

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Avaliação do potencial de técnicas de análise individual de rolhas de cortiça para o uso em controlo de qualidade

Tese de Mestrado

de

Eva Filipa Ferreira de Sousa

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim & Irmãos, S. A. - Investigação e Desenvolvimento



Orientador na FEUP: Prof.^a Dr.^a Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos, S. A.: Prof. Dr. Miguel Cabral



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

Julho de 2017

Agradecimentos

Antes de mais devo expor a minha gratidão pela oportunidade de realizar esta dissertação de mestrado no Departamento de Investigação e Desenvolvimento da Amorim & Irmãos, S. A..

Aos meus orientadores. Ao Professor Doutor Miguel Cabral pelo incentivo, atenção e compreensão, e por todo o acompanhamento prestado. À Professora Doutora Margarida Bastos pela disponibilidade, preocupação e por todos ensinamentos transmitidos.

Ao Doutor Paulo Lopes, à Professora Doutora Joana Peres e aos Engenheiros Ana Malheiro e Carlos Costa pela orientação, ideias e imensa ajuda ao longo do projeto.

A todos os que fizeram parte deste percurso. Aos colaboradores do laboratório de I&D Patrícia Oliveira, Salomé Reis e Glória Espinheira, e do NDtech Néelson Lopes e Pedro Magalhães pela integração e conselhos, por me transmitirem os seus conhecimentos e experiência e pelos momentos de boa disposição. Ao meu colega de estágio, Pedro Silva, pela partilha.

Aos que preenchem a minha vida. À minha família, pais e irmãs, por tornarem o meu sonho possível. Pela paciência e pelo amor. Por me ensinarem a humildade, o respeito e o valor de todas as coisas. O meu maior obrigado de todos. À Filipa Rodrigues, pelo cuidado, por saber estar sempre ao meu lado, pelo incentivo, por acreditar e confiar no melhor de mim.

Aos meus amigos. À Marisa Ribeiro, Ana Rocha, João Oliveira, Inês Alves, Magda Dias e Catarina Faria por crescermos juntos, por partilharmos o caminho e as histórias.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projetos: i) POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P; e ii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 - LEPABE-2-ECO-INNOVATION, cofinanciado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER).

Resumo

Apesar da rolha de cortiça ser considerada o vedante de eleição para vinhos, foi-lhe atribuída a responsabilidade pela migração de compostos de aroma indesejável para o vinho, sobretudo do composto 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Desde então, a indústria corticeira não mede esforços no sentido de prevenir e controlar as contaminações da cortiça por parte deste composto. Assim, atualmente, o controlo de qualidade das rolhas é realizado por maceração composta com posterior análise cromatográfica. No entanto, pretende-se com o presente projeto transformar o paradigma de controlo de qualidade atual, passando para esse efeito, a fazer uso de uma tecnologia de análise individual das rolhas - NDtech - tecnologia desenvolvida na Amorim & Irmãos, S. A., e que garante uma análise rápida e com elevado padrão de qualidade.

Nesse sentido, foram analisados 25 lotes de rolhas pelos dois métodos, e procedeu-se à respetiva comparação dos resultados. No entanto, não foi encontrada nenhuma correlação entre os mesmos.

Por seu lado, desenvolveu-se um critério NDtech para o controlo de qualidade, que corresponde à análise de 200 a 300 rolhas por lote, admitindo para a aceitação do lote uma percentagem máxima que o indicador de qualidade NDtech pode tomar. Nesse sentido foram definidos três possíveis cenários: o cenário 1 admite que o indicador NDtech tome o valor de 1 % para as classes de rolhas Flor e Extra, e 2 % para as classes Superior, 1º e 2º. O cenário 2 admite 2 % para as classes Flor e Extra, e 5 % para as restantes. O cenário 3 constitui um caso mais alargado e admite que o indicador de qualidade NDtech possa tomar os valores de 2 % para as classes Flor e Extra e 10 % para as restantes. Assim, é agora da responsabilidade da empresa decidir qual dos cenários cumpre melhor os seus requisitos de qualidade, e é mais viável e ajustado às suas necessidades.

Palavras-chave (Tema): 2,4,6-tricloroanisol, rolhas de cortiça, maceração composta, NDtech, controlo de qualidade

Abstract

Although cork stoppers are considered as the preferred sealant for wine, it was attributed the liability of the undesirable migration of flavor compounds to wine, especially the compound 2,4,6 - trichloroanisole (TCA). Since then, the cork industry strives towards preventing and controlling contamination of cork by this compound. Thus, currently, the quality control of the stoppers is carried out by composed maceration with subsequent chromatographic analysis. However, the intent of this project is to transform the current quality control paradigm, shifting for that purpose, to using single-cork analysis technology - *NDtech* - technology developed at *Amorim & Irmãos, S. A.*, that guarantees a fast analysis and with a high standard of quality.

In this sense, 25 lots of corks were analyzed by the two methods, and the respective results were compared. However, no correlation was found between them.

For its part, an *NDtech* quality control criterion was developed, which corresponds to the analysis of 200 - 300 corks per batch, assuming a maximum percentage of *NDtech* quality indicator for batch acceptance. In this sense, three possible scenarios have been defined: scenario 1 admits that the *NDtech* indicator takes the value of 1 % for the *Flor* and *Extra* classes, and 2 % for the *Superior*, 1st and 2nd classes. Scenario 2 admits 2 % for the *Flor* and *Extra* classes, and 5 % for the rest. Scenario 3 is a broader case and admits that the *NDtech* quality indicator can take the values of 2 % for the *Flor* and *Extra* classes and 10 % for the rest. So, it is now the company's responsibility to decide which scenarios best meet their quality requirements, and is more feasible and tailored to their needs.

Keywords (Topic): 2,4,6-trichloroanisole, cork stoppers, composed maceration, *NDtech*, quality control

Declaração

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

Porto, 3 de julho de 2017

(Eva Filipa Ferreira de Sousa)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Apresentação da Empresa	1
1.3	A cortiça	2
1.3.1	Extração da cortiça	2
1.3.2	A Unidade de Negócio Rolhas	4
1.3.3	Produção de rolhas naturais.....	5
1.4	O contaminante 2,4,6 - tricloroanisol	6
1.4.1	Origem e contaminação.....	7
1.4.2	Metodologias de prevenção e processos de remoção de TCA	9
1.5	Contributos do Trabalho.....	11
1.6	Organização da Tese	11
2	Contexto e Estado da Arte	12
2.1	Metodologias de controlo de TCA	12
2.1.1	Análise Sensorial	12
2.1.2	“Sniffing”.....	14
2.1.3	“Dry soak”.....	14
2.1.4	Maceração Composta (análise por SPME - GC - ECD/MS).....	14
2.1.5	NDtech	16
3	Descrição Técnica.....	17
3.1	Definição da dimensão da amostra a analisar	17
3.1.1	Dimensão da amostra para análise por SPME - GC - ECD.....	17
3.1.2	Definição da dimensão da amostra para análise no NDtech.....	17
3.2	Análise do TCA extraível pelo método SPME - GC - ECD	18
3.3	Análise individual das rolhas de cortiça pelo equipamento NDtech.....	20
3.4	Tratamento Estatístico	22
3.4.1	Tratamento estatístico referente à dimensão da amostra NDtech.....	22

3.4.2	Tratamento estatístico referente à correlação entre os resultados obtidos por maceração composta e os obtidos no NDtech	25
4	Resultados e discussão	27
4.1	Testes estatísticos para avaliar o efeito da dimensão da amostra.....	28
4.1.1	Teste de <i>Levene e Brown - Forsythe</i> e de <i>Bartlett</i>	28
4.1.2	Teste <i>t</i> das médias.....	29
4.2	NDtech versus Maceração Composta	30
4.2.1	Indicador de qualidade NDtech.....	32
4.2.2	Correlação dos resultados obtidos pelo NDtech e por maceração composta.....	34
4.3	Desenvolvimento de um critério aceitação/rejeição para a análise NDtech	36
5	Conclusões	39
5.1	Objetivos Realizados	40
5.2	Outros Trabalhos Realizados.....	40
5.3	Limitações e Trabalho Futuro	40
Anexo 1	MIL STD 105E.....	44
Anexo 2	Análise por SPME - GC - ECD/MS	46
2.1	Amostras.....	46
2.2	Equipamento.....	47
2.3	Análise cromatográfica.....	48
Anexo 3	Características da análise NDtech	50
Anexo 4	Resultados	52

Notação

F	Distribuição F de <i>Snedecor-Fisher</i>
k	Número de subgrupos da amostra
N	Tamanho da amostra
s_i^2	Variância
s_p^2	Variância agrupada
t	Distribuição t - <i>student</i>
Y_i	Valor médio

Letra grega

α	Nível de significância
----------	------------------------

Lista de siglas

A&I	Amorim & Irmãos
AQL	<i>American National Standards Institute</i>
ANSI	<i>Acceptable Quality Level</i> (Nível de qualidade aceitável)
APCOR	Associação Portuguesa da Cortiça
ASQC	<i>American Society for Quality Control</i>
CIPR	Código Internacional das Práticas Rolheiras
CQC	<i>Cork Quality Council</i>
CTCOR	Centro Tecnológico da Cortiça
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detetor de captura eletrónica)
ETS	<i>Enological Technological Services</i>
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia em fase gasosa)
I&D	Investigação e Desenvolvimento
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa)
nd	não detetável

PDMS	Polidimetilsiloxano
R _{G1}	Fração de rolhas no Grupo 1
R _{G2}	Fração de rolhas no Grupo 2
R _{G3}	Fração de rolhas no Grupo 3
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Micro-extração em fase sólida)
STF	<i>Trapping/flow - through Selectors</i>
SC	<i>Common outlet Selectors</i>
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A presença de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em rolhas de cortiça é uma das mais importantes problemáticas da indústria corticeira, por isso, não são medidos esforços no sentido de erradicar. Enquanto este objetivo máximo não é concretizável, várias são as medidas tomadas no sentido de prevenir e controlar as respetivas contaminações. Atualmente, o controlo dos níveis de TCA nas diferentes fases de produção é realizado no laboratório de Investigação & Desenvolvimento da empresa, sendo o método utilizado a análise cromatográfica de TCA extraível dos produtos de cortiça para uma solução etanólica. A análise de rolhas naturais, normalmente implica a maceração em 24 horas de 10 rolhas, sendo depois analisado o respetivo macerado. No entanto, esta metodologia por análise composta pode mascarar os reais valores de TCA, pelo que o presente projeto tem como objetivo a avaliação do potencial de técnicas de análise individual - NDtech - de rolhas de cortiça para o uso em controlo de qualidade, a fim de tornar este controlo mais expedito e representativo da realidade dos lotes analisados.

1.2 Apresentação da Empresa

A Corticeira Amorim SGPS S. A. nasceu de uma modesta fábrica de rolhas em Vila Nova de Gaia, em 1870. A proximidade estratégica aos produtores de vinho contribuiu para criar e fortalecer relações, e desenvolver os negócios, garantindo rapidez de resposta aos clientes. Atualmente é a maior empresa mundial de produtos de cortiça, contando na globalidade com 18 unidades industriais, 44 empresas de distribuição e 258 agentes, assegurando presença em todo o mundo. Com quase 150 anos de liderança, e um volume de negócios superior a 600 milhões de euros, é caracterizada pela preocupação e exigência em elevar os padrões de qualidade dos seus produtos. Por isso, apesar da aplicação com maior volume de negócios continuar a ser a rolha, que representa cerca de 64 % do volume de negócios da empresa, a Corticeira Amorim desenvolve a sua atividade focada na criação de valor através da aposta em Investigação & Desenvolvimento noutras áreas de aplicação, dada a versatilidade conhecida da cortiça. Assim, está organizada em cinco áreas de negócio: Matérias-Primas, Rolhas, Revestimentos, Aglomerados Compósitos e Isolamentos, disponibilizando um vasto portfólio de produtos, para incorporação em indústrias tão diversificadas como são a indústria aeronáutica, de construção ou vinícola (Corticeira Amorim-a), 2015).

1.3 A cortiça

A cortiça, casca do sobreiro *Quercus suber L.*, é um tecido totalmente natural e constituído por células microscópicas que possuem no interior um gás idêntico ao ar, que representa 80 a 90% do volume de uma rolha. Este agregado de pequenas células concede à cortiça uma compressibilidade fora do vulgar. Por sua vez, o gás contido na cortiça é responsável pela sua elasticidade e má condutibilidade térmica, sonora e vibrátil, assim como extraordinária leveza. Além disso, a cortiça é de combustão lenta, muito resistente ao atrito, e como produto natural é biodegradável, renovável e reciclável. As características da cortiça podem também ser melhor compreendidas depois de analisada a sua composição química: suberina (45 %), lenhina (27 %), polissacáridos (12 %) - componentes estruturais, ceróides (6 %) e taninos (6 %) - componentes não-estruturais. A suberina, principal constituinte, é responsável pela baixa permeabilidade e pelas suas propriedades mecânicas (APCOR-a), 2017).

O sobreiro é cultivado na bacia mediterrânica em países como Espanha, Argélia, Marrocos, Itália, Tunísia e França, mas sobretudo em Portugal. Estima-se que existem mais de 2,2 milhões de hectares de montado (floresta de sobreiro) e cerca de um terço - aproximadamente 737 mil hectares - situa-se em Portugal. A produção mundial de cortiça é de 200 mil toneladas por ano, das quais 50 % são nacionais. Assim, foi constituída árvore nacional de Portugal desde 2012 (*Cork Quality Council-a*), 2017).

Em Portugal, cerca de 25 % - 30 % da produção de cortiça, em massa, é usada para a produção de rolhas, por isso, o principal setor de destino dos produtos de cortiça é a indústria vinícola que retém cerca de 72 % de tudo o que é produzido (*Cork Quality Council-a*), 2017).

O valor gerado pelas exportações portuguesas de cortiça revela-se extremamente significativo e também muito representativo da importância desta matéria-prima. A cortiça representa cerca de 840 milhões de euros em exportações - 1 % do valor das exportações totais portuguesas e cerca de 30 % do total das exportações portuguesas de produtos florestais (APCOR-b), 2017).

1.3.1 Extração da cortiça

A extração da cortiça é um processo controlado que não requer o corte dos sobreiros. Esta casca que cobre o sobreiro pode começar a ser retirada após 25 anos do seu nascimento. É no fim da primavera - início do verão que é mais fácil retirar a cortiça porque a casca está menos aderente ao tronco. A primeira cortiça a ser retirada chama-se “cortiça virgem” e este primeiro ato de descortiçamento tem o nome de “desboia”. Como este tipo de cortiça apresenta uma estrutura muito irregular com fendas bastante profundas, não é utilizada para

a produção de rolhas naturais sendo aproveitada para produzir granulado e para a trituração. O segundo descortiçamento, 9 anos depois, tem o nome de “secundeira”. A secundeira continua com uma estrutura demasiado irregular pelo que é necessário esperar mais 9 anos para se retirar a “amadia”, cortiça com qualidade suficiente para ser utilizada na produção de rolhas. A partir daqui, a cada 9 anos pode ser feito o descortiçamento da árvore e essa cortiça pode ser utilizada na produção de rolhas. O sobreiro tem um tempo de vida longo, cerca de 170 a 200 anos, podendo ser descortificada 15 a 18 vezes (Green Cork, 2017).

Na Figura 1 são apresentadas algumas das aplicações possíveis da cortiça, além da produção de rolhas. A “amadia”, cortiça de melhor qualidade, pode por exemplo ser aplicada em calçado e em artigos desportivos. Além disso, é importante realçar que os subprodutos gerados ao longo do processo de transformação da cortiça, qualquer que seja a aplicação, podem facilmente ser reprocessados e incorporados noutras aplicações.

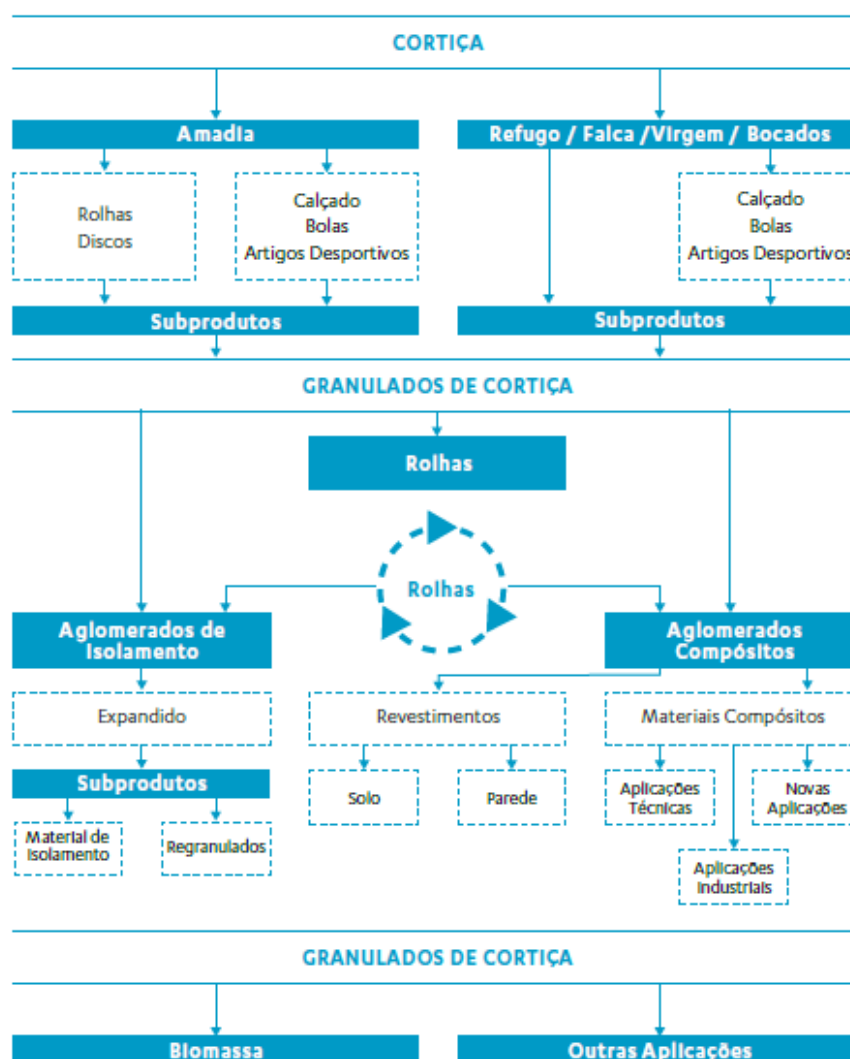


Figura 1 - Aplicações da cortiça e o seu aproveitamento integral (Corticeira Amorim-a), 2015).

1.3.2 A Unidade de Negócio Rolhas

O negócio das rolhas é, desde sempre, o *core business* da Corticeira Amorim. É nesta área que é aplicada a maior fatia de investimento em investigação e desenvolvimento de soluções de melhoria. A Amorim & Irmãos, S. A. integra a Corticeira Amorim, e é o maior produtor e fornecedor de rolhas de cortiça a nível mundial - mais de 4 mil milhões de rolhas vendidas por ano. Vende para mais de 15 mil clientes ativos em dezenas de países, incluindo as caves mais conceituadas do mundo. (Corticeira Amorim-a), 2015).

Atualmente a empresa possui uma vasta gama de rolhas, disponíveis em vários calibres, cores e marcas, de forma a cumprir os requisitos do cliente. A variedade de rolhas concede à empresa uma capacidade singular no fornecimento da rolha apropriada para qualquer segmento de bebidas, nomeadamente vinhos tranquilos, efervescentes e bebidas espirituosas (Tabela 1).

Tabela 1 - A rolha apropriada para cada segmento de bebida.

Rolhas para vinho tranquilo	A rolha de cortiça natural é ideal para vinhos, uma vez que garante uma correta evolução e maturação do vinho. Outros tipos de rolhas são também usados para vinhos tranquilos, nomeadamente as rolhas técnicas Neutrocork e Twintop.
	
Rolhas para vinhos efervescentes	Possuem um corpo constituído por aglomerado de grânulos de cortiça e 1,2 ou 3 discos de cortiça natural num dos topos. O seu maior diâmetro permite que sejam resistentes às altas pressões dos vinhos efervescentes, nomeadamente de Champanhe.
	
Rolhas para espirituosos	Rolhas naturais ou técnicas às quais são acopladas uma cápsula de madeira, porcelana, metal, vidro, PVC ou outros. São ideais para vinhos licorosos ou espirituosos, consumidos durante um maior período de tempo, uma vez que garantem fácil reutilização.
	

1.3.3 Produção de rolhas naturais

O processo de produção de rolhas naturais abrange várias etapas, iniciando-se no descortiçamento e finalizando no embalamento das rolhas para o cliente (APCOR-c), 2017):

- Descortiçamento;
- Cozedura das pranchas - são cozidas em água limpa e a ferver;
 - Objetivos: limpar a cortiça, extrair-lhe as substâncias hidrossolúveis, aumentar a sua espessura e assim reduzir a sua densidade, torná-la mais macia e elástica.
- Estabilização da cortiça - as pranchas são secas ao ar livre para aplanar e atingirem uma dureza e teor de humidade que permitam o seu corte. Só depois deste período, que se estende por duas a três semanas, é que se procede à seleção das pranchas;
- Seleção das pranchas e rabaneação - as pranchas são separadas por classes de qualidade com base na espessura, porosidade e aspeto. De seguida, são cortadas - rabaneadas - em tiras com uma largura ligeiramente superior ao comprimento da rolha a fabricar;
- Brocagem - processo manual ou semiautomático que consiste em perfurar as tiras de cortiça com uma broca. A brocagem é feita no sentido perpendicular ao crescimento da cortiça para que os poros fiquem perpendiculares ao comprimento da rolha e assim aumentar a capacidade de vedação. A cortiça que não dá diretamente origem à rolha de cortiça natural será aproveitada para granular e produzir rolhas técnicas;
- Retificação - obter as dimensões finais previamente especificadas e regularizar a superfície da rolha. A operação de correção do diâmetro (corpo da rolha) denomina-se por ponçamento e a correção do comprimento (topos) denomina-se de topejamento;
- Seleção - é a operação destinada a separar as rolhas acabadas em classes diferenciadas, sendo que a determinação de cada classe é feita por controlo automático da superfície das rolhas ou de forma manual através de pessoal qualificado para fazer a seleção visual das rolhas. Na classificação comercial de rolhas naturais, em conformidade com a porosidade presente na rolha, encontram-se as seguintes classes: Flor, Extra, Superior, 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, sendo que a Flor adquire maior valor comercial e a 6ª o menor.
- Lavagem/desinfecção e secagem - a lavagem das rolhas de cortiça utiliza compostos à base de peróxido de hidrogénio. O teor de humidade é estabilizado, obtendo-se assim uma otimização da performance da rolha como vedante e reduzindo, em simultâneo, a contaminação microbiológica;

- Revestimento - operação que consiste em revestir a superfície da rolha com uma camada pigmentada, aplicando-se unicamente em rolhas lavadas. Tem como objetivo uniformizar a cor na superfície, assim como melhorar a vedação após o arrolhamento;
- Marcação - esta operação é realizada de acordo com as indicações do cliente para o tipo de marca a aplicar. Como modo de impressão existe a impressão a tinta (de qualidade alimentar), a marcação a fogo ou, ainda, a marcação a laser;
- Tratamento de superfície - nesta operação a superfície das rolhas é revestida com produtos à base de silicone e parafina. Sendo a parafina utilizada essencialmente para garantir a boa estanquidade da garrafa, e o silicone para lubrificar a superfície da rolha para que esta deslize no gargalo da garrafa sem grande atrito, tanto na sua inserção como na sua extração;
- Embalagem e Transporte/Expedição.

1.4 O contaminante 2,4,6 - triclороанisol

Nos anos 90 a utilização da rolha de cortiça foi colocada em causa, uma vez que lhe foi atribuída a responsabilidade da deterioração da qualidade organolética dos vinhos, através da contaminação com 2,4,6-triclороанisol (TCA).

Em 2000, um estudo patrocinado pelo *Cork Quality Council* (CQC) e conduzido pelo *Enological Technological Services laboratory* (ETS), na Califórnia, desenvolveu a metodologia de análise de TCA por maceração composta de rolhas em solução etanólica, tendo por base a verificação que TCA presente em cortiça estabelece equilíbrio com a solução de maceração, à semelhança do que ocorre no vinho engarrafado. Ao longo do tempo, TCA presente em cortiça migra para o vinho, correspondendo o valor de TCA no vinho, ao fim de 14 meses em garrafa, a 51 % do valor de TCA libertável da rolha (*Cork Quality Council-b*), 2017)

Assim, concluiu-se que as rolhas de cortiça seriam as responsáveis pelos principais defeitos sensoriais do vinho, que estão relacionados com problemas microbiológicos e químicos, tais como aromas fúngicos (mofo e bafio) (Coque *et al.*, 2006), causados pelo contacto do vinho com atmosferas contendo haloanisóis: o 2,4,6-triclороанisol (2,4,6-TCA), o 2,3,4,6-tetraclороанisol (2,3,4,6-TeCA), o pentaclороанisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoанisol (2,4,6-TBA).

Desta forma, e aproveitando estas fragilidades associadas às rolhas de cortiça, apareceram os vedantes alternativos, sintéticos e as cápsulas de rosca, que assim conseguiram ganhar cerca de 30 % de mercado às rolhas durante e após a década de 90. Por esse motivo, muitas centenas de milhões de euros têm sido investidos em investigação e inovação, no sentido de erradicar TCA da cortiça. Até ao momento, este esforço da indústria corticeira já se traduziu

numa redução dos níveis de TCA nas rolhas naturais, em cerca de 96 %, desde 2001 (Figura 2, *Cork Quality Council-b*), 2017).

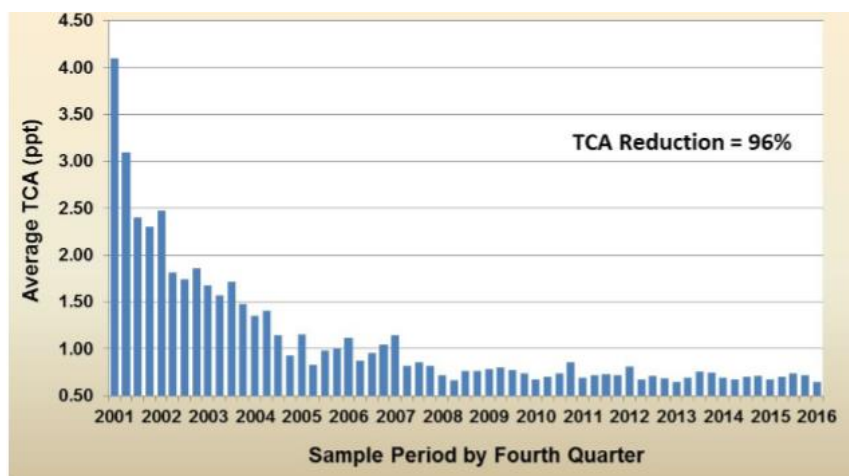


Figura 2 - Redução dos níveis de TCA nas rolhas de cortiça ao longo dos anos (*Cork Quality Council-b*), 2017).

1.4.1 Origem e contaminação

O TCA é um composto químico estável, vulgarmente presente na natureza e pode ser encontrado na madeira, no vinho, na água, no solo e, também, na cortiça. Não é conhecido nenhum efeito deste composto sobre a saúde humana e, no caso do vinho, o seu limite de perceção é variável de acordo com o consumidor, o tipo de vinho, a ocasião em que este é consumido, entre outros.

A origem do TCA na cortiça é de responsabilidade antropogénica, nomeadamente devido à extensa utilização de produtos químicos que continham clorofenóis para desinfeção e esterilização em várias indústrias como as de preservantes de madeiras e subprodutos, pesticidas, inseticidas, fungicidas e desinfetantes da água para consumo e para piscinas. Por serem baratos e fáceis de fabricar foram vastamente usados durante décadas, o que os tornou presentes em vários ecossistemas. A contaminação dos ecossistemas permitiu que alguns microrganismos desenvolvessem mecanismos de defesa contra a toxicidade destes compostos (Sefton e Simpson, 2007). Assim, bactérias do solo e fungos são capazes de formar cloroanisóis através da *O*-metilação dos clorofenóis, o que consiste na reação de biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP), formando TCA (Coque *et al.*, 2006).

Para a formação de clorofenóis, é necessário que uma substância que contenha fenol entre em contacto com uma fonte de cloro. Ou seja, se por exemplo, se lavar uma rolha de cortiça com uma fonte de cloro, potencia-se o eventual aparecimento de clorofenóis.

Por esse motivo, a indústria corticeira banuiu esta prática no processo de lavagem das rolhas de cortiça há mais de 15 anos. Está proibida pelo Código Internacional de Práticas Rolheiras (CIPR) a utilização do cloro ou de meios contendo este composto halogenado, em qualquer fase da fabricação de rolhas. Este código foi criado por empresas da indústria corticeira, em resposta à crise vivida nas rolhas de cortiça, a fim de regulamentar práticas e processos (Corticeira Amorim-b), 2011).

A contaminação das rolhas de cortiça pode dar-se em qualquer altura da sua produção, desde o sobreiro até ao produto final. A cortiça da árvore pode estar contaminada mesmo antes da sua extração, devido à absorção de halofenóis pela atmosfera ou pela água. Neste caso, a contaminação arrasta-se por todo o processo até ao produto final.

Na mesma árvore a contaminação pode ser muito heterogénea, sendo possível encontrar zonas com valores significativos de TCA, vizinhos de outras zonas com TCA não detetável. No calço, fruto do contacto com o solo mais húmido, se houver presença de TCP é possível encontrar valores significativamente altos de TCA.

A contaminação da rolha pode dar-se também dentro das adegas durante o armazenamento dos vinhos engarrafados, uma vez que a cortiça consegue facilmente absorver cloroanisóis através da atmosfera.

Só quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto direto com o vinho (ou com a câmara de ar acima do vinho na garrafa - *headspace*), se dá a transferência de TCA a partir da rolha para o vinho (Amon e Simpson, 1986; Capone *et al.*, 1999). Consequentemente, a localização do TCA na rolha, o volume de vinho em contacto com a rolha e a sua orientação no engarrafamento são parâmetros fundamentais que contribuem para a contaminação ou não do vinho (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999 e 2002).

Assim, por serem tão diversificadas as fontes de contaminação, é muito trabalhoso e exigente controlar os fatores que a tornam efetiva. O desafio do TCA passa por tomar medidas preventivas, curativas e de controlo de qualidade, a fim de diminuir as respetivas contaminações e elevar a qualidade dos produtos finais obtidos. Nesse sentido, a Amorim & Irmãos, S. A. assumiu uma atitude de aposta em Qualidade e Investigação & Desenvolvimento, que envolve um investimento financeiro anual de seis milhões de euros em I&D e que tem como objetivo a validação científica dos processos de produção, o aumento do conhecimento da interação das rolhas com o vinho e a melhoria da qualidade das rolhas produzidas (Corticeira Amorim-a), 2015).

1.4.2 Metodologias de prevenção e processos de remoção de TCA

A preocupação da Amorim & Irmãos, S. A. com os padrões de qualidade dos seus produtos passa, inevitavelmente, por boas práticas de prevenção e extração de TCA.

O rigor começa logo desde a compra da matéria-prima. Por si só, a empresa não é detentora de florestas de sobreiro e, por esse motivo, mantém uma relação muito próxima com os produtores de cortiça, adquirindo apenas matéria-prima aos que cumprem o Código das Práticas Rolheiras.

Em relação às metodologias preventivas, Duncan *et al.* (1997) demonstraram que a incidência de TCA é superior na base do tronco dos sobreiros. Como tal, quando se faz a extração da cortiça do sobreiro, são retirados cerca de 10 a 20 cm desde a sua base. As pranchas de cortiça são empilhadas em estaleiros com pavimento cimentado, evitando o contacto da cortiça com o solo. As pilhas são feitas de forma a maximizar o escoamento da água e a circulação do ar, de modo a reduzir o perigo de contaminação microbiana. É também com esse objetivo que toda a cortiça destinada à produção de rolhas é deslocada na fábrica em paletes de aço inoxidável (C.E.Liège, 2011).

As alterações efetuadas no sistema de cozedura das pranchas de cortiça levaram à humificação das pranchas em cerca de 20 %, contra os 40 % obtidos com os sistemas anteriormente usados. A grande consequência é a redução do tempo de estabilização das pranchas, que passou de 3 semanas para 3 dias, com consequência na significativa redução do crescimento de fungos.

Também como sistema preventivo as rolhas deixaram de ser lavadas com hipoclorito de sódio de forma a evitar o papel deste como precursor de TCA (C.E.Liège, 2011).

Além da prevenção, vários são os processos de cura/remoção de TCA desenvolvidos na Amorim & Irmãos, S. A. e que incluem tecnologias modernas e altamente eficazes - CONVEX®, INOS II® e ROSA EVOLUTION®.

Todas as pranchas indicadas para a produção de rolhas são processadas no sistema de cozedura dinâmico CONVEX®, que impede a contaminação cruzada e produz uma cortiça mais seca e limpa para o processamento, sendo assim menos vulnerável à formação de TCA. Os cuidados são reforçados no caso dos discos para as rolhas técnicas, tratados com o processo de lavagem hidrodinâmica INOS II® (Patente nº EP 1108507). Este processo consiste em lavar os discos num banho de água quente (cerca de 40 °C), sob ciclos de pressão e descompressão,

de forma a limpar e a retirar alguns dos contaminantes, apresentando uma eficiência de remoção de 40 %. Destaca-se ainda o sistema *ROSA EVOLUTION® - Rate of Optimal Steam Application* - que consiste numa destilação de vapor controlada que remove cerca de 80% do TCA e outros compostos voláteis (Patente nº PT 103910 B), sem danificar as propriedades físico-mecânicas das rolhas naturais (Corticeira Amorim-b), 2011).

Outras empresas do setor corticeiro também procuraram desenvolver processos que garantissem reduções significativas de TCA em produtos acabados, apresentam-se alguns exemplos na tabela seguinte.

Tabela 2 - Outros processos de remoção de TCA.

<i>Empresa</i>	<i>Processo</i>	<i>Descrição do processo</i>
<i>OENEO</i>	<i>Diamant®</i>	Extração de TCA de granulado usando dióxido de carbono comprimido até ao seu estado supercrítico. Eficácia de remoção de 99,8 %. Provoca deformações físico-mecânicas (Oeneo, 2017).
<i>Cork Supply</i>	<i>Innocork</i>	Consiste na combinação de vapor de água, álcool etílico e temperatura controlada para volatilizar o TCA presente na estrutura celular da cortiça. A utilização de etanol beneficia a remoção de TCA por ajuste de polaridade. Destina-se apenas a rolhas naturais. A sua eficácia média é de 63 % (Cork Supply-a), 2017).

Além da aplicação das metodologias de prevenção e dos processos de remoção de TCA, na Amorim & Irmãos, S. A. o trabalho desenvolvido no Departamento de Investigação & Desenvolvimento assume-se como essencial para controlar os níveis efetivos de TCA nas diferentes fases do processo e garantir a qualidade dos produtos. Importa referir que a empresa compra fora das respetivas unidades uma parte considerável de rolhas que posteriormente comercializa, necessitando por isso de fazer, logo desde o momento da compra, um controlo apertado de TCA a estes lotes. Assim, o trabalho no laboratório I&D passa não só por testar as pranchas de cortiça após a cozedura, os granulados, discos e rolhas após a produção, até à fase de acabamento, como também controlar todas as compras. O controlo é minucioso, realizado em todos os lotes e faz uso de um sistema de análise por cromatografia gasosa.

No entanto, o método de quantificação utilizado no laboratório de I&D - maceração composta com posterior análise cromatográfica - apresenta algumas limitações, que passam não só pela complexidade dos procedimentos que implica, como também e sobretudo, pelo tempo que é despendido na análise. Assim, pretende-se com o presente projeto tornar este controlo de TCA mais expedito, fazendo uso de uma tecnologia que analise mais rapidamente as rolhas, de uma forma mais representativa e com elevado padrão de qualidade - o NDtech.

1.5 Contributos do Trabalho

O presente projeto visa mudar o paradigma de controlo de qualidade da empresa, de modo a realizar um controlo mais expedito, fiável e próximo da realidade. Assim, em consequência do estudo efetuado, será criado um novo critério de rejeição/aceitação dos lotes de compra, analisados por um método diferente.

1.6 Organização da Tese

A presente tese está dividida em 5 capítulos.

No capítulo 1, Introdução, é feito um enquadramento do projeto, da empresa e da cortiça no mercado, e explicada a problemática de contaminação das rolhas de cortiça pelo composto 2,4,6-tricloroanisol. São também referidas as metodologias de prevenção e os processos que têm vindo a ser desenvolvidos no sentido de minimizar os efeitos desta contaminação.

No capítulo 2, Contexto e Estado da Arte, são apresentadas as metodologias de controlo de qualidade comumente utilizadas na indústria corticeira, no que aos níveis de TCA diz respeito, introduzindo o NDtech como novo método de controlo de qualidade.

No capítulo 3, Descrição Técnica, é exposto com detalhe o método de controlo de qualidade de referência do mercado - maceração composta, e descrita a análise individual do NDtech. É também descrito o tratamento estatístico a efetuar nos resultados obtidos.

No capítulo 4, Resultados e Discussão, são apresentados detalhadamente todos os resultados obtidos, assim como a respetiva interpretação dos mesmos.

No capítulo 5, Conclusão, apresentam-se sumariadas as principais conclusões do projeto, os objetivos realizados, assim como sugestões futuras de melhoria.

2 Contexto e Estado da Arte

A produção de rolhas de cortiça é um processo complexo, que exige um controlo de qualidade muito rigoroso nas diversas fases de produção. A garantia da qualidade na fabricação de rolhas de cortiça tem como principais objetivos:

- obter uma funcionalidade adequada da rolha de cortiça como vedante eficaz;
- a inocuidade da rolha de cortiça;
- a eficiência dos processos produtivos.

Assim, antes e durante o processamento, as rolhas são submetidas a uma série de testes e de procedimentos, como por exemplo inspeções visuais em várias fases intermédias do processo, o que permite retirar ou separar rolhas de pior qualidade, a fim de garantir que satisfazem as especificações exatas dos clientes e que cumprem os requisitos técnicos mais rigorosos.

Além disso, no controlo de qualidade das rolhas de cortiça é essencial inspecionar os níveis de contaminação por TCA. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas no sentido de melhor realizar este controlo, no entanto, a maceração composta continua a ser o método de referência do mercado para quantificar os níveis de TCA.

2.1 Metodologias de controlo de TCA

2.1.1 Análise Sensorial

O princípio do método consiste em detetar, qualificar e eventualmente avaliar o odor transmitido para o meio (água, vinho ou outros) em que as rolhas foram postas em maceração (CTCOR, 2015). O procedimento analítico está expresso na norma ISO/PRF 22308 e tem a vantagem de não só descrever a metodologia para identificar aromas a mofo, como também outros aromas que, eventualmente, possam estar presentes nas rolhas de cortiça (Tabela 3).

O CQC já realizou vários estudos para identificar a sensibilidade ao TCA numa grande variedade de vinhos em contacto com cortiça. Os resultados mostram consistentemente que, embora a sensibilidade individual varie consideravelmente, 50 % dos participantes de um painel de provadores provenientes das indústrias do vinho e da cortiça conseguiram reconhecer TCA numa concentração de aproximadamente 6 partes por mil milhões (ppt) (*Cork Quality Council-b*), 2017). Este valor é posto em causa pela experiência da indústria de cortiça e do vinho, sendo manifestamente considerado excessivo.

2.1.2 “Sniffing”

O “sniffing” é uma análise não invasiva e rápida, que permite também a identificação de odores na rolha de cortiça. Consiste em aquecer a rolha numa placa de aquecimento a temperaturas elevadas, durante cerca de 1 minuto, sendo analisadas sensorialmente logo de seguida.

2.1.3 “Dry soak”

Esta é uma análise recente, e pode ser compreendida como uma otimização da análise sensorial, na medida em que permite a identificação de odores na rolha de cortiça de uma forma não invasiva. Consiste em colocar a rolha num frasco em ambiente húmido, durante 24 h após o que é feita a análise sensorial da rolha.

A *Cork Supply*, concorrente da A&I oferece um serviço de inspeção a 100 % das rolhas por este método (*Cork Supply-b*, 2017).

De facto, as técnicas de análise sensorial, “sniffing” e “dry soak” usam o “nariz humano” como “instrumento de medida” eficiente e eficaz na avaliação do perfil organolético das rolhas de cortiça. No entanto, este sistema de análise tem limitações significativas, pois a saturação do nariz humano é rapidamente atingida. Assim, amostras com TCA analisadas após aquela saturação podem ser consideradas negativas ou com intensidade muito menor do que aquela que corresponde à realidade (CTCOR, 2015).

2.1.4 Maceração Composta (análise por SPME - GC - ECD/MS)

Esta técnica foi desenvolvida pelo ETS, nos EUA, e representa uma combinação da técnica de microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*) com a cromatografia em fase gasosa (GC - *Gas Chromatography*), com deteção por espectrometria de massa (MS - *Mass Spectrometer*), ou por captura de eletrões (ECD - *Electron Capture Detector*).

A GC é uma técnica que permite a separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida num fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel ou gás de arraste que transporta os componentes da amostra até ao detetor. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa pela coluna cromatográfica (contendo a fase estacionária), local onde ocorre a separação da mistura. As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detetor. Este dispositivo gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluído. Através do registo do sinal em função do

tempo, obtém-se um cromatograma, com os diferentes componentes representados pelos respetivos picos, com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa.

O detetor-ECD é utilizado para detetar moléculas e átomos presentes num composto gasoso, através da captura de eletrões que ionizam quando excitados. Quando as moléculas se deslocam através do detetor, este captura alguns dos eletrões na amostra o que provoca a redução da corrente elétrica. Por sua vez, no caso do detetor-MS, a amostra, no estado gasoso, é bombardeada por um feixe de eletrões de alta energia. De seguida, o instrumento deteta e regista os diferentes fragmentos formados pelo impacto. A partir do padrão dos valores da razão entre a massa e a carga (m/z) de cada um dos fragmentos identifica-se o composto em análise.

A análise por SPME-GC-ECD/MS é a técnica atualmente utilizada como referência na indústria corticeira para efetuar o controlo de qualidade da cortiça, no que respeita aos níveis de TCA. O método consiste na análise do TCA extraível da solução resultante da maceração de rolhas de cortiça, discos ou grânulos, numa solução etanólica 12 % (simulando o vinho), durante 24 horas a temperatura ambiente. A aplicação desta metodologia de análise aos lotes de rolhas de cortiça tem à partida um problema relacionado com o número de análises necessárias para evidenciar a real contaminação de um lote. De facto, cada lote é composto por um número muito significativo de peças o que inviabiliza a análise de todas elas de forma individual. Assim, a utilização de macerações compostas de 10 rolhas (*soak*) foi a solução encontrada para tornar a amostragem mais representativa. A análise das amostras, realizada posteriormente por GC, é capaz de detetar níveis de TCA libertável superiores a 0,5 partes por mil milhões (0,5 ng/L), e apresenta um tempo total de análise de 15 minutos por amostra (Comunicação pessoal, Ana Malheiro).

No entanto, o facto deste método utilizar macerações compostas, apresenta uma desvantagem relacionada com a possibilidade de absorção de TCA por rolhas em maceração que não estão contaminadas, originando uma concentração final resultante das médias das concentrações envolvidas na maceração, que pode ser maior ou menor do que o valor real. Ou seja, este controlo pode nem sempre representar a realidade do lote analisado, dada a heterogeneidade de contaminação que é conhecida em rolhas naturais. Além disso, à velocidade que o mercado exige respostas, é um método muito demorado, e que inclui muitos procedimentos.

A grande vantagem deste método em relação à análise sensorial atrás descrita tem a ver com a quantificação do real valor de TCA que está presente na amostra.

O laboratório de I&D da Amorim & Irmãos, S. A. dispõe de onze cromatógrafos que fazem este controlo de qualidade durante 24 horas por dia, sete dias por semana, uma vez que recebe macerações de todas as unidades industriais numa cadência diária de cerca de 900 amostras.

2.1.5 NDtech

O NDtech veio responder às exigências do mercado, sobretudo para suprir os requisitos dos produtores de vinho de maior qualidade. Trata-se de um equipamento que analisa individualmente as rolhas de cortiça, desenvolvido através de uma parceria entre a Amorim & Irmãos, S. A. e uma empresa especializada com sede em ILy, no Reino Unido.

O equipamento alimenta automaticamente as rolhas a um sistema de incubação onde é promovida a volatilização do TCA. Posteriormente, a amostra é encaminhada pelo gás de arraste para um forno cromatográfico onde se dá a separação dos compostos. A deteção é por captura de eletrões - detetor ECD, já que é o tipo de deteção ideal para compostos com elementos eletronegativos, como é o caso do TCA. Obtém-se um cromatograma onde é possível identificar o pico do composto, caso esteja presente, sendo que os valores resultantes de cada análise são obtidos por integração desse pico, em mV·s.

O NDtech apresenta um tempo de ciclo de análise individual de 20 segundos. Esta tecnologia de análise consegue detetar qualquer rolha que contenha mais de 0,5 ng/L de TCA, como resultado, todas as rolhas processadas com recurso à tecnologia NDtech têm garantia de TCA não detetável (Corticeira Amorim-c), 2016). As rolhas depois de analisadas são automaticamente separadas por três grupos, de acordo com a área do pico obtida. Assim, um pico até 6 mV·s representa uma rolha grupo 1 (G1) - livre de TCA/TCA não detetável, isto é, abaixo de 0,5 ng/L, entre 6 e 12 mV·s trata-se de uma rolha grupo 2 (G2), que pode ou não estar contaminada. Acima de 12 mV·s são rolhas grupo 3 (G3), correspondentes ao grupo rejeitado, por possuírem concentrações de TCA mais elevadas (Comunicação pessoal, Carlos Costa).

Apresentar uma tecnologia como o NDtech, que analisa de forma expedita e individualmente milhares de rolhas, que as separa automaticamente e que é uma garantia de rolhas livres de TCA veio revolucionar o mercado.

Desta forma, utilizar o NDtech como ferramenta de controlo de qualidade permitirá, não só melhorar as tomadas de decisão, no que ao tempo diz respeito, como também ultrapassar algumas das limitações do método por maceração, como por exemplo, efetuar uma análise individual muito mais representativa dos lotes, em termos de amostragem.

3 Descrição Técnica

Durante o projeto foram analisados 25 lotes de rolhas de compra por maceração composta (com posterior análise por SPME-GC-ECD), e no NDtech. Foram ainda analisados no NDtech quatro lotes extra, nomeadamente 200 rolhas por lote, das quais as rolhas do G2 e do G3 foram seguidamente maceradas individualmente e analisadas por SPME-GC-ECD.

3.1 Definição da dimensão da amostra a analisar

3.1.1 Dimensão da amostra para análise por SPME - GC - ECD

Para a realização do controlo de qualidade por maceração composta é seguido um esquema de amostragem previamente definido, o qual difere consoante o tipo de produto, a dimensão do lote e o cliente a quem se destina o produto final, usando assim amostragens maiores ou menores e regras de aceitação e rejeição mais ou menos exigentes. De um modo geral, no momento da amostragem retiram-se n macerações (uma maceração corresponde a uma amostra de 10 rolhas), onde o valor n , sempre maior ou igual a 2, depende da dimensão do lote (número de rolhas), tal como se evidencia na Tabela 4, do tipo de produto a inspecionar e do controlo mais ou menos apertado que se pretende efetuar (Figueiredo *et al.*, 2014).

Tabela 4 - Dimensão da amostragem em lotes de rolhas (maceração composta).

Nº de rolhas ($\times 10^3$)	Nº de amostras (macerações)
≤ 1	2
$> 1 \text{ a } \leq 50$	5
$> 50 \text{ a } \leq 250$	10
$> 250 \text{ a } \leq 750$	15
> 750	20

3.1.2 Definição da dimensão da amostra para análise no NDtech

Durante a Segunda Guerra Mundial foram desenvolvidos procedimentos padrão de amostragem para inspeção por atributos. Atualmente, a *Military Standard 105E* (MIL STD 105E) é o sistema de aceitação e amostragem mais utilizado para atributos no mundo. Existe também um derivativo padrão civil, desenvolvido pelo *American National Standards Institute* (ANSI) e pela *American Society for Quality Control* (ASQC), designado por ANSI/ASQC Z1.4, que é bastante

semelhante ao padrão militar. Esta norma foi ainda adotada pela Organização Internacional de Normalização como ISO 2859 (Montgomery, 2009).

O principal foco da MIL STD 105E é o nível de qualidade aceitável (AQL - *Acceptable Quality Level*). Quando o padrão é usado para a percentagem de planos com defeito (neste caso, rolhas contaminadas por TCA), os AQLs variam de 0,1 % a 10 %.

Por sua vez, a dimensão da amostra utilizada pela MIL STD 105E é determinada pela dimensão do lote e pela escolha do nível de inspeção, sendo fornecidos três níveis gerais de inspeção. O nível II é designado como normal, o nível I exige cerca de metade da quantidade de inspeção que o nível II e pode ser usado quando é necessário menor controlo. O nível III requer cerca de duas vezes mais inspeção do que o nível II e deve ser usado quando é necessária uma maior fiscalização (Montgomery, 2009).

Com efeito, para um nível de AQL de inspeção especificado e um dado tamanho de lote, a MIL STD 105E fornece um plano de amostragem normal que deve ser utilizado.

Importa referir que, normalmente, os lotes na Amorim & Irmãos, S. A. não ultrapassam as 250 000 rolhas, pelo que, geralmente, pelo método de maceração composta são preparadas no máximo 10 amostras, em que uma amostra corresponde a um grupo de 10 rolhas, para posterior análise cromatográfica. Sabendo que, na pior das hipóteses, basta que uma das amostras esteja acima de 1,5 ng/L para que o lote seja rejeitado, pode considerar-se que o AQL da maceração composta é de 10 %. Assim, a fim de iniciar a análise, tendo por base a informação fornecida pela MIL STD 105E e o que é realizado atualmente por maceração composta, determinou-se arbitrariamente um valor de nível de qualidade aceitável de 4% para o NDtech, considerando um nível de inspeção normal, o que corresponde a uma amostra a analisar de 315 rolhas - hipótese inicial (Anexo 1).

3.2 Análise do TCA extraível pelo método SPME - GC - ECD

Depois de feita a amostragem correspondente ao lote a analisar, as respetivas rolhas são colocadas em grupos de 10 e maceradas, em solução etanólica 12 %, durante 24 horas. Findo este período, a amostra é preparada retirando 10 mL da solução de macerado para um tubo de cromatografia (*vial*) de 20 mL, contendo 3 g de cloreto de sódio (NaCl). O NaCl favorece a volatilização do TCA para o *headspace* do tubo. Adicionam-se ainda 100 µL de padrão interno, 2,3,6-tricloroanisol (2,3,6-TCA), com concentração de 20 ng/L, composto que serve de referência analítica e que entra no cálculo da concentração de 2,4,6-tricloroanisol (Anexo 2 - Amostras). A escolha do padrão interno obedece a certos requisitos tais como possuir características semelhantes ao composto que se pretende analisar, uma vez que serve de

referência, mas, por outro lado, ter características físico-químicas diferentes para que o tempo de retenção seja diferente. No caso do 2,3,6-TCA é a alteração da posição do grupo cloro que culmina na alteração do tempo de retenção relativamente ao TCA (Duarte, 2016).

Cada cromatógrafo tem espaço para analisar 96 amostras autonomamente. A amostra é pré-incubada durante 2 minutos, e posteriormente exposta a uma fibra (PDMS, 100 µm) utilizada por norma para adsorção de compostos voláteis. A fibra é exposta ao *headspace* do tubo da amostra durante 8 minutos, a 50 °C com agitação, 250 rpm. De seguida, os voláteis são desorvidos da fibra no injetor a 270 °C, durante 4 minutos, em modo *splitless*, fechando a válvula ao fim de 2 minutos (Figura 4). Em modo *split* o fluxo de gás de purga passa através do septo (que se encontra na parte superior do injetor, e tem como função isolar o sistema cromatográfico) e ocorre a abertura da válvula de escape. Em modo *splitless* verifica-se que a amostra vaporizada que vai ser analisada é totalmente enviada para a coluna cromatográfica, uma vez que as válvulas de escape se encontram fechadas. Por fim, a análise cromatográfica propriamente dita demora 12 minutos (Anexo 2 - Equipamento e Análise cromatográfica).

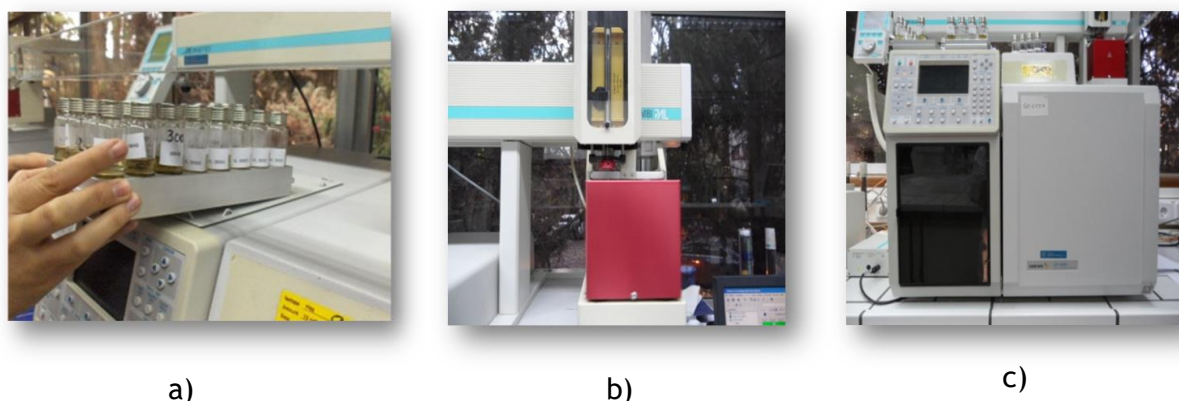


Figura 4 - Colocação das amostras no cromatógrafo (a), desorção da amostra no injetor (b) e análise por SPME-GC-ECD (c).

Após percorrer toda a coluna, o composto chega ao detetor e obtém-se o cromatograma, onde se encontram os picos correspondentes aos compostos presentes na amostra, que são identificados com base nos tempos de retenção próprios de cada componente. Recorrendo à respetiva integração dos picos do analito e do padrão interno é possível determinar a concentração de TCA na amostra analisada.

De modo a garantir a qualidade das análises cromatográficas, são analisados, ao longo das sequências, padrões de controlo que permitem construir cartas de controlo que servem como medida da exatidão dos resultados cromatográficos (Duarte, 2016).

3.3 Análise individual das rolhas de cortiça pelo equipamento NDtech

O equipamento é constituído por um módulo de alimentação/extração, um módulo de incubação e um módulo de análise (Figura 5).



Figura 5 - Equipamento NDtech constituído pelo módulo de alimentação/extração (a), o módulo de incubação (b) e o módulo de análise (c).

O módulo de alimentação/extração contempla um auto analisador que tem funções de alimentação e extração das rolhas. Os respetivos movimentos e posições estão coordenados com a abertura/fecho das câmaras de incubação e com a presença/ausência de rolha.

O módulo de incubação é constituído por um pré-incubador, que inclui um sistema rotativo com espaço para 16 rolhas, onde permanecem durante cerca de 3 minutos a 125 °C. Além disso, possui um sistema de 8 câmaras de incubação (Figura 6), colocadas em posição horizontal o que permite uma maior exposição da rolha ao gás de arraste - azoto, onde cada rolha é incubada durante 2 minutos a 140 °C de forma a volatilizar o TCA. Durante a introdução da rolha na câmara de incubação, o fluxo de azoto aumenta para evacuar o oxigénio lá existente, sendo que de seguida diminui de forma a concentrar a amostra. O sistema de controladores de fluxo de azoto (*Mass Flow Controllers*) permite variar o fluxo de azoto em cada câmara ao longo de todo o processo. As câmaras de incubação são aquecidas eletricamente e a temperatura controlada por um controlador PID (Proporcional, Integral e Derivativo). Posteriormente, a amostra é encaminhada até a uma válvula de 8 vias, cuja função é a seleção de qual das câmaras será injetada a amostra no cromatógrafo através da *transfer-line*, enquanto as outras estão a ser purgadas.



Figura 6 - Câmaras de incubação do equipamento NDtech.

De seguida, a amostra chega ao forno cromatográfico (Figura 7), que está equipado com uma ventoinha para dispersar o calor, uma válvula diafragma, duas válvulas de rotação para seleccionar a coluna em análise (STF - *Trapping/flow - trough Selectors* e SC - *Common outlet Selectors*) e 8 colunas cromatográficas (tipo *Phenomex ZB-5HT*). A válvula de diafragma quando em posição *load* pressuriza o diafragma impedindo a amostra de passar, ficando esta retida e concentrada no *loop* cromatográfico. Alterando a posição para *inject* a válvula relaxa, permitindo a passagem da amostra para as colunas cromatográficas. A válvula STF controla a coluna na qual vai ser injetada a amostra, enquanto nas restantes é injetado azoto para a respetiva limpeza. A válvula SC é responsável pela passagem da amostra das colunas cromatográficas para o detetor ECD.



Figura 7 - Forno cromatográfico do equipamento NDtech.

O detetor mede a variação do sinal elétrico produzido pela variação da composição do gás de arraste. Esta variação é assinalada pelo aparecimento de um pico positivo no cromatograma obtido.

O sistema de aquisição de dados é constituído por um *software* “AmorimCleanCork Version 3.61”, que define o método de análise cromatográfico e controla o equipamento. Para proceder a otimizações, o *software* possui uma interface “Tunning and Direct Control”, que permite ajustar os valores dos diferentes parâmetros e controlar o equipamento automática e manualmente. Além disso, existe um *software* acoplado ao “AmorimCleanCork”, o “Ellution Chromatography Data” (Figura 8), que regista ao longo do tempo os picos obtidos de cada amostra nas diferentes colunas, e que faz a respetiva integração. As especificações sobre o método utilizado encontram-se no Anexo 3.

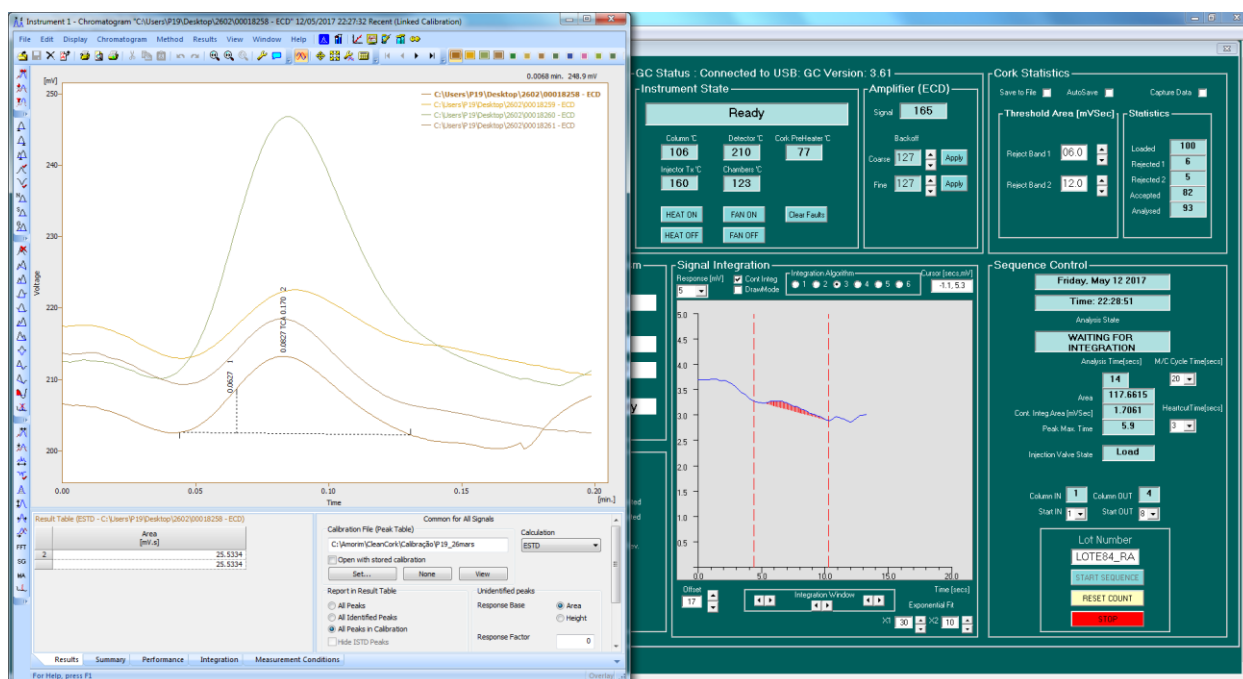


Figura 8 - Software “AmorimCleanCork” acoplado ao “Ellution Chromatography Data”.

3.4 Tratamento Estatístico

Depois de efetuado o controlo de qualidade dos lotes recolhidos pelos dois métodos procedeu-se ao respetivo tratamento estatístico dos resultados obtidos. Assim, para a análise dos dados recolhidos utilizou-se o *software* Microsoft Excel 2013. Os testes de hipóteses e a análise de correlações efetuaram-se recorrendo ao *software* estatístico XLSTAT Version 2017.

3.4.1 Tratamento estatístico referente à dimensão da amostra NDtech

Em primeiro lugar, por forma a estudar e confirmar a hipótese inicial, referente à dimensão da amostra a analisar no NDtech, foram realizados os seguintes testes estatísticos: o teste de Levene e Brown - Forsythe, o teste de Bartlett e o teste *t* das médias.

Para melhor compreender os resultados destes testes são então fundamentais os seguintes conceitos:

- Hipótese nula (H_0): é a hipótese que se assume como verdade para a construção do teste. Por outras palavras, é a teoria que se pretende testar.
- Hipótese alternativa (H_1): é o que se considera caso a hipótese nula não tenha evidência estatística que a defenda.
- Erro do tipo I: a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é efetivamente verdadeira.
- Erro do tipo II: a probabilidade de não rejeitar a hipótese nula quando ela é falsa.

O parâmetro, α , é o nível de significância, e representa a probabilidade de Erro Tipo I, ou seja, é a probabilidade de rejeitar uma hipótese verdadeira. Por sua vez, o valor de prova (valor-p) é o menor nível de significância com que se rejeitaria a hipótese nula. Em termos gerais, um p-valor pequeno significa que a probabilidade de obter um valor da estatística de teste como o observado é muito pequena, levando assim à rejeição da hipótese nula (Montgomery, 2009).

Assim, a interpretação dos testes de *Levene e Brown - Forsythe* e de *Bartlett* é a seguinte:

- Hipótese nula (H_0): as variâncias são idênticas.
- Hipótese alternativa (H_1): pelo menos uma das variâncias é diferente uma da outra.

Note-se que a variância é uma medida da dispersão dos resultados.

▪ Teste de *Levene e Brown - Forsythe*

Dada uma variável Y com amostra de tamanho N dividida em subgrupos k , onde N_i é o tamanho da amostra do i -ésimo subgrupo, a estatística do teste de *Levene e Brown - Forsythe* é definida como:

$$F = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k N_i (Z_i - Z_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_i)^2} \quad (1)$$

$$Z_{ij} = |Y_{ij} - Y_i| \quad (2)$$

Em que Y_i é a média ou a mediana do i -ésimo subgrupo, Z_i são as médias dos grupos de Z_{ij} e $Z_{..}$ é a média total de Z_{ij} . Z_{ij} são os desvios absolutos da variável Y_{ij} em relação à média (*Levene*) ou à mediana (*Brown - Forsythe*).

O teste rejeita a hipótese de que as variâncias são iguais se o valor de F observado for superior ao valor crítico de F , sendo que o valor crítico da distribuição F de *Snedecor-Fisher* é definido com base em $N-k$ e $k-1$ graus de liberdade (GL) e para um nível de significância α (Levene, 1960).

- Teste de Bartlett

Por outro lado, o teste de *Bartlett* rejeita a hipótese de que as variâncias são iguais se o valor da distribuição Qui-quadrado observado for superior ao valor de Qui-quadrado crítico. O valor crítico da distribuição Qui-quadrado é também definido com base em $k-1$ graus de liberdade e para um nível de significância α . A estatística de teste é a seguinte:

$$Q = \frac{(N - k) \ln s_p^2 - \sum_{i=1}^k (N_i - 1) \ln s_i^2}{1 + \left(\frac{1}{3(k-1)}\right) \left(\sum_{i=1}^k 1/(N_i - 1)\right) - 1/(N - k)} \quad (3)$$

Em que s_i^2 é a variância do i -ésimo subgrupo, N é o tamanho total da amostra, N_i é o tamanho da amostra do i -ésimo subgrupo, k é o número de subgrupos e s_p^2 é a variância agrupada. A variância agrupada é uma média ponderada das variâncias grupais e é definida como:

$$s_p^2 = \sum_{i=1}^k (N_i - 1) s_i^2 / (N - k) \quad (4)$$

- Teste t das médias

A interpretação deste teste é a seguinte:

- Hipótese nula (H_0): a diferença entre as médias é igual a zero.
- Hipótese alternativa (H_1): a diferença entre as médias é diferente de zero.

Caso o valor da distribuição *t-student* observado seja superior ao valor crítico de *t*, a hipótese nula deve ser rejeitada. A estatística do teste é a seguinte:

$$t = \frac{Y_1 - Y_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (5)$$

Por sua vez, o número de graus de liberdade (GL) é definido por (Montgomery, 2009):

$$GL = \frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1}\right)^2}{N_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{N_2 - 1}} - 2 \quad (6)$$

Em que Y_1 e Y_2 são os valores médios, s_1^2 e s_2^2 as variâncias amostrais e N_1 e N_2 os respetivos tamanhos das amostragens comparadas.

3.4.2 Tratamento estatístico referente à correlação entre os resultados obtidos por maceração composta e os obtidos no NDtech

Em segundo lugar, realizou-se um estudo estatístico no sentido de perceber a possível correlação existente entre os resultados obtidos por maceração composta e os obtidos no NDtech.

Correlação refere-se à relação estatística entre variáveis. Existem vários coeficientes e testes que medem o grau de correlação, adaptados à natureza dos dados. O coeficiente de *Pearson* mede o grau de associação linear entre duas variáveis, e pode ser interpretado como sendo a proporção da variação de uma variável y que é explicada pela variável x (e vice-versa).

Sendo que:

$$r = \frac{cov(x, y)}{s_x s_y} \quad (7)$$

Em que $cov(x, y)$ corresponde à covariância, s_x e s_y são os respetivos desvios padrão de x e y .

Assim, quando:

- $r = 1$ - significa uma associação linear perfeita positiva entre as duas variáveis.
- $r = -1$ - significa uma associação linear perfeita negativa entre as duas variáveis. Isto é, se uma aumenta, a outra diminui.
- $r = 0$ - significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. No entanto, pode existir uma dependência não linear. Assim, o resultado deve ser investigado por outros meios.

Por sua vez, o coeficiente de correlação ordinal de *Spearman*, r_s , é uma medida de associação que exige que ambas as variáveis se apresentem em escala de mensuração pelo menos ordinal, não requerendo a suposição que a relação entre as variáveis é linear (Câmara, 2001). Basicamente, o coeficiente de *Spearman* equivale ao coeficiente de correlação de *Pearson* aplicado às ordens das observações:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n d_i^2}{n^3 - n} \quad (8)$$

$$d_i = x_i - y_i \quad (9)$$

Em que n é o número de dados e d_i é a diferença entre os números de ordem de cada par de observações x_i e y_i .

O coeficiente de correlação ordinal de *Kendall*, τ , é também utilizado para avaliar o grau de associação entre variáveis, e é definido através de:

$$\tau = \frac{n_c - n_d}{\frac{1}{2}n(n-1)} \quad (10)$$

Onde, n_c é o número de pares concordantes, e n_d é o número de pares discordantes do conjunto de dados, n . Alternativamente, é a probabilidade de que dois pontos sorteados da distribuição conjunta sejam concordantes (Kendall, 1948).

4 Resultados e discussão

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos no NDtech referentes ao G2 e ao G3, isto é, aos grupos de estudo de maior interesse, uma vez que representam as rolhas potencialmente contaminadas. No total foram analisados 25 lotes no NDtech. Note-se que, apesar da hipótese inicial apontar para a análise de 315 rolhas por lote, analisaram-se na realidade 500 rolhas. De seguida, efetuaram-se as respetivas distribuições de frações de rolhas no G1, G2 e G3 em percentagem (R_{G1} , R_{G2} e R_{G3}) (Anexo 4).

Tabela 5 - Distribuição de rolhas de 25 lotes no G2 e no G3 realizada pelo equipamento NDtech.

Lotes	Classe	Dimensão do lote ($\times 10^3$)	Dimensão da amostra (nº de rolhas)									
			500		400		315		200		100	
			R_{G2} / %	R_{G3} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %
Nº84	Flor	55,7	4	1	5	1	5	1	7	2	9	2
Nº86	Extra	230	5	1	5	1	6	2	6	3	5	3
Nº87	Superior	140	6	2	7	1	8	1	7	0	4	0
Nº89	Flor	30	6	3	5	3	7	3	8	4	6	1
Nº90	Superior	200	18	7	20	6	23	7	25	6	29	9
Nº93	Superior	170	23	12	23	11	23	10	27	9	29	8
Nº117	Superior	90	25	9	25	8	27	8	29	7	32	5
Nº119	Superior	250	43	16	42	17	40	19	36	22	37	8
Nº121	Extra	200	8	4	5	4	4	4	5	5	2	3
Nº122	1º	200	26	9	26	9	27	10	27	11	30	11
Nº123	Flor/Extra	90	25	5	23	5	25	5	27	3	20	1
Nº104	Flor/Extra	40	14	6	12	2	13	3	13	4	17	5
Nº103	Superior	32	8	3	9	4	10	4	9	4	8	3
Nº124	Extra	250	28	11	28	11	30	13	28	15	25	13
Nº125	Superior	220	45	17	45	18	46	20	46	26	46	25
Nº126	1º	250	37	13	39	16	39	16	37	14	41	11
Nº127	1º	100	44	24	45	25	46	23	48	18	46	20
Nº128	2º	200	43	20	44	19	42	19	44	20	44	18
Nº130	Flor	100	16	5	15	3	14	4	16	4	17	4
Nº131	Extra	40	4	3	4	3	5	4	3	4	3	2
Nº132	Flor	210	7	3	6	1	7	1	7	1	5	1
Nº133	Extra	250	14	6	15	6	16	6	16	6	15	7
Nº136	Superior	250	12	7	13	6	11	5	13	5	10	5
Nº137	1º	250	44	26	44	20	44	19	42	17	35	17
Nº140	Extra	250	51	13	54	14	56	14	57	12	58	12

Depois de uma primeira análise à tabela-síntese de resultados relativa ao G2 e ao G3, o que se pode verificar é que não parecem existir diferenças percentuais significativas (em cada um dos grupos) após uma amostragem de 100, 200, 315, 400 ou 500 rolhas analisadas de cada lote. Além disso, esta perceção mantém-se independentemente da dimensão total do lote analisado.

Assim, por forma a confirmar estas observações procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados, através da realização de vários testes, abaixo descritos.

4.1 Testes estatísticos para avaliar o efeito da dimensão da amostra

4.1.1 Teste de *Levene e Brown - Forsythe* e de *Bartlett*

Com efeito, de modo a verificar que não existem diferenças estatísticas significativas entre os resultados referentes às diferentes dimensões de amostra, foram realizados os testes de *Levene e Brown - Forsythe* e de *Bartlett*, centralizados na média e na mediana dos resultados obtidos de fração de rolhas no G3 dos 25 lotes de rolhas analisados.

O teste de *Bartlett* supõe que as amostras sejam provenientes de populações com distribuições normais. Por sua vez, o teste de *Levene e Brown - Forsythe* é robusto à não normalidade, ou seja, é usado para a comparação de variâncias de grupos de observações provenientes de distribuições contínuas e não necessariamente normais (Levene, 1960).

Em relação ao teste de *Levene e Brown - Forsythe* (Tabela 6), como os valores observados da estatística do teste (F) são inferiores aos valores críticos e os respetivos resultados de p-valor são superiores ao nível de significância definido, $\alpha = 0,05$ (isto é, considerando um nível de confiança de 95 %) não se rejeita a hipótese nula, H_0 .

Tabela 6 - Resultados do teste de Levene e Brown - Forsythe.

<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>
<i>F (Valor observado)</i>	0,151	0,035
<i>F (Valor crítico)</i>	2,447	2,447
<i>GL</i>	4	4
<i>Valor-p (bilateral)</i>	0,962	0,998
<i>α</i>	0,05	0,05

Os resultados obtidos pelo teste de *Bartlett* (Tabela 7) comprovam a conclusão anterior, uma vez que, o valor observado da estatística do teste (Q) é inferior ao respetivo valor crítico.

Tabela 7 - Resultados do teste de Bartlett.

<i>Parâmetros</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>
<i>Qui-quadrado (Valor observado)</i>	0,139	0,139
<i>Qui-quadrado (Valor crítico)</i>	9,488	9,488
<i>GL</i>	4	4
<i>Valor-p (bilateral)</i>	0,998	0,998
<i>α</i>	0,05	0,05

Assim, não se encontraram efetivamente diferenças estatísticas entre as variâncias das diferentes amostragens (100, 200, 300, 400 ou 500 rolhas por lote), relativamente aos valores do G3, parecendo ser indiferente o uso de 100 a 500 rolhas.

4.1.2 Teste *t* das médias

De forma a corroborar a veracidade desta hipótese, isto é, que é indiferente analisar 100 a 500 rolhas, realizou-se também o teste *t* das médias, comparando as amostragens duas a duas. Na Tabela 8 é apresentada a comparação dos resultados, da média de fração de rolhas no G3 (dos 25 lotes), entre a amostragem de 500 rolhas e cada uma das restantes dimensões de amostra.

Tabela 8 - Resultados da aplicação do teste *t* das médias à amostragem de 500 rolhas em relação às outras dimensões de amostra.

		<i>Amostragem (nº de rolhas)</i>			
<i>Parâmetros</i>		100	200	315	400
<i>Amostragem 500 rolhas</i>	<i>Diferença</i>	0,012	0,003	0,002	0,003
	<i>t (Valor observado)</i>	1,772	0,398	0,484	0,870
	<i> t (Valor crítico)</i>	2,064	2,064	2,064	2,064
	<i>GL</i>	24	24	24	24
	<i>Valor-p (bilateral)</i>	0,089	0,694	0,633	0,393
	<i>α</i>	0,05	0,05	0,05	0,05

Verifica-se que os valores de *t* observados são inferiores aos respetivos valores críticos e, além disso, os *p*-valores são superiores ao nível de significância estabelecido, ou seja, não existem diferenças estatísticas significativas entre as diferentes amostragens.

No entanto, importa referir que, quando a amostragem é de 100 rolhas estes valores já se aproximam um pouco; se o nível de significância fosse de 0,1, observar-se-iam diferenças

significativas de uma amostragem de 100 rolhas relativamente às restantes (resultados não mostrados).

Pela análise gráfica (Figura 9) das médias de fração de rolhas no G1, G2 e G3 obtidas para cada amostragem, verifica-se, efetivamente, que apenas a amostragem de 100 rolhas se desvia muito ligeiramente das restantes no G3, que é, no entanto, por si só, um dos grupos de maior interesse neste estudo.

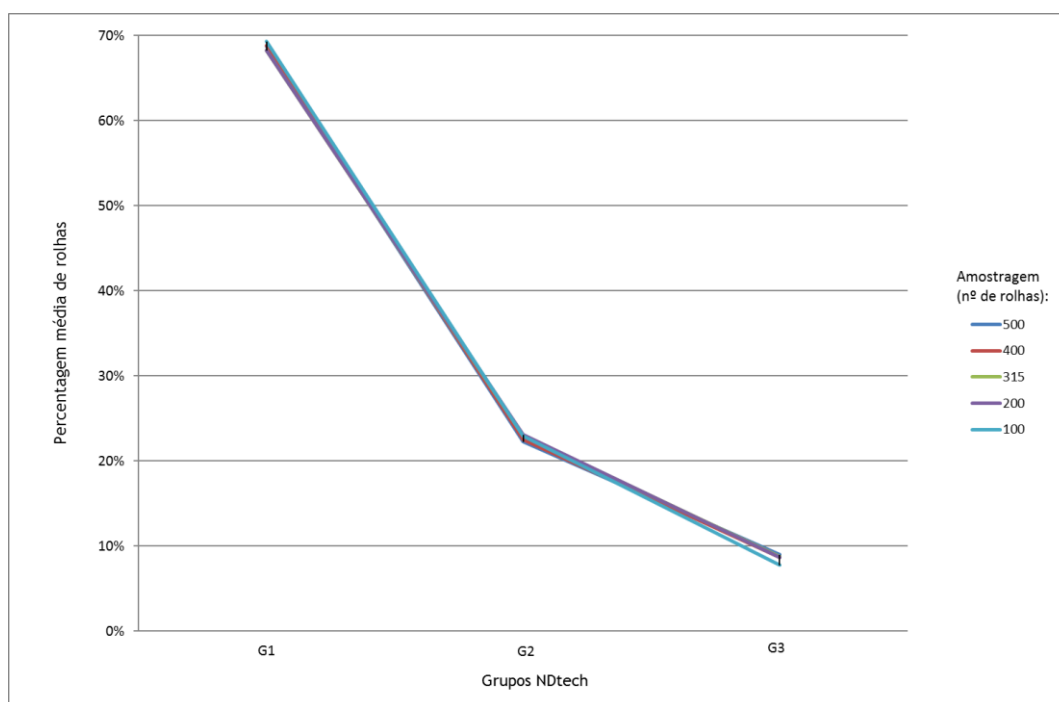


Figura 9 - Média dos valores de fração de rolhas no G1, G2 e G3 para cada nível de amostragem.

Pode, portanto, constatar-se que, embora não existam diferenças estatísticas entre as amostragens de 100 a 500 rolhas, uma amostragem de 200 a 300 rolhas será suficientemente robusta para avaliar a qualidade do lote, em termos de incidência de TCA. Com efeito, conclui-se que a hipótese inicial colocada, de analisar 315 rolhas por lote, é realmente válida. Por seu lado, não é em nada mais vantajoso aumentar a amostragem até 500 rolhas.

4.2 NDtech versus Maceração Composta

Uma vez concluída a veracidade da hipótese inicial, isto é, que é suficiente analisar 315 rolhas por lote, apresentam-se sistematizados na Tabela 9 os resultados obtidos no NDtech com base nesta amostragem, em comparação com os resultados alcançados pelo método de maceração composta. De forma a simplificar os resultados que se obtêm por maceração composta, procedeu-se à distribuição dos mesmos por três indicadores: percentagem de

macerações com valores de TCA acima de 0,5 ng/L (TCA > 0,5 ng/L), percentagem de macerações acima de 1 ng/L (TCA > 1 ng/L) e percentagem de macerações acima de 1,5 ng/L (TCA > 1,5 ng/L). Todos os resultados são disponibilizados no Anexo 4.

Através do controlo de qualidade por maceração composta foram aprovados 10 dos 25 lotes analisados. Os restantes foram rejeitados, na sua maioria com uma percentagem de macerações com TCA > 1,5 ng/L de 10 %.

Tabela 9 - Comparação de resultados de caracterização dos lotes, em termos de TCA, obtidos no NDtech e pelo controlo de qualidade por maceração composta.

Lotes	Classe	NDtech		Maceração Composta			Classificação*
		Amostragem 315 rolhas		Indicadores (%)			
		R _{G2} / %	R _{G3} / %	TCA > 0,5 ng/L	TCA > 1,0 ng/L	TCA > 1,5 ng/L	
Nº84	Flor	5	1	0	0	0	Aprov.
Nº89	Flor	6	3	0	0	0	Aprov.
Nº122	1º	8	10	30	0	0	Aprov.
Nº123	Flor/Extra	7	5	0	0	0	Aprov.
Nº126	1º	23	16	0	0	0	Aprov.
Nº127	1º	23	23	0	0	0	Aprov.
Nº130	Flor	27	4	0	0	0	Aprov.
Nº131	Extra	40	4	40	20	0	Aprov.
Nº137	1º	4	19	10	0	0	Aprov.
Nº140	Extra	56	14	20	10	0	Aprov.
Nº128	2º	27	19	50	40	40	Rej.
Nº104	Flor/Extra	25	3	20	20	20	Rej.
Nº103	Superior	13	4	80	40	20	Rej.
Nº86	Extra	10	2	30	30	20	Rej.
Nº87	Superior	30	1	20	10	10	Rej.
Nº90	Superior	46	7	20	10	10	Rej.
Nº93	Superior	39	10	20	10	10	Rej.
Nº117	Superior	46	8	20	10	10	Rej.
Nº119	Superior	42	19	10	10	10	Rej.
Nº121	Extra	14	4	20	20	10	Rej.
Nº124	Extra	5	13	40	20	10	Rej.
Nº125	Superior	7	20	30	30	10	Rej.
Nº132	Flor	16	1	20	10	10	Rej.
Nº133	Extra	11	6	10	10	10	Rej.
Nº136	Superior	44	5	20	20	10	Rej.

*Aprov. - Aprovado e Rej. - Rejeitado

4.2.1 Indicador de qualidade NDtech

De modo a verificar que fração das rolhas do G2 e G3 estão realmente contaminadas, procedeu-se a um estudo paralelo em apenas quatro lotes, em que se analisaram 200 rolhas por lote, sendo separadas e recolhidas as rolhas detetadas como G2 e G3, para posterior maceração individual e análise por SPME-GC-ECD. As rolhas do G1 foram consideradas 99,9 % com TCA não detetável (nd), uma vez que é esta a experiência da empresa, dado o histórico do NDtech. Assim, a incidência de TCA no G1 é totalmente residual e desprezável. Na Tabela 10 apresenta-se a distribuição real de incidência de TCA nos grupos estudados, obtida nos quatro lotes analisados para esse efeito.

Tabela 10 - Incidência de TCA avaliada por maceração individual de rolhas de G2 e G3 de 4 lotes analisados.

Lote	Classe	fração de rolhas no G3/%					fração de rolhas no G2/%					
		TCA (ng/L)	nd	0,5 a 1	1 a 5	5 a 15	> 15	nd	0,5 a 1	1 a 5	5 a 15	> 15
Nº146	1º		0	32	50	15	3	44	38	16	2	0
Nº143	Superior		14	28	29	29	0	9	24	62	0	5
Nº149	Extra		18	23	47	6	6	95	0	5	0	0
Nº151	Flor		-	-	-	-	-	22	11	67	0	0
Média			8	21	32	12	2	43	18	37	1	1

Como se esperaria, a incidência de TCA no G3 é mais elevada. No entanto, importa concluir que há efetivamente uma percentagem de contaminação que se verifica no G2, ainda que seja na gama de valores mais baixos de concentração de TCA. Por esse motivo, considerou-se importante proceder à obtenção de um indicador de qualidade, que contemplasse estes dados e que permitisse chegar a valores mais próximos da realidade.

Assim, o indicador considerado teve em conta uma ponderação entre os resultados do G2 e G3, sendo que foi atribuído um peso médio para o G2 de 8 % e para o G3 de 92 %, com base na razão dos resultados obtidos para concentrações de TCA superiores a 5 ng/L. Efetivamente, é nesta gama de valores que os resultados entre os dois grupos mais se distinguem, é também a gama de concentrações mais elevadas e por isso, de maior interesse. Além disso, considerou-se importante valorizar mais a contribuição do G3 para este indicador, uma vez que é o grupo com maior incidência de TCA.

O indicador de qualidade NDtech (I.Q.N) inclui ainda um fator corretivo, de forma a eliminar a contribuição de falsos positivos dos resultados obtidos, isto é, de rolhas classificadas pelo

equipamento como pertencendo ao G2 ou G3, mas que na verdade não estavam contaminadas. Este fator tem em conta a classe visual das rolhas, dado que em classes mais fracas a incidência de G2 e G3 é significativamente maior. Na Tabela 11 é apresentada a comparação entre as frações de rolhas no G1, G2 e G3, dos quatro lotes analisados, obtidas no NDtech e a respetiva percentagem de contaminação efetiva das rolhas desses lotes incluídas nos G2 e G3 determinada por maceração individual.

Tabela 11 - Contaminação efetiva das rolhas recolhidas do G2 e G3 avaliada por maceração individual, face ao obtido no NDtech.

Lote	Classe	NDtech			Maceração Individual (% de contaminação)		
		R _{G1} / %	R _{G2} / %	R _{G3} / %	G1*	G2	G3
Nº146	1º	49	31	20	na	56	100
Nº143	Superior	85	11	4	na	90	86
Média		67	21	12	na	73	93
Nº149	Extra	70	21	9	na	5	82
Nº151	Flor	95	5	0	na	78	0
Média		83	13	5	na	42	41

*na - não avaliado

Assim, foi considerado um fator de correção de 40 % (valor médio) para as classes Flor e Extra para os dois grupos, e para as classes Superior, 1º e 2º um fator de 70 % para o G2 e 90 % para o G3 (valores médios).

Ou seja, o indicador de qualidade NDtech corresponde a um resumos resultados obtidos referentes ao G2 e ao G3 e foi calculado da seguinte forma:

$$I.Q.N = fp_{G2} \times R_{G2} \times fc + fp_{G3} \times R_{G3} \times fc \quad (11)$$

Em que fp representa o fator de ponderação atribuído ao G2 (ou ao G3), fração de rolhas no G2 ou G3 (R_{G2} ou R_{G3}) representa o valor obtido no NDtech para cada lote, e fc é o fator corretivo aplicado conforme a classe da rolha.

Importa referir que seria essencial analisar um maior número de lotes nestas condições, de modo a obter resultados mais robustos. No entanto, não houve capacidade por parte do laboratório I&D para analisar mais amostras.

Com efeito, apresentam-se na Tabela 12 os valores obtidos para este indicador, em comparação com os resultados obtidos por maceração composta.

Tabela 12 - Valores de indicador de qualidade NDtech para 25 lotes de rolhas analisados.

Lotes	Classe	NDtech	Maceração Composta	
		Indicador de qualidade/ %	% TCA > 1,5 ng/L	Classificação*
Nº84	Flor	1	0	Aprov.
Nº86	Extra	1	20	Rej.
Nº87	Superior	1	10	Rej.
Nº89	Flor	1	0	Aprov.
Nº90	Superior	7	10	Rej.
Nº93	Superior	9	10	Rej.
Nº117	Superior	8	10	Rej.
Nº119	Superior	18	10	Rej.
Nº121	Extra	1	10	Rej.
Nº122	1º	10	0	Aprov.
Nº123	Flor/Extra	3	0	Aprov.
Nº104	Flor/Extra	1	20	Rej.
Nº103	Superior	4	20	Rej.
Nº124	Extra	6	10	Rej.
Nº125	Superior	19	10	Rej.
Nº126	1º	16	0	Aprov.
Nº127	1º	21	0	Aprov.
Nº128	2º	18	40	Rej.
Nº130	Flor	2	0	Aprov.
Nº131	Extra	1	0	Aprov.
Nº132	Flor	1	10	Rej.
Nº133	Extra	3	10	Rej.
Nº136	Superior	5	10	Rej.
Nº137	1º	19	0	Aprov.
Nº140	Extra	7	0	Aprov.

*Aprov. - Aprovado e Rej.- Rejeitado

4.2.2 Correlação dos resultados obtidos pelo NDtech e por maceração composta

De modo a verificar a existência de correlação entre os dois métodos de controlo de qualidade, definiram-se diferentes possíveis variáveis NDtech como pontos de comparação (com os indicadores de maceração composta), utilizando os resultados de dimensão de amostra determinada - 315 rolhas. Assim, além das variáveis fração de rolhas no G1, G2 e G3 e do indicador de qualidade NDtech anteriormente criado (secção 4.2.1), definiram-se, arbitrariamente, como possíveis variáveis a relação entre fração de rolhas no G2 e rolhas no G3 (R_{G2}/R_{G3}) e o contrário (R_{G3}/R_{G2}), e além disso, o inverso da fração de rolhas no G3 ($1/R_{G3}$)

e o inverso do quadrado da fração de rolhas no G3 ($1/R_{G3}^2$) (Tabela 13). Os resultados mostram que é absolutamente evidente a não correlação entre os dois métodos comparados (Anexo 4).

Tabela 13 - Correlação entre os resultados dos dois métodos (coeficientes de determinação).

Testes	Variáveis	Coeficientes de determinação							
		R_{G1}	R_{G2}	R_{G3}	Indicador qualidade NDtech	R_{G2}/R_{G3}	R_{G3}/R_{G2}	$1/R_{G3}$	$1/R_{G3}^2$
Kendall	TCA > 0,5 ng/L	0,000	0,003	0,001	0,000	0,019	0,019	0,001	0,001
	TCA > 1,0 ng/L	0,014	0,020	0,004	0,007	0,028	0,028	0,004	0,004
	TCA > 1,5 ng/L	0,008	0,005	0,007	0,005	0,004	0,004	0,007	0,007
Spearman	TCA > 0,5 ng/L	0,002	0,005	0,000	0,001	0,029	0,029	0,000	0,000
	TCA > 1,0 ng/L	0,019	0,027	0,004	0,005	0,056	0,056	0,004	0,004
	TCA > 1,5 ng/L	0,012	0,006	0,010	0,006	0,006	0,006	0,010	0,010
Pearson	TCA > 0,5 ng/L	0,005	0,008	0,001	0,001	0,023	0,034	0,005	0,006
	TCA > 1,0 ng/L	0,003	0,007	0,000	0,000	0,037	0,059	0,004	0,010
	TCA > 1,5 ng/L	0,001	0,001	0,002	0,003	0,000	0,002	0,000	0,000

A título de exemplo apresenta-se na Figura 10 a correlação de *Kendall* obtida entre a percentagem de G3, de cada um dos lotes analisados, e o indicador da maceração composta percentagem de TCA > 1,5 ng/L.

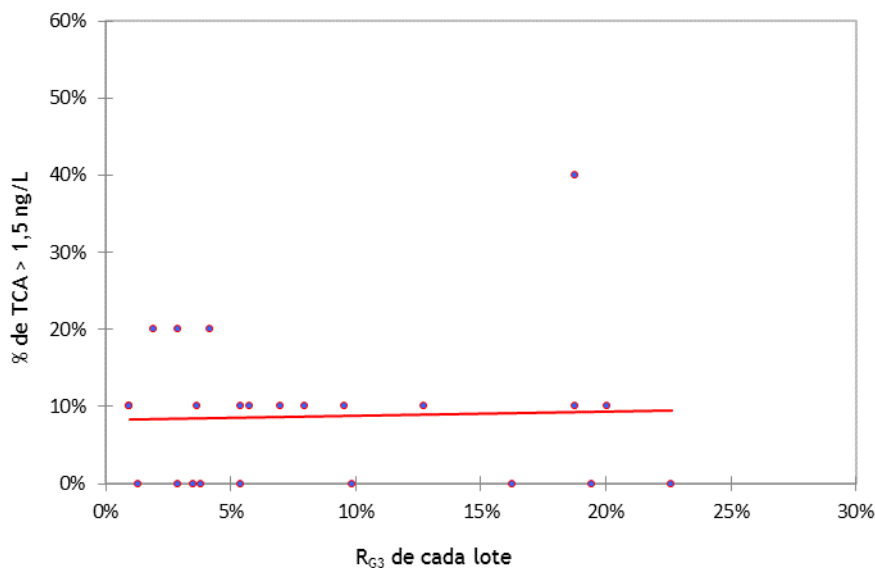


Figura 10 - Correlação de Kendall entre a fração de rolhas no G3 de cada lote (NDtech) e a percentagem de TCA > 1,5 ng/L (maceração composta).

4.3 Desenvolvimento de um critério aceitação/rejeição para a análise NDtech

Uma vez que, como mencionado na secção 4.2.2, não se observou qualquer correlação entre o método de maceração composta de 10 rolhas e a análise individual do NDtech, teve de ser criado um novo critério de aceitação/rejeição de lotes com base apenas nos resultados obtidos pelo NDtech.

Assim, foi efetuado o estudo da influência da classe visual da rolha nas frações de rolhas no G2 e G3, tendo-se verificado que estas são concordantes com a escala de valorização da rolha (Tabela 14). Ou seja, lotes de pior qualidade (Superior, 1º e 2º) apresentam frações de rolhas no G2 e G3 consideravelmente superiores às encontradas em lotes de melhor qualidade (Flor, Extra).

Tabela 14 - Influência da classe da rolha na fração de rolhas no G2 e G3 (amostragem 315 rolhas).

Classe	NDtech			Indicador qualidade / %
	R_{G1} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %	
Flor	90	8	2	1
Flor/Extra	77	19	4	2
Extra	74	19	7	3
Superior	67	24	9	9

1º	44	39	17	16
2º	39	42	19	18

Assim, o critério NDtech deve ser devidamente ajustado à qualidade do lote analisado, e por consequência, mais restritivo para classes de melhor qualidade e mais alargado para classes mais fracas. Na Tabela 15 são apresentados três possíveis critérios de aceitação/rejeição dos lotes pelo NDtech, desenvolvidos com base na classe da rolha e na percentagem máxima admissível para o indicador de qualidade NDtech.

Tabela 15 - Critérios aceitação/rejeição NDtech de lotes de rolhas com base na classe analisada e na percentagem de indicador de qualidade.

	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3
Flor a Extra	1 %	2 %	2 %
Superior a 2º	5 %	5 %	10 %

Por consequência da aplicação destes critérios apresentam-se resumidos na Tabela 16 a aprovação/rejeição dos 25 lotes analisados no NDtech de acordo com cada um dos três possíveis cenários.

Tabela 16 - Cenários de aceitação/rejeição pelo NDtech.

Lotes	Classe	Maceração Composta*	Indicador de qualidade NDtech (%)	NDtech		
				Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3
Nº84	Flor	Aprov.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº86	Extra	Rej.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº87	Superior	Rej.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº89	Flor	Aprov.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº90	Superior	Rej.	7	Rej.	Rej.	Aprov.
Nº93	Superior	Rej.	9	Rej.	Rej.	Aprov.
Nº117	Superior	Rej.	8	Rej.	Rej.	Aprov.
Nº119	Superior	Rej.	18	Rej.	Rej.	Rej.
Nº121	Extra	Rej.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº122	1º	Aprov.	10	Rej.	Rej.	Aprov.
Nº123	Flor/Extra	Aprov.	3	Rej.	Rej.	Rej.
Nº104	Flor/Extra	Rej.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº103	Superior	Rej.	4	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº124	Extra	Rej.	6	Rej.	Rej.	Rej.
Nº125	Superior	Rej.	19	Rej.	Rej.	Rej.

Nº126	1º	Aprov.	16	Rej.	Rej.	Rej.
Nº127	1º	Aprov.	21	Rej.	Rej.	Rej.
Nº128	2º	Rej.	18	Rej.	Rej.	Rej.
Nº130	Flor	Aprov.	2	Rej.	Aprov.	Aprov.
Nº131	Extra	Aprov.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº132	Flor	Rej.	1	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº133	Extra	Rej.	3	Rej.	Rej.	Rej.
Nº136	Superior	Rej.	5	Aprov.	Aprov.	Aprov.
Nº137	1º	Aprov.	19	Rej.	Rej.	Rej.
Nº140	Extra	Aprov.	7	Rej.	Rej.	Rej.

*Aprov. - Aprovado e Rej. - Rejeitado

Desta forma, verifica-se que considerando o cenário 1 e 2 se chega a um índice de rejeição global no NDtech próximo do que se obteve por maceração composta (Tabela 17). Importa referir, no entanto que, a rejeição dos lotes de classes Flor e Extra é menor no NDtech, do que por maceração composta. Ao contrário, a rejeição dos lotes de classes Superior, 1º e 2º é maior no NDtech. Na realidade, verifica-se que no NDtech são mais rejeitados os lotes de classes que, *à priori*, já seriam de pior qualidade.

Por seu lado, o cenário 3 constitui uma hipótese mais alargada, de forma a rejeitar uma menor percentagem dos lotes de classes mais fracas.

Tabela 17 - Índices de rejeição dos 25 lotes analisados, obtidos com base na maceração composta e nos três cenários NDtech.

	Maceração Composta	NDtech		
		Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3
Índice de rejeição global (%)	56	60	56	40
Índice de rejeição Flor a Extra (%)	50	42	33	33
Índice de rejeição Superior a 2º (%)	69	77	77	46

Assim, nesta fase, é da responsabilidade da empresa considerar qual das opções cumpre melhor os seus requisitos de qualidade, e é mais viável e ajustada à realidade da indústria corticeira.

5 Conclusões

Em primeiro lugar, é importante realçar que o NDtech se mostrou uma ferramenta com elevado potencial para realizar o controlo de qualidade das rolhas de cortiça.

Numa primeira fase foi estudada qual seria a dimensão da amostra a analisar pelo NDtech, de forma a concluir com fiabilidade sobre as respetivas frações de rolhas no G1, G2 e G3 dos lotes analisados. A partir dos resultados de 25 lotes, concluiu-se que não existem diferenças estatísticas entre as amostragens de 100 a 500 rolhas a analisar por lote. No entanto, 100 rolhas não seriam suficientes, se estivessemos dispostos a incorrer num maior nível de risco (10 %). Portanto, verifica-se que a amostragem ideal será entre 200 a 300 rolhas por lote, já que analisar até 500 rolhas não se revela em nada mais vantajoso.

Numa segunda fase procedeu-se ao estudo da contaminação efetiva com TCA existente no G2 e G3, através da maceração individual das respetivas rolhas e da análise posterior por SPME-GC-ECD, em 4 lotes analisados especificamente para este efeito. Concluiu-se que, nem todas as rolhas recolhidas e classificadas pelo equipamento nestes dois grupos estavam verdadeiramente contaminadas (falsos positivos) e, além disso, que o G3 é efetivamente um grupo muito contaminado enquanto que o G2 apresenta alguma incidência de TCA, sobretudo nas gamas de concentração mais baixas (TCA < 5 ng/L). Assim, considerou-se importante criar um indicador de qualidade NDtech que contemplasse estas conclusões.

Por sua vez, efetuando a comparação entre os resultados obtidos no NDtech e os resultados obtidos por maceração composta verifica-se que não existe qualquer correlação entre estes mesmos resultados, o que seria de esperar, já que no NDtech se consegue alcançar um perfil muito mais descritivo dos lotes, uma vez que se trata de uma análise individual.

Por fim, procedeu-se à elaboração de um critério NDtech para a aceitação/rejeição dos lotes. Uma vez que se verificou uma grande influência da classe das rolhas nas respetivas percentagens de G2 e G3, considerou-se a existência de dois critérios: um para as classes Flor e Extra (classes de melhor qualidade) e outro para as classes Superior e abaixo disso (classes de pior qualidade). Nesse sentido, foram desenvolvidos três possíveis cenários, considerando diferentes percentagens máximas para o indicador de qualidade NDtech. Assim, o cenário 1 corresponde a uma percentagem máxima de indicador NDtech de 1 % para as classes Flor e Extra e 5 % para Superior, 1º e 2º, o cenário 2 de 2 % para Flor e Extra e 5 % para as restantes classes, e por fim, o cenário 3, constitui um cenário mais alargado que permite 2 % para as classes de melhor qualidade e 10 % para as classes de pior qualidade. Resta por fim à empresa decidir qual dos cenários é mais viável e ajustado às suas necessidades.

5.1 Objetivos Realizados

O principal objetivo do presente projeto era estudar o potencial do NDtech como ferramenta de controlo de qualidade. Efetivamente verificou-se que se pode realizar o controlo de qualidade com este equipamento, passando assim a efetuar um controlo mais expedito e não menos fiável do que o atualmente efetuado. Embora não tenham sido encontradas correlações entre os resultados obtidos pelo NDtech e os obtidos por maceração composta, procedeu-se ao desenvolvimento de um novo critério de aceitação/rejeição dos lotes, com base neste novo método, cumprindo-se assim o segundo maior objetivo do projeto.

5.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante o estágio, foi acompanhada a rotina diária de trabalho no laboratório de I&D da Amorim & Irmãos, S. A..

5.3 Limitações e Trabalho Futuro

O estudo realizado para a obtenção do indicador NDtech foi efetuado numa quantidade de lotes reduzida, pelo que as considerações tomadas necessitam de ser confirmadas com a análise de mais lotes. No entanto, não houve disponibilidade temporal, nem disponibilidade do laboratório I&D para realizar um estudo mais alargado.

De futuro, seria importante adaptar melhor o equipamento NDtech ao controlo de qualidade, sobretudo no que diz respeito ao *software*. A sugestão passa por tornar o equipamento mais autónomo, dando-lhe capacidade de terminar a análise automaticamente no final de cada lote analisado, e por introduzir os critérios de rejeição no algoritmo, dando-lhe capacidade de devolver a decisão de aceitar ou não o lote, sem que seja necessária uma posterior análise intensiva dos resultados. Seria interessante se o equipamento fosse capacitado para distinguir as rolhas mais contaminadas das restantes, de forma a penalizar especialmente a sua existência, pesando esse facto na decisão final. Além disso, seria importante melhorar o sistema de alimentação, de forma a não ser necessário um operador a alimentar os lotes ao equipamento.

Ainda dentro de perspetivas futuras, realizou-se um estudo de forma a perceber que quantidade de lotes se pretende controlar pelo NDtech e que número de equipamentos seria necessário para fazer frente a esse valor. Concluiu-se que o NDtech teria de controlar cerca de 28 lotes por dia (Tabela 18), de acordo com o número médio de lotes que as diferentes unidades industriais recebem e verificam nesse período.

Tabela 18 - Número de lotes a analisar por dia.

<i>Unidade Industrial</i>	<i>Lotes/dia</i>
<i>Portocork</i>	2,6
<i>VL</i>	5,2
<i>AMORIM & IRMÃOS, S. A.</i>	20
<i>Potencial NDtech/dia</i>	27,8

Assim, seriam necessários 4 a 5 equipamentos afetos a este controlo de qualidade. Estes valores têm em conta a capacidade de análise do equipamento NDtech, o número de horas de trabalho (consideraram-se 16 horas de trabalho por dia, isto é, 2 turnos de 8 horas) e uma amostragem de 300 rolhas por lote (Tabela 19).

Tabela 19 - Número de equipamentos NDtech afetos ao controlo de qualidade.

<i>Cadência NDtech</i>	150 rolhas/h
<i>Horas de trabalho</i>	16 h
<i>Horas de trabalho efetivo</i>	13 h
<i>Dimensão da amostra</i>	300 rolhas/lote
<i>Capacidade analítica de rolhas</i>	1950 rolhas/dia/NDtech
<i>Capacidade analítica de lotes</i>	6,5 lotes/dia/NDtech
<i>Número de rolhas necessárias analisar</i>	8340 rolhas/dia
<i>Número de equipamentos</i>	4,3

Referências

- APCOR-a). A Cortiça, [<http://www.apcor.pt/cortica/o-que-e/>]. Acedido em fevereiro de 2017.
- APCOR-b). Estatísticas, [<http://www.apcor.pt/media-center/estatisticas/>]. Acedido em fevereiro de 2017.
- APCOR-c). Rolhas Naturais, [<http://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/rolhas-naturais/>]. Acedido em fevereiro de 2017.
- Amon, J.M. e 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.
- Câmara, F.. *Estatística Não Paramétrica - Testes de Hipóteses e Medidas de Associação*. Universidade dos Açores, 2001.
- Capone, D.L., et al.. *Absorption of choroanisoles from wine by corks and by other materials. Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98, 1999.
- Capone, D. L., Skouroumounis, e Sefton, M.A.. *Permeation of 2,4,6-tricholoroanisole through cork closures in wine bottles. Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 196-199, 2002.
- C.E.Liège. *Código Internacional das Práticas Rolheiras. European Cork Federation*, Versão 6.0. 2011.
- Corticeira Amorim-a). Relatório de Sustentabilidade 2015, [http://www.sustentabilidade.amorim.com/xms/files/RELATORIOS/Relat_sust_2015_web_protect.pdf]. Acedido em maio de 2017.
- Corticeira Amorim-b). Manual Técnico de Rolhas 2011, [http://www.amorim.com/xms/files/Documentacao/Manual_Rolhas_PT.pdf]. Acedido em junho de 2017.
- Corticeira Amorim-c). NDtech, [<http://www.amorim.com/media/noticias/Corticeira-Amorim-lanca-rolhas-naturais-com-garantia-de-TCA-nao-detetavel/1512/>]. Acedido em junho de 2017.
- *Cork Quality Council*-a). Industry Statistics, [<https://www.corkqc.com/pages/industry-statistics>]. Acedido em fevereiro de 2017.
- *Cork Quality Council*-b). *Screening for TCA with Group Cork Soaks*. Janeiro de 2017.

- *Cork Supply-a). Innocork*, [<https://www.corksupply.pt/pt/compromisso-de-qualidade/innocork/>]. Acedido em junho de 2017.
- *Cork Supply-b). Serviço DS100*, [<https://www.corksupply.pt/pt/produtos/ds100/>]. Acedido em junho 2017.
- Coque, J.J.R., *et al.. Wine contamination by Haloanisoles*. Instituto de Biotecnologia de Liòn, 2006.
- CTCOR. Manual de Análise Sensorial 2015, [http://www.subervin.eu/uploads/pub/Manual-Analise-Sensorial_PT.pdf]. Acedido em junho de 2017.
- Duarte, J.. *Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria*. Tese de mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2016.
- Duncan, B.C., Gibson, R.L. e Obradovic, D.. 2,4,6 - *Trichloroanisole and Cork Production*. *Wine Ind. J.*, 12, 180-184, 1997.
- Figueiredo, O., Figueiredo, M. e Gomes, M.. *Delineamento de um plano de amostragem por variáveis para deteção do composto 2,4,6 - TCA em rolhas de cortiça*. Relatório técnico. Faculdade de Economia da Universidade do Porto, 2014.
- *Green Cork*. O Descortiçamento e a Cortiça, [<http://www.greencork.org/a-floresta-a-cortica-e-a-rolha/o-descortiçamento-e-a-cortica/>]. Acedido em março de 2017.
- Kendall, M.G.. *Rank Correlation Methods*, Charles Griffin & Company Limited, London, UK, 1948.
- Levene, H.. *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, I. Olkin *et al.* eds., *Stanford University Press*, 278-292, 1960.
- Montgomery, Douglas, C.. *Introduction to Statistical Quality Control, Sixth Edition*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 2009.
- Oeneo. Diamant®, [<http://oeneo.com/marque-diam/>]. Acedido em junho de 2017.
- Pollnitz, A.P., *et al.. 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.
- Sefton, M.A. e Simpson, R.F.. *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.

Anexo 1 MIL STD 105E

Sample Size Code Letter	Sample Size	Acceptable Quality Levels (normal inspection)																																					
		0.010	0.015	0.025	0.040	0.065	0.10	0.15	0.25	0.40	0.65	1.0	1.5	2.5	4.0	6.5	10	15	25	40	65	100	150	250	400	650	1000												
		Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re	Ac	Re										
A	2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↓	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31		
B	3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31	44	45
C	5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31	44	45
D	8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31	44	45
E	13	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	30	31	44	45
F	20	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
G	32	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
H	50	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
J	80	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
K	125	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
L	200	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
M	315	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
N	500	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
P	800	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
Q	1250	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0	1	↑	↓	1	2	2	3	3	4	5	6	7	8	10	11	14	15	21	22	↑	↑	↑	↑
R	2000	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

- ↓ = Use first sampling plan below arrow. If sample size equals, or exceeds, lot or batch size, do 100% inspection.
- ↑ = Use first sampling plan above arrow.
- Ac = Acceptance number.
- Re = Rejection number.

Figura A.1.1 - MIL STD 105E - Tabela de inspeção normal utilizada para formular a hipótese inicial de análise de 315 rolas por lote no NDtech, considerando um AQL de 4% (Montgomery, 2009).

Lot or Batch Size	Special Inspection Levels				General Inspection Levels		
	S-1	S-2	S-3	S-4	I	II	III
2 to 8	A	A	A	A	A	A	B
9 to 15	A	A	A	A	A	B	C
16 to 25	A	A	B	B	B	C	D
26 to 50	A	B	B	C	C	D	E
51 to 90	B	B	C	C	C	E	F
91 to 150	B	B	C	D	D	F	G
151 to 280	B	C	D	E	E	G	H
281 to 500	B	C	D	E	F	H	J
501 to 1200	C	C	E	F	G	J	K
1201 to 3200	C	D	E	G	H	K	L
3201 to 10000	C	D	F	G	J	L	M
10001 to 35000	C	D	F	H	K	M	N
35001 to 150000	D	E	G	J	L	N	P
150001 to 500000	D	E	G	J	M	P	Q
500001 and over	D	E	H	K	N	Q	R

Figura A.1.2 - MIL STD 105E - Letra de código referente ao tamanho da amostra, de acordo com o nível de inspeção considerado e o tamanho total do lote (Montgomery, 2009).

Anexo 2 Análise por SPME - GC - ECD/MS

2.1 Amostras

Material

- Tubos de cromatografia (*vial*) de 20 mL
- Cápsulas de 20 mm com septo de silicone de tampa magnética
- Macropipeta, *Socorex* de 10 mL
- Micropipeta, *Gilson* de 200 μ L
- Balão volumétrico 100 \pm 0,1 mL
- Balão volumétrico 2000 \pm 0,6 mL
- Proveta 250 \pm 1,0 mL

Reagentes

- Álcool etílico 96 % (V/V)
- Água desionizada

- É verificado o nível de líquido em cada tubo cromatográfico, observando a uniformidade entre tubos;
- Verifica-se a correspondência entre o número de amostra identificada pelas unidades industriais e o número identificativo da etiqueta com código de barras colada no respetivo tubo;
- As amostras preparam-se em séries de 35, correspondentes aos tabuleiros rececionados das unidades industriais;
- As amostras verificadas são colocadas em suportes que são distribuídos pelos diferentes cromatógrafos, respeitando as cotas diárias definidas:

Tabela A.2.1 - Cota diária das unidades industriais no Laboratório I&D.

<i>Unidades Industriais</i>	<i>Cotas diárias</i>
<i>Amorim & Irmãos, S. A.</i>	243
<i>Porto Cork</i>	61
<i>V & L</i>	80
<i>Manuel Pereira de Sousa</i>	105
<i>Champcork</i>	10
<i>Amorim Distribuição</i>	10
<i>Top Series</i>	33
<i>ACIT</i>	5
<i>SC + ACI</i>	4
<i>NDtech</i>	190

- No *software* de cada cromatógrafo são feitas listas/equipamento contendo o código das amostras lido através de um leitor de barras e respetivo método de análise a utilizar.

2.2 Equipamento

- *Autosampler CTC Analytcs Combi-PAL*: responsável pelo tratamento da amostra até ao cromatógrafo. Constituído por um suporte de 3 *trays* onde são colocados os tubos cromatográficos e um braço mecânico, responsável pelo transporte da amostra do *tray* para a incubadora, com uma fibra exposta ao *headspace* do tubo de modo a extrair os compostos voláteis.

- Cromatógrafos

GC-ECD:

- *Varian CP-3800*

- *Bruker 450-GC*

- *Bruker 436-GC*

GC-MS:

- *Shimadzu-QP2010 plus NCL*

2.3 Análise cromatográfica

As condições de funcionamento dos equipamentos de cromatografia são variáveis em função das situações encontradas. A título de exemplo são apresentados os parâmetros/condições de funcionamento mais frequentemente usados:

- i) Coluna apolar ZB-5 MS com uma fase estacionária de difenil-polidimetilsiloxano (5 % - 95 %, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm e espessura 0,25 µm);
- ii) Gás de arraste: hélio qualidade 2 com alta pureza, com fluxo de coluna de 1,0 a 1,6 mL/min;
- iii) Gás de limpeza: azoto qualidade 2 com alta pureza (para ECD), com fluxo de 25 mL/min;
- iv) Rampa de temperatura dos cromatógrafos:

Tabela A.2.2 - Rampa de temperatura dos cromatógrafos.

<i>Temperatura</i>	<i>Razão</i>	<i>Tempo</i>	<i>Tempo total</i>
°C	°C/min	min	min
90	0	0	0
265	15	0,33	12

- v) Preparação das soluções-mãe de TCA:

Tabela A.2.3 - Procedimento para preparação das soluções-mãe de TCA.

<i>Soluções</i>	<i>Procedimento</i>
<i>Solução 1</i>	Pesar 10 mg de TCA numa balança analítica e dissolver com etanol a 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL. Concentração obtida de 100 mg/L.
<i>Solução 2</i>	Pipetar 100 µL da solução 1 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL. Concentração obtida de 100 µg/L.
<i>Solução 3</i>	Pipetar 10 mL da solução 2 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL. Concentração obtida de 10 µg/L.
<i>Solução 4</i>	Pipetar 10 mL da solução 3 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL. Concentração obtida de 1 µg/L.
<i>Solução 5</i>	Pipetar 10 mL da solução 4 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL. Concentração obtida de 100 ng/L.

vi) Retas de calibração:

De modo a ajustar os equipamentos às gamas de trabalho (isto é, às gamas de concentração normalmente verificadas nas análises) são efetuadas as seguintes retas de calibração:

Tabela A.2.4 - Reta de calibração - Gama baixa de concentrações.

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

*a programar no software do cromatógrafo

Tabela A.2.5 - Reta de calibração - Gama alta de concentrações.

Concentração teórica do padrão (ng/L)	Solução etanólica a 12% (mL)	Volume da solução 4 de TCA (µL)	Volume da solução 3 de padrão interno (µL)	Concentração TCA (ng/L)*
5,5	10	55	100	5,470
7,5		75		7,444
9,5		95		9,411
11,5		115		11,369
13,5		135		13,320

*a programar no software do cromatógrafo

Anexo 3 Características da análise NDtech

1. Temperatura das colunas cromatográficas

A temperatura das colunas cromatográficas permite controlar o tempo de retenção e a geometria dos picos de TCA. O tipo de coluna utilizado é de baixa polaridade, possuindo o TCA afinidade com a respetiva fase estacionária. Quanto maior a temperatura, menor será esta afinidade, mais rápida será a sua passagem pela coluna, mais delicada será a separação de compostos.

A temperatura de 95 °C é aquela que apresenta áreas de picos maiores, sem comprometer a separação dos compostos.

- Tipo de coluna: *Phenomex ZB-5HT*
- Gama de Temperaturas: -60 °C a 430 °C
- Revestimento: Resina de poliamida

2. Temperatura do injetor

É necessário que a temperatura do injetor seja superior à temperatura das câmaras de incubação, para que não haja condensação da amostra enquanto esta percorre o injetor, e consequentemente, efeito de acumulação de TCA no sistema. A temperatura definida para o injetor foi de 160 °C.

3. Temperatura do detetor

Para evitar a condensação da amostra na entrada do detetor, a temperatura deste deve ser superior à temperatura das colunas. A faixa de temperatura ótima para o tipo de detetor utilizado é entre 180 e 250 °C. Definiu-se 210 °C, pois é a temperatura que apresenta melhor definição de área de pico.

4. Fluxo de gás de arraste nas colunas

O aumento deste parâmetro diminui o tempo de análise, pois permite a passagem mais rápida da amostra nas colunas. Existem diferenças físicas nas colunas (sobretudo comprimento), logo é necessária a definição do fluxo de azoto em cada coluna, de modo a criar homogeneidade na análise.

A gama de fluxos de azoto nas colunas varia entre 20 e 25 mL/min.

5. Fluxo de carrier gas

Para limpeza da coluna cromatográfica, é usado um fluxo de azoto, *carrier gas*. Os valores considerados ótimos para este fluxo são entre 20 e 25 mL/min.

6. Fluxo de gás make-up

Este parâmetro otimiza a geometria do pico, tornando-o mais estreito e alto para o mesmo valor de área, e permite uma melhor resolução entre os picos de oxigénio e TCA. O valor médio mais aceitável para este parâmetro é entre 5 e 10 mL/min.

7. Fluxo nas câmaras de incubação

A partir do momento em que a rolha entra na câmara de incubação o fluxo de azoto aumenta instantaneamente até cerca 100 mL/min, de forma a evacuar o ar lá existente, diminuindo de seguida, gradualmente, até valores que devem estar entre os 30 a 35 mL/min.

8. Sensibilidade

O parâmetro sensibilidade influencia a integração do pico. A sensibilidade é variável ao longo do tempo, e permite excluir da integração o ruído inerente à análise. Neste caso, foi variável entre 4 e 5.

9. Heartcut

O *heartcut* é um parâmetro que permite selecionar qual a porção da amostra que chega ao detetor. A amostra chega ao detetor depois de passar pelo sistema de válvulas STF e SC, que abrem simultaneamente. Aplicando-se o *heartcut*, a abertura das válvulas é dessincronizada, permitindo a purga da amostra antes de chegar ao detetor. Assim, o pico de TCA deixa de ser afetado pelo pico de oxigénio permitindo uma maior sensibilidade do equipamento para este composto. O valor definido de *heartcut* é de 3 segundos.

Anexo 4 Resultados

Tabela A.4.1 - Distribuição das frações de rolhas no G1, G2 e G3 das amostragens de 315 e 500 rolhas.

Lotes	Amostragem (nº de rolhas)					
	315			500		
	R_{G1} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %	R_{G1} / %	R_{G2} / %	R_{G3} / %
Nº84	94	5	1	95	4	1
Nº86	92	6	2	94	5	1
Nº87	91	8	1	92	6	2
Nº89	90	7	3	91	6	3
Nº90	70	23	7	75	18	7
Nº93	67	23	10	65	23	12
Nº117	65	27	8	66	25	9
Nº119	41	40	19	41	43	16
Nº121	92	4	4	88	8	4
Nº122	63	27	10	65	26	9
Nº123	69	25	5	69	25	5
Nº104	84	13	3	80	14	6
Nº103	86	10	4	88	8	3
Nº124	57	30	13	61	28	11
Nº125	34	46	20	39	45	17
Nº126	45	39	16	50	37	13
Nº127	31	46	23	32	44	24
Nº128	39	42	19	38	43	20
Nº130	82	14	4	79	16	5
Nº131	92	5	4	94	4	3
Nº132	92	7	1	90	7	3
Nº133	78	16	6	80	14	6
Nº136	83	11	5	81	12	7
Nº137	37	44	19	31	44	26
Nº140	30	56	14	36	51	13

Tabela A.4.2 - Resultados da maceração composta (TCA em ng/L) para cada lote.

Lotes	TCA (ng/L)									
	Nº da amostra									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº84	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº86	1,50	2,30	0,49	2,56	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº87	0,49	0,49	0,60	0,49	0,49	0,49	0,49	1,90	0,49	0,49
Nº89	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49					
Nº90	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,62	1,67	0,49	0,49	0,49
Nº93	0,49	0,49	0,49	5,60	0,49	0,49	0,90	0,49	0,49	0,49
Nº117	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,70	0,49	4,30
Nº119	0,49	0,49	0,49	5,60	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº121	2,30	0,49	1,20	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº122	0,60	0,54	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,97
Nº123	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº104	0,49	2,00	0,49	0,49	0,49					
Nº103	0,49	2,20	1,10	0,90	0,70					
Nº124	0,49	2,10	1,20	0,49	0,49	0,49	0,49	1,00	0,70	0,49
Nº125	5,60	0,49	0,49	0,49	0,49	1,40	0,49	0,49	0,49	1,30
Nº126	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº127	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº128	0,49	0,49	0,49	4,51	1,81	1,88	0,98	2,46	0,49	0,49
Nº130	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº131	0,62	0,49	0,49	1,48	0,49					
Nº132	0,49	1,70	0,49	0,49	0,49	0,60	0,49	0,49	0,49	0,49
Nº133	0,49	0,50	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	2,90	0,49	0,49
Nº136	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	1,66	0,49	0,49	0,49	1,26
Nº137	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,59	0,49	0,49	0,49
Nº140	1,40	0,70	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49

Tabela A.4.3 - Correlação entre os resultados dos dois métodos (p-valores).

Testes	Variáveis	Amostragem 315 rolhas				Indicador NDtech	G2/G3	G3/G2	1/G3	1/G3 ²
		G1	G2	G3						
Kendall	TCA > 0,5 ng/L	0,939	0,758	0,858	0,942	0,398	0,398	0,858	0,939	
	TCA > 1,0 ng/L	0,469	0,393	0,717	0,609	0,301	0,301	0,717	0,737	
	TCA > 1,5 ng/L	0,607	0,704	0,645	0,683	0,725	0,725	0,645	0,892	
Spearman	TCA > 0,5 ng/L	0,844	0,734	0,930	0,872	0,425	0,425	0,930	0,943	
	TCA > 1,0 ng/L	0,520	0,443	0,774	0,748	0,263	0,263	0,774	0,734	
	TCA > 1,5 ng/L	0,616	0,719	0,647	0,719	0,712	0,712	0,647	0,914	
Pearson	TCA > 0,5 ng/L	0,734	0,677	0,864	0,865	0,483	0,387	0,742	0,504	
	TCA > 1,0 ng/L	0,795	0,707	0,991	0,968	0,366	0,252	0,764	0,699	
	TCA > 1,5 ng/L	0,893	0,911	0,856	0,782	0,918	0,842	0,984	0,675	