

ANÁLISE DO POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DO 2,4,6-TRICLOROANISOL (TCA) EM ROLHAS PREVIAMENTE CLASSIFICADAS POR SISTEMAS DE MEDIÇÃO UNITÁRIA DE TCA

MARIANA RIBEIRO FONSECA MOREIRA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Análise do potencial de migração do 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) em rolhas previamente classificadas por sistemas de medição unitária de TCA

Dissertação de Mestrado

de

Mariana Ribeiro Fonseca Moreira

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Relvas II - Rolhas de Champanhe S.A.



Orientador na FEUP: Prof. Joana Peres

Coordenador na Relvas II - Rolhas de Champanhe, S.A.: Eng.º Emanuel Cabeça



julho de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, por parte da empresa Relvas II S.A., gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de realizar a minha dissertação nesta empresa. As minhas primeiras palavras têm que ser endereçadas ao Engenheiro Emanuel Cabeça, meu orientador, por todo o conhecimento que me transmitiu nos últimos meses, sem o qual não teria conseguido desenvolver este projeto, bem como toda a paciência e disponibilidade que sempre demonstrou.

À Professora Joana Peres, agradeço profundamente por todo o tempo disponibilizado durante a execução deste trabalho, bem como pelo apoio e orientação constante. Os conhecimentos que me transmitiu e os conselhos que me deu nos momentos mais difíceis foram fulcrais para a realização desta Dissertação.

Agradeço também à excelente equipa de laboratório com que trabalhei, Filipa Correia, Joana Ramos e Gonçalo Azevedo, por me terem recebido tão bem e por me terem apoiado em todos os momentos, principalmente os de maior inquietação. Obrigada pelo carinho enorme com que sempre me trataram, pela integração e, não menos importante, pela boa disposição que tantas vezes me acalmou. Um particular obrigada à Ana Falcão que, mesmo à distância, foi incansável e essencial para que obtivesse os resultados deste projeto. Aos operadores desta empresa, agradeço por estarem sempre prontos a ajudar-me em qualquer situação.

À minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, agradeço por serem sempre o meu pilar sem nunca me deixarem cair, não só durante o meu percurso académico mas em todas as etapas da minha vida e por acreditarem em mim de forma incondicional. A vocês devo tudo o que sou e tenho.

Aos amigos que conheci quando entrei na FEUP e que me acompanharam durante estes 5 anos, agradeço por todos os momentos que vivemos juntos. Nada faria sentido sem vocês, foram o melhor que a faculdade me deu. A ti, Francisco Barbosa, como prometido: obrigada.

Aos amigos que conheço desde que nasci, que me dão motivação constante para fazer mais e melhor. E, por último, aos amigos que ganhei ao longo da vida e que me preenchem o coração da maneira mais gratificante possível, agradeço por estarem sempre presentes.

A Prof. Joana Peres, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por: Financiamento Base - UIDB/00511/2020 da Unidade de Investigação - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE - financiada por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).

Resumo

A presente Dissertação, realizada em ambiente empresarial na Relvas II S.A., teve como principal objetivo o estudo da evolução da migração do composto 2,4,6-tricloroanisol (TCA) - contaminante da cortiça que pode provocar alterações organoléticas nos vinhos - para um vinho efervescente a partir de rolhas que foram previamente analisadas por dois sistemas de deteção unitária de TCA (HS-GC-MS e TOF-MS), uma vez que o comportamento a longo prazo destas rolhas não é, ainda, conhecido. Estes sistemas classificam as rolhas com base na sua concentração de TCA, caracterizando-as consoante a quantidade de TCA que têm tendência a libertar - TCA Libertável.

Para a realização do estudo referido desenvolveram-se planos experimentais que promovem contactos de longa duração entre rolhas classificadas pelos sistemas de deteção unitária e o vinho. Consideraram-se como fatores com potencial influência na evolução da migração a temperatura a que as rolhas estão sujeitas (5, 18 e 30°C), a gama de concentração a que pertencem e a duração de contacto das rolhas com o vinho. Este plano de experiências permitiu o desenvolvimento de um modelo matemático de ajuste que descreve a evolução da migração do TCA e permite prever em quanto tempo se poderá atingir uma determinada concentração de TCA num vinho. Concluiu-se que, à temperatura de 18°C, a avaliação feita pelas tecnologias de deteção unitária é fiável e que a evolução da cedência sugere uma estabilização após 15 dias de contacto entre as rolhas e o vinho para rolhas pertencentes às gamas de concentração mais baixas. Concluiu-se ainda que o controlo da temperatura à qual as garrafas vedadas com estas rolhas estarão sujeitas é de extrema importância para evitar potenciais contaminações do vinho.

Adicionalmente, realizou-se um estudo da totalidade de TCA presente nas rolhas - TCA total - que demonstrou não existir uma relação linear entre o mesmo e o TCA Libertável, quando considerados os mesmos fatores que os do estudo da evolução da migração.

Palavras Chave:

2,4,6-tricloroanisol; Evolução da migração de TCA; Sistemas de deteção unitária; TCA Libertável; TCA Total

Abstract

The present Dissertation, carried out in a business environment in Relvas II S.A., had as its main goal the study of the migration kinetics of the compound 2,4,6-trichloroanisole (TCA) - cork contaminant that can cause organoleptic changes in wines - to a fizzy wine from cork stoppers that were previously analyzed by two individual detection systems of TCA, since the long-term behavior of these cork stoppers is not yet known. These systems classify cork stoppers based on their TCA concentration, characterizing them according to the amount of TCA they tend to release - Releasable TCA.

To carry out the study, experimental plans were developed that promote long-term contacts between stoppers classified by the individual detection systems and the wine. As factors with potential influence on the migration kinetics, were considered the temperature to which the stoppers are subject (5, 18 and 30°C), the range of concentration they belong to and the duration of contact between the cork stoppers and the wine.

This plan of experiments allowed the development of a kinetic model that fits the data and describes the kinetics of the TCA migration, allowing the prediction of how long it takes for a given concentration of TCA in a wine to be reached. It was determined that, at a temperature of 18°C, the evaluation made by the individual detection technologies is reliable and that the yield kinetics suggests a stabilization after 15 days of contact between the cork stoppers and the wine for stoppers belonging to the lower concentration ranges. It was also determined that the temperature control of the bottles sealed with these stoppers is of extreme importance to avoid potential contaminations of the wine.

Additionally, it was conducted a study of the total amount of TCA present in the cork stoppers - Total TCA - which demonstrated that there is no linear relationship between it and the Releasable TCA, when the same factors of the kinetics migration study are considered.

Keywords:

2,4,6-trichloroanisole; Migration of TCA; Individual detection systems; Releasable TCA; Total TCA

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.

Mariana Ribeiro Fonseca Moreira

30 de julho 2021

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
1.2	Relvas II - Rolhas de Champanhe S.A.	2
1.3	A cortiça	3
1.3.1	Estrutura celular da cortiça	5
1.3.2	Propriedades químicas da cortiça	6
1.3.3	Processo de preparação da cortiça	7
1.4	Contributos do Trabalho	10
1.5	Organização da Tese	11
2	Contexto e Estado da Arte	12
2.1	Produção de Rolhas de Champanhe	12
2.2	O 2,4,6-Tricloroanisol.....	14
2.2.1	TCA Libertável e TCA Total.....	15
2.2.2	Métodos instrumentais de análise para deteção individual de TCA em rolhas de cortiça .	17
3	Materiais e Métodos	20
3.1	Caracterização das rolhas analisadas	20
3.2	Procedimento experimental para determinação do TCA Libertável inicial pelo método SPME-GC-MS	20
3.3	Procedimento experimental para a determinação do TCA Total presente nas rolhas de cortiça pelo método SPME-GC-MS	21
3.4	Ensaio de migração de TCA das rolhas para o vinho	23
3.4.1	Condições de realização dos ensaios de migração de TCA das rolhas para o vinho	23
3.4.2	Descrição dos Planos experimentais considerados	25
3.4.3	Modelo teórico para descrever a evolução da migração do TCA para o vinho	27
3.4.4	Tratamento Estatístico.....	28
4	Resultados e Discussão.....	29
4.1	Comparação dos métodos instrumentais de análise para cada temperatura	29

4.2	Ajuste de um modelo matemático para a migração do TCA da rolha para o vinho	31
4.3	Relação entre o TCA Libertável e o TCA Total	37
4.3.1	Determinação dos fatores que influenciam a evolução da migração do TCA das rolhas para o vinho	38
4.3.2	Determinação dos fatores que influenciam a quantidade total de TCA presente nas rolhas	42
5	Conclusões	46
6	Avaliação do trabalho realizado	48
6.1	Objetivos Realizados	48
6.2	Outros Trabalhos Realizados	48
6.3	Limitações e Trabalho Futuro	48
	Referências	49
Apêndice A	Equipamento cromatográfico e método utilizado para análise de TCA	51
Apêndice B	Valores iniciais de TCA Libertável	52
Apêndice C	Valores obtidos de TCA Total	57
Apêndice D	Temperaturas de armazenamento das macerações	59
Apêndice E	Valores obtidos de TCA Libertável para as diferentes gamas de concentração e temperaturas medidas ao longo do tempo	60
Apêndice F	Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo escolhido para cada gama de concentração e temperatura	62
Apêndice G	Valores obtidos de TCA Libertável e TCA Total para as diferentes gamas de concentração e temperaturas ao longo do tempo	63
Apêndice H	Gráficos de Resíduos de TCA Libertável e TCA Total	65

Lista de Figuras

Figura 1.1. Sobreiro (Brigada da Floresta, 2021).....	4
Figura 1.2. Células de cortiça observadas ao microscópio. a) Corte radial ou transversal; b) Corte tangencial (Pereira, 2014).	5
Figura 1.3. Representação esquemática das diferentes fases de crescimento da cortiça. A: Entrecasco após o descortiçamento; B: Início do crescimento celular e formação da raspa; C: Fase final do crescimento anual da cortiça (Pereira, 2014).	6
Figura 1.4. Processo de preparação da cortiça. a) Descortiçamento; b) Sobreiro após a retirada das pranchas de cortiça (AMORIM, 2021).....	7
Figura 1.5. Pilha de pranchas de cortiça na floresta (APCOR, 2021).....	8
Figura 1.6. Processo de cozedura da cortiça em tanques de aço inoxidável (Relvas II S.A., 2021).	9
Figura 1.7. Processo de preparação da cortiça: Rabaneação (APCOR, 2021).....	10
Figura 2.1. Produtos intermédios formados ao longo do processo de produção de rolhas de Champanhe. a) Corpo aglomerado; b) Corpo Topejado; c) Corpo aglomerado com discos; d) Rolha branca.	13
Figura 2.2. Rolha de Champanhe da Relvas II S.A.	13
Figura 2.3. Representação da estrutura química do 2,4,6- tricloroanisol (Fontana, 2012).....	14
Figura 3.1. Tubo de cromatografia de 20 mL, com 10 mL de amostra de solução de maceração e 3,5 g de NaCl.	21
Figura 3.2. Procedimento experimental para quantificação do TCA Total - Granulação. a) Pesagem da rolha na balança analítica; b) Triturador; c) Pesagem dos grânulos de cortiça na balança analítica. ..	22
Figura 3.3. Procedimento experimental para quantificação do TCA Total - Extração do TCA em Etanol. a) Matraz com 200 mL de Etanol Absoluto; b) Matraz com Etanol e grânulos de cortiça; c) Matrizes no agitador.	22
Figura 3.4. Representação gráfica da relação entre o tempo de maceração experimental e o tempo de prateleira teórico.....	23
Figura 3.5. Bandas indicadoras de pH utilizadas no estudo da dosagem de Glutamato para solução modelo.....	24
Figura 3.6. Frasco de maceração com respetiva identificação.	25
Figura 3.7. Medições de temperatura do frasco de controlo. a) No frigorífico; b) Na Estufa; c) Na cave.	25
Figura 4.1. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 18 °C.	30

Figura 4.2. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 5 °C.	31
Figura 4.3. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 30 °C.	31
Figura 4.4. Visualização gráfica da variação dos parâmetros com a Temperatura, para a gama de concentração [0,6-0,8]. A: θ_1 e B: θ_2	33
Figura 4.5. Visualização gráfica da variação dos parâmetros com a Temperatura, para a gama de concentração [1,0-1,2]. A: θ_1 e B: θ_2	33
Figura 4.6. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [0,6-0,8].	34
Figura 4.7. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [1,0-1,2].	34
Figura 4.8. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [1,4-2,0].	35
Figura 4.9. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama < 0,5.	35
Figura 4.10. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [0,5-1,0].	35
Figura 4.11. Gráfico de efeitos principais para o TCA Libertável.	39
Figura 4.12. Visualização gráfica da interação da Gama de Concentração e da Temperatura nos valores médios de TCA libertável.	40
Figura 4.13. Visualização gráfica da interação da Gama e da Duração nos valores médios de TCA libertável.	40
Figura 4.14. Visualização gráfica da variação dos valores médios de TCA Libertável ao longo do tempo para cada gama de concentração e temperatura.	41
Figura 4.15. Gráfico de efeitos principais para o TCA Total com médias ajustadas.	43
Figura 4.16. Visualização gráfica da fração de TCA Total que se liberta para o vinho em forma de TCA Libertável para rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8].	44
Figura 4.17. Visualização gráfica da fração de TCA Total que se liberta para o vinho em forma de TCA Libertável para rolhas pertencentes à gama [1,0-1,2].	45

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1.1- Composição química média da cortiça (APCOR, 2021).....</i>	<i>7</i>
<i>Tabela 2.1- Propriedades químicas do 2,4,6-tricloroanisol (Pubchem, 2021)</i>	<i>14</i>
<i>Tabela 3.1- Diferentes gamas de concentração de TCA por método instrumental de análise</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 3.2- Correspondência entre os tempos experimentais e teóricos</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 4.1- Fatores com potencial influência na evolução da migração do TCA e respectivos níveis...</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 4.2- Parâmetros do modelo escolhido para o ajuste dos valores obtidos e valores de S, para cada gama de concentração e temperatura.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 4.3- Equações do modelo global para cada gama de concentração.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 4.4- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 5 °C</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4.5- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 18 °C</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 4.6- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 30 °C</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 4.7- Caracterização das rolhas pertencentes às gamas [0,6-0,8] e [1,0-1,2]</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 4.8- Valor de prova para valores individuais e com interação entre os 3 fatores- TCA Libertável</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4.9- Valor de prova para valores individuais e com interação entre os 3 fatores- TCA Total..</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 4.10- Caracterização de rolhas utilizadas no Plano Destrutivo, pertencentes às gamas [0,6-0,8] e [1,0-1,2].....</i>	<i>44</i>

Notação e Glossário

A	Área de transferência	cm^2
c_f	Concentração final de TCA após diluição	ng/L
c_i	Concentração inicial de TCA na solução de maceração	ng/L
C_{TCA}	Concentração de TCA libertável no vinho	ng/L
k	Constante de Transferência de massa	$\text{dia}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$
S	Erro padrão estimado de ajuste	ng/L
V	Volume	cm^3
V_f	Volume final de vinho na solução de maceração	cm^3
V_i	Volume inicial de vinho na solução de maceração	cm^3

Letras gregas

β Parâmetro de modelo global

θ Parâmetro de modelo

Lista de siglas

A2D Rolhas aglomeradas com dois discos de cortiça

CRT Limite de Rejeição do Consumidor (*Consumer Rejection Threshold*)

CTCOR Centro Tecnológico da Cortiça

DT Limite de Deteção (*Detection Thresholds*)

d_5 - TCA 2,4,6-tricloroanisol deuterado

ECD Detetor de captura eletrónica (*Electron Capture Detector*)

GC Cromatografia em fase gasosa (*Gas Chromatography*)

HS Câmara de ar (*Headspace*)

MS Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*)

SIM *Selected ion monitoring*

SPME Micro-extração em fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction*)

PCA Pentacloroanisol

TBA 2,4,6-tribromoanisol

TCA 2,4,6-tricloroanisol

TCP 2,4,6-Triclorofenol

TeCA 2,3,4,6- tetracloroanisol

TOF *Time of Flight*

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

A rolha de cortiça apresenta características, como compressibilidade e elasticidade, que a tornam indispensável como material de embalagem, sendo usadas para a vedação de garrafas de vinho com as mais diversas dimensões e formatos, sendo por isso o produto mais utilizado para o efeito. A rolha de cortiça promove também uma harmoniosa evolução do vinho, uma vez que assegura uma transferência mínima de oxigénio que o auxilia a melhorar as suas características organoléticas ao longo do tempo, sendo este equilíbrio essencial para que o produto atinja a qualidade esperada.

A empresa Relvas II S.A. tem como principal atividade a produção de rolhas aglomeradas com dois discos de cortiça (A2D), para uso em garrafas de Champanhe e de outros vinhos espumantes.

O objetivo da dissertação é estudar a evolução da migração do composto 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) a partir de rolhas A2D que foram previamente analisadas por dois sistemas de deteção unitária de TCA (designados por sistemas de inspeção rolha-a-rolha). Nestes sistemas, as rolhas são submetidas a um processo de dessorção térmica - para a volatilização de compostos orgânicos voláteis - com temperaturas entre 80 e 120 °C, tendo como consequência a ocorrência de micro-deformações no corpo aglomerado, perda de estabilidade dimensional e o aumento do índice de absorção. Neste sentido, torna-se imperativo antecipar se durante o tempo de prateleira da bebida efervescente poderá existir um risco acrescido associado à migração de TCA, proveniente das camadas mais profundas da rolha aglomerada, potenciada pelo aumento de interações sólido-líquido resultantes do contacto entre a rolha e o vinho.

Ambos os sistemas de inspeção unitária (métodos instrumentais de análise adaptados a ensaios de alta rotina) têm por objetivo a classificação de rolhas com base na sua concentração de TCA, permitindo assim obter grupos de produtos com diferentes níveis de qualidade.

Com este trabalho, pretende-se estudar o comportamento das rolhas de cortiça A2D, previamente selecionadas em dois sistemas de deteção unitária de TCA, utilizando as condições de migração preconizadas na norma de análise sensorial ISO 13302:2003, simulando desta forma períodos de contacto entre 4 semanas e 4 meses. Com base na informação analítica recolhida neste estudo, foi definido como objetivo deste trabalho a estimativa do tempo a partir do qual a rolha poderá interferir com as propriedades organoléticas de um vinho efervescente através da potencial cedência de TCA residual remanescente nas camadas mais internas do corpo aglomerado da rolha de cortiça.

Tratando-se a rolha A2D de um produto compósito (uma vez que é formada por um corpo aglomerado e dois discos de cortiça), a pertinência deste trabalho prende-se com o facto do TCA remanescente nas camadas interiores da rolha poder vir a interferir com o vinho, após passagem das rolhas pelos sistemas de deteção unitária, através dos fenómenos de migração sólido-líquido facilitados pelas alterações das rolhas enunciadas anteriormente.

Pretende-se assim apresentar um modelo que permita estimar a quantidade de TCA libertada num vinho após um determinado período de tempo. O modelo matemático deverá ser uma função da concentração inicial de TCA presente na rolha e refletir as condições reais de utilização do produto ao longo do tempo.

1.2 Relvas II - Rolhas de Champanhe S.A.

A empresa Relvas S.A foi fundada por Américo Coelho Relvas, no ano de 1926. Quando a empresa iniciou a sua atividade, tinha como principal objetivo produzir rolhas de cortiça para vinhos e líquidos farmacêuticos. Mais tarde, nos anos 30, evoluiu para a produção de rolhas de Champanhe compostas unicamente por cortiça natural. Nos anos 60, iniciou-se a produção de discos de cortiça natural e, devido aos consequentes desperdícios dessa atividade, iniciou-se também a produção de materiais aglomerados, o que levou ao surgimento das primeiras rolhas constituídas por um corpo aglomerado e discos de cortiça natural.

Com a crescente evolução da empresa, a Relvas investiu, nos anos 80, numa nova unidade fabril em Mozelos, onde são atualmente produzidas as rolhas de Champanhe. Foi também criado um laboratório de controlo de qualidade e uma oficina industrial, com o intuito de desenvolver novos equipamentos para a sua área produtiva.

Uma nova unidade fabril surge nos anos 90, em Cortiçadas de Lavre, Alentejo. Este investimento teve como objetivo melhorar o controlo de qualidade das matérias-primas, assegurando uma maior verticalidade do processo produtivo desde a seleção da cortiça na floresta até ao fornecimento do produto acabado ao cliente final. Nesta unidade são, atualmente, selecionados e produzidos os granulados e discos de cortiça natural, sendo estes posteriormente enviados por transporte rodoviário para a unidade de Mozelos onde são fabricadas as rolhas aglomeradas.

Devido à elevada exigência dos mercados da Relvas II S.A., esta continua a investir na área produtiva para uma melhoria contínua da qualidade e desempenho dos produtos, tendo sido, em 2012, reconhecida e certificada nas áreas da Gestão Ambiental (norma ISO 14001), Gestão da Qualidade (norma ISO 9001) e Segurança Alimentar (norma ISO 22000). É, atualmente, certificada também segundo a SYSTECODE EXCELLENCE do Código Internacional das Práticas Rolheiras.

No que diz respeito à gama de produtos produzidos pela Relvas II S.A., esta engloba rolhas com diferentes calibres (diâmetro e comprimento) e que são adaptáveis a diferentes formatos de garrafa e ao tipo de vinho (maioritariamente vinho espumante). Destaca-se a rolha aglomerada com dois discos naturais e, em certos casos específicos, a rolha totalmente em cortiça natural, sendo de notar que o produto se diferencia pela qualidade visual dos discos, sendo que estes integram diferentes classes. As rolhas apresentam, habitualmente, maiores dimensões comparativamente com as rolhas usadas para vinhos tranquilos uma vez que têm que ser capazes de suportar as elevadas pressões a que estão sujeitas dentro das garrafas, entre 5 e 6 bar, devido à concentração de CO₂ dissolvido no vinho efervescente. As rolhas A2D apresentam valores de densidade aparente superiores aos valores da densidade de uma rolha de cortiça para vinhos tranquilos. Este atributo é uma variável importante na conservação de vinho efervescente em garrafa (Relvas II S.A., 2021).

1.3 A cortiça

A cortiça é um tecido vegetal totalmente natural, renovável e sustentável que é extraída do tronco do sobreiro (*Quercus suber* L.), ilustrado na Figura 1.1. Esta espécie de sobreiro tem um lento crescimento e floresce apenas em regiões específicas do Mediterrâneo ocidental, sendo uma árvore que requer uma combinação não muito comum de pouca quantidade de chuva, mas elevada humidade, bem como bastante luz solar (Silva et al., 2005).

A excelente adaptação do sobreiro ao clima mediterrânico deve-se ao facto das suas raízes serem profundas de forma a captarem água em profundidade e por terem folhas com cutícula que impedem o excesso de transpiração (têm poros que se fecham e reduzem as perdas de água durante o tempo seco), o que garante que não se perca tanta água pela superfície, e que se mantêm verdes durante todo o ano (o que lhes permite realizar a fotossíntese durante um tempo superior comparativamente com outras árvores). A casca espessa e esponjosa dos sobreiros protege-os dos incêndios.

Os sobreiros têm uma grande longevidade (em média 200 anos) e apresentam uma elevada capacidade de regeneração (o que é uma vantagem na medida em que durante o seu tempo de vida lhe fazem mais de 15 descortiçamentos por períodos de nove anos). A indústria corticeira é, no entanto, essencial para a manutenção do montado e para a preservação da fauna e da flora. Em Portugal existe legislação que protege os sobreiros e os montados, aplicando multas pesadas a quem não cumprir as regras rigorosas que estão estabelecidas para a sua manutenção. Portugal é o país que possui a maior área do mundo de montado de sobreiro, cerca de 736 mil hectares, o que representa 23 % do total da área florestal nacional e 34 % da área mundial de montado de sobreiro (APCOR, 2021).



Figura 1.1. Sobreiro (Brigada da Floresta, 2021).

O sobreiro é, desde dezembro de 2011, a Árvore Nacional de Portugal, tendo a decisão sido tomada na Assembleia da República após uma petição pública com 2291 assinaturas (Ambientes Geográficos, 2021).

A cortiça é, atualmente, a matéria-prima mais utilizada para a produção de vedantes. As suas características inigualáveis permitem que a rolha de cortiça preserve a qualidade do vinho ao longo do tempo, isolando-o das influências nocivas provenientes do exterior, uma vez que, por exemplo, apresenta uma excelente capacidade de adaptação ao formato do gargalo das garrafas de vidro, impedindo assim que o líquido que se encontra no seu interior verta e fique comprometido. As excecionais propriedades da cortiça garantem que as características individuais do “*bouquet*” dos vinhos se desenvolvam, sendo por isso o vedante ideal (Bicho, 2003).

Para além da indústria de produção de rolhas, que corresponde a 72% das exportações de cortiça em Portugal e cerca de 711 milhões de euros, há outros setores nos quais a cortiça marca presença. O setor da construção é um deles, onde a cortiça é utilizada em pavimentos e revestimentos, o que corresponde a 25 % das exportações, sendo a Alemanha o principal mercado de destino. Em Portugal, existem atualmente 685 empresas a laborar no setor da cortiça, gerando assim mais de 9 000 postos de trabalho a nível nacional. Com uma quota de exportações neste setor de 63% e cerca de 986 milhões de euros, Portugal é o líder mundial de produção de cortiça (APCOR, 2021).

1.3.1 Estrutura celular da cortiça

Em 1665, Robert Hook descreveu e desenhou o tecido da cortiça, tendo verificado a presença de pequenas cavidades que se encontram dispostas, de forma regular, em fiadas concêntricas e radiais. As células apresentam um contorno sensivelmente retangular em corte radial e transversal. Por outro lado, em corte tangencial, apresentam um contorno frequentemente hexagonal, como ilustrado na Figura 1.2 a) e b) (Bicho, 2003).

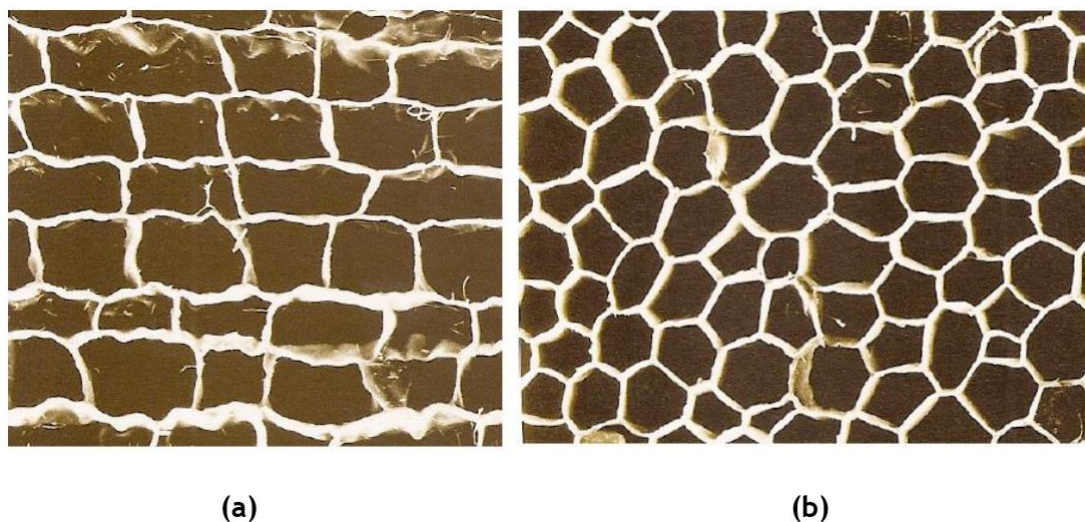


Figura 1.2. Células de cortiça observadas ao microscópio. a) Corte radial ou transversal; b) Corte tangencial (Pereira, 2014).

As células da parede celular da cortiça encontram-se dispostas em camadas sucessivas e existem cerca de 40 milhões de células por cm^3 , apresentando estas uma altura média entre 10-30 μm . As células são originadas pelo felogénio - tecido meristemático com capacidade de divisão celular. A atividade celular do felogénio faz variar a dimensão das camadas: nas estações Primavera/Verão, altura em que ocorre a atividade máxima do felogénio, as células originadas são mais numerosas, longas e finas; no Outono, quando a atividade do felogénio é significativamente menor, originam-se células com alongamentos bem menores e paredes mais espessas (Cordeiro, 1998)

O entrecasco do sobreiro, normalmente designado por “raspa” ou “costa”, constitui o revestimento externo da cortiça e é uma zona frequentemente mais dura com bastantes fendas, resultantes do crescimento celular. A zona mais interna da cortiça, por sua vez, denomina-se de “barriga” e corresponde à última camada de crescimento anual. Na Figura 1.3 encontram-se apresentadas as diferentes fases de crescimento da cortiça (Pereira, 2014).

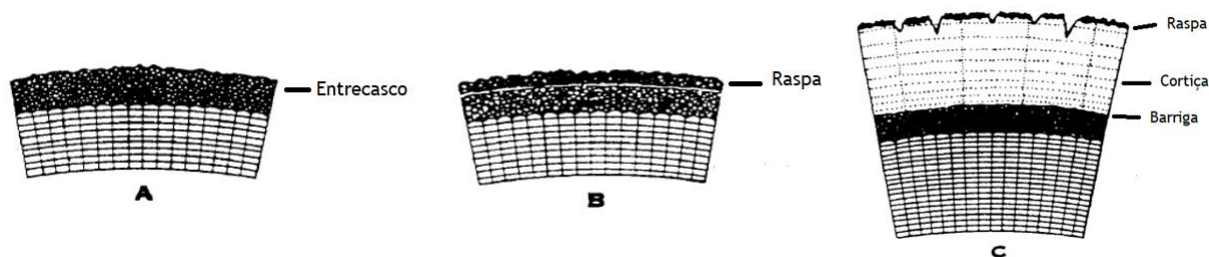


Figura 1.3. Representação esquemática das diferentes fases de crescimento da cortiça. A: Entrecasco após o descortiçamento; B: Início do crescimento celular e formação da raspa; C: Fase final do crescimento anual da cortiça (Pereira, 2014).

1.3.2 Propriedades químicas da cortiça

As propriedades características e tão apreciadas da cortiça devem-se, em grande parte, à sua constituição química que difere bastante da de outros tecidos vegetais. A composição química da cortiça tem vindo a ser estudada há vários séculos e apesar de não haver ainda uma total uniformidade, por parte dos vários investigadores, nos valores dos componentes identificados, sabe-se que a parede celular é constituída essencialmente por suberina e lenhina, como se pode verificar na Tabela 1.1. A origem geográfica da cortiça, o clima e condições de solo, as dimensões do sobreiro e a idade da cortiça são alguns fatores que influenciam a composição química da cortiça (Silva et al., 2005).

A suberina confere às células da cortiça a impermeabilidade a gases e a líquidos, pois é insolúvel em água e em álcool. A lenhina, por apresentar uma elevada massa molecular, possui funções de suporte para outros componentes da parede celular e contribui para a rigidez das células de cortiça. Embora numa quantidade bem inferior, a cortiça apresenta na sua constituição polissacarídeos (constituídos por celulose e hemicelulose), ceroides (que contribuem também para a impermeabilidade da cortiça), taninos e cinzas (APCOR, 2021).

Tabela 1.1- Composição química média da cortiça (APCOR, 2021)

<i>Composto</i>	<i>Composição (%)</i>
<i>Suberina</i>	45
<i>Lenhina</i>	27
<i>Polissacarídeos</i>	12
<i>Ceroides</i>	6
<i>Taninos</i>	6
<i>Cinzas</i>	4

Estas propriedades químicas conferem à cortiça baixa permeabilidade, resistência à humidade, à deformação e ao fogo, bem como uma baixa condutividade térmica. A cortiça é, então, um material leve, com baixa densidade, bastante elástico e flexível.

1.3.3 Processo de preparação da cortiça

A cortiça, enquanto matéria-prima, vê o seu ciclo de vida iniciar-se com a extração da casca aos sobreiros, processo designado por descortiçamento. Este processo é extremamente delicado e, por isso, realizado por experientes trabalhadores que, entre maio e agosto, fazem uma incisão vertical e em seguida horizontal no tronco do sobreiro, retirando assim com bastante cuidado e precisão a prancha de cortiça, como é possível verificar na Figura 1.4 (AMORIM, 2021).

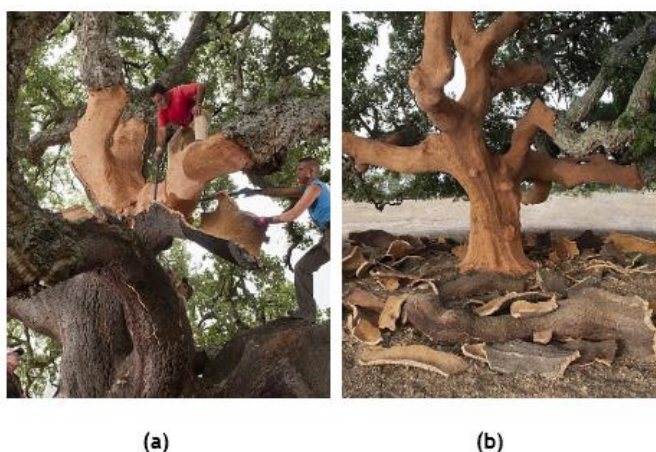


Figura 1.4. Processo de preparação da cortiça. a) Descortiçamento; b) Sobreiro após a retirada das pranchas de cortiça (AMORIM, 2021).

A primeira cortiça produzida pelo sobreiro é denominada de cortiça virgem e a sua extração realiza-se quando a árvore tem entre 20 e 25 anos e apenas quando apresenta as dimensões desejadas. Do primeiro descortiçamento, chamado de desbóia, obtém-se uma cortiça de

elevada dureza e com uma forma bastante irregular, não sendo adequada para o processo de fabrico de rolhas. Esta cortiça é triturada e utilizada na produção de aglomerados que posteriormente serão usados na produção de pavimentos e isolamentos. Nove anos mais tarde, realiza-se o segundo descortiçamento, que dá origem à cortiça “secundeira”, não tendo esta ainda características apropriadas para a fabricação de rolhas, pelo que é também utilizada na produção de granulados e aglomerados. No entanto, esta cortiça é já menos dura que a cortiça virgem e apresenta uma estrutura mais regular (APCOR, 2021).

Após a remoção desta cortiça, o sobreiro inicia a autorregeneração da sua casca, formando uma nova camada designada por cortiça amadia, que se obtém então a partir do terceiro descortiçamento. Esta cortiça apresenta uma textura bastante mais suave e uma camada uniforme com poucas fraturas, pelo que reúne as condições adequadas para a produção de rolhas com boa qualidade. Assim, a partir do terceiro descortiçamento e em períodos regulares de nove em nove anos, é possível extrair cortiça de qualidade dos sobreiros, durante cerca de 150 anos (AMORIM, 2021).

Após o descortiçamento, formam-se, ainda na floresta, pilhas com as pranchas de cortiça para que ocorra a sua estabilização e para que a matéria-prima continue com as condições adequadas até ser transportada para a fábrica. Este período de repouso tem a duração de cerca de 6 meses e é um processo de secagem natural, também designado por maturação, uma vez que garante a oxidação dos polifenóis da cortiça. O empilhamento deve ser realizado num local inclinado que permita a drenagem e é importante que a cortiça não fique em contacto direto com o solo. As pranchas, que apresentam uma curvatura devido à forma do tronco, são distribuídas em camadas horizontais e posicionadas com o ventre (parte interior) voltado para o solo, como ilustrado na Figura 1.5.

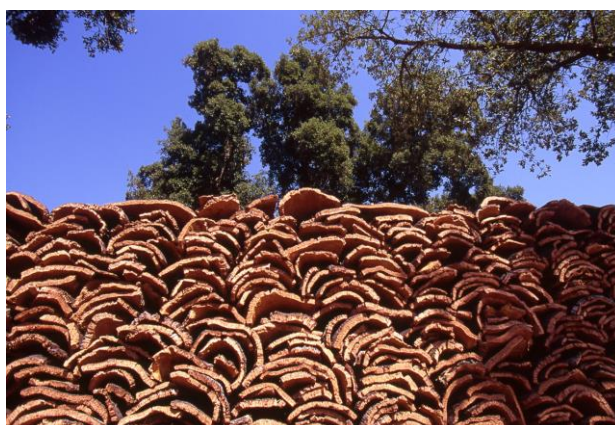


Figura 1.5. Pilha de pranchas de cortiça na floresta (APCOR, 2021).

Esta disposição das pranchas permite que ocorra circulação do ar e escoamento de água, sendo que a perda de água aliada ao peso que as camadas superiores exercem nas camadas inferiores,

leva a uma diminuição da altura das pilhas com o tempo e também a um aplanamento das pranchas.

Posteriormente a este período de estabilização, transportam-se as pranchas para a fábrica e efetua-se uma triagem da cortiça amadia por calibres e qualidades, realizando-se também o traçamento - processo realizado manualmente, por operários experientes, que consiste em cortar as pranchas em fragmentos de menores dimensões (Bicho, 2003).

De seguida, a cortiça passa por uma das fases mais importantes do seu tratamento - a cozedura. Esta operação, com a duração de pelo menos uma hora, consiste em mergulhar as pranchas de cortiça em água limpa (sem aditivos) a 100°C e tem como objetivo limpar a cortiça, extraíndo-lhe as substâncias hidrossolúveis (taninos e sais minerais). Este processo, exibido na Figura 1.6, devido à expansão celular que promove, altera as propriedades mecânicas do material - incrementa a espessura da cortiça, o que reduz a sua densidade e a torna mais elástica e macia (APCOR, 2021).



Figura 1.6. Processo de cozedura da cortiça em tanques de aço inoxidável (Relvas II S.A., 2021).

Concluída a etapa da cozedura, a cortiça fica em repouso durante um período de duas a quatro semanas, num local coberto e arejado. Este período de estabilização é essencial pois permite que se perca o excedente da água em que as pranchas foram imersas e que a cortiça adquira a consistência necessária para a sua transformação em rolhas ou discos de cortiça. Pode realizar-se uma segunda cozedura como complementação da anterior, tendo esta uma menor duração- cerca de trinta minutos- e que deve obedecer aos mesmos cuidados da primeira cozedura bem como a um novo período de repouso no final da mesma (Bicho, 2003).

Finalmente, após se apararem as arestas das pranchas, procede-se a uma avaliação manual inicial em que se consideram características como a espessura, a porosidade e a aparência da prancha. É feita assim uma separação das pranchas por classes de qualidade e, de seguida, estas são rabaneadas - cortadas - em tiras que apresentam uma largura um pouco superior à da rolha a produzir, como se verifica na Figura 1.7 (APCOR, 2021).

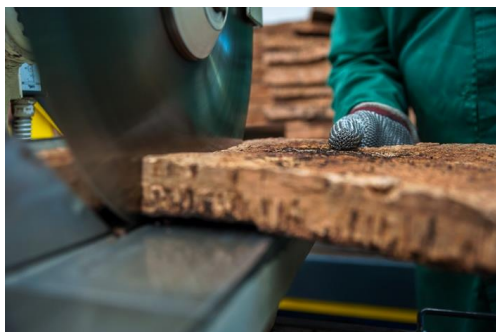


Figura 1.7. Processo de preparação da cortiça: Rabaneação (APCOR, 2021).

1.4 Contributos do Trabalho

Atualmente, a empresa Relvas II - Rolhas de Champanhe, S.A. suporta-se em dois laboratórios internos, distribuídos pelas duas fábricas, para que a qualidade do seu produto seja sempre assegurada e devido à exigência e rigor por parte dos seus clientes, torna-se indispensável adquirir conhecimentos relativos aos fatores que afetam a funcionalidade e qualidade do mesmo. Assim, neste projeto realizei um estudo aprofundado sobre a migração do composto 2,4,6 - Tricloroanisol (TCA) de rolhas previamente analisadas por sistemas de quantificação unitária de TCA - que sofreram um processo de dessorção térmica - para o vinho e avaliei a fiabilidade analítica e a robustez destes métodos instrumentais de análise. Tal mostra-se de extrema importância uma vez que os sistemas de deteção unitária de TCA são atualmente uma nova solução disponível para a indústria rolheira, não havendo ainda certezas relativamente aos impactos que estes apresentam nas rolhas e no seu posterior comportamento em condições de prateleira. A realização deste trabalho permitiu-me também implementar na empresa um procedimento de medição do TCA presente em rolhas que fiquem sujeitas a macerações de longa duração.

Este trabalho revela-se de elevada importância para a empresa Relvas II S.A., uma vez que condiciona a tomada de decisão da empresa relativamente a um eventual investimento nestes sistemas de controlo rolha-a-rolha.

1.5 Organização da Tese

Esta dissertação encontra-se estruturada segundo seis capítulos.

No capítulo 1, de modo a enquadrar o leitor no contexto do projeto desenvolvido, é feita uma breve introdução da empresa onde a tese foi realizada, os contributos da mesma, uma breve explicação sobre as principais características da cortiça bem como do seu processo de obtenção e tratamento.

No capítulo 2 são abordados todos os conceitos teóricos relativos ao TCA e a sua importância na indústria de produção de rolhas de cortiça, sendo explicada a influência que este composto apresenta nos vinhos. Este capítulo permite que o leitor obtenha o conhecimento básico necessário para a compreensão dos capítulos posteriores da dissertação.

No capítulo 3 são apresentados todos os ensaios e métodos utilizados em cada estudo para a obtenção dos resultados.

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos em cada estudo, bem como a sua respetiva discussão e análise.

No capítulo 5 são expostas as conclusões do trabalho realizado.

Por último, no capítulo 6 é realizada uma apreciação do projeto realizado e são apresentadas sugestões para trabalhos futuros.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Produção de Rolhas de Champanhe

As rolhas de Champanhe, também designadas por rolhas técnicas, são constituídas por um corpo aglomerado de cortiça e dois discos de cortiça natural colocados num dos topos. O seu processo de produção engloba uma diversidade de operações unitárias, sujeitas a um elevado controlo de qualidade.

A empresa Relvas II S.A. é constituída por duas unidades fabris, uma no Alentejo e outra em Mozelos. As matérias-primas essenciais para produzir as rolhas, sendo estas os granulados e os discos de cortiça natural, são produzidas na fábrica do Alentejo sendo, posteriormente, enviadas diariamente para a unidade de Mozelos onde se realiza o processo de produção das rolhas de Champanhe. Este processo envolve diversas etapas, desde a moldação até ao processo de tratamento de superfície.

Na unidade de Mozelos, a produção de rolhas de Champanhe inicia-se então com uma das operações unitárias mais importantes do processo de fabrico, a moldação. Este processo unitário consiste em aglutinar o granulado com uma cola de poliuretano. A mistura resultante obtida é, de seguida, transferida para duas moldadoras onde se forma o corpo aglomerado, primeiro produto intermédio do processo, ilustrado na Figura 2.1 a).

Posteriormente, os corpos aglomerados passam para a operação de topejamento onde sofrem alterações no seu aspeto visual- os topos são polidos de forma a eliminar os resíduos de cola nas duas extremidades do corpo cilíndrico. A Figura 2.1 b) ilustra o aspeto de um corpo topejado. Esta operação facilita as posteriores na medida em que garante uma boa colagem dos discos.

De seguida, os corpos topejados são enviados para o setor da colagem onde lhes são colados dois discos de cortiça natural - selecionados previamente através de uma análise de Raio X para descarte de defeitos grosseiros - num dos topos, obtendo-se assim o terceiro produto intermédio, exibido na Figura 2.1 c). O disco do topo, denominado de disco espelho, é de maior qualidade comparativamente com o disco intermédio, colado ao corpo aglomerado. A cola utilizada para o efeito é uma dispersão aquosa de poliuretano. As rolhas com os discos colados são armazenadas, durante cerca de 20h, dentro de uma estufa de forma a garantir a completa cura da cola de aglomeração - reticulação completa - e a evaporação da água residual existente na dispersão aquosa de poliuretano usada para a colagem dos discos.

A etapa que se segue é a retificação dimensional, onde é feito o ajuste das dimensões finais das rolhas para o calibre pretendido (especificado pelo cliente) bem como a correção da

superfície da rolha, obtendo-se assim o último produto intermédio do ciclo de produção, a denominada rolha branca, ilustrada na Figura 2.1 d). Após serem retificadas, as rolhas são automaticamente classificadas em diferentes qualidades através de equipamentos eletrónicos de visão artificial. Esta seleção em classes é obtida em função da quantidade e tamanho de poros existentes no disco de topo. No entanto, operadores experientes e qualificados, realizam também uma seleção manual de modo a descartar as rolhas que apresentam ainda defeitos visuais.

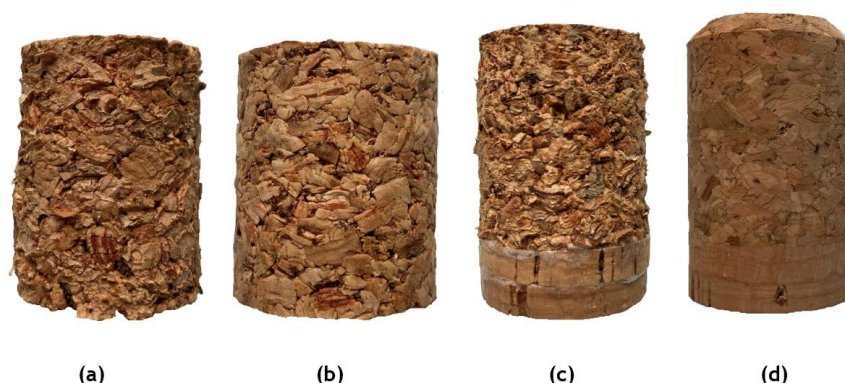


Figura 2.1. Produtos intermédios formados ao longo do processo de produção de rolhas de Champanhe.

a) Corpo aglomerado; b) Corpo Topejado; c) Corpo aglomerado com discos; d) Rolha branca.

Seguidamente, as rolhas são marcadas a fogo com um logótipo ou texto - previamente escolhido pelo cliente - na superfície lateral e/ou topo da rolha branca. Finalmente, segue-se o processo de tratamento de superfície em que se aplica uma banda de parafina e uma camada de elastómero de silicone, o que confere à rolha a impermeabilização e a lubrificação necessárias para assegurar uma boa inserção de rolhamento e, finalmente, uma adequada extração. Obtém-se, então, o produto final que se encontra representado na Figura 2.2.



Figura 2.2. Rolha de Champanhe da Relvas II S.A.

Por último, as rolhas são embaladas com a possibilidade de serem armazenadas a vácuo com atmosfera de SO_2 , o que reduz significativamente o risco de desenvolvimento microbológico.

2.2 O 2,4,6-Tricloroanisol

Apesar de todas as propriedades inigualáveis que a cortiça apresenta e que a tornam no vedante ideal para garrafas de vinho, a verdade é que por ser um produto natural acaba por sofrer contaminações de origens diferentes e variadas. Estas contaminações levam, por exemplo, à migração de compostos com aroma indesejável da superfície da rolha para o vinho, o que causa alterações organoléticas nos mesmos. Grande parte destes compostos relaciona-se com os metabolitos resultantes da atividade microbiológica que a cortiça pode sofrer. Um composto bastante volátil e quimicamente estável que se destaca na matriz da cortiça é, então, o 2,4,6-tricloroanisol (TCA), cuja estrutura química se encontra apresentada na Figura 2.3. Algumas propriedades químicas do TCA encontram-se apresentadas na Tabela 2.1.

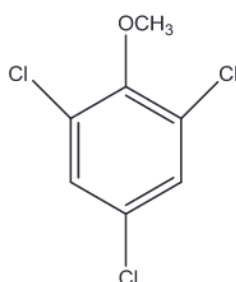


Figura 2.3. Representação da estrutura química do 2,4,6- tricloroanisol (Fontana, 2012).

Tabela 2.1- Propriedades químicas do 2,4,6-tricloroanisol (Pubchem, 2021)

Peso Molecular (g/mol)	Ponto de Fusão(°C)	Ponto de Ebulição (°C)	Solubilidade em água a 20 °C (mg/mL)
211,5	61,5	241,0	0,01

O mecanismo mais aceite que explica a formação dos cloroanisóis é a O-metilação dos clorofenóis, correspondente à reação de metilação do 2,4,6-Triclorofenol (TCP) realizada por diferentes fungos filamentosos que podem crescer nas pranchas de cortiça e nos materiais de madeira existentes nas caves (Coque et al.,2006). Os clorofenóis são então os principais precursores do TCA (Cravero, 2020).

Durante várias décadas eram utilizados biocidas clorofenólicos em sistemas agroflorestais, inclusive no tratamento da cortiça - uma vez que durante a fase de amadurecimento da mesma, esta fica sujeita a fungos e bactérias que podem causar a sua deterioração (Fontana, 2012). Atualmente, apesar de ser proibido o uso destes biocidas, os clorofenóis continuam presentes e acumulados na natureza pelo que são ainda, inevitavelmente, precursores do TCA (Tarasov et al., 2017).

O TCA é responsável por 80% dos desvios sensoriais - alteração das características olfativas e gustativas - encontrados nos vinhos sendo, por isso, o contaminante mais problemático na

indústria vinícola, que origina o aroma/gosto a mofo bem como a papel/cartão molhado. A presença deste composto pode contaminar o vinho desde concentrações ínfimas, bem inferiores ao seu limiar de identificação - concentração a que o aroma é não só detetado, mas também reconhecido pelo sentido olfativo humano, segundo a Norma ISO 5492.

Após a realização de ensaios experimentais que utilizaram rolhas de cortiça contaminada artificialmente com TCA, concluiu-se que a migração de TCA aumenta com a temperatura, a superfície de contacto e o tempo (Cravero, 2020).

Uma vez que o TCA é uma molécula hidrofóbica, é de esperar que quando cortiça contaminada com TCA está em contacto com uma fase líquida que contém uma elevada fração de água (como é o caso do vinho), o TCA não apresente facilidade em migrar da cortiça para a fase líquida, como se observa pelo baixo valor de solubilidade apresentado na Tabela 2.1 (Afonso, 2018).

Vinhos contaminados com TCA apresentam frequentemente outros cloroanisóis e bromoanisóis, como é o caso do 2,3,4,6- tetracloroanisol (TeCA), pentacloroanisol (PCA) e do 2,4,6-tribromoanisol (TBA). No entanto, o principal composto que contribui para a contaminação dos vinhos é o TCA, já que é o que apresenta limites de deteção sensorial inferior - desde 0,03 até 1-2 ng/L em água e 0,5-1,0 ng/L em vinho branco para provadores experientes (Cravero et al., 2015). O limite de rejeição do consumidor (CRT- *Consumer Rejection Threshold*) varia com a espécie de vinho, o tipo de casta e de pessoa para pessoa, apresentando valores estimados de 2,0 ng/L (Prescott et al., 2005).

Apesar das rolhas de cortiça serem apontadas como a mais importante contaminação dos vinhos, está provado que esta pode ter origem também nas próprias caves de vinho. O TCA, bem como os outros cloroanisóis, pode formar-se nos diferentes constituintes de madeira dentro das adegas - como os barris de carvalho - contaminando depois a atmosfera das mesmas e, também, todo o equipamento vinícola, aumentando o risco de transmissão de TCA para o vinho pelo que é de extrema importância não utilizar, por exemplo, lixívia - hipoclorito de sódio - em caves de vinho nem em ambientes próximos das mesmas (Tarasov et al., 2017).

2.2.1 TCA Libertável e TCA Total

No que diz respeito à determinação de TCA em rolhas de cortiça, existem duas perspetivas convencionais: análise de TCA libertável (extraível) e análise de TCA total (intrínseco).

Define-se o TCA libertável como sendo o valor da concentração de equilíbrio que uma determinada rolha de cortiça atinge numa solução de maceração, sendo que uma maceração consiste na imersão completa de uma matriz sólida (cortiça) numa determinada matriz líquida (simulante hidroalcoólico). Considera-se o TCA libertável como a parte do TCA presente nas rolhas de cortiça que é então capaz de migrar para o vinho.

Os valores de TCA libertável são expressos em nanograma por litro (ng TCA/L) de solução, arredondados à décima. Na indústria da cortiça, a análise do TCA libertável é uma prática de rotina que permite o controlo de qualidade das rolhas de cortiça em diferentes etapas da produção, sendo, no entanto, um método destrutivo uma vez que após a maceração, mesmo que se realize a secagem das rolhas, a sua superfície fica manchada e alterada. Foi demonstrado que o TCA libertável é constante mesmo após a realização de várias macerações sucessivas.

Primeiramente, as macerações das rolhas eram feitas em etanol absoluto, em soluções hidroalcoólicas a 40% (v/v) ou até mesmo em água. No entanto, uma vez que o poder extrativo destes solventes é demasiado diferente daquele que o vinho apresenta, nenhum deles pode ser associado a valores reais de TCA libertável e a sua utilização não permite uma aproximação significativa às condições reais de utilização. Então, de modo a normalizar a medição de TCA libertável, os devidos métodos analíticos foram definidos pela Norma internacional ISO 20752:2014. Os protocolos a seguir definem condições de maceração de 24 ± 2 h - tempo após o qual as macerações garantem um equilíbrio químico para a extração de TCA - em soluções hidroalcoólicas a 12% (v/v) e/ou em vinho branco a 12% (v/v) (Tarasov et al., 2017).

Os extratos obtidos a partir das macerações são depois analisados seguindo uma metodologia de controlo de qualidade desenvolvida por Hervé et al. (2004) que consiste na combinação de micro-extração em fase sólida (SPME) com cromatografia gasosa (GC) e um detetor de espectroscopia de massa (MS), usando equipamentos GC-MS ou então por cromatografia gasosa com detetor de captura eletrónica (GC-ECD). As amostras são analisadas e quantificadas em modo SIM (*selected ion monitoring*), através do uso de d_5 - tricloroanisol (d_5 - TCA) - padrão interno deuterado com pureza maior ou igual a 98%. Este processo garante medições sensíveis com limites de quantificação inferiores a 0,5 ng/L (Hervé et al., 2004).

É de notar, no entanto, que como o vinho não apresenta um poder de extração de haloanisóis muito elevado a quantidade de haloanisóis extraída da cortiça pelo vinho está longe de ser a quantidade total de TCA presente na rolha de cortiça. O TCA total é, então, toda a quantidade deste contaminante presente numa rolha de cortiça e é expressa em nanograma de TCA por grama de cortiça (ng TCA/g).

A aplicação da análise do TCA total, apesar de ser de elevada importância uma vez que permite estudar a distribuição do TCA no interior das rolhas, é bem menos comum na indústria corticeira e os estudos atualmente feitos sobre TCA total são bastante limitados.

Macerações de 7 a 24 h e extrações com *Soxhlet* são técnicas de extração que necessitam de elevados volumes de solvente e que requerem bastante tempo de preparação de amostras. Os solventes utilizados na extração são, habitualmente, o diclorometano, metanol, n-pentano e o etanol absoluto e variam consoante os haloanisóis e halofenóis que se pretende extrair. Estas técnicas de extração de TCA total dependem essencialmente de dois fatores: do poder extrativo

do solvente e da superfície de contacto da cortiça com o mesmo. Esta última é aumentada com a trituração da cortiça em grânulos, assegurando desta forma o aumento da área de superfície disponível no processo de extração. Algumas técnicas de preparação de amostras recomendam que a cortiça seja previamente congelada através da sua imersão em nitrogénio líquido, de modo a facilitar o processo de trituração e para diminuir as perdas dos haloanisóis voláteis. A extração com *Soxhlet* garante uma contínua circulação do solvente no granulado de cortiça e é aconselhada a agitação durante todo o processo de extração. Os extratos são posteriormente analisados através de métodos de cromatografia gasosa como previamente referido, SPME-GC-MS (Tarasov et al., 2017).

As análises sensoriais têm também um papel muito importante na indústria corticeira na medida em que permitem um controlo industrial não-destrutivo. A abordagem padrão para análise sensorial implica uma imersão total ou parcial das rolhas em água destilada dentro de copos de prova tapados com vidros de relógio, durante 24 h, seguindo-se a análise sensorial da câmara de ar no topo dos copos por provadores experientes. É também comum adotar uma operação de análise denominada de *sniffing* em que as rolhas, após passarem num tapete de aquecimento, são cheiradas por um provador experiente que as aceita ou rejeita consoante o tipo de aroma apercebido. As análises sensoriais são demoradas, apresentam um elevado custo e a deteção, identificação e quantificação dos contaminantes responsáveis pelos defeitos organoléticos é de elevada dificuldade e subjetividade (Cappellin et al., 2020).

Tanto as análises sensoriais como as análises de TCA libertável realizadas por macerações são feitas em lotes aleatórios de rolhas de cortiça não facultando por isso garantias precisas relativamente ao risco de contaminação associado a cada rolha de cortiça individualmente. Para além disso, o método de análise do TCA libertável previamente referido, devido ao elevado tempo de preparação da amostra e de análise, bem como o facto de ser destrutivo para a rolha, não é o mais indicado para medições de TCA a nível industrial sendo apenas utilizado nos laboratórios para controlo de qualidade.

2.2.2 Métodos instrumentais de análise para deteção individual de TCA em rolhas de cortiça

De maneira a tentar contornar estes obstáculos e aumentar a eficiência do controlo de qualidade que o mercado da cortiça exige, é de extrema importância adotar um método analítico para quantificação do TCA presente nas rolhas que garanta rapidez, sensibilidade e precisão da análise. O departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Amorim & Irmãos, S.A. (A&I) desenvolveu uma tecnologia de análise individual de rolhas de cortiça para deteção unitária de TCA, que assenta num sistema de cromatografia em fase gasosa com deteção por captura de eletrões (GC-ECD). Tendo apresentado resultados promissores,

desenvolveu-se e otimizou-se o equipamento, que passou de protótipo laboratorial a industrial, com capacidade de operar autonomamente (Guimarães, 2015).

Posteriormente, outras tecnologias foram desenvolvidas e começaram a integrar a indústria corticeira. Uma das tecnologias tem como base o método HS-GC-MS, que consiste numa preparação de amostra por aquecimento para dessorção térmica de compostos orgânicos voláteis que passam para a câmara de ar - *headspace* (HS) - sendo a análise feita através de cromatografia gasosa (GC) e um detetor de espectroscopia de massa (MS).

Os equipamentos que permitem adotar este método de análise são normalmente constituídos por um módulo de alimentação - que contempla um amostrador automático (“*auto-sampler*”) com funções de alimentação e extração das rolhas - um módulo de incubação constituído por um conjunto de fornos com ajuste preciso de temperatura e um módulo de análise.

Primeiramente, ocorre a incubação de cada rolha numa câmara cilíndrica - pequenos fornos - com uma temperatura ajustável entre 70 °C e 100 °C que garante a volatilização do TCA. A injeção da amostra no cromatógrafo ocorre com auxílio do gás de arraste, o hélio. O injetor tem como função assegurar as condições adequadas da transferência da toma de gás (proveniente do *headspace*) para a coluna capilar de cromatografia. Nesta coluna cromatográfica dá-se a separação dos compostos, assegurando desta forma que a chegada das moléculas ao detetor seja feita de forma diferenciada. A seleção da coluna cromatográfica é realizada em função da natureza química do seu material de enchimento, a fase estacionária da coluna. A ionização das moléculas, por sua vez, ocorre no detetor - último elemento do sistema cromatográfico - e tem por objetivo a fragmentação da molécula em iões que, ao atingirem a célula do detetor, produzem um sinal elétrico cuja intensidade é proporcional à concentração da molécula a quantificar. Estes sinais elétricos são apresentados sob a forma de picos cromatográficos. A área obtida através da integração destes picos permite a quantificação dos compostos (Costa, 2012).

Um outro método utilizado para o controlo unitário de TCA é o TOF-MS. É uma abordagem baseada em espectroscopia de massa com ionização química - *time of flight* (CI-TOF), tempo de voo. Este método substitui o uso de separação cromatográfica pelo que a separação é feita através da combinação de uma ionização suave e seletiva com espectroscopia de massa de elevada resolução, sendo capaz de quantificar de maneira não destrutiva a concentração de TCA presente numa rolha de cortiça em apenas 3 segundos. Os equipamentos que permitem a adoção deste método possuem um *auto-sampler* com cavidades individuais para cada rolha de cortiça - de modo a evitar contaminações cruzadas entre rolhas - sendo a temperatura definida para cada uma das cavidades de 120 °C, podendo esta ser alterada se assim for necessário (Cappellin et al., 2020).

Ambos estes métodos implicam a ocorrência de uma dessorção térmica na rolha - que sofre também uma expansão (e consequente alteração de calibre) considerável após a passagem nestes equipamentos de deteção individual de TCA - não tendo sido ainda realizados estudos sobre qual o efeito desta dessorção térmica nas rolhas de cortiça, no que diz respeito à migração de TCA da rolha para o vinho a longo prazo bem como do interior da rolha para a superfície.

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os protocolos experimentais utilizados para se proceder ao estudo da evolução da migração do TCA das rolhas de cortiça para o vinho. É abordado o método de análise de deteção de TCA libertável por SPME-GC-MS, usado diariamente na Relvas II S.A, bem como o método de análise e quantificação do TCA Total presente nas rolhas, implementado na empresa no âmbito deste projeto. São também apresentados e descritos neste capítulo os dois planos de experiências desenvolvidos para o estudo da evolução da migração bem como o modelo matemático que descreve a mesma.

3.1 Caracterização das rolhas analisadas

As rolhas técnicas utilizadas em todos os ensaios realizados apresentam um calibre de 44 mm de comprimento e 26,5 mm de diâmetro, tendo sido cedidas pela Relvas II S.A. Todas as rolhas apresentam uma marcação no topo com a sua respetiva numeração - 231 C, por exemplo - e foram todas previamente analisadas por um dos dois métodos instrumentais de análise para deteção individual e controlo unitário de TCA, HS-GC-MS e TOF-MS, referidos no Capítulo 2.

A análise das rolhas por estes métodos permitiu agrupá-las em diferentes gamas de concentração de TCA, apresentadas na Tabela 3.1, o que foi de extrema importância para a avaliação da fiabilidade qualitativa de cada um dos métodos instrumentais de análise.

Tabela 3.1- Diferentes gamas de concentração de TCA por método instrumental de análise

<i>Método Instrumental de análise</i>	<i>Gama de concentração de TCA (ng/L)</i>
TOF-MS	[0,6 - 0,8]
	[1,0 - 1,2]
	[1,4 - 2,0]
HS-GC-MS	< 0,5
	[0,5 - 1,0]

3.2 Procedimento experimental para determinação do TCA Libertável inicial pelo método SPME-GC-MS

Primeiramente, para uma caracterização inicial das rolhas utilizadas no desenvolvimento do projeto, selecionaram-se 39 rolhas de cada uma das gamas de concentração apresentadas na Tabela 3.1 e, de forma a determinar o TCA libertável de cada uma das 195 rolhas, procedeu-se a uma maceração individual das mesmas em vinho branco com teor alcoólico a 12% (v/v), assegurando a ausência de ar entre a superfície do líquido e o limite do frasco de maceração.

As macerações foram realizadas durante 24 h, como preconizado na Norma ISO 20752:2014, referida no Capítulo 2.

Após esse período, retiraram-se amostras de 10 mL da solução de maceração para tubos de cromatografia de 20 mL que continham no seu interior 3,5 g de cloreto de sódio (NaCl), como ilustrado na Figura 3.1. O objetivo do NaCl é favorecer a volatilização do TCA para a câmara de ar - *headspace* - do tubo cromatográfico. De seguida, adicionou-se a cada tubo, com o auxílio de uma micropipeta de 200 µL, 50 µL de d₅- tricloroanisol (d₅- TCA), padrão interno de TCA.



Figura 3.1. Tubo de cromatografia de 20 mL, com 10 mL de amostra de solução de maceração e 3,5 g de NaCl.

Posteriormente, os tubos cromatográficos foram enviados para o laboratório de análises químicas da empresa e a solução foi analisada por cromatografia gasosa (GC) com espectroscopia de massa (MS), usando o equipamento GC-MS, envolvendo processos de micro-extração em fase sólida (SPME). As características do equipamento GC-MS bem como do método de análise utilizado, SPME-GC-MS, encontram-se apresentadas no Apêndice A. Foi assim quantificado o TCA libertável presente em cada uma das rolhas, cujos valores obtidos se encontram registados na Tabela B.1 do Apêndice B.

3.3 Procedimento experimental para a determinação do TCA Total presente nas rolhas de cortiça pelo método SPME-GC-MS

De seguida, foram então selecionadas 16 rolhas de cada uma das 5 diferentes gamas de concentração - das 39 rolhas usadas para a determinação do TCA libertável - e foi quantificado o TCA total presente em cada uma das 80 rolhas.

Para a quantificação do TCA Total presente nas rolhas utilizou-se um procedimento experimental que se rege por oito passos. Primeiramente, a rolha é pesada numa balança analítica - Figura 3.2 a) - sendo o valor obtido registado. De seguida, com o auxílio de um triturador - Figura 3.2 b) - tritura-se a rolha em pedaços de granulado (grânulos) com uma dimensão de cerca de 3 mm e pesa-se os mesmos na balança analítica com auxílio de um prato de alumínio - Figura 3.2 c) - registando-se o valor de massa.

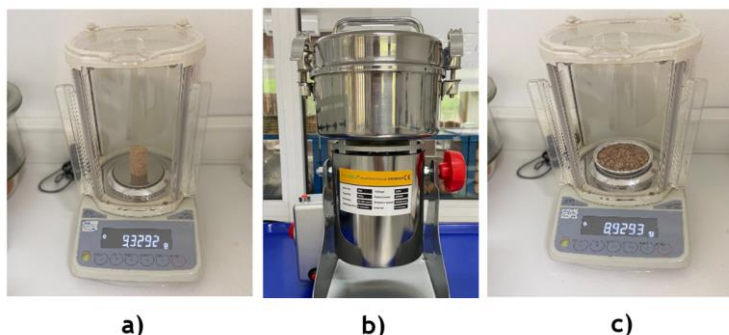


Figura 3.2. Procedimento experimental para quantificação do TCA Total - Granulação. a) Pesagem da rolha na balança analítica; b) Triturador; c) Pesagem dos grânulos de cortiça na balança analítica.

Posteriormente, introduz-se 200 mL de Etanol Absoluto (P.a. $\geq 99,8\%$) num matraz de boca estreita de 500 mL - Figura 3.3 a) - colocando-se no seu interior os grânulos de cortiça e vedando-se o matraz com papel de alumínio e parafilm - Figura 3.3 b). Após a preparação dos matrizes, estes são colocados num agitador durante 24 horas com uma velocidade orbital de 130 rpm - Figura 3.3 c).

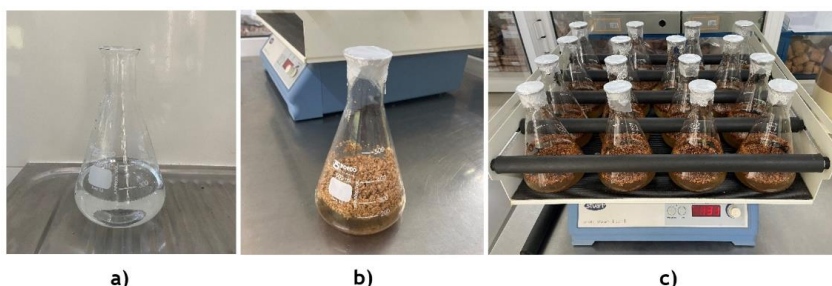


Figura 3.3. Procedimento experimental para quantificação do TCA Total - Extração do TCA em Etanol. a) Matraz com 200 mL de Etanol Absoluto; b) Matraz com Etanol e grânulos de cortiça; c) Matrizes no agitador.

Finalmente, com o auxílio de um suporte, um funil de vidro e papel de filtro, filtra-se o extrato para um tubo de cromatografia de 20 mL. Os tubos foram vedados, devidamente identificados e enviados para posterior análise no Centro Tecnológico da Cortiça (CTCOR), para validar o método de análise em questão, uma vez que a análise para obtenção de resultados de TCA Total foi colocada pela primeira vez em prática na empresa no âmbito deste projeto. Após a análise destas 80 rolhas referidas, foi então implementado este procedimento na empresa - de forma totalmente autónoma - com as respetivas análises a serem realizadas no laboratório de análises químicas da mesma. É de notar que para tal foi necessário fazer um duplicado dos filtrados (para envio ao CTCOR e para análise no laboratório da empresa) de modo a validar, posteriormente, a concordância dos resultados internos com os do CTCOR.

O valor de TCA obtido pelo método SPME-GC-MS está expresso em ng TCA/L. Multiplicando este valor pelo volume de extrato (200 mL) e dividindo pela massa de amostra inicialmente medida (rolha ou grânulos), obtém-se o valor de TCA Total, expresso em ng TCA / g amostra.

Os valores obtidos de TCA Total encontram-se registados na Tabela C.1 do Apêndice C.

3.4 Ensaios de migração de TCA das rolhas para o vinho

No que diz respeito ao Plano de experiências elaborado para o desenvolvimento deste projeto, foram planeados dois estudos de 30 dias que, através de ensaios de envelhecimento acelerado e tendo por base a Norma ISO 13302:2003, simulam um tempo de contacto de longa duração, mais especificamente um contacto máximo de 4 meses, através de macerações individuais das rolhas em vinho branco efervescente com teor alcoólico de 12% (v/v). Foram previstas medições de TCA libertável no vinho após 2, 6, 10, 15 e 30 dias, o que corresponde a 30, 45, 60, 75 e 120 dias de “tempo de prateleira” - teoricamente - como se pode verificar na Tabela 3.2 e na Figura 3.4.

Tabela 3.2- Correspondência entre os tempos experimentais e teóricos

<i>Tempo de maceração experimental (dias)</i>	<i>Tempo de prateleira teórico baseado nas referências da Norma ISO 13302:2003</i>
2	30
6	45
10	60
15	75
30	120

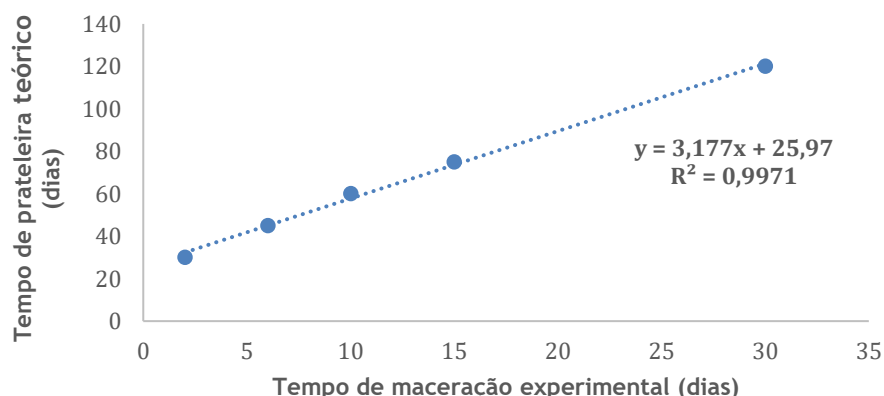


Figura 3.4. Representação gráfica da relação entre o tempo de maceração experimental e o tempo de prateleira teórico.

3.4.1 Condições de realização dos ensaios de migração de TCA das rolhas para o vinho

Conhecidas as dimensões - diâmetro e comprimento - das rolhas de cortiça foi então calculado o volume das mesmas, aproximadamente 25 cm³. Foram utilizados frascos de maceração de 100 mL, logo, conhecido o volume das rolhas foi possível determinar a quantidade de vinho a introduzir em cada um dos frascos - 75 cm³. No entanto, uma vez que se trata de macerações prolongadas e de forma a tentar evitar o desenvolvimento de microrganismos, foi adicionado Glutamato de Sódio (E-621) - aditivo alimentar que, juntamente com o teor alcoólico e a acidez do vinho, atua como conservante e inibidor da deterioração por microrganismos dos compostos cedidos pela rolha à solução de maceração.

Para perceber qual a quantidade adequada de Glutamato a utilizar, realizou-se um estudo com quantidade crescente do aditivo - 0,25 g; 0,50 g; 1,0 g e 1,5 g - em água e vinho. Utilizaram-se 4 frascos de maceração, tendo sido colocada água, a respetiva quantidade de Glutamato e uma rolha de cortiça no interior de cada um.

Os frascos foram vedados com papel de alumínio e uma tampa de metal, tendo sido deixados em repouso durante 5 dias, à temperatura ambiente de 20 °C. O mesmo procedimento foi realizado com o vinho. Terminados os 5 dias, de forma a verificar se ocorreu o desenvolvimento de aromas de redução - associados à degradação biológica anaeróbia de compostos cedidos pela rolha - foi realizada, por um provador experiente, uma prova sensorial às 8 soluções, tendo-se concluído que nenhuma delas apresentava alterações de sabor e confirmando assim a viabilidade do Glutamato.

Posteriormente, com recurso a tiras indicadoras de pH, mediu-se o pH de uma amostra do vinho utilizado nas macerações (pH = 4) e também do vinho presente em cada um dos frascos utilizados no descrito estudo, como se pode verificar na Figura 3.5.



Figura 3.5. Bandas indicadoras de pH utilizadas no estudo da dosagem de Glutamato para solução modelo.

Este procedimento permitiu concluir que a adição de 1,0 g e 1,5 g do aditivo alteram o pH do vinho de 4 para 3, não sendo então aconselhável a sua utilização. Optou-se então por adicionar 0,25 g de Glutamato, quantidade que garante a conservação das soluções sem alterar o valor de pH original do vinho.

Consideraram-se três diferentes temperaturas para os ensaios, que simulam as temperaturas às quais as garrafas vedadas com as rolhas poderão estar sujeitas, sendo estas temperaturas de refrigeração, de acondicionamento em cave e de transporte em ambientes quentes (como o transporte marítimo em contentores). Experimentalmente, as temperaturas utilizadas foram de aproximadamente 5 °C para simular a refrigeração, com amostras colocadas no frigorífico; de cerca de 18 °C de forma a simular o acondicionamento, com amostras colocadas na cave e, finalmente, uma temperatura de aproximadamente 30 °C com respeito ao transporte, tendo as amostras sido colocadas numa estufa.

Após a colocação da rolha, do Glutamato e do vinho no frasco de maceração (e para que a identificação das amostras fosse facilitada e não houvesse perda de informação), colocou-se no frasco uma etiqueta onde foi anotado o local de armazenamento do frasco, o número da rolha e a gama de concentração de TCA a que esta pertence. Na Figura 3.6 encontra-se apresentado um exemplo de um dos frascos de maceração utilizados na atividade experimental.



Figura 3.6. Frasco de maceração com respetiva identificação.

De modo a ser possível controlar a temperatura de cada um dos diferentes locais de armazenamento das amostras, foi colocado um frasco de controlo - apenas com vinho no seu interior, estando vedado com papel de alumínio e parafilm - no frigorífico, na estufa e na cave, tendo a temperatura dos mesmos sido medida regularmente, com auxílio de um termómetro digital, como se pode verificar na Figura 3.7 a), b) e c). No Apêndice D estão registadas todas as temperaturas obtidas em cada medição bem como a respetiva média.

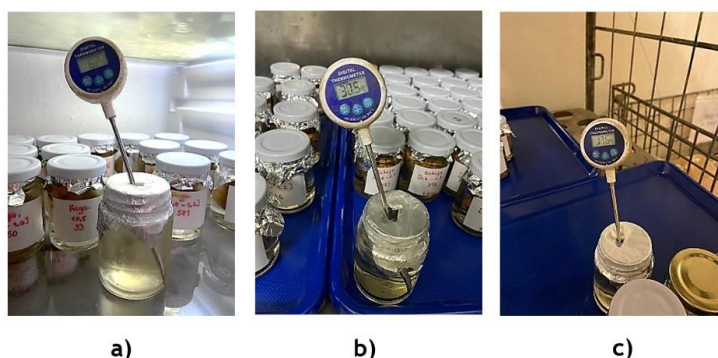


Figura 3.7. Medições de temperatura do frasco de controlo. a) No frigorífico; b) Na Estufa; c) Na cave.

3.4.2 Descrição dos Planos experimentais considerados

Para os dois estudos realizados foram elaborados dois planos, o Plano Não-Destrutivo e o Plano Destrutivo. Todas as rolhas utilizadas no Plano Não-Destrutivo foram previamente maceradas durante 24h de modo a obter-se valores de TCA libertável que permitiram então uma primeira caracterização das rolhas (procedimento experimental referido na Secção 3.2 deste Capítulo). Os valores encontram-se presentes na Tabela B.1 do Apêndice B. As rolhas passaram depois por um período de estabilização de cerca de dois meses, tendo estado guardadas em sacos de

amostras que impediram a sua contaminação durante este tempo. É de notar que das 195 rolhas previamente analisadas, 80 foram destruídas para determinação do TCA Total (procedimento experimental referido na Secção 3.3 deste Capítulo), tendo sobrado portanto 115 rolhas, 23 de cada gama considerada. Para o Plano Não-Destrutivo foram então seleccionadas 15 rolhas por gama - destas 23 que sobraram. As rolhas utilizadas no Plano Destrutivo, contrariamente às do Plano Não-Destrutivo, não foram submetidas à primeira maceração de deteção do TCA libertável.

Plano Não-Destrutivo

Para este plano foram utilizadas 75 rolhas - 5 rolhas de cada uma das diferentes gamas de concentração para cada uma das três temperaturas consideradas - maceradas nas condições enunciadas na Secção 3.4.1 durante um tempo máximo de 30 dias.

O Plano Não-Destrutivo permitiu um seguimento contínuo das rolhas, que nunca foram removidas dos frascos, sendo que de cada vez que se retiravam os 10 mL de amostra de solução de maceração para os tubos de cromatografia, estes 10 mL eram repostos imediatamente com vinho fresco.

Este plano, apesar de permitir analisar a cedência de TCA de cada uma das rolhas para o vinho ao longo do tempo, apresenta a desvantagem de se ter que lhe adicionar o vinho, o que implica que seja necessário realizar um ajuste dos resultados de TCA libertável obtidos, uma vez que a adição dos 10 mL de vinho fresco dilui a concentração de TCA da solução de maceração presente nos frascos. Após a obtenção do valor da concentração de TCA presente nos 10 mL de amostra retirados e considerando o mesmo como constante em toda a solução de maceração (c_i), foi necessário calcular a concentração que ficou no frasco após a adição dos 10 mL de vinho fresco (c_f) através da Equação 3.1:

$$c_i V_i = c_f V_f \quad (3.1)$$

onde V_i corresponde ao volume inicial presente no frasco de maceração - posterior à remoção dos 10 mL de amostra e prévio à adição do vinho fresco - sendo este de 65 mL e V_f ao volume final, 75 mL. Este cálculo foi realizado de cada vez que se obtiveram resultados de TCA libertável, para cada um dos dias previamente estipulados de fim de maceração.

Devido à possibilidade de se estarem a cometer erros de propagação pelas diluições sucessivas, elaborou-se um plano alternativo, realizado em simultâneo com o Plano Não-Destrutivo, que não implica a alteração de concentração da solução de maceração, o Plano Destrutivo.

Plano Destrutivo

Para o Plano Destrutivo foram utilizadas 150 rolhas - 5 rolhas da gama de concentração [0,6 - 0,8] e da gama [1,0 - 1,2] - método TOF-MS - para cada uma das três temperaturas consideradas, bem como para cada data prevista de fim de maceração. De cada vez que se retiraram amostras de solução de maceração para os tubos de cromatografia, a rolha foi imediatamente retirada do frasco, lavada com água e posta a secar à temperatura ambiente durante 48h, sendo a restante solução de maceração descartada. Posteriormente, determinou-se o TCA total de cada uma das rolhas de modo a perceber se o mesmo está relacionado com a evolução da migração de TCA destas rolhas para o vinho. É de notar que uma vez que para a quantificação de TCA total é necessário destruir as rolhas, não foi possível fazer macerações contínuas como no Plano Não-Destrutivo.

A quantidade de rolhas utilizadas nos procedimentos experimentais descritos anteriormente - Caracterização inicial das rolhas, Plano Não-Destrutivo e Plano Destrutivo - encontra-se especificada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Resumo da quantidade de rolhas utilizadas em cada procedimento experimental e número total de ensaios de cada procedimento

<i>Nº de rolhas</i>	<i>Caracterização inicial</i>		<i>Plano Não-Destrutivo</i>	<i>Plano Destrutivo</i>	
	<i>TCA Libertável</i>	<i>TCA Total</i>	<i>TCA Libertável</i>	<i>TCA Libertável</i>	<i>TCA Total</i>
195	195	80	75	-	-
150	-		-	150	150
<i>Nº total de ensaios</i>	275		75	300	

3.4.3 Modelo teórico para descrever a evolução da migração do TCA para o vinho

Uma vez que a migração do TCA (contaminante na matriz sólida) para o vinho (solvente no estado líquido) pode ser descrita como uma transferência de massa sobre a interface rolha/vinho, que ocorre por difusão uma vez que se trata de um sistema em que está presente um gradiente de concentração, escolheu-se um modelo para o ajuste de resultados que representasse essa mesma transferência de massa. A evolução da concentração do TCA no vinho traduz-se então pela relação entre um parâmetro θ_2 (sendo este a simplificação de $\frac{k \times A}{V}$, onde k é a constante de transferência de massa, A é a área de transferência e V é o volume de vinho) e o gradiente de concentração de TCA. Este gradiente é a diferença entre a concentração de

TCA em equilíbrio (representada pelo parâmetro θ_1) e a concentração de TCA libertável presente no vinho, C_{TCA} . A concentração de TCA em equilíbrio referida corresponde à solubilidade do TCA, ou seja, à concentração máxima deste contaminante que é possível dissolver num determinado volume de vinho (Welty et al, 2015).

O modelo que permite representar esta evolução foi obtido através da dedução do balanço de massa ao contaminante e encontra-se então apresentado na Equação 3.2:

$$C_{TCA}(t) = \theta_1 \times (1 - e^{-\theta_2 t}) \quad (3.2)$$

onde t corresponde ao tempo.

3.4.4 Tratamento Estatístico

Uma vez concluída a fase experimental, sucede-se então o tratamento dos dados obtidos. Primeiramente, tendo por base os dados obtidos de cada um dos ensaios realizados relativos ao Plano Não-Destrutivo, determinou-se os parâmetros de ajuste do modelo matemático representado pela Equação 2 utilizando uma regressão não linear e recorrendo ao *software* Minitab18.

Posteriormente, considerando os resultados obtidos relativos ao Plano-Destrutivo, realizou-se uma análise estatística dos resultados que permite identificar os diferentes fatores bem como as suas interações significativas. Para o tratamento dos resultados obtidos recorreu-se à análise de variância (método ANOVA), tendo sido também utilizado o *software* Minitab 18.

4 Resultados e Discussão

Neste Capítulo são apresentados os resultados obtidos em cada estudo e é feita a sua respetiva análise. Como o objetivo desta dissertação é estudar a evolução da migração do TCA de rolhas previamente analisadas por dois sistemas de deteção unitária para o vinho, os mesmos são comparados relativamente ao seu desempenho. É também analisado o ajuste do modelo matemático para a migração do TCA da rolha para o vinho e, finalmente, é realizada uma análise estatística dos resultados obtidos de TCA Libertável e TCA Total.

4.1 Comparação dos métodos instrumentais de análise para cada temperatura

Os métodos referidos permitiram agrupar as rolhas em diferentes gamas de concentração de TCA. Foram considerados três níveis de temperatura e cinco níveis de períodos de contacto das rolhas com o vinho, de maneira a que fosse possível perceber os fatores que influenciam a evolução da migração de TCA. Estes fatores e respetivos níveis encontram-se resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Fatores com potencial influência na evolução da migração do TCA e respetivos níveis

<i>Método Instrumental de análise</i>	<i>Gama de concentração (ng/L)</i>	<i>Duração (dias)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
TOF-MS	[0,6-0,8]	2	5
	[1,0-1,2]	6	18
	[1,4-2,0]	10	30
HS-GC-MS	< 0,5	15	—
	[0,5-1,0]	30	

Tendo primeiramente como foco de análise o Plano Não-Destrutivo, os resultados de TCA libertável obtidos para os diferentes períodos de maceração estipulados encontram-se apresentados na Tabela E.1 do Apêndice E, tendo os valores considerados atípicos - *outliers* - sido retirados.

De modo a tentar analisar a fiabilidade de cada um dos métodos instrumentais de análise, torna-se importante analisar a evolução da cedência do TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo e para cada uma das três temperaturas. Na Figura 4.1 está representada a evolução da cedência para a temperatura de 18°C.

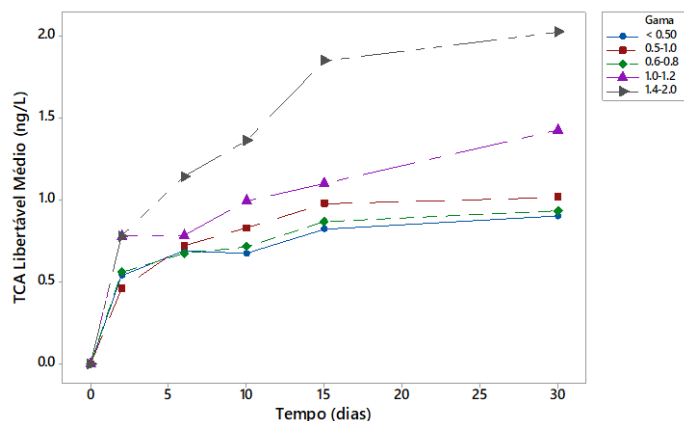


Figura 4.1. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 18 °C.

É possível verificar que a 18 °C as rolhas tiveram um comportamento concordante com a caracterização inicial de ambos os métodos instrumentais de análise. As rolhas pertencentes à gama de concentração mais elevada do método TOF-MS ([1,4-2,0]) libertaram sempre mais TCA ao longo do tempo do que as rolhas pertencentes às duas outras gamas deste método. O mesmo se verificou para o método HS-GC-MS. É possível concluir que para frascos que se encontrem guardados em cave, a avaliação feita pelas tecnologias de deteção unitária de TCA é então fiável, com exceção das rolhas pertencentes à gama < 0,5 que a 18 °C libertaram sempre, em média, mais TCA do que aquele que a gama de concentração indica.

O mesmo não se verificou para as rolhas pertencentes às outras gamas de concentração, que apresentam então uma libertação de TCA sempre inferior à estabelecida pelo limite máximo do intervalo da gama que lhes corresponde.

No entanto, quando as temperaturas consideradas são de 5 e 30 °C, o mesmo não se verifica. Começando por analisar o gráfico apresentado na Figura 4.2, que mostra a evolução da cedência de TCA de rolhas mantidas a 5 °C, pode observar-se que apenas o método HS-GC-MS foi fiável uma vez que as rolhas pertencentes à gama mais elevada deste método apresentam um maior potencial de libertação de TCA comparativamente com a gama mais baixa. Por outro lado, tendo como foco o método TOF-MS, não houve concordância e as rolhas pertencentes à gama de concentração mais baixa (evolução representada pela linha verde) libertaram, ao longo do tempo, mais TCA para o vinho do que as rolhas pertencentes à gama intermédia (evolução representada pela linha roxa). Para esta temperatura, não se verificou a ocorrência de libertações significativas de TCA atípicas, ou seja, superiores às estabelecidas pelos limites das gamas de concentração, o que permite concluir que 5 °C é uma temperatura inibidora de cedência.

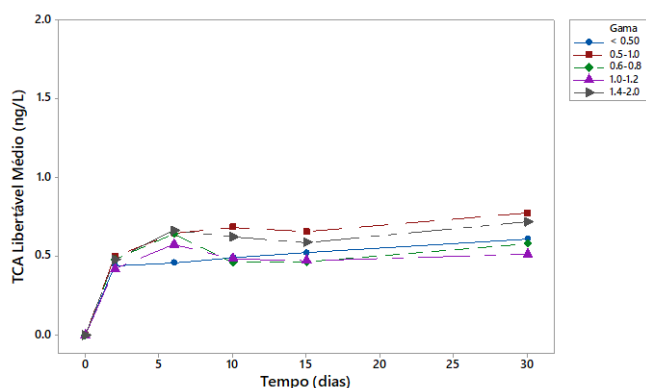


Figura 4.2. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 5 °C.

Finalmente, quando se consideram as rolhas que estiveram em macerações mantidas na estufa, o método que provou ser menos fiável foi o HS-GC-MS. Através da análise da Figura 4.3, que ilustra a evolução da cedência para a temperatura de 30 °C, é possível verificar que logo após dois dias de maceração as rolhas pertencentes à gama < 0,5 libertaram mais TCA que as rolhas da gama [0,5-1,0] e o mesmo voltou a verificar-se para períodos de maceração superiores a 15 dias. A esta temperatura, a partir do 6º dia de maceração, todas as rolhas libertaram TCA em quantidades significativamente superiores às estabelecidas pela análise de deteção unitária, para ambos os métodos instrumentais de análise, com exceção das rolhas pertencentes à gama [1,4-2,0]. Pode considerar-se a temperatura de 30 °C como uma temperatura crítica para o desempenho de ambos os métodos.

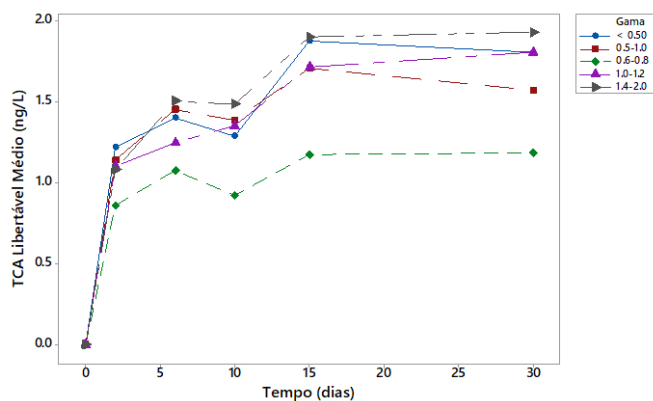


Figura 4.3. Evolução da cedência de TCA para cada uma das diferentes gamas de concentração ao longo do tempo, a 30 °C.

4.2 Ajuste de um modelo matemático para a migração do TCA da rolha para o vinho

O modelo matemático referido na Secção 3.4.3 do Capítulo 3 foi ajustado recorrendo ao *software* Minitab 18. Tendo por base os dados obtidos a partir de cada um dos ensaios (apresentados na Tabela E.1 do Apêndice E) foi ajustado, para cada temperatura e gama de concentração, o modelo matemático com capacidade de estimar valores de TCA libertável após

os 30 dias do estudo em questão, ou seja, capaz de prever o valor médio que uma rolha de cortiça, pertencente a determinada gama e a determinada temperatura, liberta para um vinho após um dado período de tempo.

É de notar que este modelo é apenas um ajuste dos resultados obtidos durante os 30 dias de ensaio, não estando ainda validado e não sendo possível conhecer o grau de incerteza da estimativa (pois para tal seria necessário ter amostras independentes para cada tempo, o que não aconteceu neste projeto de estudo contínuo).

O valor obtido dos parâmetros da equação do modelo referido - Equação 3.2 - para cada gama de concentração e temperatura considerada bem como os valores do erro padrão estimado do ajuste (S), encontram-se apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Parâmetros do modelo escolhido para o ajuste dos valores obtidos e valores de S, para cada gama de concentração e temperatura

Gama de concentração (ng/L)	Temperatura (°C)	θ_1	θ_2	S (ng/L)
[0,6-0,8]	5	0,5371	1,149	0,08
	18	0,8222	0,4758	0,09
	30	1,092	0,7679	0,1
[1,0-1,2]	5	0,5114	0,8924	0,04
	18	0,9525	0,8398	0,2
	30	1,580	0,4753	0,2
[1,4-2,0]	5	0,6507	0,6813	0,05
	18	1,210	0,1864	0,2
	30	1,776	0,3927	0,2
< 0,5	5	0,5228	0,8896	0,06
	18	0,7900	0,5142	0,09
	30	1,611	0,6500	0,3
[0,5-1,0]	5	0,6971	0,6093	0,05
	18	0,9829	0,2444	0,06
	30	1,541	0,6531	0,1

Verifica-se que o θ_1 aumenta com a temperatura, para todas as gamas de concentração, o que faz sentido uma vez que o mesmo representa a concentração máxima de TCA (em equilíbrio) e a cedência é, como demonstrado anteriormente, favorecida pelo aumento da temperatura. Por sua vez, o $\theta_2 = \left(\frac{k \times A}{V}\right)$ não apresenta um comportamento linear para as diferentes gamas de concentração (o valor do θ_2 para a temperatura de 18°C é inferior ao valor observado para as temperaturas de 5 e 30°C) e para a gama de concentração [1,0-1,2] segue um comportamento diferente do que para as restantes gamas. Na Figura 4.4 A e B encontra-se representada a variação dos parâmetros θ_1 e θ_2 em função da temperatura para a gama de concentração [0,6-0,8], respetivamente, e na Figura 4.5 A e B para a gama de concentração [1,0-1,2].

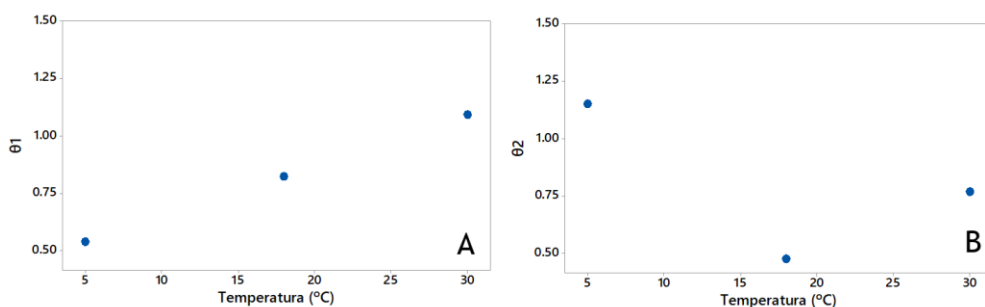


Figura 4.4. Visualização gráfica da variação dos parâmetros com a Temperatura, para a gama de concentração [0,6-0,8]. A: θ_1 e B: θ_2 .

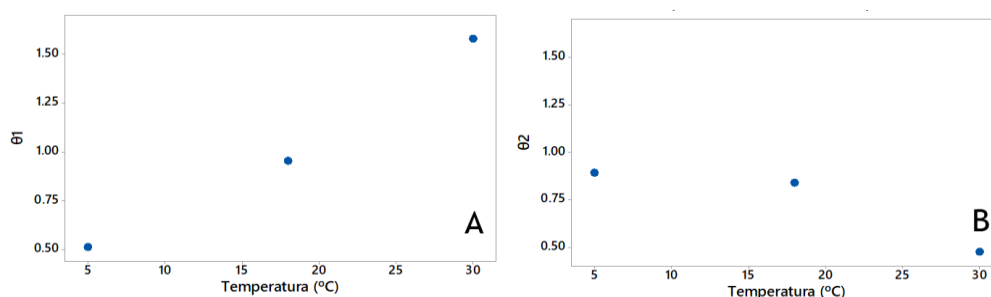


Figura 4.5. Visualização gráfica da variação dos parâmetros com a Temperatura, para a gama de concentração [1,0-1,2]. A: θ_1 e B: θ_2 .

Uma vez determinados os parâmetros do modelo que melhor ajustam os resultados obtidos de TCA Libertável, em média, ao longo do tempo e para cada gama de concentração e temperatura, estes foram representados graficamente juntamente com os pontos experimentais para verificar o ajuste dos mesmos ao modelo obtido. Estes gráficos encontram-se ilustrados nas Figuras F.1 (método instrumental de análise TOF-MS) e F.2 (método instrumental de análise HS-GC-MS) do Apêndice F.

Modelo global de ajuste para descrever a migração do TCA da rolha para o vinho

Como referido anteriormente, verificou-se que os parâmetros θ_1 e θ_2 apresentam ambos dependência da temperatura, para cada uma das diferentes gamas de concentração. Então, uma vez estudada a forma como cada um desses parâmetros se relaciona com a temperatura, desenvolveu-se um modelo global para cada uma das diferentes gamas que pode ser usado para as temperaturas consideradas (5, 18 e 30°C). Este modelo global é representado pela Equação 4.1:

$$C_{TCA}(t) = (\beta_1 + \beta_2 \times T) \times (1 - e^{-t(\beta_3 \times T^2 + \beta_4 \times T + \beta_5)}) \quad (4.1)$$

onde T corresponde à temperatura e t corresponde ao tempo. Na Tabela 4.3 encontram-se apresentadas as equações correspondentes a cada uma das gamas de concentração bem como os valores do erro padrão estimado do ajuste para cada gama de concentração.

Tabela 4.3- Equações do modelo global para cada gama de concentração

Gama de concentração	Equação de modelo global	S (ng/L)
[0,6-0,8]	$C_{TCA}(t) = (0,42519 + 0,02221 \times T) \times (1 - e^{-t(0,00311 \times T^2 - 0,12445 \times T + 1,70074)})$	0,09
[1,0-1,2]	$C_{TCA}(t) = (0,27304 + 0,04203 \times T) \times (1 - e^{-t(0,00125 \times T^2 - 0,06446 \times T + 1,34240)})$	0,2
[1,4-2,0]	$C_{TCA}(t) = (0,42352 + 0,04493 \times T) \times (1 - e^{-t(0,00231 \times T^2 - 0,09241 \times T + 1,09246)})$	0,1
< 0,5	$C_{TCA}(t) = (0,27537 + 0,04327 \times T) \times (1 - e^{-t(0,00482 \times T^2 - 0,18504 \times T + 1,92006)})$	0,2
[0,5-1,0]	$C_{TCA}(t) = (0,50792 + 0,03368 \times T) \times (1 - e^{-t(0,00322 \times T^2 - 0,11198 \times T + 1,14200)})$	0,09

De seguida, representaram-se graficamente os pontos experimentais com as respetivas linhas ajustadas (desta vez pelo modelo global) para cada uma das diferentes gamas de concentração. Estes gráficos encontram-se ilustrados nas Figuras 4.6 a 4.10.

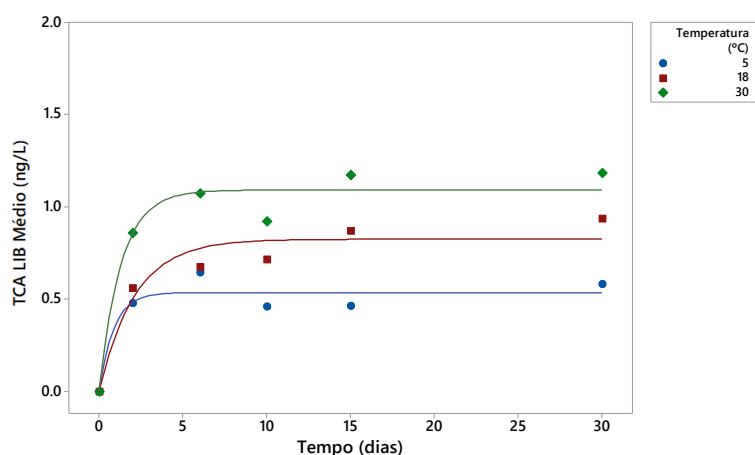


Figura 4.6. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [0,6-0,8].

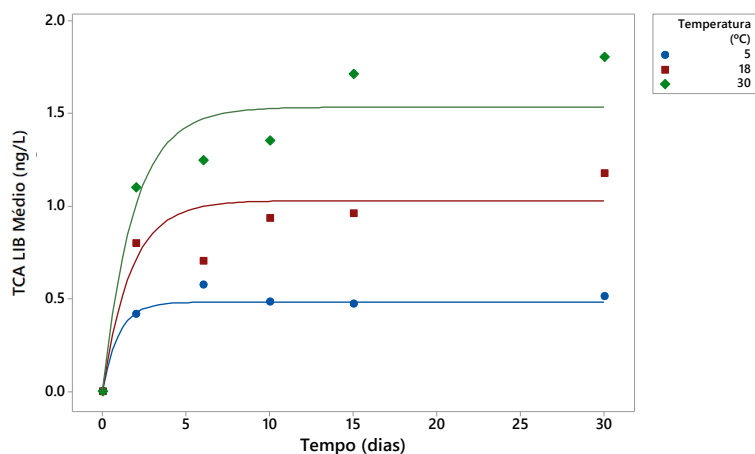


Figura 4.7. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [1,0-1,2].

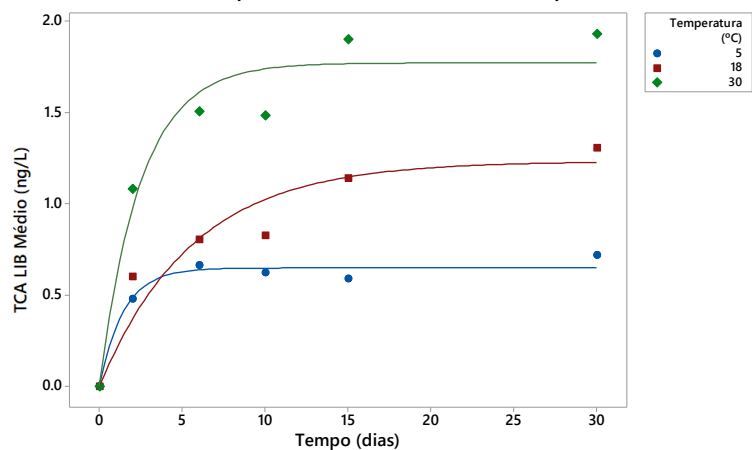


Figura 4.8. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [1,4-2,0].

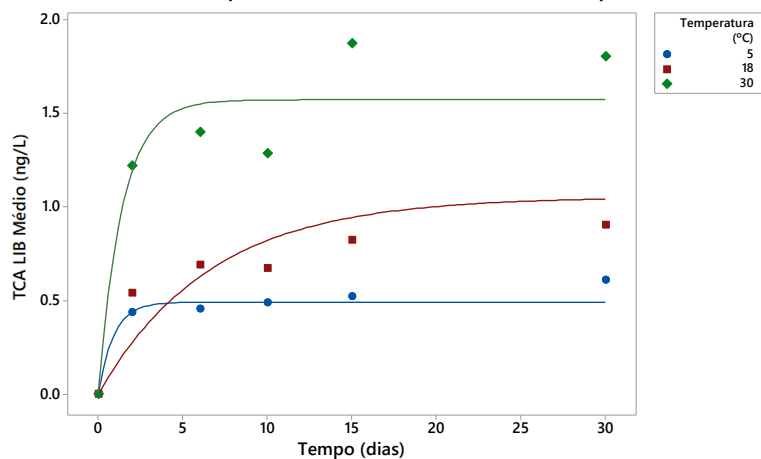


Figura 4.9. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama < 0,5.

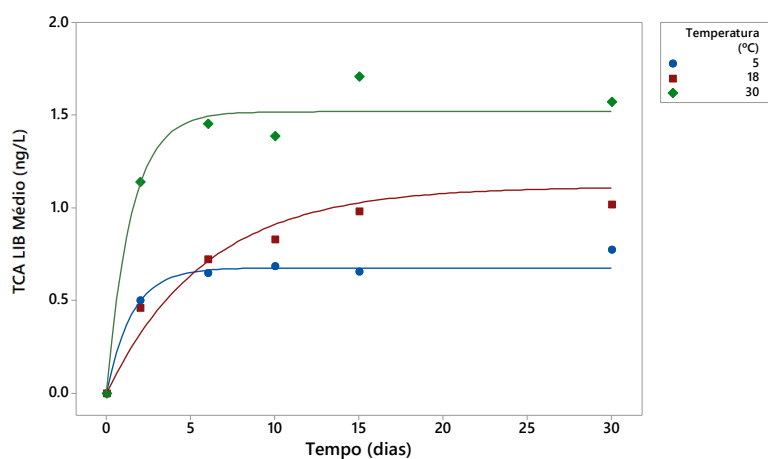


Figura 4.10. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo global para a gama [0,5-1,0].

Através da análise dos gráficos das Figuras 4.6 a 4.10 observa-se que para as gamas de concentração mais baixas, [0,6-0,8] (Figura 4.6) e <0,5 (Figura 4.9), a previsão é que a estabilização se dê a partir do 6º dia enquanto que para as restantes gamas de concentração, mais altas, a previsão é de uma estabilização apenas após o 10º dia. Os valores do erro padrão estimado do ajuste (S) apresentados na Tabela 4.3 demonstram que o modelo ajusta melhor os pontos experimentais para as gamas de concentração [0,6-0,8] (método TOF-MS) e [0,5-1,0] (método HS-GC-MS), uma vez que o valor de S é o menor (0,09 ng/L). Pelo contrário, o pior ajuste verifica-se para os pontos experimentais relativos às gamas de concentração [1,0-1,2] e <0,5, com o maior valor de S observado (0,2 ng/L).

Torna-se assim possível calcular, para rolhas classificadas pelos sistemas de deteção unitária referenciados - HS-GC-MS e TOF-MS -, ao fim de quanto tempo se atinge uma determinada concentração de TCA num vinho. Uma vez conhecida a temperatura à qual a rolha vai estar sujeita - 5, 18 e 30°C - e sabendo a gama de concentração a que a rolha pertence - entre as 5 gamas consideradas neste projeto - seleciona-se a equação correta da Tabela 4.3 e, resolvendo-a em ordem à variável t , substitui-se na equação a temperatura e a concentração de TCA que se pretende atingir. Considerando como concentrações críticas de TCA no vinho 0,5 ng/L (limiar de deteção sensorial), 1,0 ng/L e 2 ng/L (limiar de rejeição sensorial), os tempos (teóricos e experimentais) após os quais as rolhas (pertencentes às diferentes gamas de concentração) atingem estas concentrações referidas, para cada uma das três temperaturas consideradas, encontram-se apresentados nas Tabelas 4.4 a 4.6.

Tabela 4.4- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 5 °C

Gama de Concentração	Tempo experimental (dias)	Tempo teórico (dias)
	0,5 (ng/L)	0,5 (ng/L)
[0,6-0,8]	2	32
[1,0-1,2]	-	-
[1,4-2,0]	2	32
<0,5	-	-
[0,5-1,0]	2	32

Tabela 4.5- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 18 °C

Gama de Concentração	Tempo experimental (dias)		Tempo teórico (dias)	
	0,5 (ng/L)	1,0 (ng/L)	0,5 (ng/L)	1,0 (ng/L)
[0,6-0,8]	2	-	32	-
[1,0-1,2]	1	6	29	45
[1,4-2,0]	3	9	36	55
<0,5	4	20	39	90
[0,5-1,0]	4	13	39	67

Tabela 4.6- Tempos experimentais e teóricos em que se atingem as concentrações críticas para 30 °C

Gama de Concentração	Tempo experimental (dias)		Tempo teórico (dias)	
	0,5 (ng/L)	1,0 (ng/L)	0,5 (ng/L)	1,0 (ng/L)
[0,6-0,8]	1	3	29	36
[1,0-1,2]	1	2	29	32
[1,4-2,0]	1	2	29	32
<0,5	0,5	1	28	90
[0,5-1,0]	1	2	29	32

Verificou-se que para as temperaturas consideradas, a concentração de 2,0 ng/L nunca é atingida. É de notar também que para a temperatura de 5°C, apenas a concentração de 0,5 ng/L é atingida - é, como demonstrado anteriormente, uma temperatura de inibição de cedência - e que a 30°C estas concentrações são atingidas quase instantaneamente. Estes resultados aplicam-se apenas a situações em que a rolha está totalmente imersa no vinho.

Apesar da análise dos gráficos apresentados e do estudo feito aos parâmetros do modelo escolhido sugerirem que o mesmo ajusta corretamente os pontos experimentais obtidos até ao momento, é ainda prematuro tirar conclusões sobre estas previsões porque não foi estudada a capacidade preditiva do modelo a novas observações.

4.3 Relação entre o TCA Libertável e o TCA Total

De modo a ser possível estudar a relação entre o TCA Libertável e o TCA Total foi então necessário analisar os resultados obtidos do Plano Destrutivo. No entanto, uma vez que as rolhas utilizadas neste plano não foram submetidas à primeira maceração de deteção do TCA libertável, determinou-se a média dos valores obtidos a partir da maceração das rolhas utilizadas no ensaio descrito na Secção 3.2 deste Capítulo (Tabela B.1 do Apêndice B), para as gamas utilizadas neste plano - [0,6 - 0,8] e [1,0 - 1,2] - e considerou-se a mesma como sendo a concentração de referência de TCA libertável. O mesmo foi feito para os valores de TCA total, sendo então a concentração de referência dos mesmos a média dos valores apresentados na Tabela C.1 do Apêndice C. A caracterização destas rolhas encontra-se resumida na Tabela 4.7.

Tabela 4.7- Caracterização das rolhas pertencentes às gamas [0,6-0,8] e [1,0-1,2]

TCA	Gama de concentração (ng/L)	Nº de amostras	Valor médio	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)	Intervalo de Confiança a 95 % para o valor médio
Libertável	[0,6-0,8]	39	0,330	0,158	48	(0,280; 0,382)
	[1,0-1,2]	39	0,360	0,126	35	(0,322; 0,405)
Total	[0,6-0,8]	16	1,89	0,599	32	(1,56; 2,22)
	[1,0-1,2]	16	2,04	0,317	16	(1,87; 2,22)

*As unidades do valor médio, desvio padrão e intervalo de confiança são ng/L e ng/g para o TCA Libertável e o TCA Total, respetivamente.

É de notar que o coeficiente de variação relativo ao TCA libertável das rolhas é bastante elevado (principalmente para as rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8]), o que pode ser justificado pelo facto dos valores obtidos de TCA Libertável desta gama serem baixos e estarem muito próximos do limite de deteção e quantificação - 0,2 e 0,3 ng/L, respetivamente - do equipamento, pelo que o erro associado ao método de leitura/medição é maior.

4.3.1 Determinação dos fatores que influenciam a evolução da migração do TCA das rolhas para o vinho

Tendo então como foco de análise o Plano Destrutivo, os resultados de TCA libertável obtidos para os diferentes períodos de maceração estipulados bem como os valores de TCA Total de cada uma das rolhas, encontram-se listados na Tabela G.1 e Tabela G.2 do Apêndice G, respetivamente, tendo os valores considerados atípicos - *outliers* - sido retirados.

Considerando a temperatura, a gama de concentração inicial e a duração de maceração como os 3 fatores com potencial influência na evolução da migração do TCA libertável e de modo a tentar entender qual o comportamento do TCA Total nesta evolução, foram realizadas duas análises de variância (ANOVA), uma para os valores de TCA libertável obtidos para cada rolha e a segunda para os valores de TCA Total que cada uma dessas rolhas continha.

Relativamente ao TCA Libertável, o valor de prova obtido para cada um destes fatores, individualmente e respetivas interações encontra-se apresentado na Tabela 4.8.

Tabela 4.8- Valor de prova para valores individuais e com interação entre os 3 fatores- TCA Libertável

Fatores	Valor de prova
Gama de Concentração	$< 10^{-4}$
Temperatura	$< 10^{-7}$
Duração	$< 10^{-3}$
Gama de Concentração x Temperatura	0,031
Gama de Concentração x Duração	0,028
Temperatura x Duração	0,445
Gama x Temperatura x Duração	0,857

Através da análise da Tabela 4.8, verifica-se que considerando os fatores individualmente a gama de concentração, a temperatura e a duração afetam a resposta considerada - TCA libertável - uma vez que o valor de prova é inferior ao nível de significância 0,05. No entanto, conclui-se que também existe influência quando são combinados dois fatores, neste caso a gama de concentração com a temperatura e a gama de concentração com a duração.

Na Figura 4.11 encontram-se apresentados três gráficos de efeitos principais que representam a resposta média de cada nível de fator ligada por uma linha, ilustrando assim a variação dos valores médios de TCA Libertável obtidos em função das duas gamas de concentração, temperatura e duração. A linha de referência presente nos gráficos representa a média global.

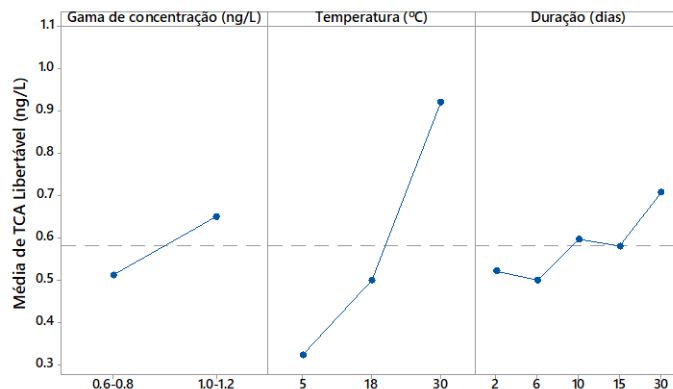


Figura 4.11. Gráfico de efeitos principais para o TCA Libertável.

Estes gráficos de efeitos principais demonstram que a gama de concentração, a temperatura e a duração são fatores cujos diferentes níveis afetam a resposta de maneira diferente - a linha presente nos gráficos não é horizontal, ou seja, paralela ao eixo do x - sendo que a temperatura é o fator com maior influência uma vez que a amplitude entre níveis é maior (Montgomery, 2017).

A análise dos gráficos permite verificar que as rolhas pertencentes à gama de concentração mais elevada libertam em média mais TCA para o vinho o que permite concluir que esta caracterização das rolhas feita através do método de deteção unitária TOF-MS foi correta, apresentando por isso utilidade para prevenção do potencial de libertação de TCA. No que diz respeito à temperatura, observa-se um aumento significativo de libertação de TCA com o aumento da temperatura, sendo que os valores médios de TCA Libertável obtidos nos frascos da estufa (a 30°C) são bastante superiores aos dos frascos que foram mantidos no frigorífico (a 5 °C). Relativamente à duração, verifica-se que, em média, as rolhas mantidas nos frascos durante 30 dias libertaram mais TCA do que as restantes.

Uma vez que a ANOVA permitiu concluir também que existe uma interação significativa entre a gama e a temperatura bem como entre a gama e a duração, torna-se vantajoso analisar os gráficos de interação para TCA libertável com médias ajustadas pelo modelo ANOVA, de maneira a facilitar a interpretação dos resultados. A Figura 4.12 ilustra o efeito da temperatura e da gama de concentração nos valores médios de TCA libertável obtidos.

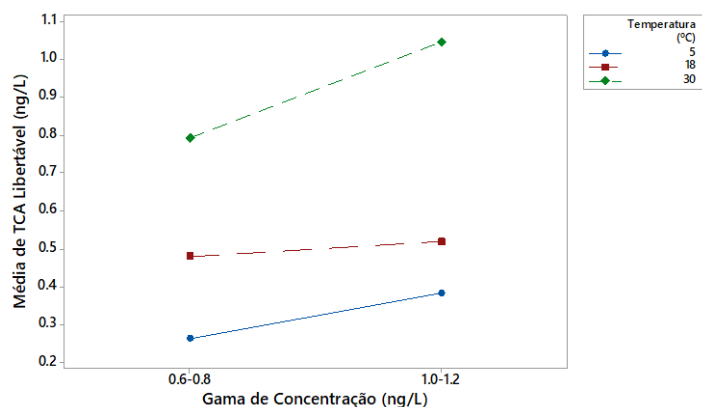


Figura 4.12. Visualização gráfica da interação da Gama de Concentração e da Temperatura nos valores médios de TCA libertável.

Este gráfico mostra que o efeito da temperatura sobre a quantidade de TCA Libertável não é o mesmo para as duas gamas de concentração consideradas neste Plano Destrutivo (não existe paralelismo entre as linhas). No entanto, como concluído anteriormente, os valores mais baixos de TCA libertável obtêm-se sempre para temperaturas mais baixas, independentemente da gama de concentração a que as rolhas pertencem.

Como verificado na ANOVA, a gama de concentração também apresenta influência quando combinada com a duração, estando o efeito desta combinação ilustrado na Figura 4.13.

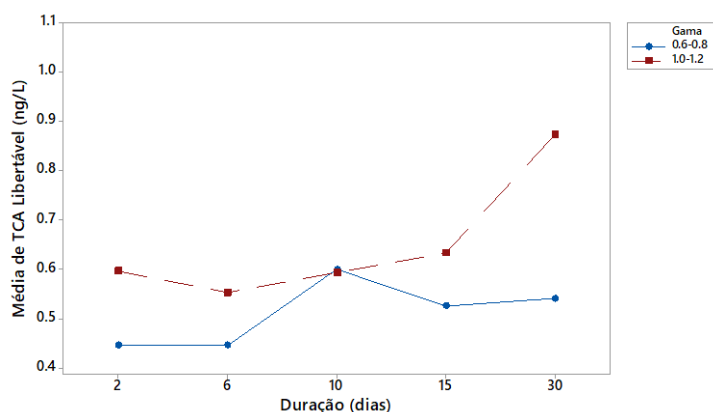


Figura 4.13. Visualização gráfica da interação da Gama e da Duração nos valores médios de TCA libertável.

Através da análise do gráfico verifica-se que a partir de 10 dias as rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8] têm um comportamento diferente das rolhas da gama [1,0-1,2]. Rolhas pertencentes à gama mais baixa apresentam um decréscimo de TCA Libertável entre 10 e 15 dias e o mesmo mantém-se praticamente constante (com variações pouco significativas) até ao final do estudo (30 dias). No entanto, rolhas pertencentes à gama mais elevada apresentam um aumento contínuo de libertação de TCA.

Na Figura 4.14 encontram-se apresentados gráficos que representam a variação do TCA Libertável médio ao longo do tempo para as duas gamas consideradas, em função da temperatura. Pode concluir-se que as rolhas pertencentes à gama [1,0-1,2] tiveram um comportamento semelhante para as 3 temperaturas, sendo visível que a libertação de TCA foi praticamente sempre crescente ao longo do tempo, verificando-se, no entanto, um aumento da taxa de crescimento com o aumento da temperatura. O valor máximo é atingido ao fim de 30 dias para os frascos que foram mantidos na estufa (a 30°C), sendo que este valor máximo (1,4 ng/L) é superior àquele que o método TOF-MS tinha estabelecido (1,2 ng/L), tendo isto apenas sido verificado para a temperatura de 30°C.

Por sua vez, as rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8] não apresentam uma libertação de TCA significativamente crescente ao longo do tempo, sendo os valores obtidos bastante próximos para os diferentes períodos de tempo de maceração. No entanto, situam-se em patamares crescentes à medida que a temperatura aumenta, sendo que o valor máximo obtido é de 0,8 ng/L após 30 dias no patamar de temperatura de 30°C. Este valor corresponde ao limite superior estabelecido pelo método TOF-MS para esta gama de concentração. A análise do gráfico sugere uma tendência de estabilização a partir de 15 dias.

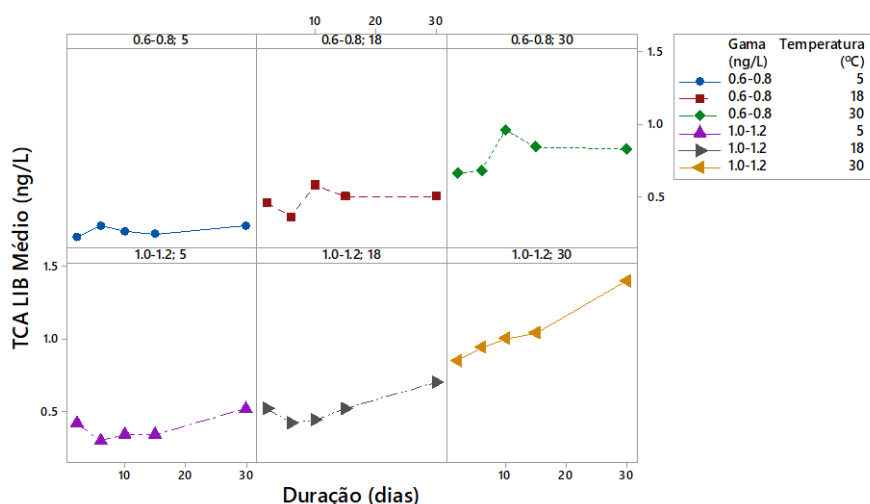


Figura 4.14. Visualização gráfica da variação dos valores médios de TCA Libertável ao longo do tempo para cada gama de concentração e temperatura.

Como referido anteriormente, foi feita uma média dos valores de TCA Libertável obtidos a partir das macerações iniciais das rolhas utilizadas no plano Não-Destrutivo para cada uma das gamas de concentração consideradas neste projeto, de modo a obter valores de referência para as rolhas utilizadas neste projeto (Tabela 4.7). O valor médio obtido para o TCA Libertável de rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8] (método TOF-MS) foi então $0,330 \pm 0,158$ ng/L e, analisando a Tabela G.3 do Apêndice G, é possível concluir que apenas para a temperatura de 5°C o valor médio obtido foi inferior a 0,33 ng/L, tendo sido significativamente superior para as temperaturas de 18 e 30°C. O mesmo se verificou para a gama [1,0-1,2], cujo valor médio

obtido tinha sido de $0,360 \pm 0,126$ ng/L. A temperatura é, por isso, um fator de extrema importância para a evolução da cedência do TCA e é imperativo que a mesma seja devidamente controlada após o rolhamento das garrafas para que a caracterização feita pelos sistemas de detecção unitária de TCA seja fiável e concordante.

De maneira a verificar os pressupostos da ANOVA realizada - variância constante, normalidade e independência dos erros aleatórios - efetuou-se uma análise dos resíduos, cujos gráficos se encontram apresentados na Figura H.1 do Apêndice H. Esta análise dos resíduos permitiu concluir que não existem desvios significativos ao pressuposto da normalidade dos erros aleatórios, verificando-se que os valores residuais seguem uma distribuição normal uma vez que os valores se encontram próximos da reta - Figura H.1 A. Por sua vez, existe aleatoriedade na distribuição dos pontos em torno da reta horizontal - Figura H.1 B - não apresentando nenhum padrão, o que permite concluir que o pressuposto da variância constante dos erros aleatórios também se verifica. Por fim, verifica-se que não existe nenhuma tendência relativamente ao comportamento dos valores residuais pelo que se confirma a independência dos erros aleatórios - Figura H.1 D.

4.3.2 Determinação dos fatores que influenciam a quantidade total de TCA presente nas rolhas

Relativamente ao TCA Total, o valor de prova obtido para cada um destes fatores, individualmente e com interação entre os mesmos, encontra-se apresentado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9- Valor de prova para valores individuais e com interação entre os 3 fatores- TCA Total

Fatores	Valor de prova
Gama de Concentração	$< 10^{-4}$
Temperatura	0,926
Duração	0,782
Gama de Concentração x Temperatura	0,171
Gama de Concentração x Duração	0,914
Temperatura x Duração	0,109
Gama x Temperatura x Duração	0,548

Então, no caso do TCA Total verifica-se que apenas a gama de concentração apresenta um valor de prova inferior ao nível de significância 0,05 o que permite concluir que apenas este fator tem influência na quantidade total de TCA presente nas rolhas.

Os três gráficos de efeitos principais para este caso, que ilustram a variação dos valores médios de TCA Total obtidos em função das duas gamas, temperaturas e duração encontram-se apresentados na Figura 4.15.

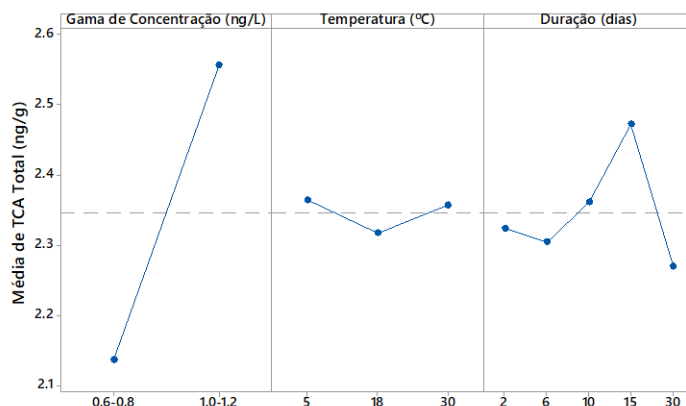


Figura 4.15. Gráfico de efeitos principais para o TCA Total com médias ajustadas.

A análise do gráfico permite concluir que a avaliação feita pelo método TOF-MS é coerente uma vez que rolhas pertencentes à gama de concentração mais baixa possuem, em média, menos TCA Total que as da gama mais elevada, confirmando-se assim a fiabilidade da tecnologia em questão.

Por sua vez, e contrariamente ao que se verificou para o TCA Libertável (que apresenta uma evolução claramente favorecida pelo aumento da temperatura), o mesmo não se verifica para a quantidade de TCA intrínseco presente nas rolhas, que não é afetada pela temperatura. Este resultado pode ser explicado pelo facto da cortiça ser um material que apresenta excelentes propriedades de isolamento térmico, o que a torna resistente à transferência de calor. Por este motivo, rolhas que permaneceram em diferentes regimes de temperatura não apresentam diferenças significativas no seu valor de TCA Total e a temperatura não é um fator determinante que influencie a migração do TCA intrínseco para as camadas mais superficiais da rolha. Finalmente, verifica-se que para uma rolha de cortiça aglomerada, o tempo de maceração em frasco não tem influência no TCA Total que as mesmas apresentam, não ocorrendo uma diminuição do mesmo ao longo do tempo. Ou seja, os resultados obtidos não sugerem que o facto das rolhas estarem mais tempo em maceração leva a que o TCA intrínseco das mesmas migre para as extremidades da rolha e se converta assim em TCA libertável. Este resultado pode ser explicado pela natureza do material compósito que constitui a rolha de cortiça, uma vez que o corpo aglomerado das rolhas tem na sua formulação uma resina de poliuretano que confere uma barreira à transferência de massa entre as camadas mais interiores da rolha e as suas camadas mais superficiais. De forma análoga ao que foi feito para os valores obtidos de TCA Total referentes às rolhas utilizadas no ensaio descrito na Secção 3.3 do Capítulo 3 (representados na Tabela 3.3), procedeu-se à caracterização estatística dos valores de TCA Total obtidos no Plano Destrutivo, conforme apresentado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- Caracterização de rolhas utilizadas no Plano Destrutivo, pertencentes às gamas [0,6-0,8] e [1,0-1,2]

TCA	Gama de concentração (ng/L)	Nº de amostras	Valor médio (ng/g)	Desvio Padrão (ng/g)	Coeficiente de variação (%)	Intervalo de Confiança a 95 % para o valor médio (ng/g)
Total	[0,6-0,8]	74	2,14	0,624	29	(1,99; 2,28)
	[1,0-1,2]	70	2,57	0,625	24	(2,42; 2,72)

Comparando os valores apresentados na Tabela 4.10 com os da Tabela 4.7, conclui-se que não existe um comportamento padrão para as rolhas no que diz respeito à quantidade de TCA Total que as mesmas apresentam. Para rolhas da gama [1,0-1,2] o valor médio é $2,04 \pm 0,317$ ng/g rolha (Tabela 4.7) e verifica-se que as rolhas do Plano Destrutivo pertencentes a esta gama apresentam um valor médio apenas ligeiramente superior, de $2,14 \pm 0,625$ ng/g. A diferença mais acentuada relativamente aos valores médios verifica-se para a gama mais baixa, [0,6-0,8], cujo valor médio de referência é $1,89 \pm 0,599$ ng/g e, no Plano Destrutivo, tem um valor de $2,57 \pm 0,624$ ng/g. Se a quantidade total de TCA presente numa rolha aglomerada de cortiça se convertesse ao longo do tempo em TCA Libertável, iria verificar-se que rolhas que estiveram a macerar, tendo libertado TCA para o vinho, apresentam valores inferiores de TCA total e, por isso, um menor valor médio (o que não se verificou). É de notar, no entanto, que a amostragem é significativamente diferente.

As Figuras 4.16 e 4.17 representam a visualização gráfica da fração de TCA Total da rolha que se transfere para o vinho em forma de TCA Libertável, para os diferentes períodos de maceração e para as diferentes temperaturas, para a gama [0,6-0,8] e a gama [1,0-1,2], respetivamente. As unidades dos valores de TCA Libertável foram convertidas em ng/g rolha - unidades do TCA Total.

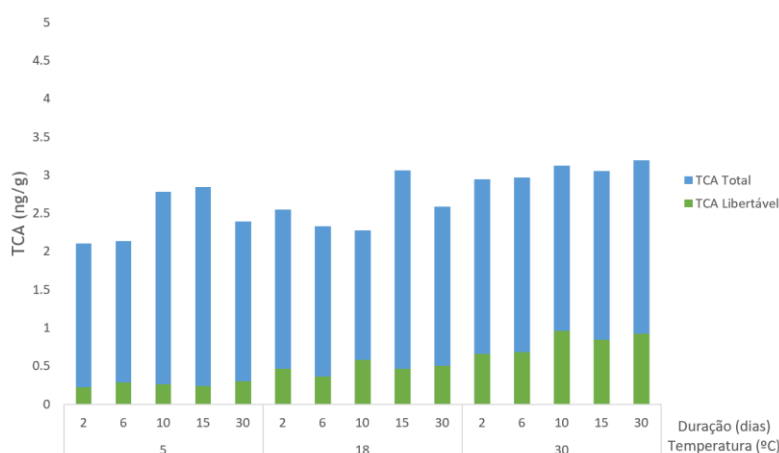


Figura 4.16. Visualização gráfica da fração de TCA Total que se liberta para o vinho em forma de TCA Libertável para rolhas pertencentes à gama [0,6-0,8].

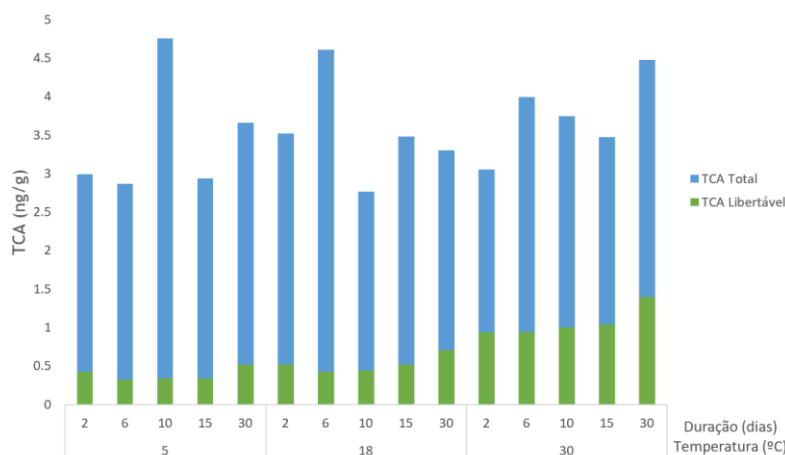


Figura 4.17. Visualização gráfica da fração de TCA Total que se liberta para o vinho em forma de TCA Libertável para rolhas pertencentes à gama [1,0-1,2].

A análise destes gráficos permite verificar que o TCA que se liberta para o vinho é efetivamente uma fração muito reduzida da totalidade de TCA existente na rolha. O TCA intrínseco, como visto anteriormente, é superior nas rolhas pertencentes à gama de concentração mais elevada, [1,0-1,2], no entanto, não se verifica um aumento muito significativo relativamente à fração deste TCA que se liberta para o vinho comparativamente com a gama de concentração mais baixa, [0,6-0,8]. É de notar que o aumento ligeiro da fração de TCA Total que se liberta para o vinho à temperatura de 30 °C comparativamente com a de 5 e 18 °C se deve ao facto do TCA Libertável aumentar (a evolução da cedência é, como demonstrado anteriormente, favorecida pelo aumento da temperatura) e não pela diminuição do TCA Total. Uma possível justificação para tal é que a rolha, após ter passado pelo sistema de inspeção unitária, sofreu então ligeiras alterações estruturais (expansão da rolha e aumento da porosidade, por exemplo) o que leva a que seja plausível acreditar que o aumento do TCA libertável tenha sido favorecido por estas alterações nas propriedades das rolhas sem, no entanto, provocar uma redução acentuada do teor de TCA intrínseco que, à partida, apresentava também valores muito baixos.

De modo a validar as conclusões retiradas da ANOVA realizada aos valores de TCA Total efetuou-se outra análise dos resíduos, cujos gráficos se encontram apresentados na Figura H.2 do Apêndice H. Esta análise dos resíduos permitiu concluir que todos os pressupostos da ANOVA relativamente aos valores de TCA Total (de forma análoga ao que se verificou para os valores de TCA Libertável) se verificam.

5 Conclusões

A presente Dissertação teve como principal objetivo estudar a evolução da migração do composto 2,4,6-tricloroanisol de rolhas A2D, previamente analisadas por duas tecnologias de detecção unitária de TCA (métodos instrumentais de análise adaptados a ensaios de alta rotina), sendo estas o HS-GC-MS e o TOF-MS. Estas tecnologias classificam as rolhas com base na sua concentração de TCA, permitindo assim obter diferentes níveis de qualidade. O problema inicial incidiu no facto de atualmente não ser ainda conhecido o comportamento a longo prazo destas rolhas, após passagem nas tecnologias de detecção unitária (onde sofrem um processo de dessorção térmica), havendo por isso a necessidade de o estudar, de modo a ser possível obter uma estimativa do tempo a partir do qual estas rolhas poderão interferir com as propriedades organoléticas de um vinho efervescente.

Deste modo, para a realização do estudo referido, foram desenvolvidos planos experimentais que utilizaram as condições de migração preconizadas na norma ISO 13302:2003, simulando assim períodos de contacto das rolhas com o vinho entre 4 semanas e 4 meses. As rolhas utilizadas pertenciam a diferentes gamas de concentração de TCA (estando assim caracterizadas consoante a quantidade de TCA que têm tendência a libertar, segundo as tecnologias de detecção unitária consideradas) e estiveram sujeitas a três temperaturas diferentes - que simularam três possíveis cenários aos quais as garrafas vedadas com estas rolhas poderão estar sujeitas (refrigeração, acondicionamento em cave e transporte em ambientes quentes) - durante diferentes períodos de duração de contacto das rolhas com o vinho. Foram realizados dois planos, um deles com o intuito de estudar apenas a evolução da migração do TCA libertável das rolhas - Plano Não-Destrutivo - e o outro que permitiu tirar conclusões relativamente ao TCA total das rolhas - Plano Destrutivo.

Os resultados obtidos do Plano Não-Destrutivo levaram ao desenvolvimento de um modelo matemático de ajuste que permite prever, para rolhas classificadas por estes dois sistemas de detecção e para as temperaturas consideradas 5, 18 e 30°C, ao fim de quanto tempo se poderá atingir uma determinada concentração de TCA num vinho. Estes resultados, juntamente com os resultados de TCA libertável obtidos do Plano Destrutivo, permitiram também concluir que para garrafas que sejam armazenadas em cave (temperaturas de cerca de 18°C) a avaliação feita pelas tecnologias de detecção unitária é robusta e fiável, sendo que as rolhas apresentaram uma libertação de TCA pertencente ao intervalo da gama que lhes corresponde. À temperatura de 18°C, a evolução da cedência sugere uma estabilização após 15 dias de maceração para ambas as gamas de concentração do método HS-GC-MS ($[0,5-1,0]$ e $<0,5$) bem como para a gama de concentração mais baixa do método TOF-MS ($[0,6-0,8]$) pelo que as rolhas pertencentes a estas gamas de concentração não sugerem que a dessorção térmica que as rolhas sofrem no

interior dos equipamentos de medição unitária de TCA apresenta efeitos negativos nas mesmas nem no seu posterior comportamento. Contudo, verificou-se que para esta mesma temperatura, as rolhas pertencentes às gamas de concentração [1,0-1,2] e [1,4-2,0] do método TOF-MS não estabilizam a partir do 15º dia.

Conclui-se, no entanto, que a temperatura de 30°C é crítica na medida em que rolhas sujeitas a esta temperatura têm a sua evolução de cedência significativamente alterada e libertam uma quantidade de TCA para o vinho bastante superior, tendo-se verificado que apenas as rolhas pertencentes à gama de concentração mais elevada do método TOF-MS ([1,4-2,0]) tiveram libertações de TCA inferiores ao limite máximo estabelecido. Uma vez que rolhas pertencentes a esta gama de concentração são, à partida, consideradas produto não-conforme pela empresa (que não são, por isso, comercializadas) então é crítico que as rolhas pertencentes às gamas de concentração mais baixas, que são gamas de conformidade, libertem quantidades tão elevadas de TCA a esta temperatura. É, por isso, de extrema importância controlar a temperatura à qual as garrafas vedadas com as rolhas estarão sujeitas de modo a garantir que o vinho não fica potencialmente contaminado.

Finalmente, o estudo realizado da totalidade de TCA presente nas rolhas - TCA total - demonstrou que, contrariamente ao que se esperava, não existe uma relação linear entre o mesmo e o TCA libertável. Ou seja, o TCA total presente nas rolhas não aumenta nem diminui com o tempo nem com a temperatura a que a rolha está sujeita, não sendo possível verificar se o mesmo se converte em TCA libertável ao longo do tempo. No entanto, rolhas pertencentes a gamas de concentração mais elevadas - e, por isso, com maior potencial de libertação de TCA - apresentam uma quantidade superior de TCA total comparativamente com as rolhas pertencentes às gamas de concentração mais baixas.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Um dos principais objetivos deste trabalho foi o estudo da evolução da migração do composto 2,4,6-tricloroanisol a partir de rolhas A2D que foram previamente analisadas por dois sistemas de detecção unitária de TCA, com intuito de avaliar a fiabilidade e robustez de ambos os sistemas de detecção. Este objetivo foi conseguido através de ensaios experimentais que promoveram o contacto de longa duração de rolhas (pertencentes a diferentes gamas de concentração) com o vinho. O outro grande objetivo deste projeto consistiu no desenvolvimento de um modelo matemático que permite estimar a quantidade de TCA libertada num vinho ao final de um determinado período de tempo, de modo a antecipar se durante o tempo de prateleira da bebida efervescente poderá vir a existir um risco acrescido relativamente à migração de TCA. No entanto, o modelo desenvolvido é apenas um ajuste aos resultados experimentais obtidos.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante o estágio curricular, foi acompanhada a rotina diária do laboratório da Relvas II, S.A. tendo a autora desta dissertação cooperado no trabalho desenvolvido pela empresa para análise de TCA presente nas rolhas de cortiça e contribuído para alguns projetos paralelos da empresa, como o estudo do impacto que a perda de CO₂ num vinho apresenta na forma da rolha quando a mesma é retirada de uma garrafa de espumante.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Nesta dissertação a grande limitação foi o tempo. Uma vez que para ser possível chegar a conclusões estatisticamente significativas foi necessário estudar uma elevada quantidade de rolhas - pertencentes a diferentes gamas de concentração -, não foi possível realizar um plano de experiências para o estudo contínuo da migração de TCA superior a 30 dias. Neste momento, o modelo matemático apresentado neste trabalho ajusta os resultados obtidos para os 30 dias, pelo que como trabalho futuro sugere-se continuar o estudo para tempos de maceração superiores a 30 dias, de modo a comprovar os resultados que se obtêm com este modelo e assim poder validar o mesmo. Seria também interessante para o estudo futuro que se fizessem medições de TCA para intervalos de tempo menores nos 5 primeiros dias de maceração - com diferenças de horas entre cada medição - de modo a compreender melhor a evolução da cedência destas rolhas nos primeiros momentos de contacto com o vinho.

Referências

- Ambientes Geográficos [online]. Disponível em: <http://ambientesgeograficos.blogspot.com/> [acedido em maio de 2021].
- AMORIM [online]. Disponível em: <http://www.amorim.com/> [acedido em março de 2021].
- APCOR - Associação Portuguesa da Cortiça [online]. Disponível em: <https://www.apcor.pt/> [acedido em março de 2021].
- Afonso, C. J. P. *Extração supercrítica de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e de compostos bioativos presentes na cortiça natural e sua retenção em polímeros molecularmente impressos*. Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, 2018.
- Bicho, M. (2003). *A Rolha de Cortiça da floresta à utilização*, 1ª Edição. Santa Maria de Lamas. APCOR.
- Brigada da Floresta [online]. Disponível em: <https://brigadadafloresta.abae.pt/> [acedido em fevereiro de 2021].
- Cappellin, L., Lopez-Hilfiker, F. D., Pospisilova, V., Ciotti, L., Pastore, P., Gonin, M., & Hutterli, M. A. (2020). Thermal Desorption-Vocus Enables Online Nondestructive Quantification of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Stoppers below the Perception Threshold. *Analytical Chemistry*, 92(14), 9823-9829. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01326>.
- Cordeiro, N. M. A. *Fraccionamento da cortiça e caracterização dos seus componentes. Estudo de possibilidade de valorização da suberina*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 1998.
- Cravero, M. C. (2020). Musty and moldy taint in wines: A review. In *Beverages* (Vol. 6, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/beverages6020041>.
- Cravero, M. C., Bonello, F., del Pazo Alvarez, M., Tsolakis, C., & Borsa, D. (2015). The sensory evaluation of 2,4,6-trichloroanisole in wines. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3). <https://doi.org/10.1002/jib.230>.
- Fontana, A. R. (2012). Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 37, 135-147. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.012>.
- Guimarães, I. *Deteção individual de TCA em rolhas de cortiça: otimização de um sistema para análise de rolhas naturais*. Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2015.
- ISO 13302 (2003). *Sensory analysis – Methods for assessing modifications to the flavour of foodstuffs due to packaging*. 1ª Edição.

- ISO 5492 (2008). Análise Sensorial- Vocabulário. 2ª Edição.
- ISO 20752 (2014). Rolhas de Cortiça- Determinação do 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) libertável. 2ª Edição.
- Welty, J. R., Rorrer, G. L., Foster, D. G. (2015). Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer, 6th Edition. Oregon. In *John Wiley & Sons, Inc.*
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments, 9th Edition*. Arizona. In *John Wiley & Sons, Inc.*
- Nuno, C., Costa, S. *Otimização de equipamento industrial para a quantificação de 2,4,6 - Tricloroanisol*. Tese de Mestrado, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2012.
- Pereira, M., Sara, J. *Otimização de Revestimentos Poliméricos em Rolhas de Cortiça Natural*. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2014.
- Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., Kim, S. (2005). Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, 16(4). <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.05.010>.
- Pubchem [online]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [acedido em junho de 2021].
- Relvas II - Rolhas de Champanhe S.A. [online]. Disponível em: <http://http://relvascork.com/website/> [acedido em fevereiro de 2021].
- Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., Reis, R. L. (2005). Cork: Properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50(6). <https://doi.org/10.1179/174328005X41168>.
- Tarasov, A., Rauhut, D., & Jung, R. (2017). “Cork taint” responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review. *Talanta*, 175(March), 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.029>.

Apêndice A Equipamento cromatográfico e método utilizado para análise de TCA

Equipamento:

- Cromatógrafo gasoso agregado a espectrometria de massa: Agilent GCMS - 7890A/5975C
- Auto-sampler: CombiPAL (Pal Loader Versão 2.1.1) equipado com um módulo SPME que permite que a introdução e extração das amostras seja contínua e automática
- Programa de aquisição e integração de dados: *Enhanced Data Analysis MSD Chemstation E.02.02.1431*
- Coluna: Agilent J&W, GC Columns HP5-MS com um comprimento de 30 m, um diâmetro interno de 0,25 mm e uma espessura de filme de 0,25 μm
- Fibra: SUPELCO, com 100 μm de revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS)
- Gás de arraste: Hélio



Figura A.1. Equipamento de análise por SPME-GC-MS: a) auto-sampler; b) MS; c) GC.

Método:

Após uma pré-incubação de 10 segundos a 35°C e uma velocidade de agitação da amostra a 250 rpm, dá-se a extração para a fibra que ocorre durante 15 minutos a 35°C e à mesma velocidade de agitação. Por fim, a dessorção dos compostos da fibra para o injetor dá-se durante 3 minutos a 270°C, em modo *splitless*. Após os 3 minutos de dessorção a válvula é fechada e inicia-se a purga com hélio a uma pressão de 0,15 bar e um caudal de 50 mL/min, iniciando-se a dessorção dos compostos para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos mesmos.

Apêndice B Valores iniciais de TCA Libertável

Na tabela estão apresentados os valores obtidos da concentração de TCA libertável presente nas 195 rolhas de cortiça utilizadas, pelo método de análise por SPME-GC-MS. É de notar que o limite de deteção (ld) e o limite de quantificação (lq) do equipamento utilizado para obtenção destes valores é 0,2 ppt e 0,3 ppt, respetivamente.

Tabela B.1- Valores obtidos da concentração de TCA libertável das rolhas selecionadas, por método de análise e respetiva gama de concentração

Número da Rolha	Método de Análise	Gama de concentração	TCA Libertável (ng/L)
1	HS-GC-MS	<0,5	0,3
2	HS-GC-MS	<0,5	0,3
3	HS-GC-MS	<0,5	0,3
4	HS-GC-MS	<0,5	0,3
5	HS-GC-MS	<0,5	0,4
6	HS-GC-MS	<0,5	0,3
7	HS-GC-MS	<0,5	0,4
8	HS-GC-MS	<0,5	0,4
9	HS-GC-MS	<0,5	0,5
10	HS-GC-MS	<0,5	0,3
11	HS-GC-MS	<0,5	0,4
12	HS-GC-MS	<0,5	0,4
13	HS-GC-MS	<0,5	0,4
14	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
15	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
16	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
17	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
18	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,3
19	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
20	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
21	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
22	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
23	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
24	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	1,0
25	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
26	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,4
67	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,6
82	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
133	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
135	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,1
148	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
152	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
199	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
206	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
208	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
266	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
335	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4

469	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
478	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
561	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
578	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
581	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,3
605	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
625	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
634	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
657	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,1
674	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
681	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
716	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
762	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
851	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
857	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,1
870	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,1
873	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
930	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
962	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
982	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
988	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
1025	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
1026	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
1062	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
1083	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
1112	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
1246	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
1253	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,0
27	HS-GC-MS	<0,5	0,2
28	HS-GC-MS	<0,5	0,2
29	HS-GC-MS	<0,5	0,2
30	HS-GC-MS	<0,5	0,9
31	HS-GC-MS	<0,5	0,5
33	HS-GC-MS	<0,5	0,6
34	HS-GC-MS	<0,5	0,6
35	HS-GC-MS	<0,5	0,6
36	HS-GC-MS	<0,5	0,5
37	HS-GC-MS	<0,5	0,4
38	HS-GC-MS	<0,5	0,4
39	HS-GC-MS	<0,5	0,5
40	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
41	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,8
42	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
43	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
44	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
45	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
46	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
47	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,8
48	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
49	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7

50	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
51	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
52	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
28	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
103	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
116	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
124	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5
172	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
177	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
202	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
271	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5
280	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
287	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
298	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
332	TOF-MS	[1,4-2,0]	1,1
400	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
402	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
417	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
487	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
577	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
672	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
682	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,3
720	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
731	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
749	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
759	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
788	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
794	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
804	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
807	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5
863	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,5
898	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
947	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,5
1038	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,5
1044	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
1045	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
1078	TOF-MS	[1,4-2,0]	1,6
1221	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
1224	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,5
1226	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
1243	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
1247	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,3
53	HS-GC-MS	<0,5	0,5
54	HS-GC-MS	<0,5	0,3
55	HS-GC-MS	<0,5	0,5
56	HS-GC-MS	<0,5	0,4
57	HS-GC-MS	<0,5	0,5
58	HS-GC-MS	<0,5	1,1
59	HS-GC-MS	<0,5	0,4
60	HS-GC-MS	<0,5	0,4

61	HS-GC-MS	<0,5	0,5
62	HS-GC-MS	<0,5	0,5
63	HS-GC-MS	<0,5	0,5
64	HS-GC-MS	<0,5	0,4
65	HS-GC-MS	<0,5	0,5
66	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
67	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
68	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
69	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
70	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
71	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
72	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
73	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
74	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
75	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,5
76	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,6
77	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
78	HS-GC-MS	[0,5-1,0]	0,7
14	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
435	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
491	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,8
572	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,3
585	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
609	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
645	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,7
666	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
684	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
703	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
727	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5
748	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,5
774	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5
816	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
887	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
935	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
996	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
1128	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
1153	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
1230	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,3
1232	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
1244	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,2
107	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
141	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
175	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,3
205	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,6
226	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,4
230	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,2
232	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
239	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
260	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
264	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3

265	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,2
268	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
276	TOF-MS	[1,0-1,2]	0,4
294	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
375	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,4
412	TOF-MS	[1,4-2,0]	0,3
413	TOF-MS	[0,6-0,8]	0,5

Apêndice C Valores obtidos de TCA Total

Na tabela estão apresentados os valores obtidos do TCA Total presente em 80 rolhas de cortiça que foram sujeitas previamente a métodos de análise instrumental para deteção unitária de TCA bem como ao método de análise por SPME-GC-MS que permitiu quantificar o TCA Libertável das mesmas. O limite de deteção (ld) e o limite de quantificação (lq) do equipamento utilizado para obtenção destes valores é 0,2 ppt e 0,3 ppt, respetivamente.

Tabela C.1- Valores obtidos do TCA Total presente nas rolhas seleccionadas

Número da Rolha	Massa da Rolha (g)	Massa dos grânulos (g)	TCA-SPME (ng/L)	TCA-Total (ng/g amostra)	TCA-Total (ng/g rolha)
107	6,661	6,091	43,10	1,415	1,294
1128	5,958	5,677	62,90	2,216	2,112
375	6,366	5,821	66,90	2,299	2,102
175	6,554	6,050	84,90	2,806	2,591
887	6,695	6,323	67,50	2,135	2,016
727	6,306	5,820	300,10	10,312	9,518
413	6,513	6,010	60,00	1,997	1,843
400	6,165	5,701	46,20	1,621	1,499
491	6,735	6,196	86,50	2,792	2,569
265	6,516	6,115	41,20	1,348	1,265
774	6,222	5,661	44,90	1,586	1,443
749	6,334	5,861	49,40	1,686	1,560
807	6,132	5,760	41,60	1,444	1,357
645	6,270	6,009	106,60	3,548	3,400
873	6,445	6,214	60,10	1,934	1,865
962	6,171	5,951	45,10	1,516	1,462
609	6,466	5,879	57,80	1,966	1,788
268	6,064	6,018	68,60	2,280	2,262
14	6,831	6,451	65,50	2,031	1,918
657	6,428	6,354	66,80	2,103	2,078
585	6,684	6,367	71,50	2,246	2,139
996	6,541	6,293	62,60	1,989	1,914
260	6,367	6,277	55,10	1,756	1,731
435	6,083	5,570	83,80	3,009	2,755
1230	6,276	6,138	59,80	1,949	1,906
487	6,256	6,128	61,00	1,991	1,950
276	6,124	5,634	81,60	2,897	2,665
172	6,411	6,150	59,20	1,925	1,847
572	6,625	6,521	63,00	1,932	1,902
577	6,374	6,244	68,90	2,207	2,162
748	6,527	6,175	53,80	1,742	1,649
1247	6,442	5,936	134,90	4,545	4,188
232	6,662	6,229	137,50	4,415	4,128
935	6,423	6,374	81,70	2,564	2,544
681	6,179	5,935	78,60	2,649	2,544
264	6,228	6,017	50,10	1,665	1,609

1226	6,502	6,260	100,20	3,201	3,082
226	6,278	6,244	109,30	3,501	3,482
1224	6,434	6,033	55,60	1,843	1,728
1078	6,646	6,470	173,00	5,348	5,206
205	6,488	6,137	51,40	1,675	1,584
1253	6,501	6,407	130,60	4,077	4,018
1153	6,667	6,482	98,60	3,042	2,958
1045	6,796	6,444	99,20	3,079	2,919
202	6,364	6,263	125,70	4,014	3,950
239	6,181	6,067	329,80	10,872	10,671
898	6,597	6,471	153,80	4,754	4,663
684	6,438	6,099	101,90	3,342	3,165
6	6,390	5,988	101,40	3,387	3,174
7	6,351	5,992	59,40	1,983	1,870
35	6,762	6,538	50,20	1,536	1,485
13	6,350	6,001	83,10	2,769	2,617
60	6,194	6,045	45,40	1,502	1,466
54	6,350	6,262	47,70	1,524	1,502
30	6,560	6,391	47,10	1,474	1,436
65	6,946	6,809	66,30	1,947	1,909
9	6,302	6,197	100,90	3,257	3,202
12	6,197	5,948	68,10	2,290	2,198
2	6,144	6,015	60,10	1,998	1,956
27	6,462	6,452	81,90	2,539	2,535
10	6,506	6,203	69,10	2,228	2,124
11	6,248	6,088	61,00	2,004	1,953
3	6,724	6,605	64,70	1,959	1,924
36	6,510	6,392	74,70	2,337	2,295
49	6,236	5,921	148,70	5,023	4,769
78	6,547	6,450	230,70	7,154	7,047
69	6,649	6,417	80,80	2,518	2,430
72	6,356	6,233	57,50	1,845	1,809
41	6,370	6,283	71,20	2,266	2,236
23	6,405	6,283	77,30	2,461	2,414
20	6,606	6,377	77,70	2,437	2,352
46	6,068	5,918	89,10	3,011	2,937
22	6,616	6,517	86,10	2,642	2,603
42	6,444	6,336	58,10	1,834	1,803
40	6,521	6,399	123,20	3,851	3,779
75	6,263	6,159	76,60	2,487	2,446
45	6,614	6,481	59,90	1,849	1,811
74	6,629	6,456	79,70	2,469	2,405
52	6,602	6,532	90,50	2,771	2,742
47	6,739	6,584	115,30	3,503	3,422

Apêndice D Temperaturas de armazenamento das macerações

Nesta secção estão apresentados todos os valores de temperatura obtidos através das medições regulares da mesma com auxílio de um termómetro digital, bem como as respetivas datas em que as medições foram feitas.

Tabela D.1- Valores obtidos para as diferentes temperaturas de armazenamento das macerações

<i>Data de medição</i>	<i>Temperatura na estufa (°C)</i>	<i>Temperatura na cave (°C)</i>	<i>Temperatura no frigorífico (°C)</i>
20/04/2021	30,7	17,8	7,6
21/04/2021	31,1	17,7	6,4
22/04/2021	30,8	17,6	5,0
23/04/2021	31,1	18,0	4,0
26/04/2021	30,5	17,7	6,4
27/04/2021	30,6	17,9	6,0
28/04/2021	30,6	17,8	4,9
29/04/2021	30,7	17,7	5,7
30/04/2021	30,3	17,5	5,1
3/05/2021	30,4	17,5	5,8
4/05/2021	30,6	17,3	7,3
5/05/2021	30,8	17,8	5,1
7/05/2021	30,9	18,3	5,8
11/05/2021	30,3	17,7	5,6
12/05/2021	30,3	17,6	6,1
14/05/2021	30,4	17,6	5,6
17/05/2021	30,6	17,8	5,5
18/05/2021	30,5	18	6,6
19/05/2021	30,5	18,2	5,7
Valor médio	30,6	17,8	5,8

Apêndice E Valores obtidos de TCA Libertável para as diferentes gamas de concentração e temperaturas medidas ao longo do tempo

Nesta secção estão apresentados os valores obtidos de TCA Libertável - pelo método de análise por SPME-GC-MS - para as diferentes gamas de concentração e temperaturas consideradas neste projeto. Os valores são referentes ao Plano Não Destrutivo referenciado no Capítulo 3. O limite de deteção (ld) e o limite de quantificação (lq) do equipamento utilizado para obtenção destes valores é 0,2 ppt e 0,3 ppt, respetivamente.

Tabela E.1- Valores obtidos de TCA Libertável ao longo do tempo para as diferentes gamas de concentração e temperaturas - Plano Não Destrutivo

Gama de Concentração (ng/L)	Temperatura (°C)	Número da Rolha	TCA Libertável após 2 dias (ng/L)	TCA Libertável após 6 dias (ng/L)	TCA Libertável após 10 dias (ng/L)	TCA Libertável após 15 dias (ng/L)	TCA Libertável após 30 dias (ng/L)
[0,6-0,8]	5	206	0,3	0,6	0,3	0,3	0,5
[0,6-0,8]	5	208	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3
[0,6-0,8]	5	294	0,5	1,1	0,4	0,4	0,6
[0,6-0,8]	5	402	0,6	0,4	0,2	0,2	0,2
[0,6-0,8]	5	857	0,5	0,4	0,3	0,2	0,2
[1,0-1,2]	5	103	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4
[1,0-1,2]	5	581	0,7	0,5	0,3	0,4	0,3
[1,0-1,2]	5	759	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3
[1,0-1,2]	5	788	0,4	0,5	0,3	0,3	0,2
[1,0-1,2]	5	794	0,4	0,6	0,5	0,2	0,3
[1,4-2,0]	5	412	0,4	0,8	0,4	0,3	0,3
[1,4-2,0]	5	703	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
[1,4-2,0]	5	947	0,5	0,7	0,5	0,4	0,6
[1,4-2,0]	5	1038	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3
[1,4-2,0]	5	1112	0,6	0,6	0,6	0,5	0,7
< 0,50	5	8	0,6	0,4	0,4	0,4	0,3
< 0,50	5	33	0,4	0,3	0,6	0,4	0,3
< 0,50	5	37	0,3	0,5	0,2	0,3	0,5
< 0,50	5	55	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5
< 0,50	5	57	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4
[0,5-1,0]	5	16	0,6	0,6	0,8	0,6	0,8
[0,5-1,0]	5	48	0,4	0,5	0,4	0,3	0,6
[0,5-1,0]	5	50	0,3	0,4	0,5	0,3	0,2
[0,5-1,0]	5	73	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4
[0,5-1,0]	5	76	0,7	0,8	0,5	0,5	0,5
[0,6-0,8]	18	141	0,8	1,0	0,6	0,6	0,6
[0,6-0,8]	18	271	0,4	0,5	0,7	0,6	0,8
[0,6-0,8]	18	287	0,4	0,6	0,5	0,7	0,6
[0,6-0,8]	18	605	0,8	0,4	0,4	0,7	0,7
[0,6-0,8]	18	804	0,4	0,5	0,6	0,6	0,4
[1,0-1,2]	18	133	1,1	0,8	1,1	0,9	0,8
[1,0-1,2]	18	417	0,8	0,5	0,6	0,7	0,7

[1,0-1,2]	18	672	0,4	0,7	0,8	0,6	0,8
[1,0-1,2]	18	1244	0,9	0,4	0,5	0,5	0,9
[1,4-2,0]	18	578	0,9	0,7	0,8	1,1	1,0
[1,4-2,0]	18	625	0,5	0,8	0,8	0,9	1,2
[1,4-2,0]	18	731	0,4	0,5	0,5	0,8	0,8
[1,4-2,0]	18	1246	0,6	0,9	0,5	0,7	0,7
< 0,50	18	4	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5
< 0,50	18	39	0,7	0,5	0,6	0,7	0,5
< 0,50	18	53	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7
< 0,50	18	56	0,4	0,7	0,5	0,6	0,7
< 0,50	18	58	0,6	0,8	0,5	0,7	0,6
[0,5-1,0]	18	18	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5
[0,5-1,0]	18	26	0,4	0,7	0,7	0,9	0,7
[0,5-1,0]	18	43	0,5	0,6	0,8	0,7	0,6
[0,5-1,0]	18	51	0,5	0,7	0,6	0,7	0,8
[0,5-1,0]	18	67	0,3	0,8	0,7	0,9	0,8
[0,6-0,8]	30	177	1,1	1,1	0,9	0,9	0,8
[0,6-0,8]	30	280	1,0	1,0	0,7	0,9	0,9
[0,6-0,8]	30	298	0,8	0,7	0,6	0,8	0,7
[0,6-0,8]	30	1025	0,9	1,1	0,7	0,7	0,6
[0,6-0,8]	30	1044	0,5	0,9	0,5	0,9	0,7
[1,0-1,2]	30	116	1,4	1,1	0,9	1,0	1,1
[1,0-1,2]	30	674	1,2	1,4	1,6	1,6	1,4
[1,0-1,2]	30	682	1,1	1,2	1,1	1,4	1,1
[1,0-1,2]	30	716	1,2	1,2	0,8	0,9	1,0
[1,0-1,2]	30	1221	0,6	0,6	0,9	1,5	1,4
[1,4-2,0]	30	28	1,0	1,5	1,0	1,3	1,2
[1,4-2,0]	30	666	0,5	1,4	1,5	1,9	1,6
[1,4-2,0]	30	762	1,0	1,6	1,0	1,1	0,8
[1,4-2,0]	30	1062	2,0	1,4	1,5	1,6	1,5
[1,4-2,0]	30	1243	0,9	0,9	0,8	1,2	1,2
< 0,50	30	28	1,4	1,0	0,8	1,3	0,9
< 0,50	30	29	1,1	1,3	1,0	1,2	1,1
< 0,50	30	34	0,9	1,4	1,0	1,3	1,4
< 0,50	30	62	2,0	1,5	1,4	1,7	1,3
< 0,50	30	63	0,7	1,0	0,6	1,6	1,1
[0,5-1,0]	30	14	1,6	0,9	0,9	1,3	1,0
[0,5-1,0]	30	44	1,0	1,4	1,2	1,4	1,1
[0,5-1,0]	30	66	1,0	0,9	0,8	1,1	0,6
[0,5-1,0]	30	68	0,5	1,7	1,0	1,1	0,8
[0,5-1,0]	30	70	1,6	1,6	1,4	1,3	1,2

Apêndice F Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo escolhido para cada gama de concentração e temperatura

Nesta secção estão apresentados os gráficos que permitem visualizar o ajuste dos resultados obtidos pelo modelo escolhido para cada gama de concentração e temperatura.

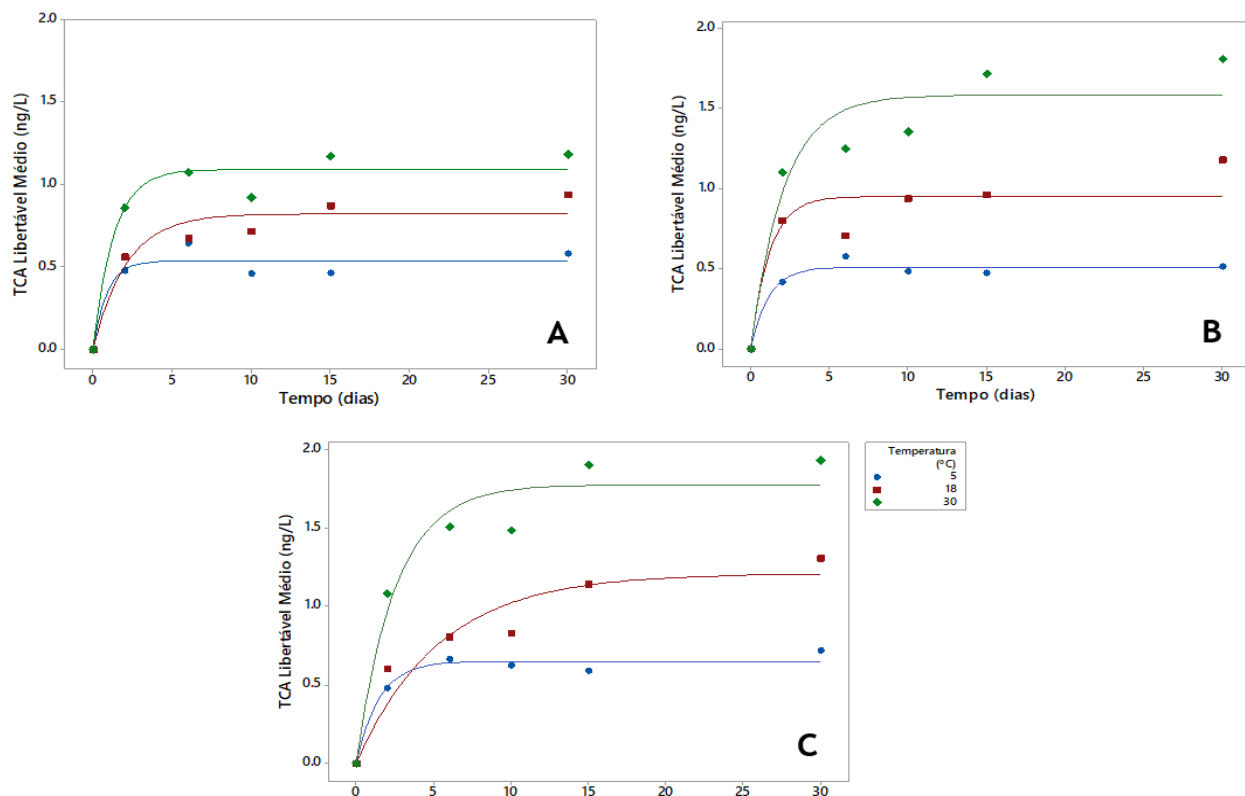


Figura F.1. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo escolhido para cada gama de concentração e temperatura. A: [0,6-0,8]; B: [1,0-1,2] e C: [1,4-2,0].

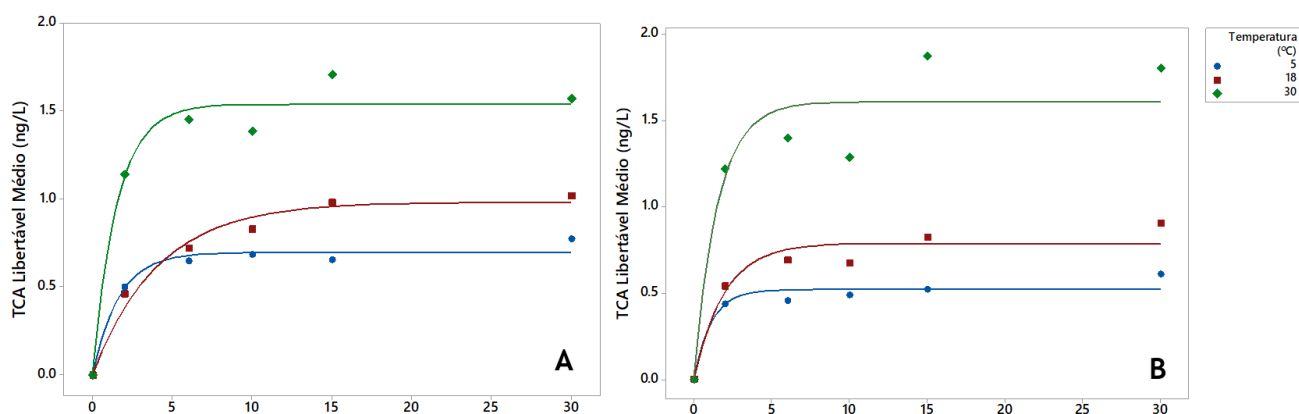


Figura F.2. Visualização gráfica do ajuste dos resultados obtidos pelo modelo escolhido para cada gama de concentração e temperatura. A: [0,5-1,0] e B: < 0,5.

Apêndice G Valores obtidos de TCA Libertável e TCA Total para as diferentes gamas de concentração e temperaturas ao longo do tempo

Nesta secção estão apresentados os valores obtidos de TCA Libertável (Tabela G.1) e TCA Total (Tabela G.2) - pelo método de análise por SPME-GC-MS - para as duas gamas de concentração do método instrumental de análise TOF-MS e temperaturas consideradas neste projeto. Os valores são referentes ao Plano Destrutivo referenciado no Capítulo 3. O limite de deteção (ld) e o limite de quantificação (lq) do equipamento utilizado para obtenção destes valores é 0,2 ppt e 0,3 ppt, respetivamente.

Tabela G.1- Valores obtidos de TCA Libertável ao longo do tempo para as diferentes gamas de concentração e temperaturas - Plano Destrutivo

Gama de Concentração (ng/L)	Temperatura (°C)	TCA Libertável após 2 dias (ng/L)	TCA Libertável após 6 dias (ng/L)	TCA Libertável após 10 dias (ng/L)	TCA Libertável após 15 dias (ng/L)	TCA Libertável após 30 dias (ng/L)
[0,6-0,8]	5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
[0,6-0,8]	5	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2
[0,6-0,8]	5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2
[0,6-0,8]	5	0,2	0,3	0,3	0,3	0,6
[0,6-0,8]	5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4
[1,0-1,2]	5	0,4	0,3	0,2	0,4	0,7
[1,0-1,2]	5	0,5	0,3	0,4	0,4	0,6
[1,0-1,2]	5	0,6	0,3	0,6	0,3	0,5
[1,0-1,2]	5	0,2	0,4	0,2	0,3	0,4
[1,0-1,2]	5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4
[0,6-0,8]	18	0,6	0,3	0,4	0,5	0,3
[0,6-0,8]	18	0,2	0,4	0,4	0,5	0,2
[0,6-0,8]	18	0,4	0,2	1,0	0,3	1,1
[0,6-0,8]	18	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5
[0,6-0,8]	18	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
[1,0-1,2]	18	0,6	0,5	0,4	0,4	0,8
[1,0-1,2]	18	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7
[1,0-1,2]	18	0,3	0,4	0,5	0,6	0,9
[1,0-1,2]	18	0,6	0,3	0,3	0,6	0,4
[1,0-1,2]	18	0,5	0,4	0,4	0,5	0,7
[0,6-0,8]	30	0,4	0,6	0,4	1,1	1,3
[0,6-0,8]	30	0,7	0,6	1,7	0,7	0,9
[0,6-0,8]	30	0,9	0,7	0,9	0,9	0,8
[0,6-0,8]	30	0,7	0,6	0,9	0,7	0,8
[0,6-0,8]	30	0,6	0,9	0,9	0,8	0,8
[1,0-1,2]	30	0,9	1,4	0,8	1,1	1,6
[1,0-1,2]	30	1,3	1,0	1,5	1,1	1,5
[1,0-1,2]	30	0,9	0,8	0,8	1,0	2,0
[1,0-1,2]	30	0,8	0,9	0,9	1,0	1,0
[1,0-1,2]	30	0,8	0,6	1,0	1,0	0,9

Tabela G.2- Valores obtidos de TCA Total para as rolhas utilizadas no Plano Destrutivo

Gama de Concentração (ng/L)	Temperatura (°C)	TCA Total após 2 dias (ng/g rolha)	TCA Total após 6 dias (ng/g rolha)	TCA Total após 10 dias (ng/g rolha)	TCA Total após 15 dias (ng/g rolha)	TCA Total após 30 dias (ng/g rolha)
[0,6-0,8]	5	2,11	1,39	3,04	3,35	1,60
[0,6-0,8]	5	1,68	1,98	1,53	2,09	1,39
[0,6-0,8]	5	1,75	2,13	2,90	2,97	0,76
[0,6-0,8]	5	1,78	2,11	3,14	2,82	4,59
[0,6-0,8]	5	2,10	1,65	2,02	1,80	2,14
[1,0-1,2]	5	2,95	2,13	2,56	2,42	2,43
[1,0-1,2]	5	1,93	1,98	11,19	3,34	3,03
[1,0-1,2]	5	2,62	2,37	3,22	2,03	2,32
[1,0-1,2]	5	2,53	2,45	2,59	1,78	5,46
[1,0-1,2]	5	2,81	3,82	2,51	3,44	2,46
[0,6-0,8]	18	2,75	1,78	1,32	2,01	2,31
[0,6-0,8]	18	1,62	2,35	2,14	4,89	1,46
[0,6-0,8]	18	1,54	1,40	1,63	1,88	1,88
[0,6-0,8]	18	1,88	2,04	1,81	2,30	2,43
[0,6-0,8]	18	2,65	2,27	1,59	1,91	2,35
[1,0-1,2]	18	4,01	2,08	2,90	1,98	2,20
[1,0-1,2]	18	2,74	2,53	1,98	2,37	2,94
[1,0-1,2]	18	2,23	2,71	1,98	3,50	3,14
[1,0-1,2]	18	2,66	2,39	2,85	2,92	2,31
[1,0-1,2]	18	3,37	11,22	1,90	4,02	2,43
[0,6-0,8]	30	1,51	2,05	1,46	2,31	2,14
[0,6-0,8]	30	3,63	3,12	3,38	2,07	2,48
[0,6-0,8]	30	1,66	2,47	2,08	2,44	1,87
[0,6-0,8]	30	2,58	1,83	1,68	1,58	3,17
[0,6-0,8]	30	2,05	1,99	2,21	2,67	1,73
[1,0-1,2]	30	1,91	4,33	3,23	2,88	1,87
[1,0-1,2]	30	1,93	3,94	3,35	2,99	2,13
[1,0-1,2]	30	0,84	2,15	2,09	2,16	7,38
[1,0-1,2]	30	3,06	2,80	2,72	2,31	2,57
[1,0-1,2]	30	2,85	2,07	2,33	1,81	1,42

Tabela G.3- Valor médio dos valores de TCA Libertável apresentados na Tabela G.1 e respetivos desvio padrão

Gama de Concentração (ng/L)	Temperatura (°C)	TCA LIB médio (ng/L) - 2 dias	TCA LIB médio (ng/L) - 6 dias	TCA LIB médio (ng/L) - 10 dias	TCA LIB médio (ng/L) - 15 dias	TCA LIB médio (ng/L) - 30 dias
[0,6-0,8]	5	0,22 ± 0,084	0,28 ± 0,045	0,26 ± 0,055	0,24 ± 0,055	0,30 ± 0,20
[1,0-1,2]		0,42 ± 0,15	0,32 ± 0,045	0,34 ± 0,17	0,34 ± 0,055	0,52 ± 0,13
[0,6-0,8]	18	0,46 ± 0,17	0,36 ± 0,11	0,58 ± 0,27	0,46 ± 0,089	0,50 ± 0,35
[1,0-1,2]		0,52 ± 0,13	0,42 ± 0,084	0,44 ± 0,11	0,52 ± 0,084	0,70 ± 0,19
[0,6-0,8]	30	0,66 ± 0,18	0,68 ± 0,13	0,96 ± 0,47	0,84 ± 0,17	0,92 ± 0,22
[1,0-1,2]		0,94 ± 0,21	0,94 ± 0,30	1,0 ± 0,29	1,04 ± 0,055	1,4 ± 0,45

Apêndice H Gráficos de Resíduos de TCA Libertável e TCA Total

Na Figura H.1 encontram-se apresentados os 4 gráficos correspondentes à análise dos resíduos de TCA Libertável que permitem verificar os pressupostos da ANOVA realizada aos resultados obtidos neste projeto. Por sua vez, na Figura H.2 encontram-se apresentados os 4 gráficos correspondentes à análise dos resíduos de TCA Total.

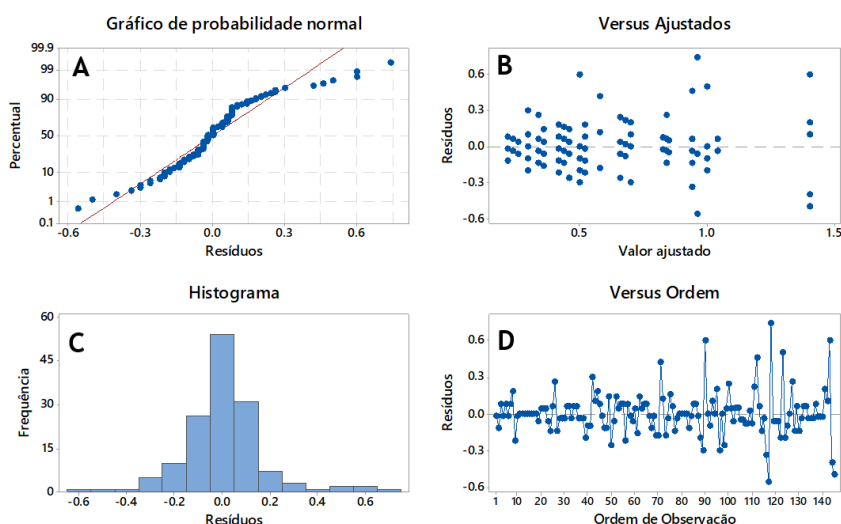


Figura H.1. Gráficos de Resíduo de TCA Libertável. A: Gráfico da distribuição normal dos valores residuais; B: Gráfico dos resíduos em função da previsão da resposta; C: Histograma de frequências dos Resíduos; D: Gráfico com o comportamento dos valores residuais

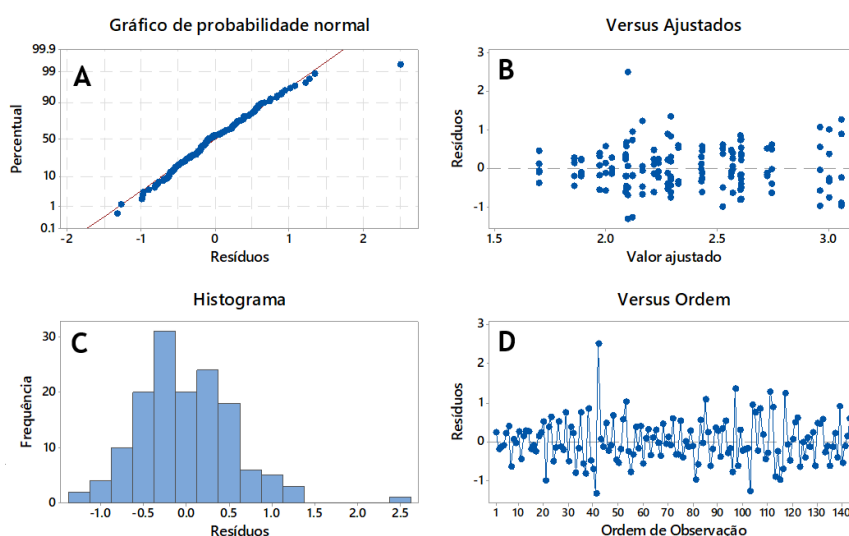


Figura H.2. Gráficos de Resíduo de TCA Total. A: Gráfico da distribuição normal dos valores residuais; B: Gráfico dos resíduos em função da previsão da resposta; C: Histograma de frequências dos Resíduos; D: Gráfico com o comportamento dos valores residuais.