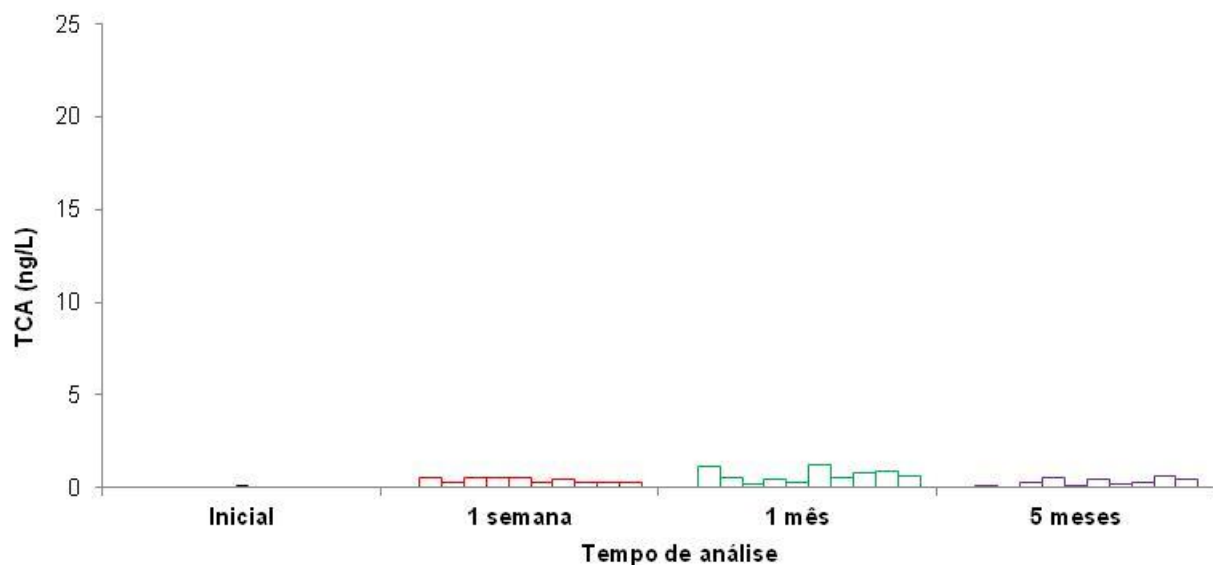


Figura 19 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **5 ng/L**.

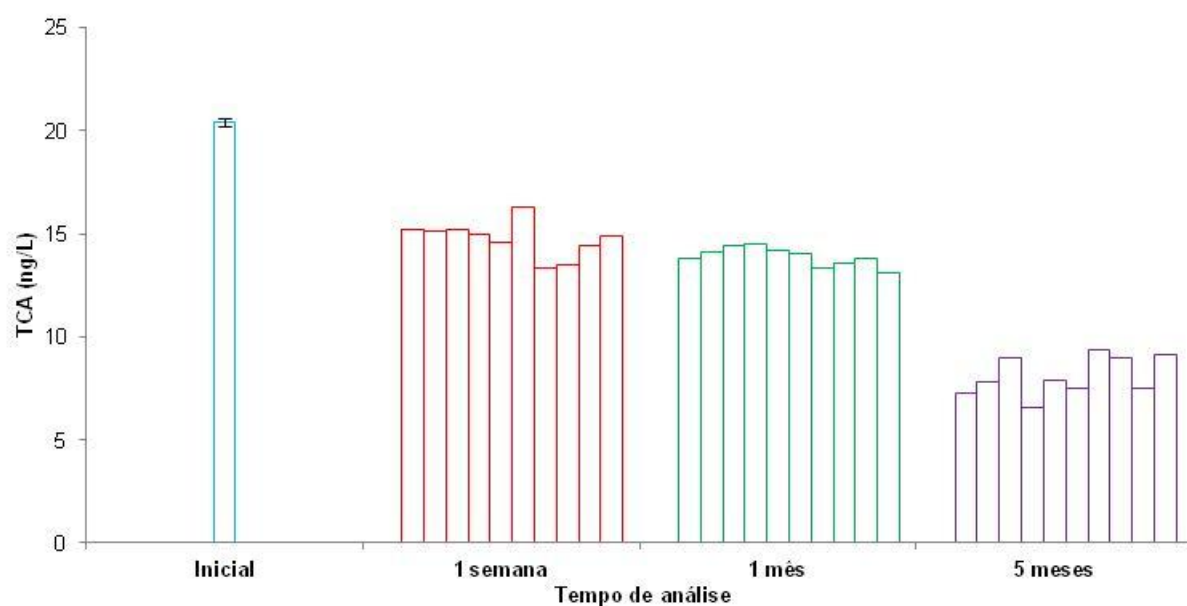


Figura 20 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **20 ng/L**.

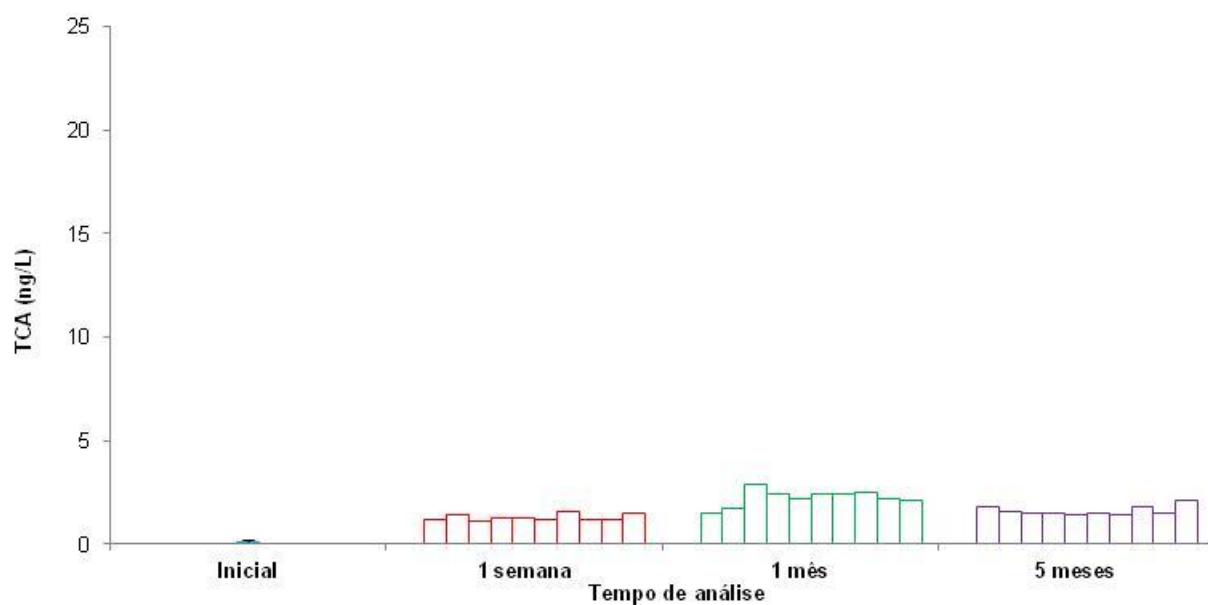


Figura 21- Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinho de **20 ng/L**.

7.7 Anexo 7 - Cinética de adsorção de TCA pelas rolhas a partir do vinho (rolhas microaglomeradas)

As figuras seguintes referem-se aos resultados individuais de cada garrafa, ao longo do tempo de análise de 5 meses, para a solução simulante de vinho com contaminação inicial de 5 e 10 ng/L (Figura 22 e Figura 24, respetivamente) e as respetivas rolhas que inicialmente se encontravam isentas de TCA (Figura 23 e Figura 25, respetivamente).

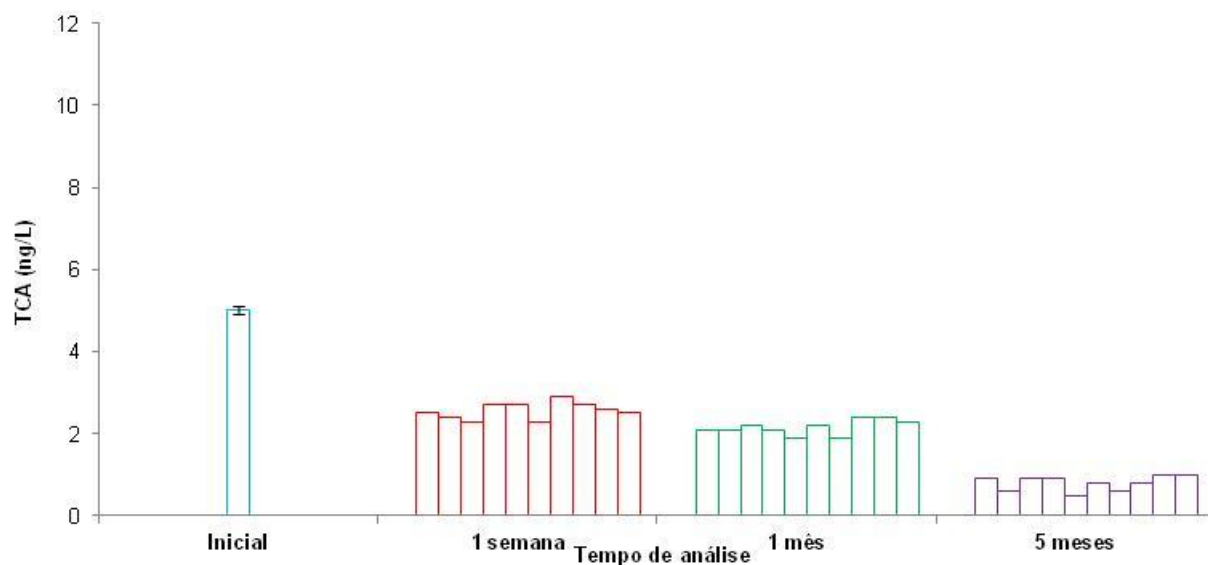


Figura 22 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **5 ng/L**.

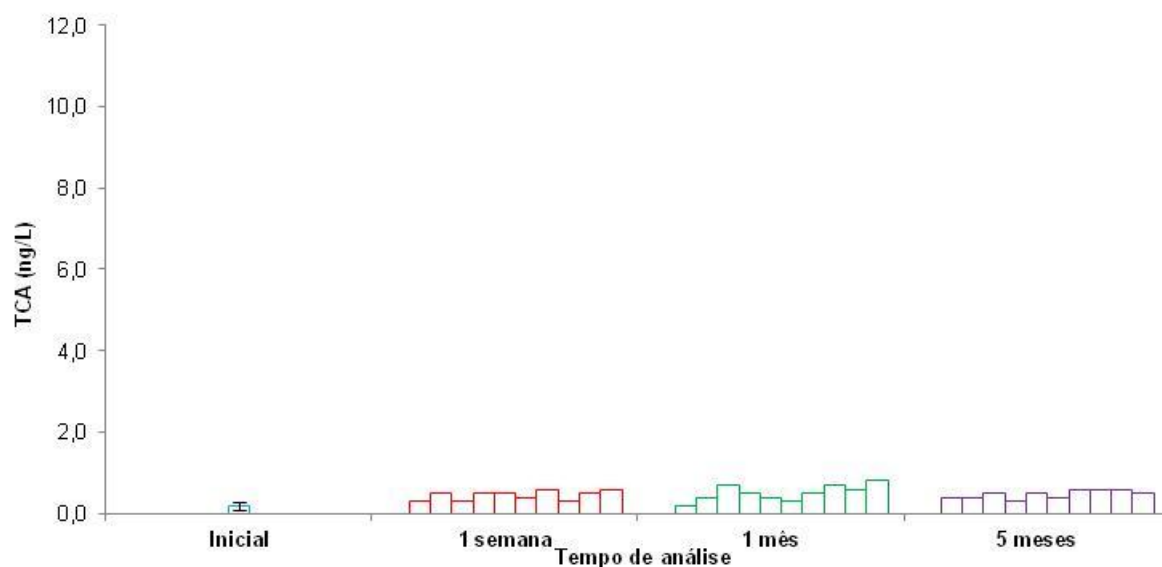


Figura 23 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **5 ng/L**.

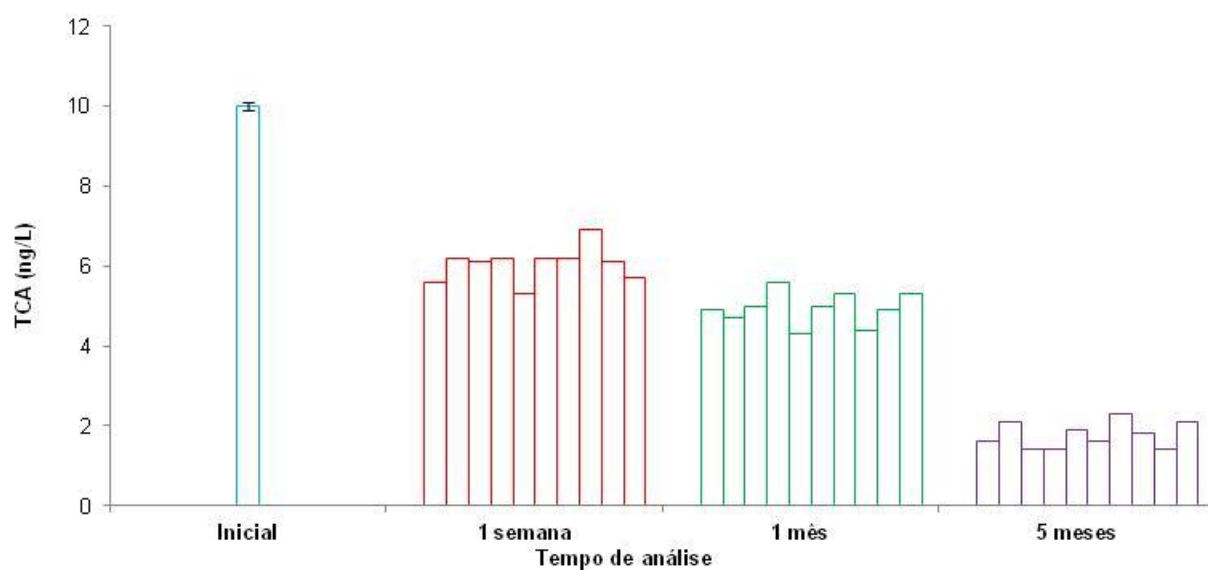


Figura 24 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **10 ng/L**.

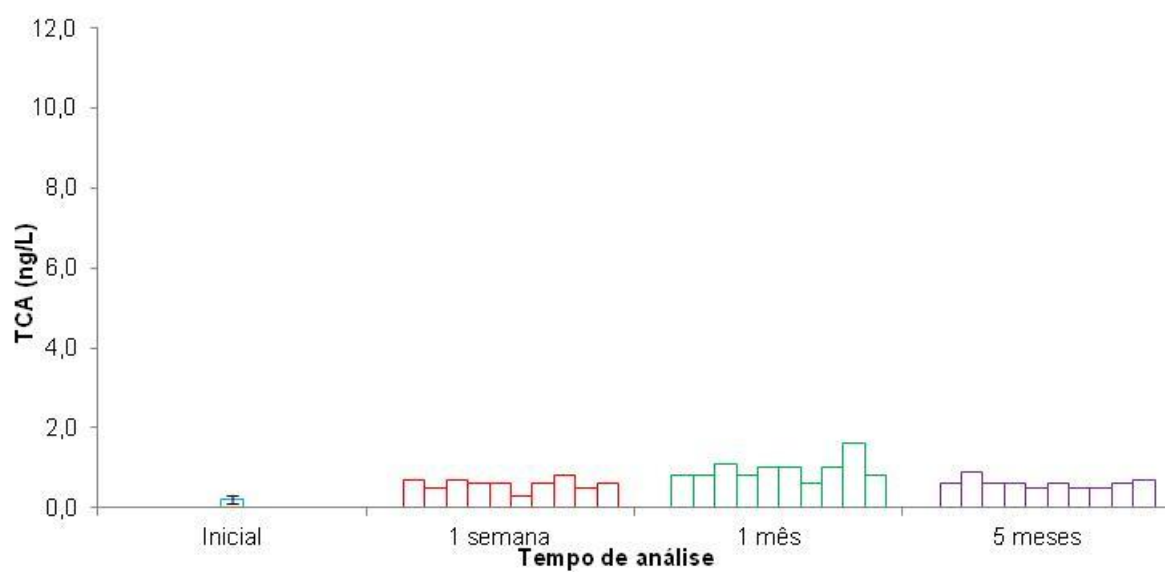


Figura 25 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com contaminação inicial da solução simulante de vinhode **10 ng/L**.

7.8 Anexo 8 - Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho (rolhas naturais)

As figuras seguintes referem-se aos resultados individuais de cada garrafa, ao longo do tempo de análise de 5 meses, para as rolhas com contaminação inicial de 5 e 20 ng/L (Figura 27 e Figura 29, respetivamente) e a respetiva solução simulante de vinho que inicialmente se encontrava isentas de TCA (Figura 26 e Figura 28, respetivamente).

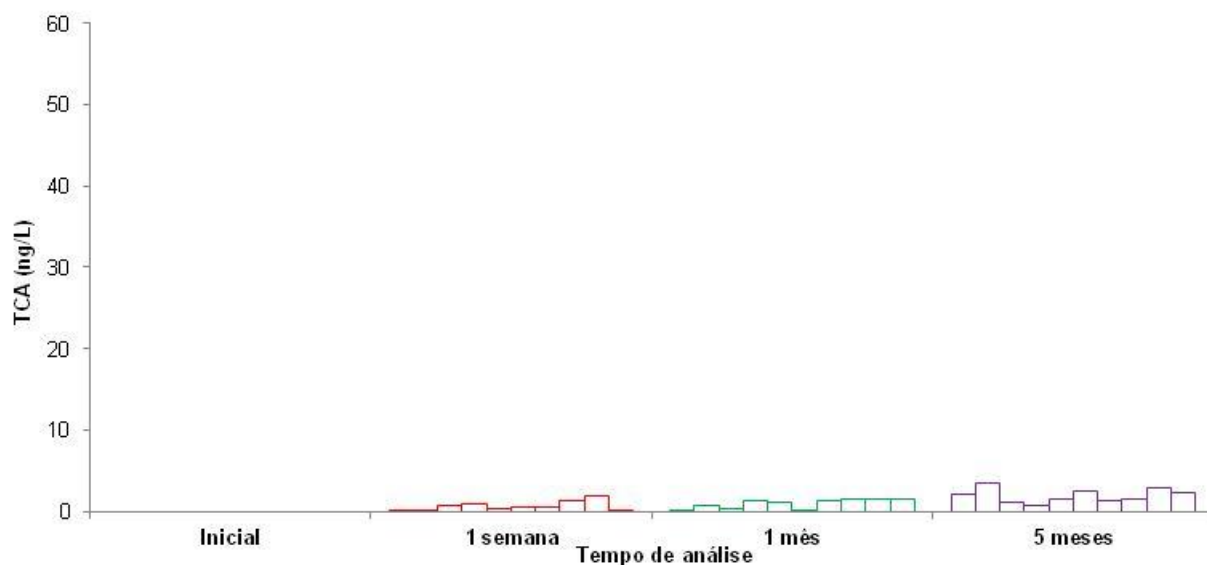


Figura 26 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 5 ng/L**.

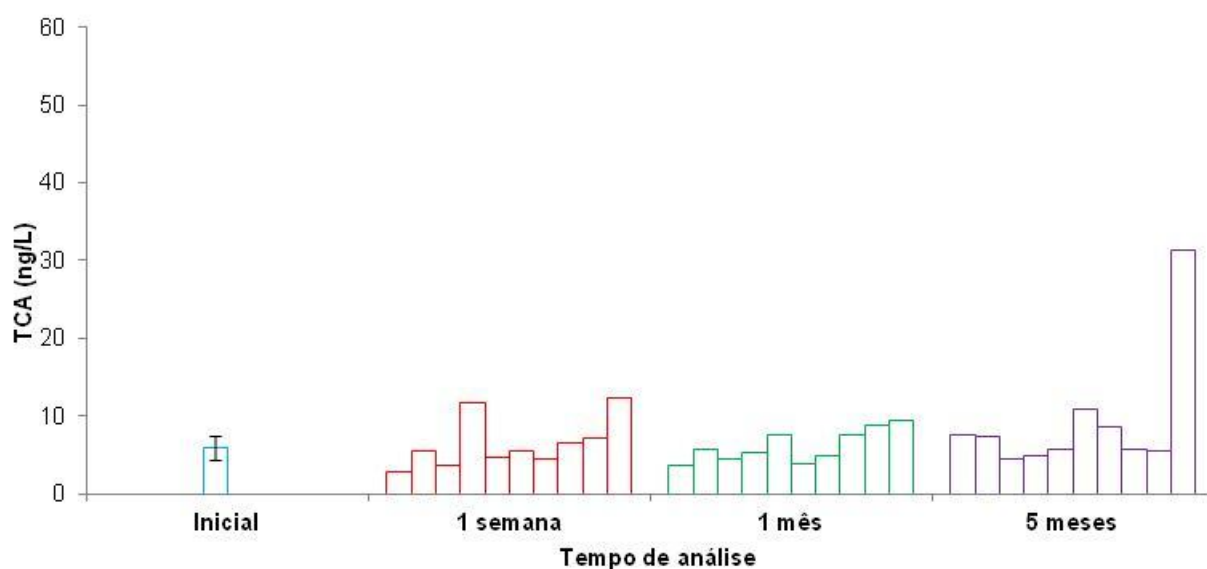


Figura 27 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 5 ng/L**.

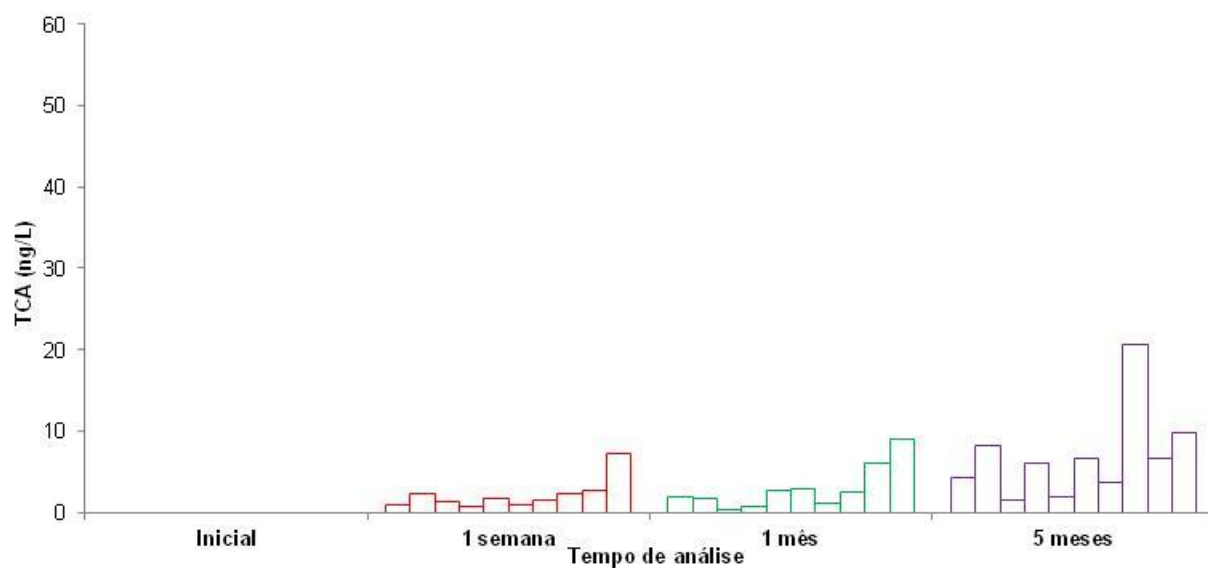
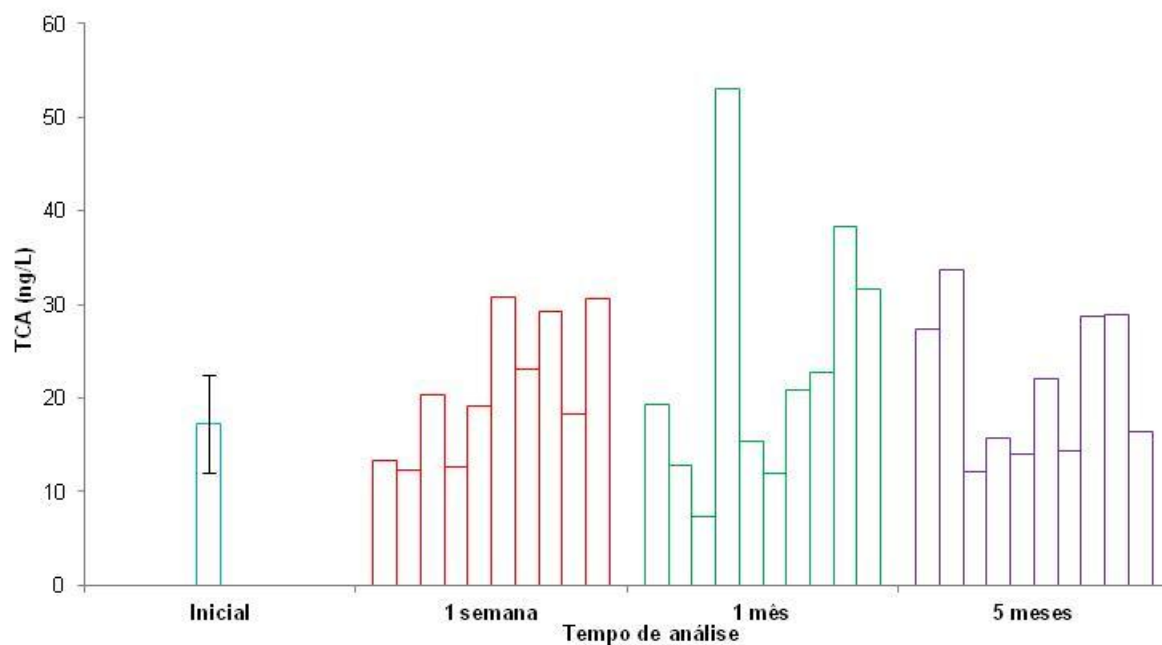


Figura 28 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 20 ng/L**.



*Figura 29 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas com contaminação de TCA 20 ng/L**.*

7.9 Anexo 9 - Cinética de dessorção de TCA de rolhas de cortiça para o vinho (rolhas microaglomeradas)

Para este estudo, foi necessário produzir isolada e manualmente as rolhas por se tratar de rolhas microaglomeradas contaminadas.

O ensaio foi realizado na Fábrica Piloto e na Unidade Industrial MPS, segundo o seguinte procedimento de produção:

- 1º - pesou-se 281,6 g de granulado;
- 2º - pesou-se 38,4 g da cola FP 280A;
- 3º - misturou-se o granulado e a cola na batedeira durante 5 minutos;
- 4º - pesou-se **6,4 g** da mistura (granulado e cola), o que corresponde a uma rolha, para um copo de plástico;
- 5º - o conteúdo de cada copo foi colocado em cada orifício do molde (a mistura de cola e granulado deu para produzir 48 rolhas);
- 6º - as “rolhas” foram comprimidas automaticamente no molde;
- 7º - os moldes foram retirados da máquina e colocados na estufa a cerca de 130-140°C durante 60 minutos;
- 8º - os moldes foram retirados da estufa e arrefeceram durante 2 a 3 horas, período após o qual se procedeu à desmoldação;
- 9º - as rolhas, após dois dias foram retificadas na MPS.

- Resultados da caracterização dos granulados quanto à contaminação com TCA.

Granulado	C TCA (ng/L)
A	nd
B	6,2 ± 0,1
C	10,8 ± 0,2

As figuras seguintes referem-se aos resultados individuais de cada garrafa, ao longo do tempo de análise de 5 meses, para as rolhas com contaminação inicial < 0,5 ng/L e próxima de 1,6 e 6,9 ng/L (Figura 31, Figura 33 e Figura 35, respetivamente) e a respetiva solução simulante de vinho que inicialmente se encontrava isenta de TCA (Figura 30, Figura 32 e Figura 34, respetivamente).

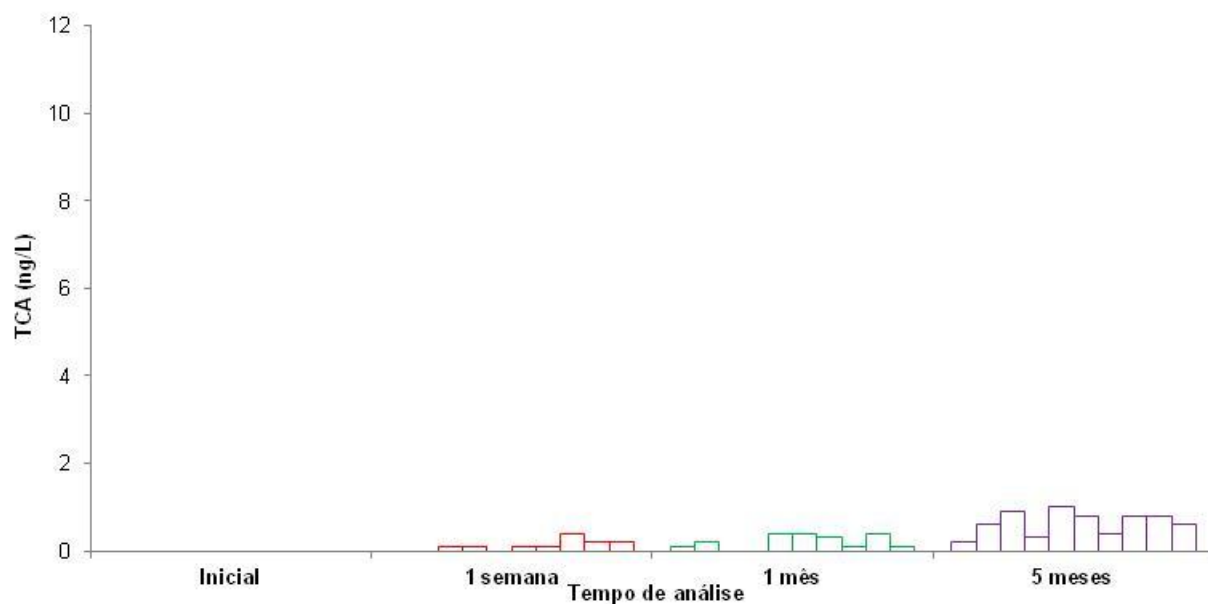


Figura 30 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial de TCA < 0,5 ng/L**.

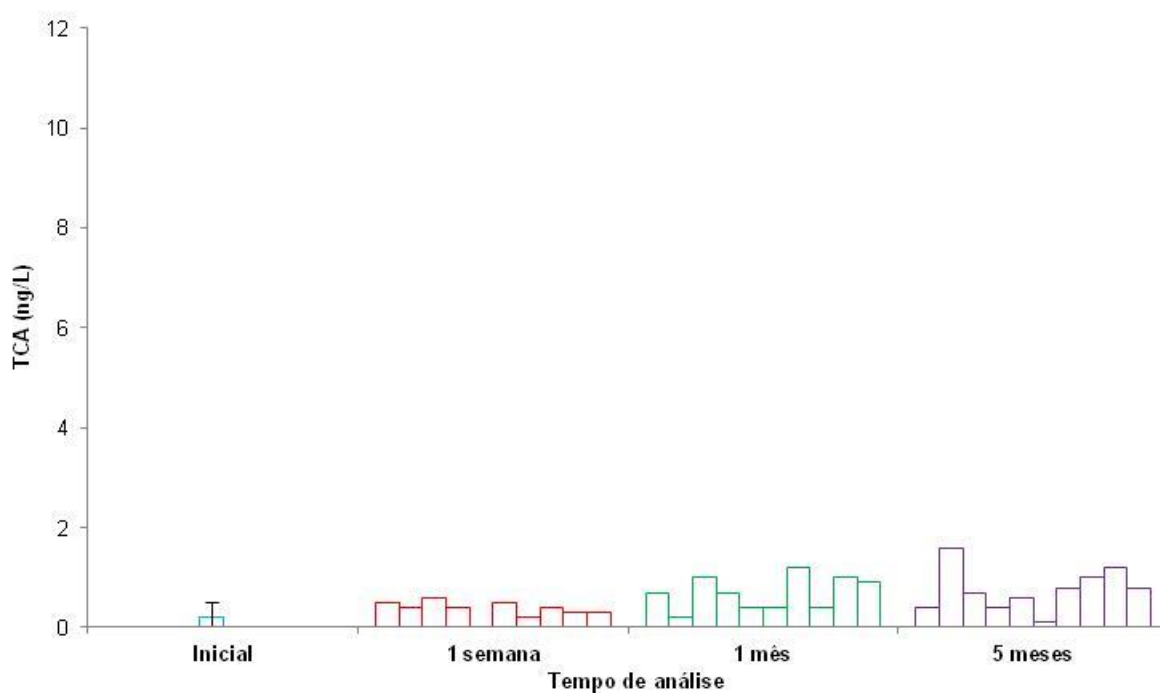


Figura 31- Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial de TCA < 0,5 ng/L**.

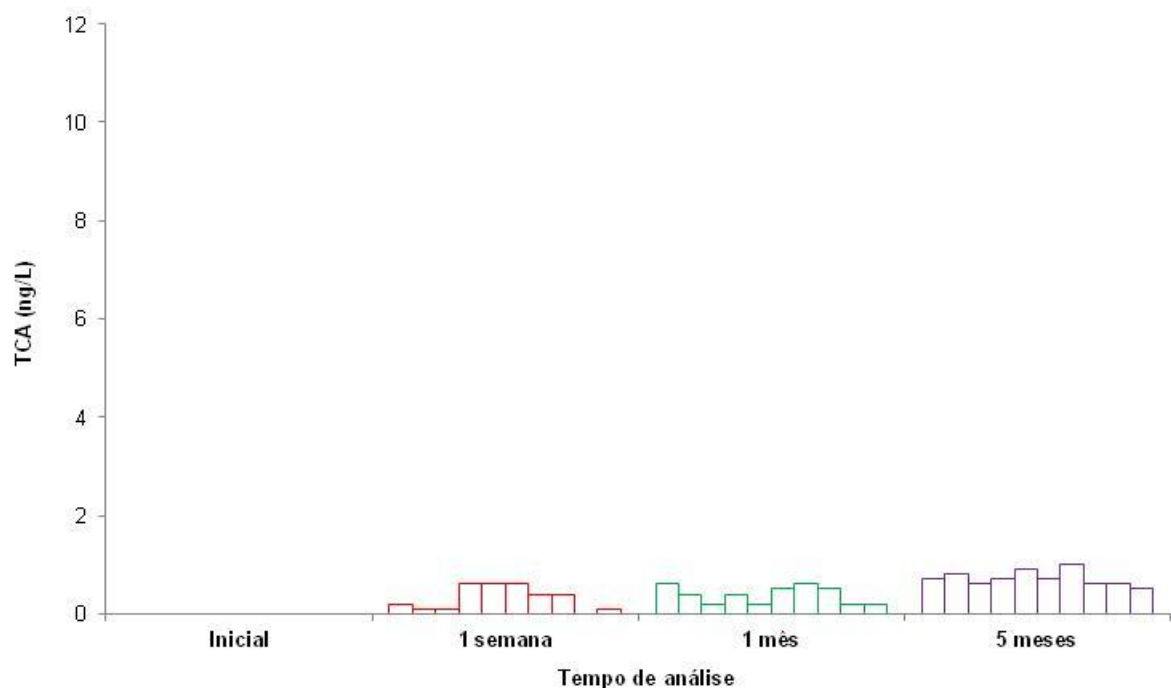


Figura 32 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 1,6 ng/L**.

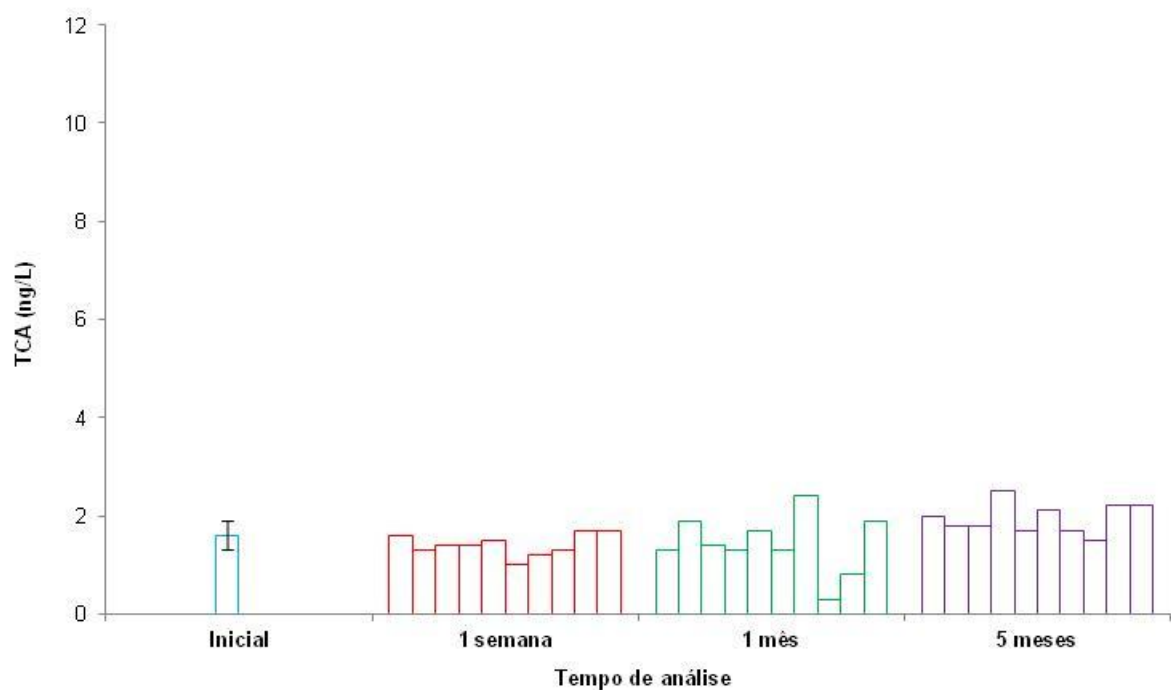


Figura 33 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 1,6 ng/L**.

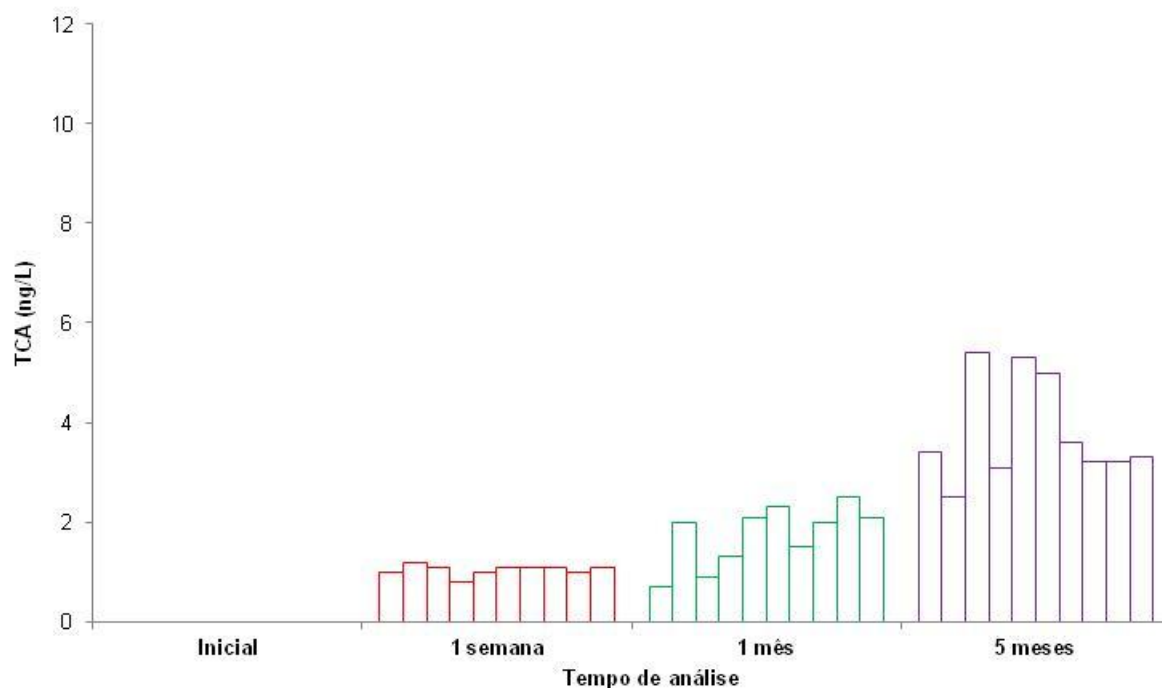


Figura 34 - Resultados de TCA na **solução simulante de vinho**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 6,9 ng/L**.

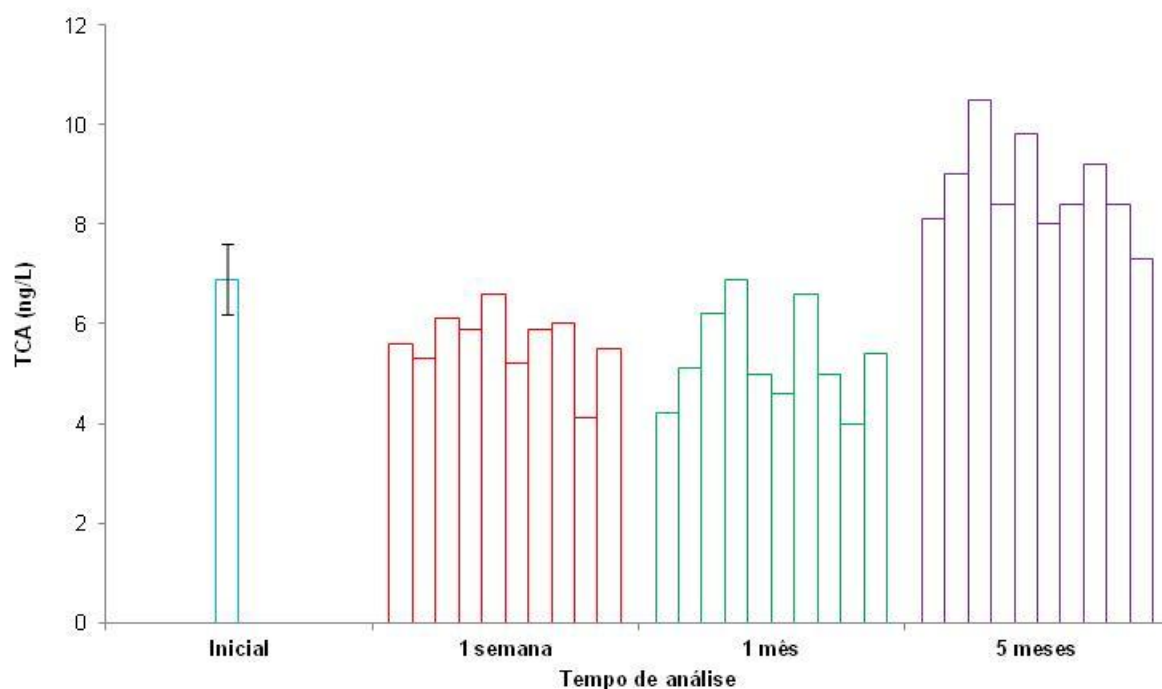


Figura 35 - Resultados de TCA na **rolha**, ao longo do tempo de engarrafamento, para as garrafas com **rolhas microaglomeradas com contaminação inicial média de TCA 6,9 ng/L**.