

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Análise de cloroanisóis e clorofenóis em solos de montado de sobro com vista à avaliação do risco de contaminação da cortiça com 2,4,6-Tricloroanisol

Tese de Mestrado

de

Ana Isabel da Rocha Malheiro

Desenvolvida no âmbito da Disciplina de Dissertação

realizada em

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



Orientador na FEUP: Professor Doutor Fernão Magalhães

Orientador na Amorim & Irmãos: Professor Doutor Miguel Cabral



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Departamento de Engenharia Química

Setembro de 2010

Agradecimentos

O trabalho de investigação realizado durante o estágio curricular, desenvolvido no Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Amorim & Irmãos, só foi desenvolvido graças aos contributos de inúmeras pessoas, às quais protesto os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Miguel Cabral e ao Professor Doutor Adélio Mendes devo as condições de trabalho proporcionadas, a disponibilidade demonstrada e as oportunidades de aquisição de experiência e de aprendizagem facultadas durante o tempo de desenvolvimento do projecto, sem esquecer a profunda competência com que acompanharam o desenvolvimento do projecto.

Ao Doutor Paulo Lopes e à Engenheira Juliana Marques sublinho a total dedicação, paciência e espontâneo auxílio na superação dos obstáculos que foram surgindo durante a realização da fase experimental do projecto.

À Doutora Isabel Roseira pela simpatia, gentileza e interesse demonstrados.

Uma palavra de apreço às colaboradoras do I&D, colegas e amigas, Eliana, Salomé e Patrícia, pelo seu desempenho no processo de integração, pela boa disposição e companhia. Agradeço-lhes também o auxílio prestado, em especial na fase experimental do projecto.

A toda a equipa da *Amorim Cork Research* pela pronta cedência dos equipamentos específicos necessários e pela pronta colaboração, quando necessária, de todos.

Por fim, um especial agradecimento aos familiares e amigos mais próximos, pais, irmão, Nuno, Renata, João, Karina, Susana, Yaidelin, pelo acompanhamento, incitamento, compreensão e carinho demonstrados ao longo de toda a minha vida. Agradeço igualmente por cuidadosamente lerem e criticarem este trabalho. A todos, muito obrigada.

Resumo

Foi otimizado um método de análise de cloroanisóis e clorofenóis presentes em amostras de solo, utilizando extracção por micro-ondas seguida de microextracção em fase sólida (SPME), conjugada com cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS/MS).

Foram optimizadas as variantes relativas ao tempo de extracção, à potência do micro-ondas e à disposição física dos frascos contendo macerações de amostras de solo no prato do micro-ondas. Os resultados obtidos mostraram que a extracção efectuada durante 5 minutos, a uma potência máxima (800 W) e com uma disposição física dos frascos no prato do micro-ondas em círculo, propiciam os melhores resultados na recuperação dos compostos analisados.

Os resultados das análises efectuadas aos diferentes lotes permitiram concluir que, dentro de cada lote, os valores dos compostos detectados variam pouco; que, de lote para lote, a variação dos valores dos compostos é maior que dentro do mesmo lote; que o TCA foi detectado em todos os solos em níveis quase imperceptíveis; que a quantidade de clorofenóis presente é muito superior à de cloroanisóis; que o TCP e o DCP foram identificados como sendo os principais marcadores químicos dos solos estudados.

Palavras Chave: clorofenóis, cloroanisóis, extracção, SPME/GC-MS/MS, solo.

Abstract

A method for detection and quantification of chlorophenols and chloroanisoles in soils was optimized by means of microwave extraction followed by solid phase microextraction (SPME) combined with gas chromatography and mass spectroscopy (GC-MS/MS).

The time of extraction, the microwave power and the physical arrangement of the bottles containing the soil sample macerations in the microwave plate were the three variables analyzed. The results showed that an extraction during 5 minutes, at maximum power (800 W) with a circle arrangement of the bottles in the microwave plate results in the best recovery rates of the analyzed compounds.

The results obtained showed that amounts of chloroanisols and chlorophenols were much more variable between the soils lots than between the different soil samples of the same lots. The amounts of chlorophenols were much higher than those of chloroanisols, being TCA detected in all soils at residual amounts. Conversely, TCP and DCP were identified as the main chemical markers of the considered soils.

Key-words: Chlorofenols, chloroanisoles, extraction, SPME/GC-MS/MS, soil.

Índice

1	Introdução	9
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projecto	9
1.2	Compostos responsáveis pela contaminação do vinho por aromas fúngicos.....	9
1.3	Contributos do Trabalho	14
1.4	Organização da Tese	15
2	Estado da Arte.....	17
3	Descrição Técnica.....	20
3.1	Optimização do método de análise dos cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo	20
3.1.1	Método de extracção utilizando micro-ondas: testes preliminares	20
3.1.2	Análise qualitativa e quantitativa da extracção por micro-ondas.....	21
3.2	Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de exploração de cortiça	22
3.2.1	Descrição dos procedimentos experimentais adoptados na análise de solos	22
3.2.2	Amostras de solo analisadas.....	23
3.2.3	Análise dos cloroanisóis e clorofenóis por GC-MS/MS.....	23
3.2.4	Tratamento estatístico dos dados.....	23
4	Discussão dos resultados.....	24
4.1	Optimização do método de análise dos cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo	24
4.1.1	Método de extracção utilizando micro-ondas: testes preliminares	24
4.1.2	Análise qualitativa e quantitativa da extracção por micro-ondas.....	26
4.2	Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de exploração de cortiça	34
4.2.1	Amostras de solo analisadas.....	34

5	Conclusões	44
6	Avaliação do trabalho realizado	45
6.1	Objectivos Realizados	45
6.2	Outros Trabalhos Realizados	45
6.3	Limitações e Trabalho Futuro	46
6.4	Apreciação final.....	46
7	Referências	48
8	Anexos.....	52
8.1	Anexo 1 - Método de Extracção de Cloroanisóis e Clorofenóis de amostras de solo .	52
8.2	Anexo 2 - Método de Análise Cromatográfica de Cloroanisóis e Clorofenóis de amostras e solo	52

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Propostas para os mecanismos biossintéticos do 2,4,6-TCA na cortiça. I - Hipótese A; II - Hipótese B; III - Hipótese C; IV - Hipótese D; V - Hipótese E (adaptada de Coque et al., 2006).</i>	<i>14</i>
<i>Figura 2 - Esquema representativo da disposição dos frascos para os ensaios A, B e C no prato giratório do micro-ondas.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3 - Recuperações do contaminante d₅-TCA obtidas utilizando ultra-sons (método de referência) e o micro-ondas durante 2 minutos e fazendo variar a potência de extracção (média, alta ou máxima).</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4 - Recuperações do contaminante d₅-TCA obtidas utilizando o micro-ondas durante 2 e 3 minutos e fazendo variar a potência de extracção (alta ou máxima).</i>	<i>27</i>
<i>Figura 5 - Disposição dos frascos em quadrícula no prato giratório do micro-ondas.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6 - Quantidades de TCA obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7 - Quantidades de TCP obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 8 - Quantidades de DCP obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.</i>	<i>30</i>

Figura 9 - Disposição dos frascos em círculo no prato giratório do micro-ondas. 31

Figura 10 - Quantidades de TCA obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. 31

Figura 11 - Quantidades de TCP obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. 32

Figura 12 - Quantidades de DCP obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. 32

Figura 13 - Esquema representativo do método utilizado para análise dos solos. 33

Figura 14 - Quantidades de TCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde se efectua a exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 34

Figura 15 - Quantidades de TeCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 35

Figura 16 - Quantidades de PCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 35

Figura 17 - Quantidades de TCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 36

Figura 18 - Quantidades de TeCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 36

Figura 19 - Quantidades de PCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 37

Figura 20 - Quantidades de DCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão. 37

Figura 21 - Análise de componentes principais (ACP) dos cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo dos diferentes lotes analisados. 42

Figura 22 - Rampa de temperaturas do programa de temperaturas correspondentes às condições de detecção do GC-MS/MS. 53

Figura 23 - Curva de calibração do TCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹. 54

Figura 24 - Curva de calibração do TeCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹. 55

Figura 25 - Curva de calibração do PCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹. 55

Figura 26 - Curva de calibração do TCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹. 56

Figura 27 - Curva de calibração do TeCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹. 56

Figura 28 - Curva de calibração do PCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹. 57

Figura 29 - Curva de calibração do DCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹. 57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Limite de percepção sensorial dos principais haloanisóis e halofenóis responsáveis pelos aromas fúngicos nos vinhos. 10

Tabela 2 - Estrutura química dos principais cloroanisóis, bromoanisóis e clorofenóis envolvidos na contaminação do vinho. 12

Tabela 3 - Descrição dos ensaios realizados: potências, tempos e número de frascos testados. 21

Tabela 4 - Quantidades de cloroanisóis e clorofenóis dos 21 lotes de exploração de cortiça (entre parênteses são apresentados os respectivos desvios-padrão relativos às 10 amostras de solo de cada lote) obtidas pela análise da variância ANOVA. 39

Tabela 5 - Matriz correlacção dos diferentes compostos (TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, PCP e DCP), resultante da Análise de Componentes Principais (ACP). 41

Notação e Glossário

A_{cont}	Área do pico cromatográfico do contaminante	
$A_{p.i.}$	Área do pico cromatográfico do padrão interno	
$A_{média\ p.i.}$	Média das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno	
A_{cont}^*	Área corrigida dos picos cromatográficos do contaminante	
C_{cont}	Concentração do contaminante	ng·L ⁻¹
H_{Solo}	Humidade da amostra de solo	%
P	Peso da amostra de solo húmido	g
P_s	Peso da amostra de solo seco	g

Lista de Siglas

TBA	2,4,6-Tribromoanisol
d ₅ -TBA	Deutério 2,4,6-Tribromoanisol
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
d ₅ -TCA	Deutério 2,4,6-Tricloroanisol
TeCA	2,3,4,6-Tetracloroanisol
PCA	Pentacloroanisol
TCP	2,4,6-Triclorofenol
TeCP	2,3,4,6-Tetraclorofenol
PCP	Penclorofenol
DCP	2,6-Diclorofenol
CPOMT	Clorofenol O-metiltransferase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
SPME	Microextracção em fase sólida
SPME/GC-MS/MS	Microextracção em fase sólida conjugada com cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
PDMS	Polidimetilsiloxano
ANOVA	Análise de variância
ACP	Análise de componentes principais
A&I	Amorim & Irmãos, S.A.

I&D	Investigação e Desenvolvimento
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
DEQ	Departamento de Engenharia Química
MIEQ	Mestrado Integrado em Engenharia Química

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

A contaminação dos vinhos com 2,4,6-tricloroanisol (TCA) pelas rolhas de cortiça foi um dos mais importantes problemas com que a indústria vitivinícola se confrontou nos anos 90 e início dos anos 2000 (Sefton *et al.*, 2005), dadas as potenciais perdas, quer de cariz económico, quer deste em associação directa com a criação de uma imagem negativa no mercado (*marketing*), as empresas de produção de rolhas de cortiça viram-se obrigadas a dirigir os seus esforços de investigação em diversas direcções, procurando desta forma estabelecer qual a natureza da contaminação da cortiça. Este problema foi de tal ordem que levou ao aparecimento de rolhas sintéticos - plástico e cápsulas de rosca como substitutos da cortiça no processo de conservação e/ou envelhecimento do vinho engarrafado, o que contribuiu para perda de quota de mercado das rolhas de cortiça (Pereira *et al.*, 1999).

Sendo certo que a presença de TCA nas rolhas de cortiça pode contaminar os vinhos, estudos recentes mostram que aquele composto é o principal factor responsável pela contaminação, mas não o único. Outros cloroanisóis (tetra e pentacloroanisol) têm sido identificados como co-responsáveis pelo aroma a “mofo” (*idem*).

É tendo presente o quadro descrito no parágrafo anterior que as empresas produtoras de rolhas de cortiça têm investido em estudos científicos com o objectivo de minimizar ou mesmo eliminar os possíveis efeitos nocivos da presença de cloroanisóis e clorofenóis nos rolhas, efectuando assim uma avaliação do risco de contaminação da cortiça com 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

O trabalho a realizar consistirá na substituição dos ultra-sons por micro-ondas no processo de extracção dos compostos voláteis presentes em amostras de solo, seguindo a sugestão deixada por Marques (2009), avaliando desta forma se o novo método permitirá atingir os resultados pretendidos: obter extracções com melhor qualidade e efectuar mais extracções por unidade de tempo.

É neste contexto que o objectivo do trabalho será a realização de análises de amostras de solo de diversos montados de sobro, provenientes de diferentes localizações geográficas, com vista a efectuar a avaliação do risco de contaminação da cortiça proveniente dos diferentes montados.

1.2 Compostos responsáveis pela contaminação do vinho por aromas fúngicos

Os haloanisóis e os haloifenóis são os compostos apontados como sendo responsáveis pela contaminação do vinho com aromas fúngicos/mofo/terra. Estes são compostos voláteis

facilmente detectados através do olfacto e do paladar, dados os baixos limiares de percepção sensorial que os caracterizam, quer em água quer em soluções alcoólicas e vinho. Na Tabela 1 indicam-se os limites de percepção sensorial dos mais comuns.

Tabela 1 - Limite de percepção sensorial dos principais haloanisóis e halofenóis responsáveis pelos aromas fúngicos nos vinhos.

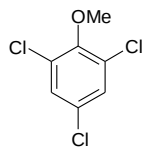
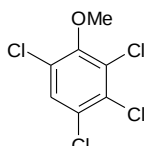
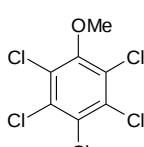
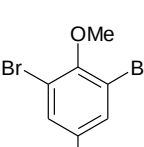
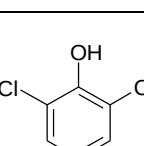
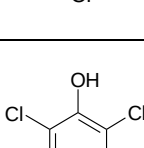
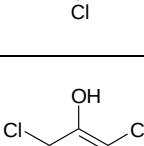
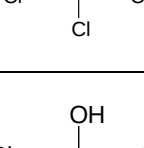
Composto	Limite de percepção sensorial (Capone <i>et al.</i> , 2009; Boutou <i>et al.</i> , 2007)
2,4,6 - Tricloroanisol (2,4,6-TCA)	Em água: 30 - 300 pg/L Em solução alcoólica (vinho): 1,5 - 3 ng/L
2,3,4,6 - Tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA)	Em água: 4 ng/L Em solução alcoólica (vinho): 15 ng/L
Pentacloroanisol (PCA)	Limiar de detecção - 10000 ng/L
2,4,6 - Tribromoanisol (2,4,6-TBA)	Em água: 8 - 30 pg/L Em solução alcoólica (vinho): 3 ng/L
2,4,6 - Triclorofenol (2,4,6-TCP)	Em água: 300 µg/L Em solução alcoólica (vinho): > 0,90 µg/L
2,3,4,6 - Tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP)	Em água: 600 µg/L Em solução alcoólica (vinho): > 0,90 µg/L
Pentaclorofenol (PCP)	Em água: 1600 µg/L Em solução alcoólica (vinho): > 0,90 µg/L
2,6-Diclorofenol (2,6-DCP)	Em água: 200 µg/L Em solução alcoólica (vinho): 0,032 µg/L

O 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) foi o primeiro composto identificado como causador do “sabor a rolha” (Buser *et al.*, 1982). Trata-se de uma substância estável, que não se degrada no vinho com o tempo, pelo que a variação da sua concentração no mesmo terá de ser explicada através da sua desorção a partir do vedante de cortiça ou da sua absorção por parte desta (Capone *et al.*, 1999; Sefton *et al.*, 2005). Existem contudo outros compostos identificados como contaminantes. O mesmo autor identificou o 1-octen-3-ona em uvas

afectadas por mofo. Mesmo o TCA identificado como contaminante do vinho não tem sempre origem nos rolhas de cortiça. Amon *et al.* (1986), Capone *et al.* (1999) e Chatonnet *et al.* (2004) concluíram que, ocasionalmente, o vinho pode ser contaminado por TCA antes do engarrafamento como resultado de contactos com material contaminado.

Outros cloroanisóis e bromoanisóis encontram-se frequentemente associados ao TCA de entre os quais importa destacar o tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o tribromoanisol (2,4,6-TBA). Estes compostos são derivados dos anisóis que se combinam com um ou mais átomos de um halogéneo, no caso, o cloro ou o bromo, originando então os cloroanisóis ou os bromoanisóis (Tabela 2).

Tabela 2 - Estrutura química dos principais cloroanisóis, bromoanisóis e clorofenóis envolvidos na contaminação do vinho.

Composto	Estrutura
2,4,6-TCA	
2,3,4,6-TeCA	
PCA	
2,4,6-TBA	
2,4,6-TCP	
2,3,4,6-TeCP	
PCP	
2,6 - DCP	

Do ponto de vista biológico, os haloanisóis são originados por uma reacção bioquímica de defesa de alguns microorganismos, em especial fungos filamentosos (*Streptomyces*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cephalosporium*), quando entram em contacto com halofenóis, estes últimos muito usados como pesticidas de elevada toxicidade e como fungicidas. Como resultado desta reacção os halofenóis tóxicos são convertidos em haloanisóis, compostos voláteis e não tóxicos para os microorganismos. A reacção de formação dos haloanisóis é um mecanismo de sobrevivência para muitos microorganismos quando expostos a ambientes poluídos com halofenóis (Coque *et al.*, 2006).

Diferentes estudos têm proposto diferentes mecanismos moleculares para a formação de TCA (idem):

A - Catabolismo de compostos clorados complexos

A formação do TCA encontra-se ligada ao facto de este composto ser intermediário do catabolismo de compostos clorados complexos. Por exemplo, o PCP e o TeCP são compostos altamente tóxicos e a sua biometilação aos respectivos anisóis são uma forma de detoxificação. Os anisóis resultantes são posteriormente de-halogenados formando o TCA.

O hexaclorociclohexano sofre uma de-hidrohalogenação dando origem ao 1,3,5-triclorobenzeno, o qual, por sua vez, sofre uma hidroxilação originando TCP, o qual é, por fim, metilado a TCA.

Do mesmo modo, a de-halogenação redutora do hexaclorobenzeno pode conduzir ao PCP, ao TCP ou ao PCA, os quais são depois os precursores para a reacção de metilação.

B - De-Halogenação de anisóis clorados complexos

O TCA forma-se directamente a partir de cloroanisóis complexos, como o TeCA e o PCA por um processo de de-halogenação redutivo.

C - Síntese por halogenação do anisol

O fenol dá origem ao TCA por cloração e, subsequentemente, por biometilação; se o anisol for o precursor, então a biometilação terá de acontecer antes da cloração.

D - Cloração na presença de hipoclorito de sódio e subsequente biometilação do fenol

O fenol é sintetizado intracelularmente a partir da glucose dando origem ao ácido shiquímico através da via das pentoses fosfato e originando o TCA posteriormente por cloração.

E - Síntese directa por biometilação

Os cloroanisóis aparecem na natureza, a partir de microorganismos, directamente da biometilação (o-metilação) do respectivo precursor clorofenol.

Na Figura 1 estão ilustradas as diversas hipóteses anteriores.

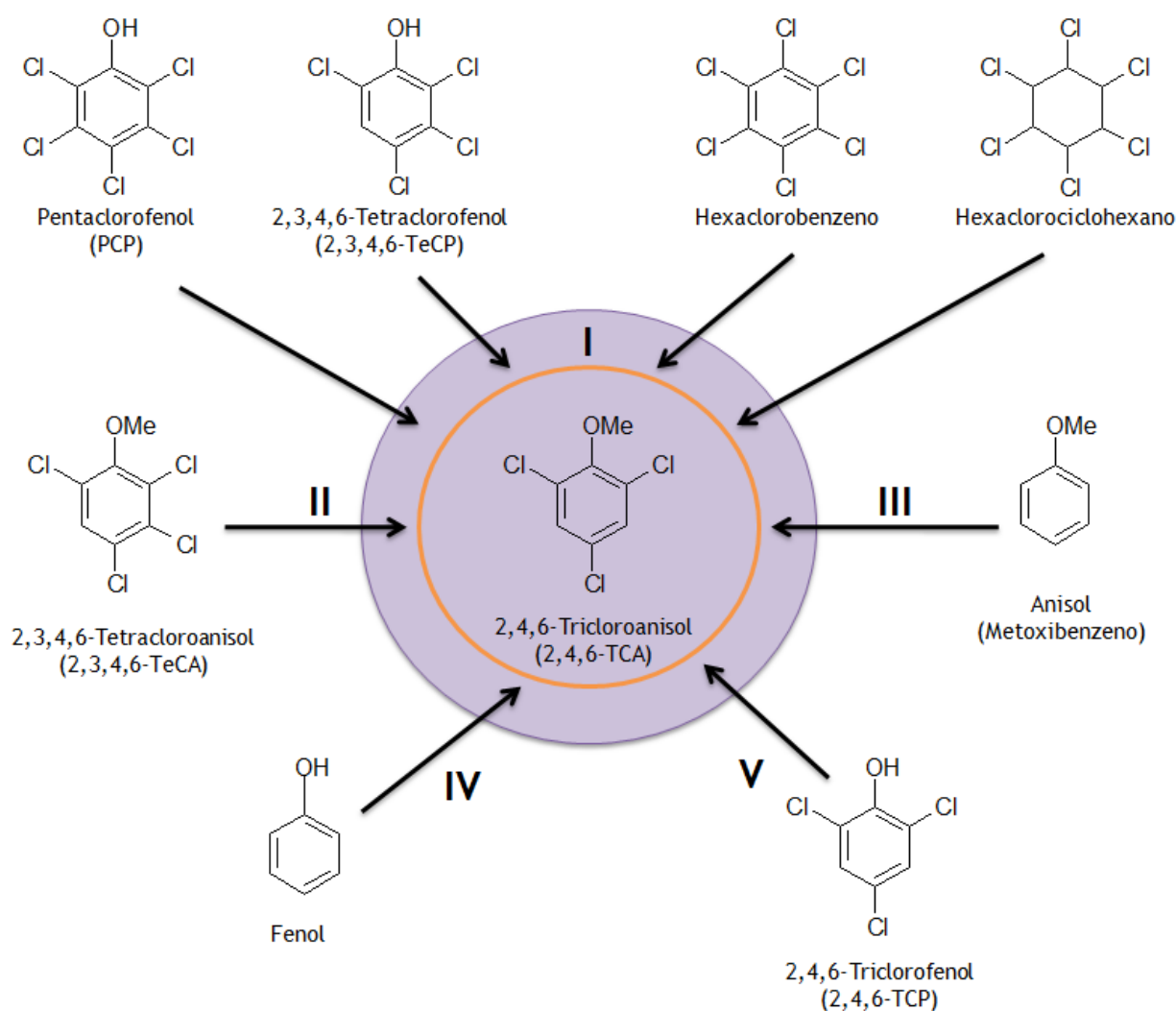


Figura 1 - Propostas para os mecanismos biossintéticos do 2,4,6-TCA na cortiça. I - Hipótese A; II - Hipótese B; III - Hipótese C; IV - Hipótese D; V - Hipótese E (adaptada de Coque et al., 2006).

A utilização em larga escala do pesticida TCP, até à proibição do seu uso em toda a Europa, contaminou não apenas os montados de sobre e, consequentemente a cortiça, mas também as madeiras presentes em muitas adegas, dada a utilização daquele produto no tratamento e conservação das madeiras. Os microrganismos presentes, em especial os fungos filamentosos possuidores da enzima clorofenol O-metiltransferase (CPOMT) sintetizam, quando em contacto com clorofenóis, os cloroanisóis que contaminam o vinho. Assim, este mecanismo é apontado como sendo o principal responsável pela formação do TCA, do TeCA, do PCA e do TBA (Coque et al., 2006).

1.3 Contributos do Trabalho

O Departamento de Investigação e Desenvolvimento da Amorim & Irmãos, S.A., fundado em 2000, tem vindo a desenvolver diversos estudos tendentes a determinar a presença de

cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo de montados de sobro em diferentes localizações geográficas.

Sendo o TCA o principal cloroanisol “acusado” de contaminar o vinho engarrafado, torna-se crucial para a indústria de rolhas de cortiça eliminar a possibilidade de tal contaminação ter origem nos referidos rolhas, elevando dessa forma, quer o seu desempenho, quer, concomitantemente, a sua imagem junto da indústria vitivinícola. Este projecto de investigação teve assim como objectivo, numa primeira fase, a optimização de um método de análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo adoptado no estudo anterior realizado por Marques (2009). Em seguida, este método foi aplicado ao estudo de compostos voláteis, cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo de diferentes localizações geográficas.

Os resultados obtidos e os previsíveis desenvolvimentos permitirão à A&I um conhecimento mais aprofundado das características dos solos onde se procede à exploração da cortiça e, em consequência, dos eventuais problemas de contaminação. Os trabalhos realizados constituem desta forma um contributo significativo para que as empresas deste grupo possam intervir nos factores associados à exploração da cortiça e continuar a apresentar produtos que respondam às suas exigências do mercado.

1.4 Organização da Tese

A presente tese encontra-se dividida em seis capítulos. O primeiro capítulo, Introdução, fornece uma perspectiva geral do problema em estudo - contaminação do vinho com aromas e paladares estranhos. Centra-se nas origens dessa contaminação e procura identificar os principais responsáveis pela mesma, enquadrando desta forma o desenvolvimento de todo o projecto.

O segundo capítulo, Estado da Arte, debruça-se sobre os estudos até hoje realizados com a problemática a analisar — origens da contaminação do vinho e identificação dos seus responsáveis — enquadrando o projecto na sua vertente teórica.

O terceiro capítulo, Descrição Técnica, é inteiramente dedicado à explanação das metodologias testadas bem como à explicitação da optimização do método de extracção.

No quarto capítulo, Discussão dos Resultados, é efectuada uma exposição dos resultados obtidos e a consequente análise dos mesmos.

No quinto capítulo, são apresentadas as Conclusões com base nas ilações consideradas pertinentes e sustentadas pelos resultados obtidos no capítulo quarto.

Por fim, no capítulo 6 dedicado à avaliação do trabalho realizado, é realizada uma apreciação sobre os objectivos concretizados, outros trabalhos efectuados em paralelo com o de

desenvolvimento do projecto, as limitações e constrangimentos que foi necessário superar, os necessários desenvolvimentos futuros e a apreciação final do trabalho desenvolvido.

2 Estado da Arte

A contaminação dos vinhos com TCA tem sido frequentemente atribuída à presença daquele composto nas rolhas de cortiça (Barker *et al.*, 2001). Contudo, existem estudos (Capone *et al.*, 2002) que referem que todas as rolhas de cortiça contêm vestígios detectáveis de TCA, mas apenas uma reduzida parte desses vedantes transmite o TCA para o vinho. Os mesmos autores consideram que a cortiça constitui uma excelente barreira à contaminação externa do vinho e que apenas o TCA endógeno, presente na porção de vedante que entra em contacto com o vinho ou com a parte livre superior a este, pode ser responsável pelo aroma a “mofo”.

Todos os processos até agora descritos como dando origem aos cloroanisóis implicam fortemente os clorofenóis pois aqueles resultam da metilação fúngica destes (Pollnitz *et al.*, 1996). Buser *et al.* (1982) e Saxby (1982) presumiram mesmo que os clorofenóis presentes na cortiça ou mesmo nas rolhas de cortiça podem resultar da reacção directa dos produtos resultantes da degradação da lenhina com o cloro resultante dos produtos utilizados no branqueamento das rolhas, prática já não efectuada pela indústria há mais de quinze anos. Consideram os mesmos autores que a utilização de biocidas à base de policlorofenóis nos montados de sobreiro constitui outra importante fonte de contaminação.

Estudos realizados concluíram que a degradação de PCP presente nos solos da floresta com baixos níveis de matéria orgânica era quase nula. A degradação dos clorofenóis no ambiente está directamente relacionada com as propriedades e características do próprio solo: teor de matéria orgânica, pH, temperatura, concentração de O₂, tipo de microorganismos presentes e potencial redox. A susceptibilidade para a biodegradação no solo dos clorofenóis está dependente do grau de coloração e da posição que os átomos de cloro têm relativamente ao grupo hidroxilo (Coque *et al.*, 2006).

Sendo certo que a cortiça, logo após a sua extracção, contém TCP, TeCP, PCP e os cloroanisóis correspondentes, foi demonstrado por Simpson *et al.* (2007) que, da camada interior da cortiça para a camada exterior, se verifica um aumento dos níveis de TCA e PCA o que dá consistência à ideia de que estes compostos são absorvidos do ar e do solo pelos sobreiros. Descout *et al.* (2000), demonstra que a maior parte do TCA presente na cortiça está maioritariamente localizada na parte inferior da árvore e no tronco. Constatou ainda que a cortiça em contacto com o solo tem um aroma intenso a “mofo”, sugerindo uma forte presença de cloroanisóis.

A confirmação dos resultados apresentados no parágrafo anterior foi feita por um recente estudo realizado no departamento de Investigação & Desenvolvimento da Amorim & Irmãos. Constatou-se que a contaminação das pranchas de cortiça é muito mais elevada nas zonas próximas do solo (“calços”) e varia em função da localização geográfica do montado. Tais

resultados dão suporte à ideia de que o uso intensivo de compostos policlorados no tratamento dos sobreiros pode constituir uma fonte de contaminação e estar na origem dos cloroanisóis presentes na cortiça. Este factor assume particular relevância segundo Thevénet *et al.* (s/d) pois as pranchas de cortiça contendo elevados níveis de TCA são susceptíveis de dar origem a rolhas com elevada capacidade de contaminar o vinho.

A constatação, por Hervé *et al.* (2000), de uma diminuição de 76% de TCA na cortiça importada pelos EUA desde 1990 e durante quatro anos, implica que o TCA presente nas pranchas de cortiça pode ter diminuído fortemente naquele espaço de tempo. Este resultado pode ser explicado pela remoção das pranchas contaminadas, pela diminuição das quantidades de TCA e TCP presentes nos solos ou ainda ser apenas reflexo dos melhoramentos introduzidos nos procedimentos de controlo de qualidade adoptados pelos industriais do sector da cortiça (Simpson *et al.*, 2007). Estudos recentes mostram uma forte contaminação dos solos com clorofenóis causada pelo uso, em larga escala, de biocidas clorofenados em países como o Canadá, a Finlândia, a Suécia e a Grécia mas nenhum estudo foi feito para Portugal (Coque *et al.*, 2006).

Muitos métodos de análise de clorofenóis em amostras de solo são baseados em técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida, a cromatografia gasosa e a electroforese capilar. A aplicação de qualquer destas técnicas implica, contudo, um prévio tratamento das amostras no sentido de as limpar ou de pré-concentrar as moléculas a analisar. No pré-tratamento de amostras de solo contendo clorofenóis aplicam-se metodologias de extracção líquido-líquido ou extracção em fase sólida, ao passo que a extracção por ultra-sons ou os métodos de Soxhlet se aplicam preferencialmente à análise do pentaclorofenol em amostras de madeira (Wei *et al.*, 2003).

Apesar de estes métodos de extracção serem eficientes e fornecerem resultados precisos, apresentam alguns inconvenientes: são demorados, perigosos para a saúde dada a necessidade da utilização de solventes orgânicos e dispendiosos dados os custos dos solventes (*idem*). Estes inconvenientes conduziram ao desenvolvimento de novos métodos de extracção mais rápidos e sem necessidade de utilização de solventes orgânicos. Procurou-se ainda que numa mesma operação fosse possível efectuar a amostragem, a extracção e a concentração da amostra. O mesmo autor desenvolveu um método de extracção assistida por micro-ondas, com extracção em fase sólida e quantificação através de cromatografia gasosa com detector de electrões (MAE-HS-SPME com GC-ECD) que, face aos resultados, permite a sua aplicação com vantagem relativamente a outros, na detecção e quantificação de clorofenóis em amostras de solo.

Wennrich *et al.* (2000) desenvolveu um método de determinação de clorofenóis em amostras de solo, utilizando extracção acelerada por solvente combinado com micro-extracção em fase

sólida (ASE-SPME). O autor refere que este método é mais selectivo que o que utiliza solventes orgânicos, pelo que os cromatogramas são perturbados por um largo número de picos de interferência.

No departamento de I&D da empresa A&I foi desenvolvido e optimizado por Marques (2009) um método de determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo, utilizando como solvente de extracção uma solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1M) e como método de extracção ultra-sons. Este método apresentava como principal inconveniente o tempo necessário à realização da extracção e ao reduzido número de frascos passíveis de serem colocados simultaneamente no sonicador.

O presente trabalho insere-se na mesma linha de investigação sendo que a extracção por ultra-sons foi substituída por extracção por micro-ondas com o duplo objectivo de reduzir substancialmente o tempo necessário para preparar cada amostra e aumentar qualitativamente a extracção.

O presente projecto tem como objectivo optimizar todo o processo de análise das amostras de solo de montados de sobro, em especial o processo de extracção dos compostos voláteis eventualmente presentes, enriquecendo a bibliografia existente. A detecção e a quantificação da presença nas amostras de cloroanisóis e clorofenóis permitem proceder à análise das eventuais contaminações e caracterizar cada um dos solos onde se efectua a exploração de cortiça.

3 Descrição Técnica

No presente capítulo encontra-se descrito, de forma detalhada, todo o trabalho desenvolvido e realizado ao longo do estágio curricular. Numa primeira fase tornou-se necessário otimizar o método desenvolvido por Marques (2009) para a quantificação dos cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e clorofenóis (TCP, TeCP, PCP e DCP) presentes nas diferentes amostras de solo recolhidas em diferentes montados de sobro.

3.1 Optimização do método de análise dos cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo

O método de extracção desenvolvido por Marques (2009) e que importava otimizar, iniciava-se com a preparação prévia das amostras de solo, o que implicava o seu peneiramento com um crivo (malha de 2 mm) para remoção de pedras e algum material orgânico presente nas amostras em causa. De seguida, colocavam-se 15 g de solo em frascos de 100 mL (escuros, para minimizar os efeitos das radiações luminosas e com tampa de rosca, isolada com papel de alumínio, para um melhor tamponamento) e adicionavam-se 90 mL de solvente de extracção - solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) e carbonato de potássio (0,1 M). Posteriormente, os frascos com as amostras de solo eram macerados no sonicador (*Ultrasonic Cleaner, Fungilab S.A.*) durante 15 minutos, a uma temperatura de 90°C, para melhor extracção dos compostos voláteis. Finalmente as amostras eram analisadas por SPME/GC-MS (método de análise descrito no Anexo 2).

Com o objectivo de melhorar a metodologia descrita e consequentemente diminuir o tempo de preparação de cada amostra (aumento do número de amostras preparadas por unidade de tempo), foi optimizado o método de extracção dos compostos, substituindo o sonicador pelo micro-ondas.

3.1.1 Método de extracção utilizando micro-ondas: testes preliminares

Inicialmente foram testadas as várias disposições possíveis dos frascos escuros, de 100 mL, no prato giratório do micro-ondas (*BLUEsky, MOF800L20.1*) de forma a maximizar a capacidade do mesmo.

De seguida foram efectuados vários ensaios fazendo variar o número de frascos, a potência e o tempo de extracção (Tabela 3). Todos os frascos utilizados nesta etapa experimental continham macerações de 15 g de solo com solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M).

Tabela 3 - Descrição dos ensaios realizados: potências, tempos e número de frascos testados.

Número de frascos (dispostos no prato do micro-ondas)	Condições de extracção no micro-ondas testadas	
	Potência *	Tempo (min)
1	Mínima	3
	Média	1
		2
3	Alta	1
	Mínima	3
12	Média	1
	Alta	2
		3
		1
	Máxima	2
		3
		5
		6
		7

* Mínima: 136 W; Média: 528 W; Alta: 680 W; Máxima: 800 W

3.1.2 Análise qualitativa e quantitativa da extracção por micro-ondas

Estabelecidos os limites físicos de utilização do micro-ondas, importava determinar se a extracção nele efectuada era qualitativa e quantitativamente melhor do que a efectuada com o sonicator.

Numa primeira fase, foi peneirado solo com um crivo de malha 0,850 mm. Procedeu-se de seguida à sua esterilização, colocando-o em estufa durante 60 minutos à temperatura de 180 °C com o objectivo de eliminar qualquer contaminação nativa. Estas amostras foram então contaminadas com 1 mL de d₅-TCA, a partir de uma concentração de 10 mg.L⁻¹ (quantidade absoluta de 5 ng) e maceradas com 90 mL de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M).

Efectuadas as preparações, foram as mesmas sujeitas aos procedimentos descritos acima e submetidas a análise por SPME/GC-MS/MS (método de análise descrito no Anexo 2), com o propósito de determinar as recuperações obtidas do contaminante d₅-TCA para cada uma das combinações efectuadas no processo de extracção.

3.2 Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de exploração de cortiça

3.2.1 Descrição dos procedimentos experimentais adoptados na análise de solos

Os procedimentos seguidos para efectuar a análise das amostras de solo foram os seguintes:

- peneiraram-se as diferentes amostras de solo com um crivo (malha 0,850 mm); utilizou-se um crivo de malha mais fina do que o utilizado por Marques (2009) com o objectivo de extrair o máximo de matéria orgânica e pedras presentes no solo;
- colocaram-se 15 g de solo em cada frasco (frasco escuro de 100 mL com tampa de rosca forrada com papel de alumínio);
- adicionaram-se 90 mL de solução hidroalcoólica (12% v/v) de carbonato de potássio (0,1 M) a cada frasco;
- procedeu-se à extracção em micro-ondas, utilizando como condições de extracção, a potência máxima, durante 5 minutos;
- efectuou-se a análise de cada uma das amostras utilizando o método de análise SPME/GC-MS/MS (método de análise descrito no Anexo 2).

Paralelamente, e dada a necessidade de reportar os resultados finais em $\text{ng} \cdot \text{g}_{\text{solo seco}}^{-1}$, foi determinado o teor de humidade de cada amostra de solo. A equação é a seguinte:

$$H_{\text{Solo}} (\%) = \frac{P - P_s}{P_s} \times 100 \quad (3.1)$$

, em que H_{Solo} é a percentagem de humidade da amostra de solo, P o peso da amostra húmida e P_s é o peso da amostra seca (estufa a 105 °C, até peso constante).

3.2.2 Amostras de solo analisadas

As amostras de solo analisadas foram enviadas, a pedido do Departamento de I&D, por diversas herdades que se dedicam à exploração da cortiça, com diferentes localizações geográficas. De cada uma das herdades (lotes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21), num total de vinte e uma, foram enviadas dez amostras de solo, o que fez um total de duzentas e dez amostras analisadas. Em cada herdade o local de recolha das amostras foi efectuado de forma aleatória. O objectivo principal consistia em determinar o grau de contaminação por cloroanisóis e clorofenóis das diferentes amostras de cada uma das herdades e determinar também o grau de contaminação global das herdades entre si, especialmente nos locais onde a cortiça recolhida apresenta elevado grau de contaminação pelos agentes atrás referidos.

3.2.3 Análise dos cloroanisóis e clorofenóis por GC-MS/MS

A partir do programa de aquisição de dados do GC-MS/MS foi possível proceder à quantificação dos cloroanisóis e clorofenóis presentes nas amostras através da integração dos picos correspondentes ao padrão interno (d_5 -TBA) e ao contaminante que se pretendia analisar. O tratamento destes resultados está descrito no Anexo 2.

3.2.4 Tratamento estatístico dos dados

Para a análise dos resultados obtidos foi utilizado o programa XLSTAT - *Statistical Software*, uma aplicação informática implementada no *Microsoft Office Excel*. Foram ainda efectuadas análises de variância (ANOVA), análise de componentes principais (ACP) e testes de Tukey.

4 Discussão dos resultados

4.1 Optimização do método de análise dos cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo

4.1.1 Método de extracção utilizando micro-ondas: testes preliminares

Os testes preliminares permitiram constatar que a capacidade máxima de frascos passível de serem dispostos no prato do micro-ondas era 20. Esta disposição conduzia a uma quase total ocupação da superfície do prato, o que levava à falta de uniformidade na transmissão da energia aos diferentes frascos. Esta disposição não se mostrava, pois, adequada.

Posteriormente e com vista a testar o comportamento do micro-ondas face à alteração das variáveis número de frascos, potência e tempo de extracção, procedeu-se à realização das seguintes experiências:

Ensaio A - Colocação no prato giratório do micro-ondas de um frasco contendo 15 g de amostra de solo ao qual foram adicionados 90 mL de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1M). Actuando nas variáveis tempo e potência de extracção observou-se o seguinte:

Potência	Tempo de extracção	Resultado da observação
Mínima	3 minutos	Quente
Média	1 minuto	Quente, quase em ebulição
Média	2 minutos	Transbordou
Alta	1 minuto	Transbordou

Ensaio B - Colocação no prato giratório do micro-ondas de três frascos contendo cada um 15 g de amostra de solo ao qual foram adicionados 90 mL de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1M). Actuando nas variáveis tempo e potência de extracção observou-se o seguinte:

Potência	Tempo de extracção	Resultado da observação
Mínima	3 minutos	Morno
Média	1 minuto	Morno

Ensaio C - Colocação no prato giratório do micro-ondas de doze frascos contendo cada um 15 g de amostra de solo ao qual foram adicionados 90 mL de solução hidroalcoólica (12% de etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1M). Actuando nas variáveis tempo e potência de extracção observou-se o seguinte:

Potência	Tempo de extracção	Resultado da observação
Mínima	2 minutos	Morno
Média	2 minutos	Quente
Alta	2 minutos	Quente
Alta	3 minutos	Quase entrou em ebulição
Máxima	2 minutos	Quente
Máxima	3 minutos	Quente
Máxima	5 minutos	Entrou em ebulição
Máxima	6 minutos	Entrou em ebulição
Máxima	7 minutos	Transbordou



Ensaio A



Ensaio B



Ensaio C

Figura 2 - Esquema representativo da disposição dos frascos para os ensaios A, B e C no prato giratório do micro-ondas.

Perante os resultados obtidos pelo ensaio A, foi possível constatar que os instrumentos utilizados - frascos e rolhas - suportavam as condições de operação do micro-ondas. Não sendo objectivo do trabalho utilizar este método de extracção para um único frasco, este

ensaio serviu apenas para observar o comportamento do material laboratorial perante as condições de operação do micro-ondas.

Como consequência dos resultados observados para os três ensaios, foram desde logo excluídas as condições de operação do micro-ondas com potência mínima dado que o tempo necessário à ocorrência de extracção com esta potência seria grande o que contrariava o objectivo inicial - efectuar mais extracções por unidade de tempo. Foi possível observar que para esta potência e tempos de extracção reduzidos, aparentemente não se verificava extracção. De igual forma foram excluídas as condições de operação em que se observou que o volume das amostras ficava comprometido (demasiada potência e/ou demasiado tempo de exposição levavam os frascos a transbordarem).

4.1.2 Análise qualitativa e quantitativa da extracção por micro-ondas

Nesta fase o objectivo principal foi efectuar a análise da eficiência da utilização do micro-ondas como método de extracção. Para tal procedeu-se à contaminação artificial de amostras de solo, o que permitia conhecer à partida a quantidade de contaminante presente. As preparações foram submetidas a diferentes potências e tempos de extracção no micro-ondas e comparadas com outras amostras sujeitas a extracção por ultra-sons (método de referência).

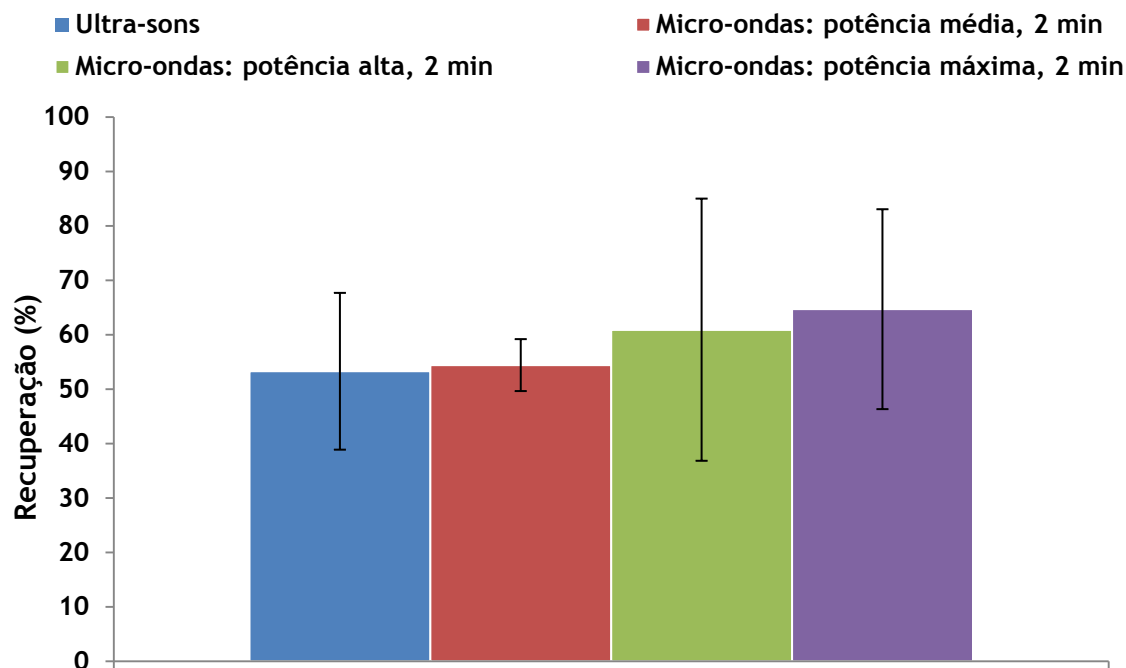


Figura 3 - Recuperações do contaminante d_5 -TCA obtidas utilizando ultra-sons (método de referência) e o micro-ondas durante 2 minutos e fazendo variar a potência de extracção (média, alta ou máxima).

A recuperação do d_5 -TCA, utilizando como método de extracção o micro-ondas, é superior quando comparada com os resultados obtidos com extracção por ultra-sons (Figura 3), sendo possível obter mais 20% de recuperação (para as condições testadas). Foi possível constatar que algumas condições de operação se mostraram mais vantajosas do que outras. Assim, mantendo fixo o tempo de extracção e fazendo variar a potência, a recuperação do contaminante aumenta com o aumento da potência. Esta constatação levou à exclusão da utilização da potência média nos ensaios seguintes.

Numa segunda fase, a extracção foi realizada aumentando o tempo e comparando as recuperações obtidas para as potências alta e máxima, potências estas que anteriormente forneceram melhores resultados.

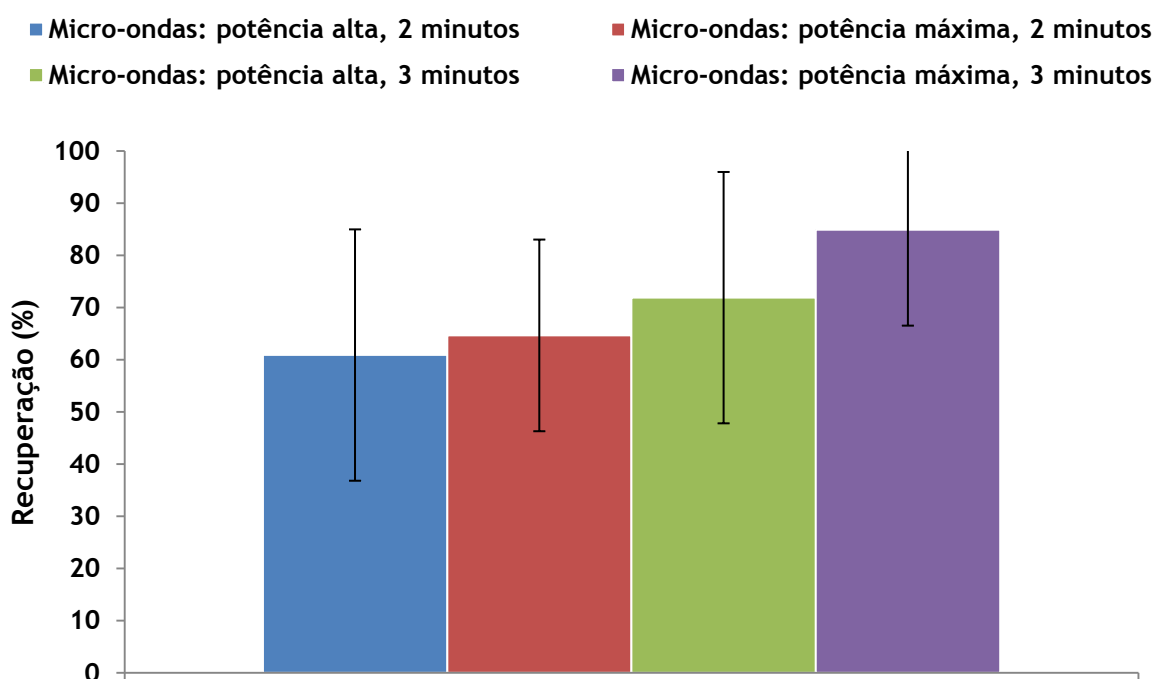


Figura 4 - Recuperações do contaminante d_5 -TCA obtidas utilizando o micro-ondas durante 2 e 3 minutos e fazendo variar a potência de extracção (alta ou máxima).

Observando a Figura 4 é possível verificar que as recuperações do d_5 -TCA são superiores quando, quer o tempo de extracção, quer a potência utilizada, são superiores, obtendo-se para a potência máxima e tempos de extracção de 2 e 3 minutos, 65% e 85% de recuperação, respectivamente.

Estabelecidas as condições de potência óptima e tendo verificado que a extracção por micro-ondas era de facto mais eficiente que a realizada por ultra-sons, passou-se à análise de amostras de solo com possíveis contaminações nativas com cloroanisóis e clorofenóis.

Pretendia-se desta forma verificar se os resultados obtidos seriam consistentes com os das amostras contaminadas artificialmente e otimizar o método de extracção quanto à variável tempo.

Da mesma forma tornou-se importante aquilatar da influência na extracção da disposição física dos frascos no prato do micro-ondas. Numa primeira fase, foram dispostos 9 frascos em quadrícula (Figura 5) por se pressupor que esta disposição assegurava a equidistância entre aqueles.

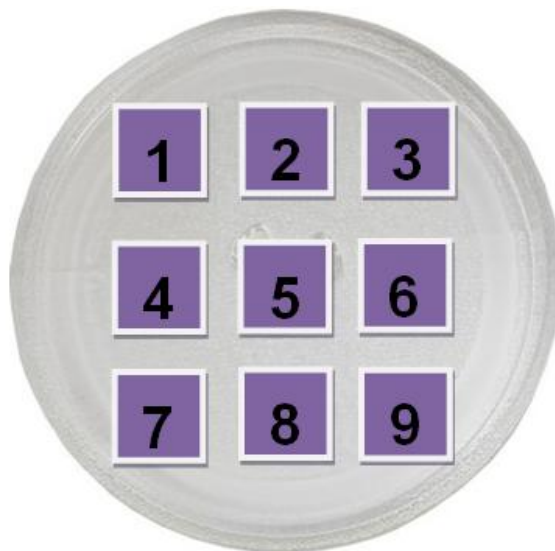


Figura 5 - Disposição dos frascos em quadrícula no prato giratório do micro-ondas.

Utilizando a potência considerada óptima (potência máxima) foram efectuados diferentes extracções, fazendo variar o tempo entre um e seis minutos dado que já tínhamos constatado que os frascos transbordavam aos sete minutos. Estes ensaios tiveram como objectivo confirmar o pressuposto inicial: um aumento do tempo de extracção conduziria a uma mais eficiente extracção. As Figuras 6, 7 e 8, que ilustram as concentrações extraídas dos compostos TCA, TCP e 2,6-DCP, permitem confirmar o pressuposto enunciado. Para os restantes compostos (TeCA, PCA, TeCP e PCP) não são apresentados gráficos dado que as concentrações extraídas apresentaram valores residuais.

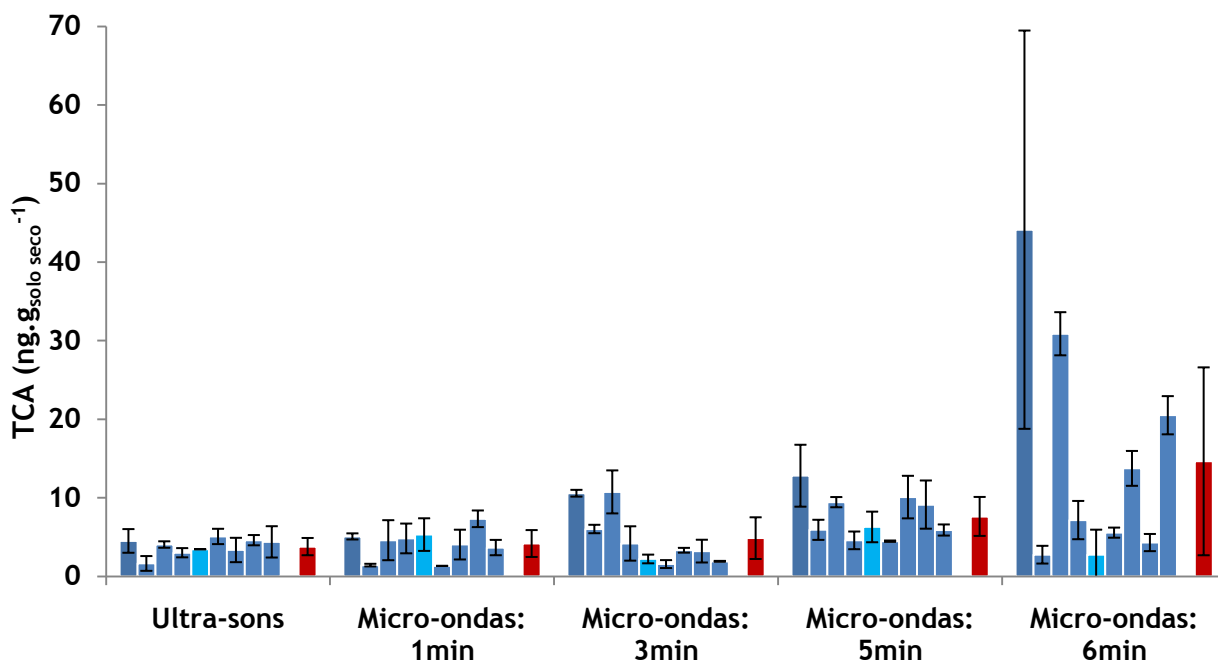


Figura 6 - Quantidades de TCA obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.

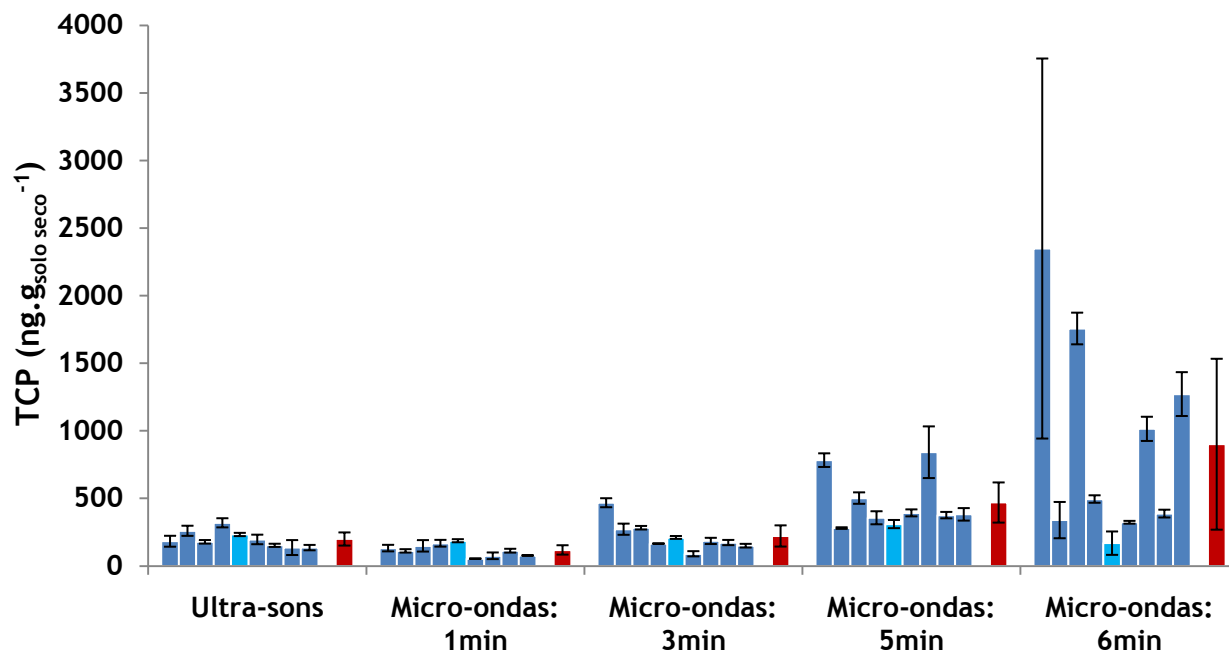


Figura 7 - Quantidades de TCP obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.

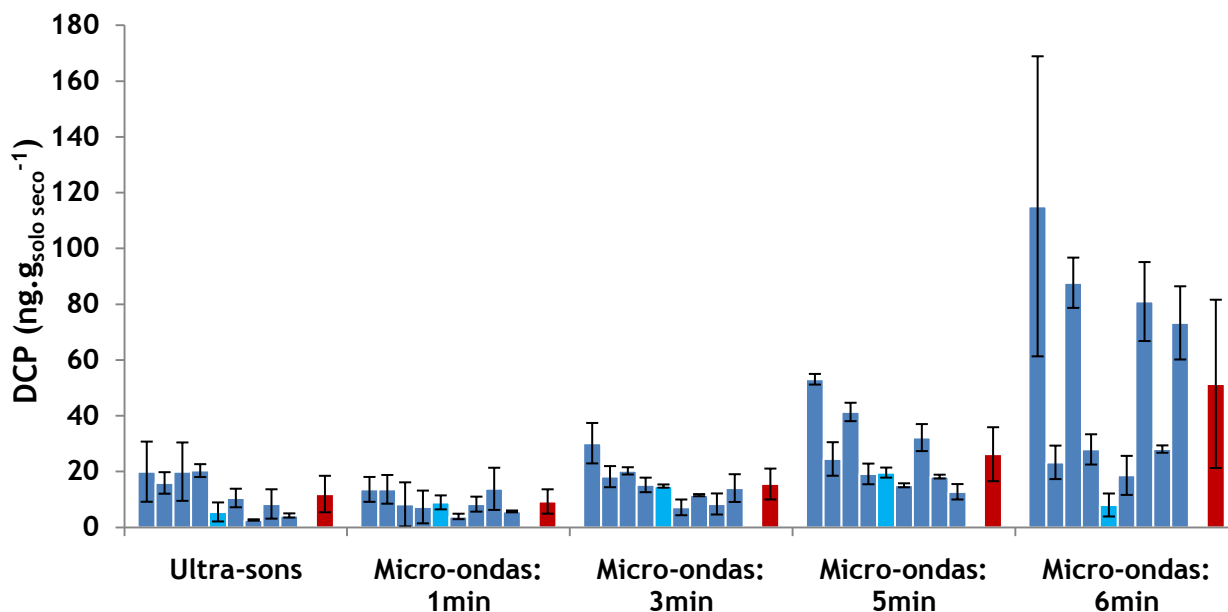


Figura 8 - Quantidades de DCP obtidas com os métodos de extracção por ultra-sons e por micro-ondas (potência máxima, tempo entre 1 e 6 minutos). As barras azuis representam os 9 frascos e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção. A barra equivalente ao frasco 5 apresenta cor azul claro.

Importa realçar, que para um tempo de extracção de 6 minutos alguns frascos apresentam muito bons resultados, ao contrário de outros que evidenciam extracções pobres, o que conduz a resultados globais com elevada variabilidade.

Os resultados das análises vieram no entanto evidenciar que a extracção realizada nos frascos colocados na posição 5 conduzia a resultados insatisfatórios. Esta situação é bem observada nas figuras anteriores, onde estão assinaladas com cor diferente (azul claro) as quantidades de extracção para os compostos TCA, TCP e 2,6-DCP no frasco referido. Optou-se por retirar o mesmo e comparar os resultados obtidos na disposição em quadrícula com os obtidos numa disposição em círculo (Figura 9).

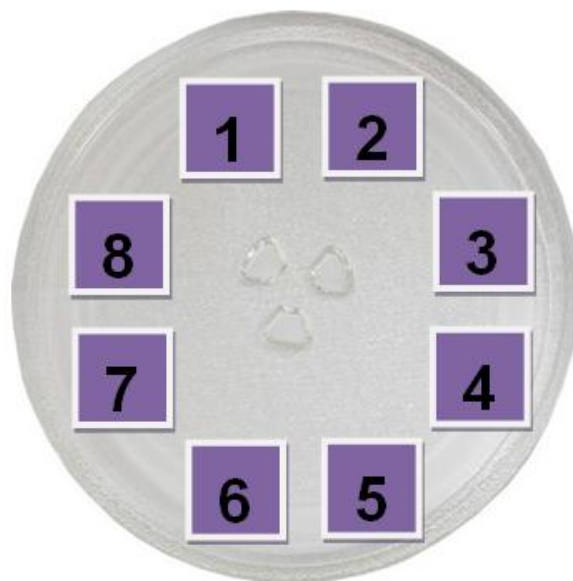


Figura 9 - Disposição dos frascos em círculo no prato giratório do micro-ondas.

Nas figuras 10, 11 e 12 são apresentados os resultados obtidos, com extracção por micro-ondas, na potência máxima e para os tempos de 5 e 6 minutos, na nova disposição (Figura 9) comparando com a disposição apresentada na Figura 5 retirado o frasco número 5.

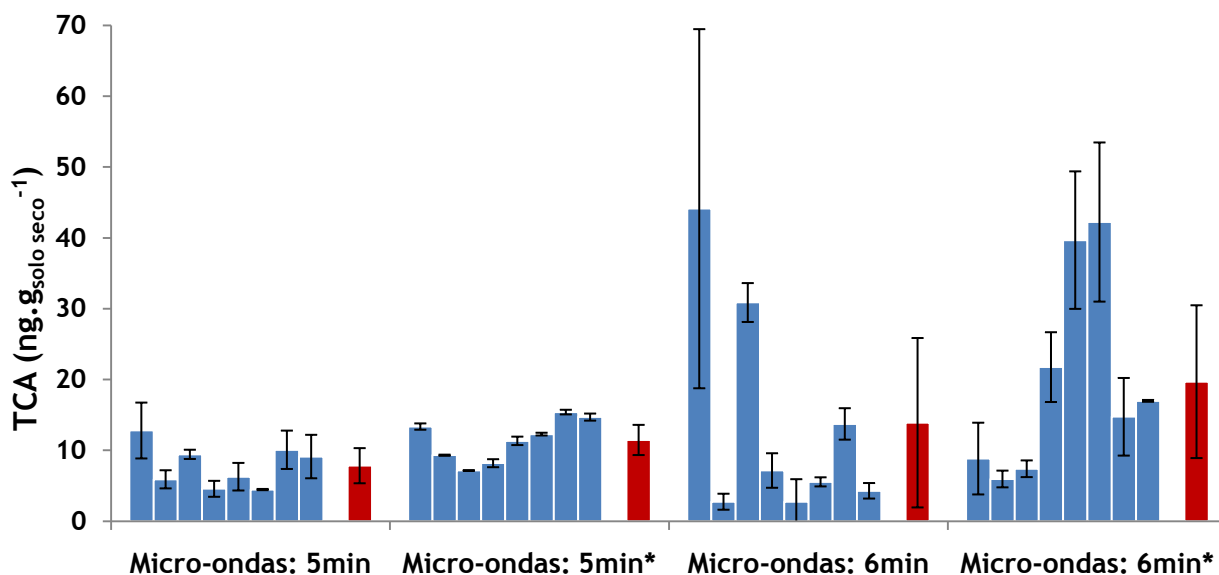


Figura 10 - Quantidades de TCA obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção.

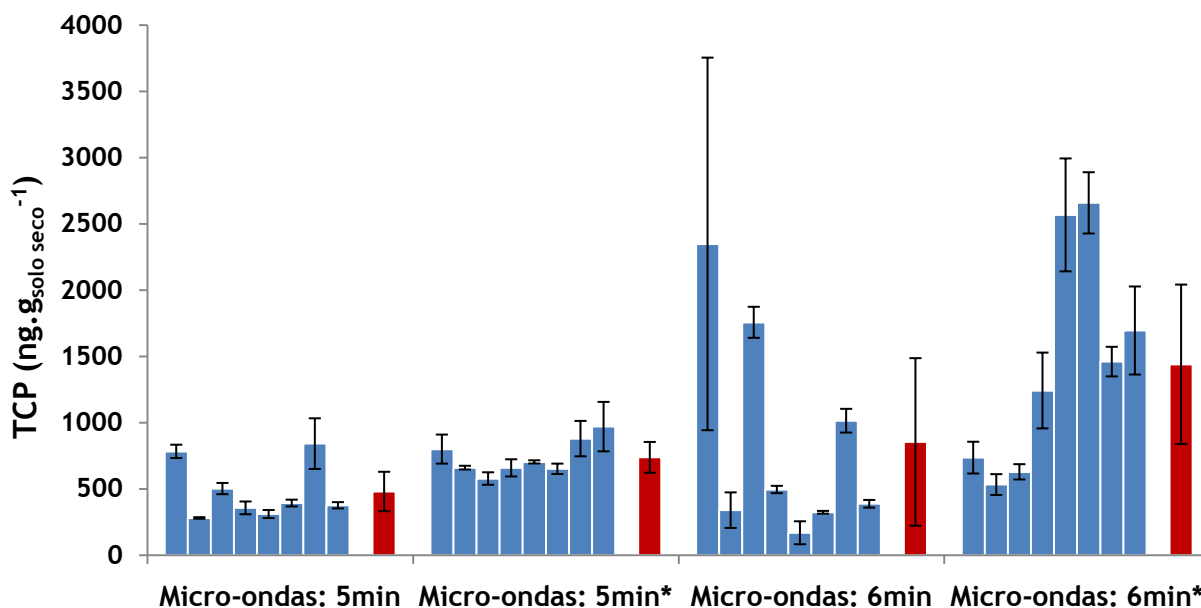


Figura 11 - Quantidades de TCP obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção.

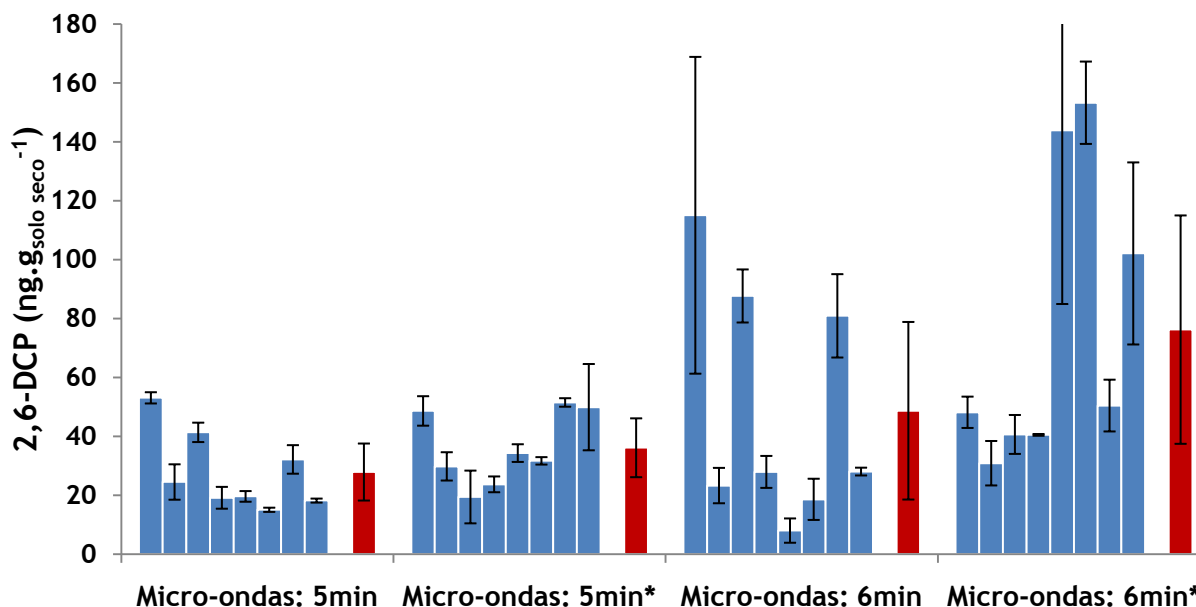


Figura 12 - Quantidades de DCP obtidas para os métodos de extracção por micro-ondas (potência máxima, 5 e 6 minutos). As representações cuja legenda apresenta asterisco, referem-se à disposição em círculo enquanto os outros são para a disposição em quadrícula. As barras azuis representam os 8 frascos dispostos no micro-ondas e os respectivos desvios-padrão. As barras vermelhas representam a média e o respectivo desvio-padrão das quantidades extraídas pelos frascos, para cada condição experimental de extracção.

Efectuadas novas extracções com a nova disposição dos frascos, utilizando tempos de 5 e 6 minutos, confirmou-se que para ambas as disposições e para o tempo de extracção de 6 minutos se mantêm resultados globais com elevado desvio-padrão, apesar de alguns frascos continuarem a apresentar elevada extracção (Figuras 10, 11 e 12). A danificação térmica das amostras e a consequente destruição do padrão interno pode ser a razão da elevada variabilidade observada com 6 minutos de extracção. A formulação desta hipótese surgiu da visualização destas macerações que, após a extracção, apresentavam uma coloração muito diferente da inicial, o que poderá indiciar a ocorrência de um processo de degradação térmica da amostra.

Observando os resultados obtidos com o tempo de extracção 5 minutos com as duas disposições atrás referidas, constatou-se que a recuperação dos contaminantes foi relativamente elevada quando comparada com as condições de potência, tempo e disposição dos frascos no prato do micro-ondas referidos anteriormente. Contudo, com a disposição em círculo, obtêm-se não só melhores resultados de extracção (cerca de 20% mais elevada) mas também resultados mais homogéneos.

Tendo presente o exposto anteriormente, as análises das amostras de solo vão ser realizadas com extracção por micro-ondas, utilizando a potência máxima, um tempo de extracção de 5 minutos e disposição em círculo dos frascos no prato do micro-ondas. Estas constituem as condições de operação estabelecidas como mais eficientes.

Em seguida é apresentado um esquema representativo da metodologia utilizada para análise dos solos (Figura 13).



Figura 13 - Esquema representativo do método utilizado para análise dos solos.

4.2 Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de exploração de cortiça

4.2.1 Amostras de solo analisadas

Tendo em conta os resultados obtidos por Marques (2009) interessavam, particularmente, os resultados obtidos para a quantificação dos compostos TCA, TCP e PCP. Neste projecto assumia igual interesse quantificar o DCP dado que, de acordo com a literatura entretanto publicada, se trata de um composto com significativa relevância na contaminação dos solos.

Analisados os resultados obtidos para a quantificação dos cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e dos clorofenóis (TCP, TeCP, PCP e DCP), tornou-se evidente que, para as diferentes amostras de solo provenientes dos diferentes lotes analisados, o TCP e o DCP são os compostos detectados em maior quantidade (Figuras 17, 19 e 20), sendo que o DCP, face ao TCP, apresentam valores substancialmente mais baixos. Para os restantes compostos, nomeadamente TCA, os valores quantificados podem considerar-se como sendo residuais (Figuras 14, 15, 16 e 18).

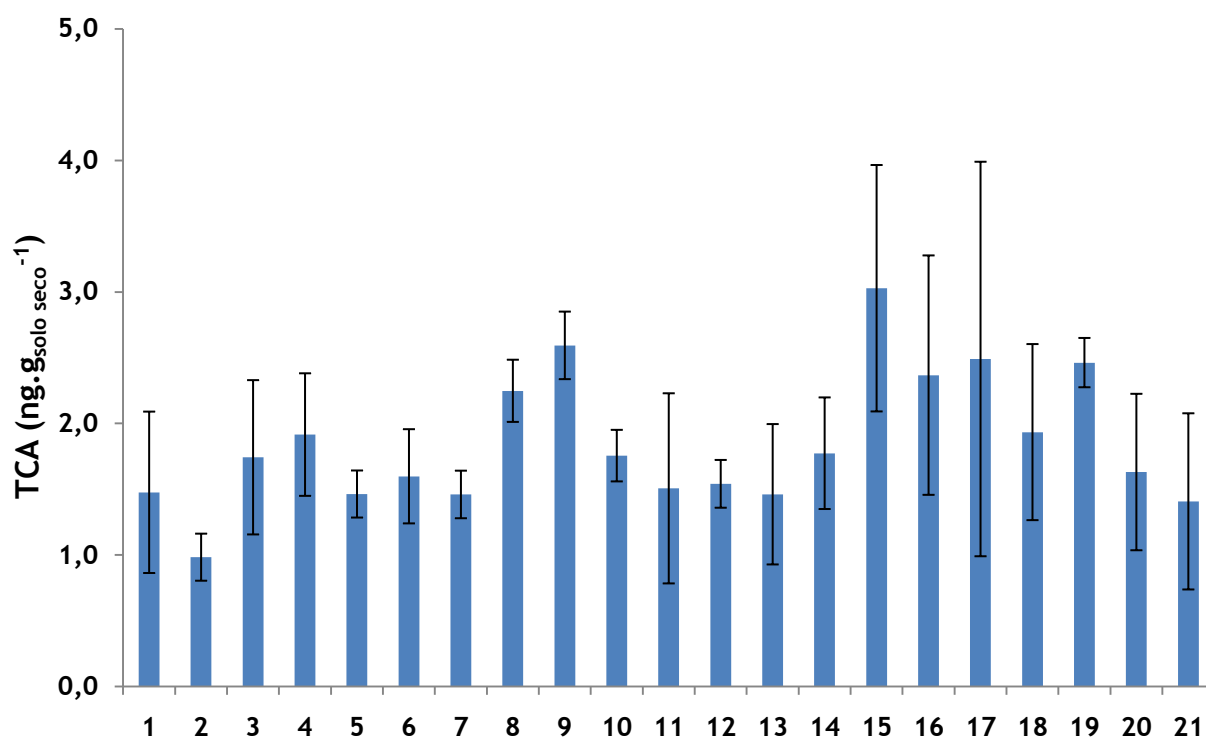


Figura 14 - Quantidades de TCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde se efectua a exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

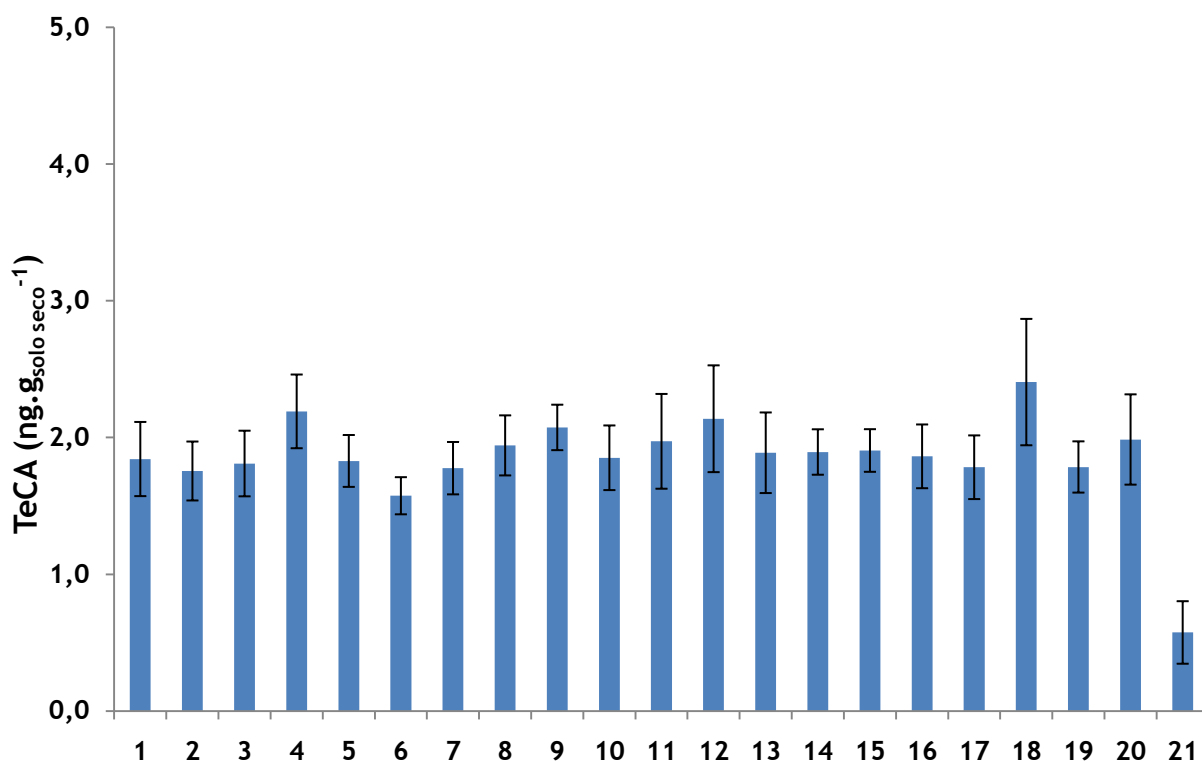


Figura 15 - Quantidades de TeCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

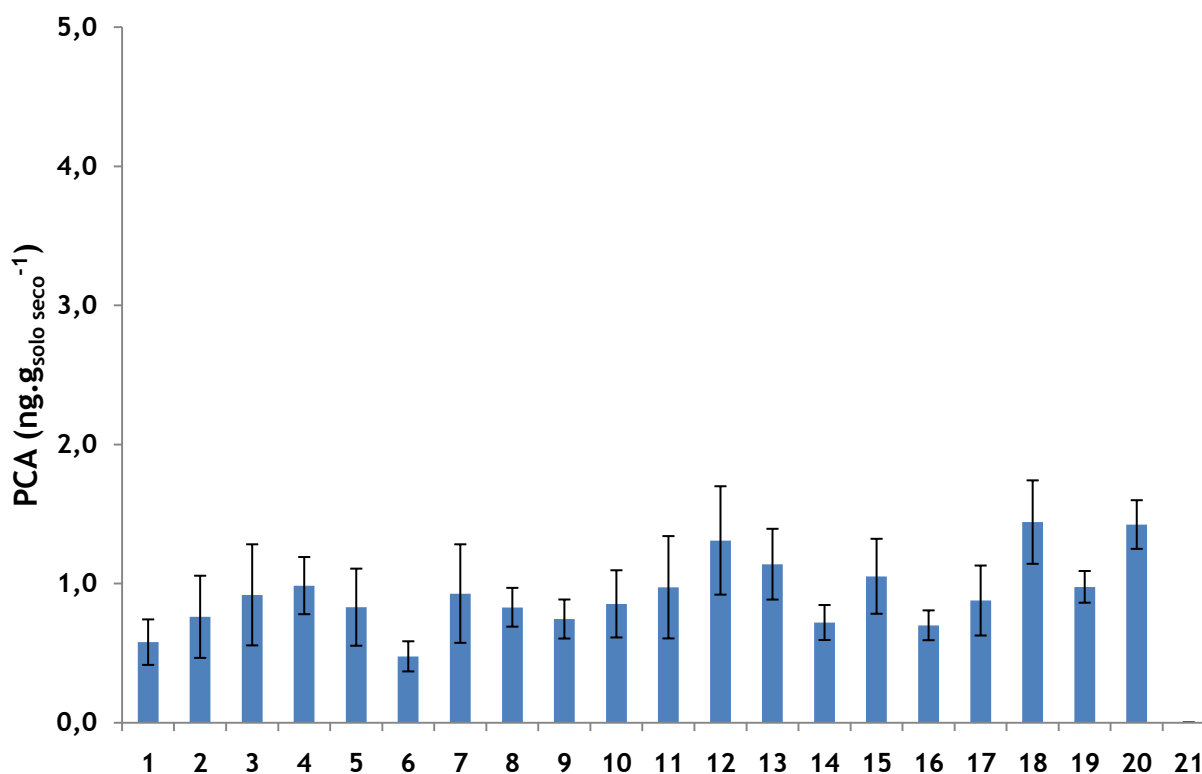


Figura 16 - Quantidades de PCA detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

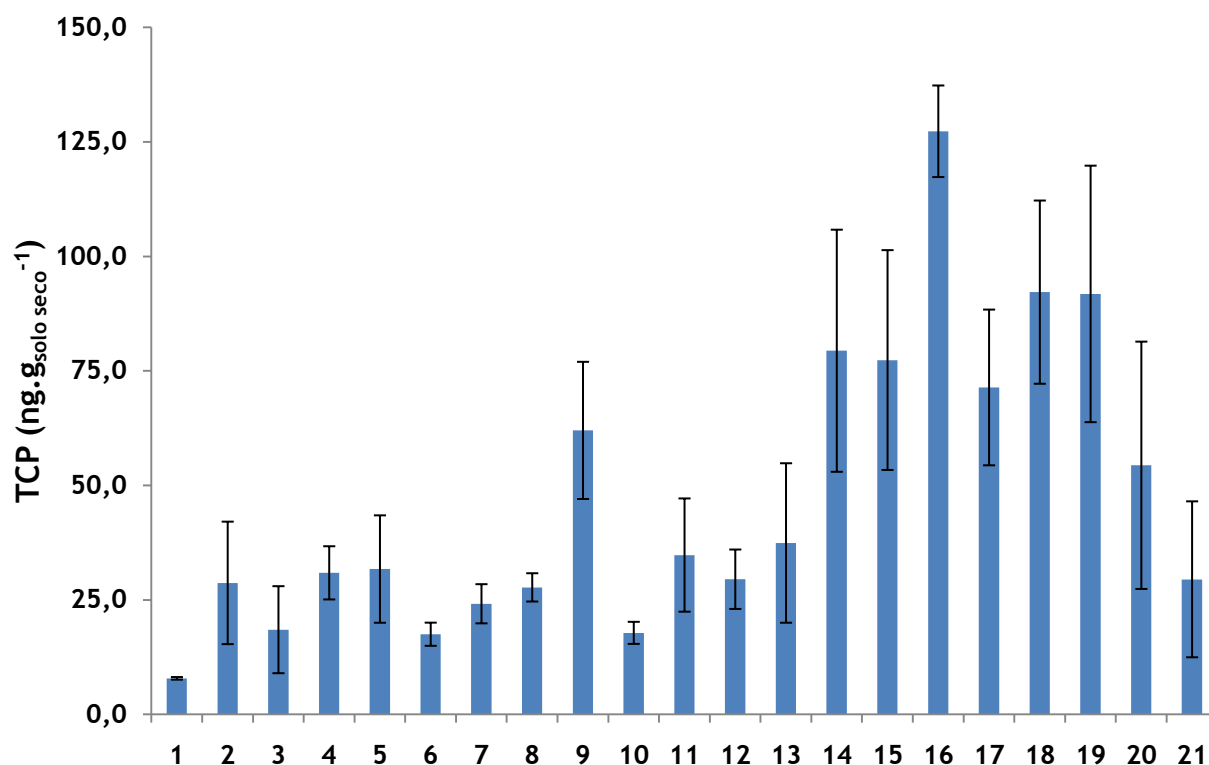


Figura 17 - Quantidades de TCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

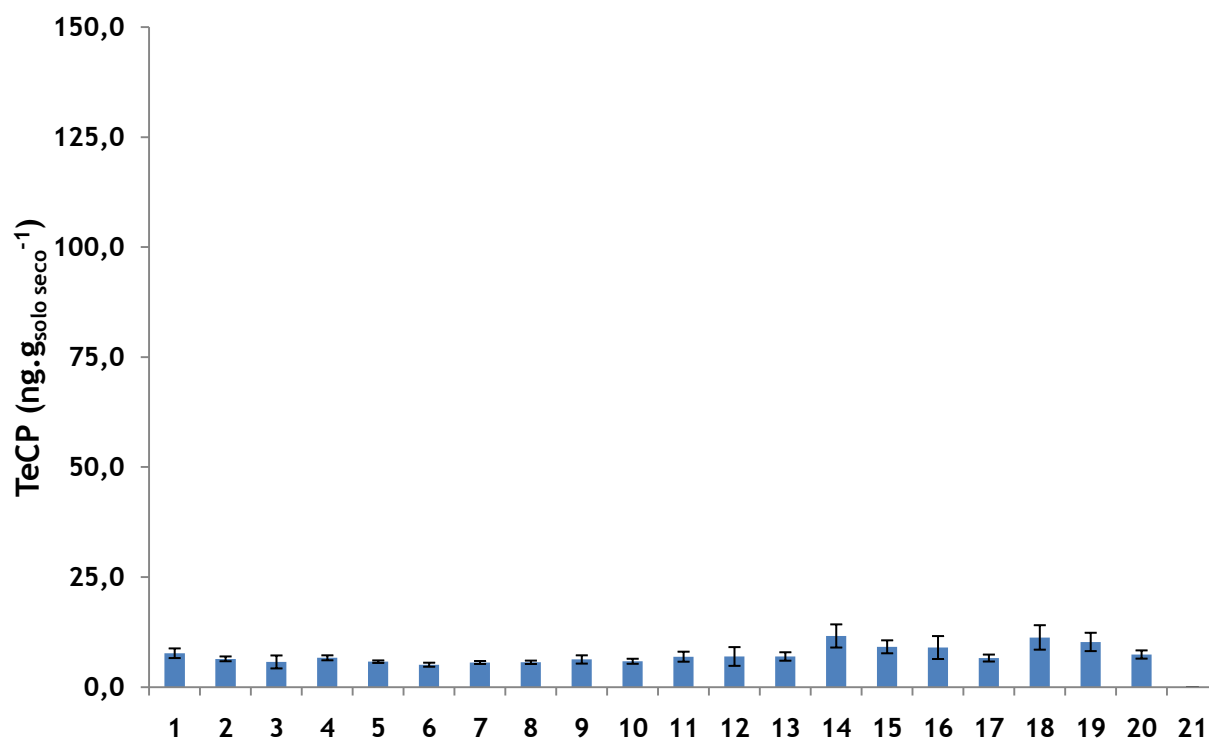


Figura 18 - Quantidades de TeCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

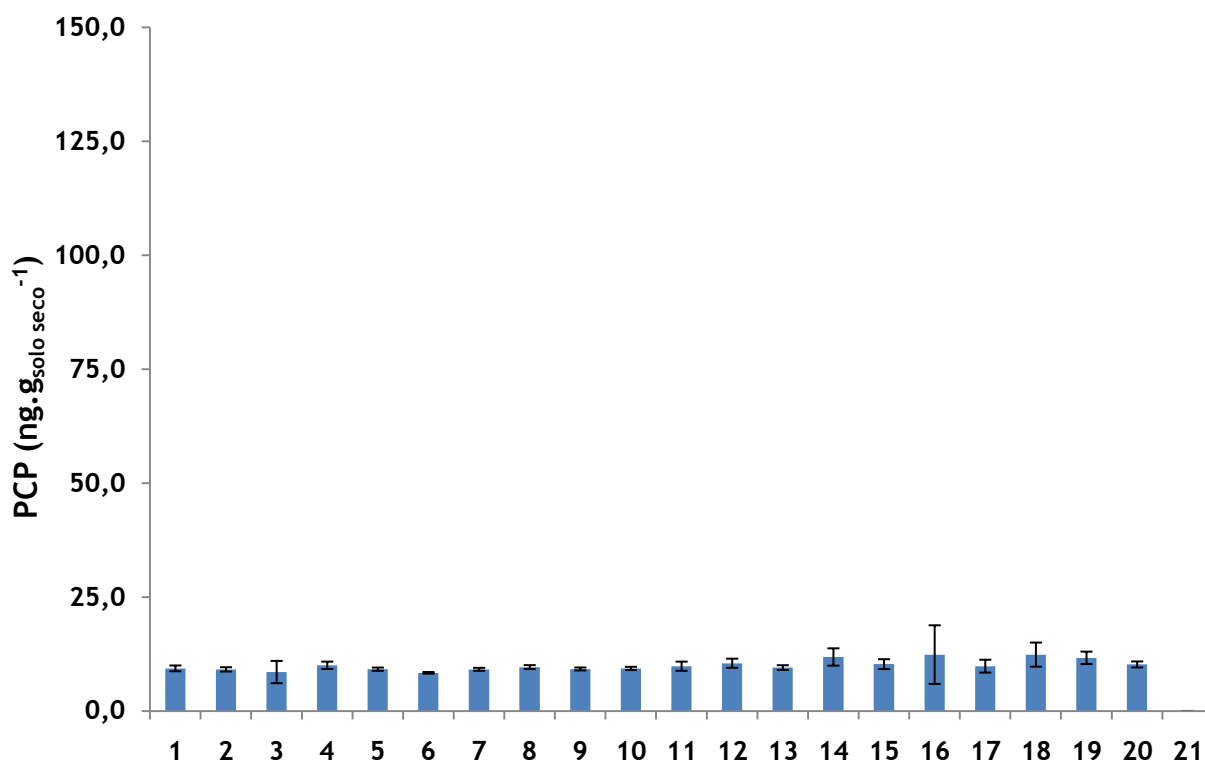


Figura 19 - Quantidades de PCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

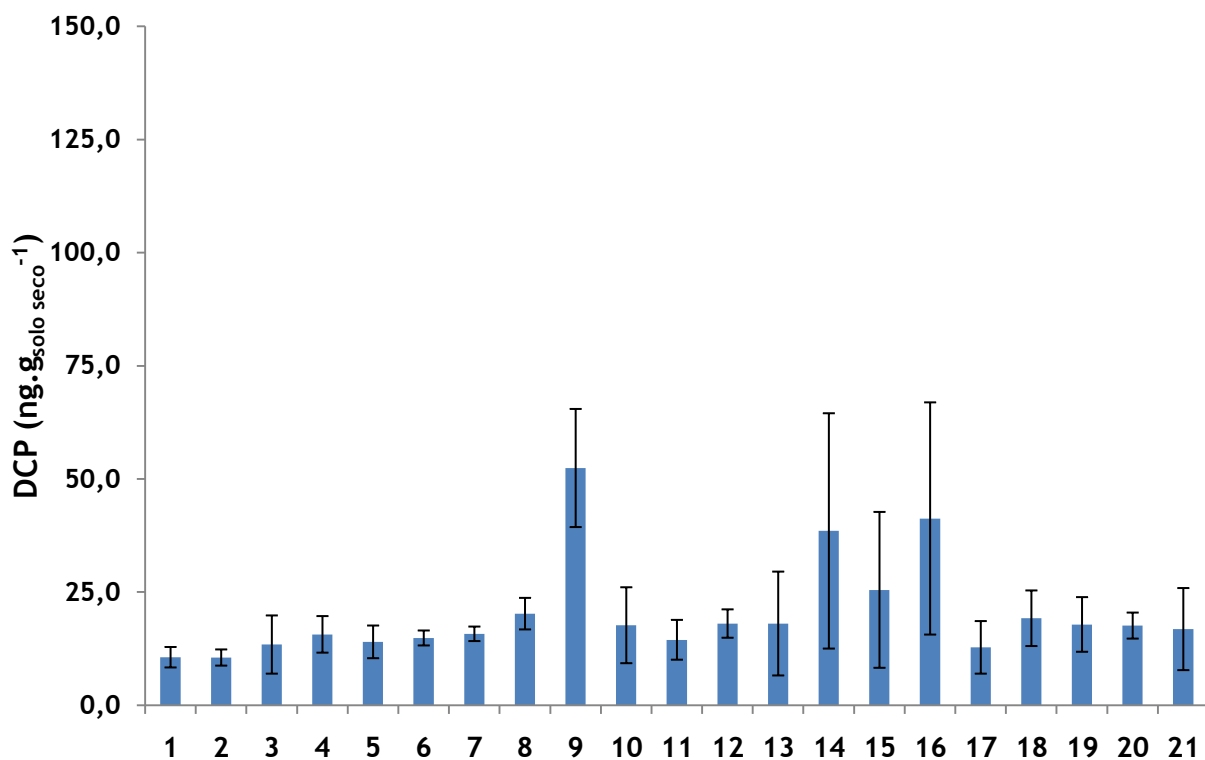


Figura 20 - Quantidades de DCP detectadas nos 21 lotes de solo recolhidos em diferentes locais onde existe exploração da cortiça. As barras azuis representam a média das 10 amostras e o respectivo desvio-padrão.

A análise de variância (ANOVA) realizada aos resultados obtidos mostrou a existência de diferenças significativas de contaminação entre os diferentes lotes, para todos os compostos (TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, PCP e DCP) ($p < 0,001$).

Tabela 4 - Quantidades de cloroanisóis e clorofenóis dos 21 lotes de exploração de cortiça (entre parênteses são apresentados os respectivos desvios-padrão relativos às 10 amostras de solo de cada lote) obtidas pela análise da variância ANOVA.

	Compostos (ng composto.g _{solo seco} ⁻¹)						
	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	PCP	DCP
Lote 1	1,5 (0,6) ^{b,c}	1,8 (0,3) ^{b,c,d}	0,6 (0,2) ^{e,f}	7,9 (0,3) ^b	7,7 (1,1) ^{d,e,f}	9,3 (0,6) ^{b,c}	10,6 (2,3) ^d
Lote 2	1,0 (0,2) ^c	1,8 (0,2) ^{c,d}	0,8 (0,3) ^{d,e,f}	28,7 (13,4) ^b	6,4 (0,5) ^{f,g}	9,1 (0,5) ^{b,c}	10,5 (1,8) ^d
Lote 3	1,7 (0,6) ^{b,c}	1,8 (0,2) ^{b,c,d}	0,9 (0,4) ^{c,d,e,f}	18,5 (9,5) ^b	5,7 (1,5) ^{f,g}	8,5 (2,4) ^c	13,4 (6,4) ^d
Lote 4	1,9 (0,5) ^{a,b,c}	2,2 (0,3) ^{a,b}	1,0 (0,2) ^{b,c,d,e}	30,9 (5,8) ^b	6,7 (0,6) ^{f,g}	10,0 (0,8) ^{a,b,c}	15,6 (4,0) ^d
Lote 5	1,5 (0,2) ^{b,c}	1,8 (0,2) ^{b,c,d}	0,8 (0,3) ^{d,e,f}	31,7 (11,7) ^b	5,8 (0,3) ^{f,g}	9,2 (0,4) ^{b,c}	14,0 (3,6) ^d
Lote 6	1,6 (0,4) ^{b,c}	1,6 (0,1) ^d	0,5 (0,1) ^f	17,5 (2,5) ^b	5,1 (0,5) ^g	8,4 (0,2) ^c	14,8 (1,7) ^d
Lote 7	1,5 (0,2) ^{b,c}	1,8 (0,2) ^{b,c,d}	0,9 (0,4) ^{c,d,e}	24,2 (4,3) ^b	5,6 (0,3) ^{f,g}	9,1 (0,3) ^{b,c}	15,8 (1,6) ^d
Lote 8	2,2 (0,2) ^{a,b}	1,9 (0,2) ^{b,c,d}	0,8 (0,1) ^{d,e,f}	27,7 (3,1) ^b	5,6 (0,4) ^{f,g}	9,6 (0,4) ^{a,b,c}	20,2 (3,5) ^{c,d}
Lote 9	2,6 (0,3) ^{a,b}	2,1 (0,2) ^{a,b,c}	0,7 (0,1) ^{d,e,f}	62,0 (15,0) ^{a,b}	6,3 (0,9) ^{f,g}	9,2 (0,3) ^{b,c}	52,4 (13,0) ^a
Lote 10	1,8 (0,2) ^{b,c}	1,9 (0,2) ^{b,c,d}	0,9 (0,2) ^{d,e,f}	17,8 (2,4) ^b	5,9 (0,6) ^{f,g}	9,3 (0,4) ^{b,c}	17,7 (8,4) ^d
Lote 11	1,5 (0,7) ^{b,c}	2,0 (0,3) ^{b,c,d}	1,0 (0,4) ^{c,d,e}	34,8 (12,4) ^b	6,9 (1,1) ^{e,f,g}	9,8 (1,0) ^{a,b,c}	14,4 (4,4) ^d
Lote 12	1,5 (0,2) ^{b,c}	2,1 (0,4) ^{a,b,c}	1,3 (0,4) ^{a,b,c}	29,5 (6,5) ^b	7,0 (2,1) ^{a,b,c,d}	10,5 (1,0) ^{a,b,c}	18,0 (3,1) ^d
Lote 13	1,5 (0,5) ^{b,c}	1,9 (0,3) ^{b,c,d}	1,1 (0,3) ^{a,b,c,d}	37,4 (17,4) ^b	7,0 (1,0) ^{e,f,g}	9,5 (0,5) ^{a,b,c}	18,0 (11,5) ^d
Lote 14	1,8 (0,4) ^{a,b,c}	1,9 (0,2) ^{b,c,d}	0,7 (0,1) ^{d,e,f}	79,4 (26,4) ^{a,b}	11,6 (2,6) ^a	11,8 (1,9) ^{a,b}	38,5 (26,0) ^{a,b,c}
Lote 15	3,0 (0,9) ^a	1,9 (0,2) ^{b,c,d}	1,1 (0,3) ^{a,b,c,d}	77,4 (24,0) ^{a,b}	9,1 (1,5) ^{b,c,d,e}	10,3 (1,1) ^{a,b,c}	25,5 (17,2) ^{b,c,d}
Lote 16	2,4 (0,9) ^{a,b}	1,9(0,2) ^{b,c,d}	0,7 (0,1) ^{d,e,f}	127,3 (10,0) ^a	9,0 (2,6) ^{c,d,e}	12,3 (6,4) ^a	41,3 (25,7) ^{a,b}
Lote 17	2,5 (1,5) ^{a,b}	1,8 (0,2) ^{b,c,d}	0,9 (0,3) ^{c,d,e,f}	71,4 (17,0) ^{a,b}	6,6 (0,8) ^{f,g}	9,8 (1,4) ^{a,b,c}	12,8 (5,8) ^d
Lote 18	1,9 (0,7) ^{a,b,c}	2,4 (0,5) ^a	1,4 (0,3) ^a	92,2 (20,0) ^{a,b}	11,3 (2,8) ^{a,b}	12,4 (2,6) ^a	19,2 (6,1) ^{c,d}
Lote 19	2,5 (0,2) ^{a,b}	1,8 (0,2) ^{b,c,d}	1,0 (0,1) ^{a,b}	91,8 (28,0) ^{a,b}	10,3 (2,1) ^{a,b,c}	11,7 (1,4) ^{a,b}	17,8 (6,0) ^d
Lote 20	1,6 (0,6) ^{b,c}	2,0 (0,3) ^{b,c,d}	1,4 (0,2) ^{a,b}	54,4 (27,0) ^{a,b}	7,4 (0,9) ^{d,e,f}	10,2 (0,7) ^{a,b,c}	17,6 (2,9) ^d
Lote 21	1,4 (0,7) ^{b,c}	0,6 (0,2) ^e	0,0 (0,0) ^g	29,5 (17,0) ^b	0,0 (0,0) ^h	0,0 (0,0) ^d	16,8 (9,1) ^d
Nível de significância	***	***	***	***	***	***	***

*** = diferenças significativas ($p < 0,001$); letras iguais (a, b, c, d, e, f ou g) na mesma coluna (TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, PCP ou DCP) indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si.

Como se pode verificar a partir da Tabela 4, o lote 15 apresenta nível elevado de contaminação, relativamente ao TCA, apresentando $3,0 \text{ ng TCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$. Já o lote 2 é o menos contaminado com TCA ($1,0 \text{ ng TCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$). Relativamente ao TeCA não se verifica o mesmo padrão de contaminação já que os lotes com maior e menor quantidade deste composto são, respectivamente, o Lote 18 ($2,4 \text{ ng TeCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) e o Lote 21 ($0,6 \text{ ng TeCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$). Para o PCA o Lote 18 ($1,4 \text{ ng PCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) é o mais contaminado e o Lote 21 apresenta uma quantidade nula deste composto. Para o TCP, o Lote 16 apresenta a quantidade mais elevada ($127,3 \text{ ng TCP.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) e o Lote 1 apresenta uma quantidade reduzida deste composto ($7,9 \text{ ng TCP.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$). O contaminante TeCP aparece em maior quantidade no Lote 14 ($11,6 \text{ ng TeCP.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) e não foi possível quantificar este composto no Lote 21. Para o PCP, o Lote 16 é o que apresenta maior contaminação ($12,3 \text{ ng PCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) e o Lote 21 apresenta um valor nulo deste composto. Finalmente o DCP está presente em maior quantidade no Lote 9 ($52,4 \text{ ng DCP.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$) e em menor quantidade no Lote 2 ($10,5 \text{ ng TCA.g}_{\text{solo seco}}^{-1}$).

Constata-se, claramente, que a quantidade de clorofenóis detectados é maior do que a de cloroanisóis.

Estatisticamente, e apesar da grande variabilidade entre os vários lotes analisados, poderá afirmar-se, de uma forma geral, que para cada composto, os lotes não são significativamente diferentes entre si. Para tanto é suficiente analisar a forma como os diferentes lotes se agrupam e observar as quantidades de contaminação de cada um deles.

Para visualizar as diferenças significativas existentes entre os compostos analisados e os diferentes lotes, foi realizada a análise de componentes principais (ACP).

Tabela 5 - Matriz correlacção dos diferentes compostos (TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, PCP e DCP), resultante da Análise de Componentes Principais (ACP).

Variáveis	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	PCP	DCP
TCA	1	0,245	0,135	0,636	0,374	0,344	0,528
TeCA	0,245	1	0,809	0,233	0,703	0,870	0,175
PCA	0,135	0,809	1	0,227	0,574	0,686	-0,084
TCP	0,636	0,233	0,227	1	0,651	0,507	0,590
TeCP	0,374	0,703	0,574	0,651	1	0,891	0,312
PCP	0,344	0,870	0,686	0,507	0,891	1	0,251
DCP	0,528	0,175	-0,084	0,590	0,312	0,251	1

A matriz correlacção (Tabela 5) permite verificar a relação existente entre os diferentes compostos. Os coeficientes de correlacção positivos assinalados a negrito, indiciam uma relação significativa entre os diferentes pares de compostos e, quanto mais próximo da unidade é o valor deste coeficiente, mais estreita é a relação entre o par. Assim, quanto maiores forem os níveis de TCA maiores são os de TeCA e DCP. Por outro lado, os níveis de TeCA estão fortemente relacionados com os níveis de PCA, de TeCP e de PCP. O nível de PCA, para além da forte relação que tem com o nível de TeCA, também se relaciona com os níveis de TeCP e de PCP. O nível de TCP, por sua vez, encontra-se relacionado com os níveis de TCA, de TeCP, de PCP e de DCP. Os níveis de PCP aumentam com o aumento dos níveis de TeCA, de PCA, de TCP e de TeCP. Finalmente os níveis de DCP relacionam-se com os níveis de TCA e de TCP.

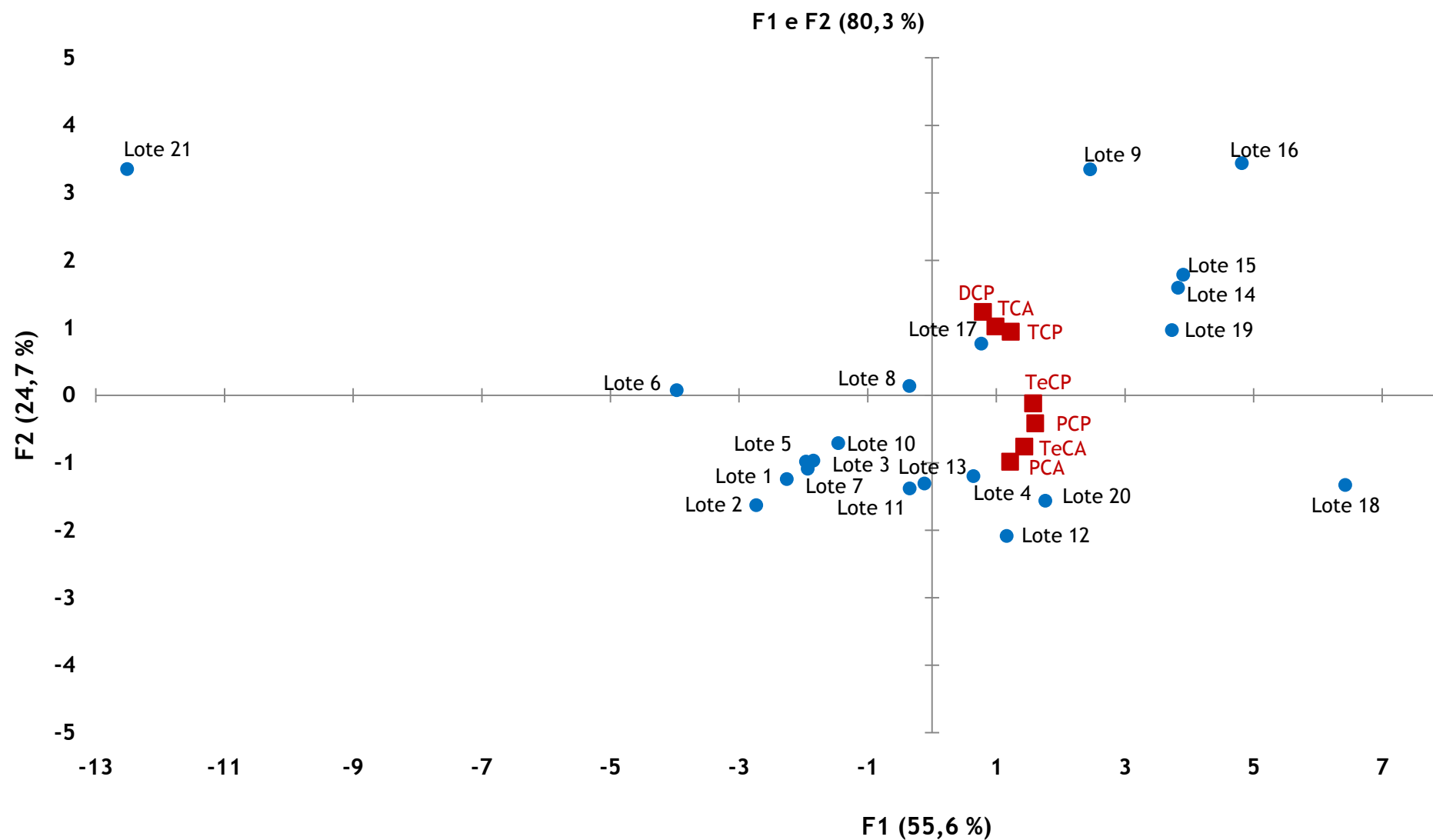


Figura 21 - Análise de componentes principais (ACP) dos cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo dos diferentes lotes analisados.

Os dois primeiros factores (F1 e F2) representam 80,3% da variabilidade total. O primeiro eixo (F1) representa 55,6% da variância total e o segundo eixo (F2) representa 24,7% dessa variância. As variáveis TCA, TCP e DCP têm uma maior contribuição e estão positivamente relacionadas com o eixo F1. As restantes variáveis (TeCA, PCA, TeCP e PCP) também estão positivamente relacionadas entre si, mas com menor contribuição relativamente às anteriores.

Quando se projectam os indivíduos (amostras de terra dos lotes), verifica-se que estes estão distribuídos ao longo de todo o referencial. Os lotes que estão mais afastados do centro do gráfico e na linha de um determinado composto, apresentam maior intensidade deste. Assim, é possível verificar que existe uma relação positiva entre todas as variáveis e os lotes 9, 14, 15, 16, 17 e 19 que são os que apresentam níveis mais elevados de contaminação. Pelo contrário, os lotes 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 11 estão muito próximos entre si, o que significa que são semelhantes, estando negativamente relacionados com as variáveis analisadas, por se tratar de lotes com pouco teor de contaminação. Os lotes 6, 8 e 21 estão mais dispersos entre si e também se encontram negativamente relacionados com as variáveis relativas aos compostos. No que se refere ao lote 21, constatou-se a não detecção de alguns dos compostos pesquisados, situação coerente com esta análise.

5 Conclusões

Ao longo do trabalho realizado procedeu-se à optimização de um método de análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo de montado de sobreiro, utilizando como solvente de extracção uma solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1M) e extracção por micro-ondas. Este método é mais eficaz e mais eficiente relativamente ao método baseado em extracção por ultra-sons dado que foi possível obter extracções com maior quantidade de cloroanisóis e clorofenóis, tornando assim possível efectuar um maior número de extracções por unidade de tempo.

O método optimizado foi aplicado na análise de amostras de solo de montados de sobreiro provenientes de diferentes zonas geográficas onde se efectua a exploração da cortiça. O TCP, o PCP e o DCP foram os compostos detectados em maior quantidade. Os resultados das análises efectuadas aos diferentes lotes permitem concluir que, dentro de cada lote, os valores dos compostos variam pouco. De lote para lote a variação dos valores dos compostos é maior do que dentro do mesmo lote. O TCA foi detectado em todos os solos em níveis negligenciáveis. O TCP e o DCP foram identificados como sendo os principais marcadores químicos dos solos estudados. Estes resultados, caracterizadores dos solos analisados, podem constituir-se como auxiliares importantes no que diz respeito ao processo de escolha dos locais mais apropriados à exploração e compra de cortiça.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objectivos Realizados

O trabalho realizado consistiu na substituição dos ultra-sons por micro-ondas no processo de extracção, seguindo a sugestão deixada por Marques (2009) e na avaliação das potencialidades do novo método no que respeita à obtenção de extracções com melhor qualidade e à realização de mais extracções por unidade de tempo.

Para o efeito procedeu-se à realização de análises de amostras de solo de diversos montados de sobro, provenientes de diferentes localizações geográficas, com o intuito de analisar o risco de contaminação da cortiça em função da caracterização dos solos de que eram provenientes.

Os objectivos traçados foram atingidos pelo que os resultados do trabalho desenvolvido permitem que o Departamento de I&D da A&I possa proceder, em futuros projectos, ao seu aprofundamento.

O tempo dedicado à realização de todas as fases prévias à realização das análises das amostras de solo absorveu a quase totalidade do tempo de estágio.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante o tempo de estágio existiu profícua colaboração com o laboratório do Departamento de I&D da A&I. Tal colaboração contribuiu para a aquisição de experiência e conhecimentos que se mostraram úteis na fase da realização das análises respeitantes ao trabalho de estágio.

Foi necessária uma aprendizagem na operação e manutenção do equipamento GC-MS/MS que possibilitou a realização autónoma dos necessários trabalhos de análise efectuados. Para os diferentes métodos foi efectuada a calibração e optimização dos métodos analíticos e calculados os limites de detecção.

Outras tarefas foram realizadas, das quais importa mencionar as seguintes: preparação de amostras de rotina para análise de TCA, preparação de soluções mãe, análises de TBA, TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP e PCP em amostras de rotina ou reclamações de clientes.

A autora colaborou em diversos projectos a decorrer na empresa e realizou visitas às instalações das Unidades Industriais, A&I, Portocork e Champcork, todas pertencentes à A&I e localizadas em Santa Maria da Feira.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo do trabalho verificaram-se alguns problemas técnicos de que importa referir as avarias no equipamento GC-MS/MS prontamente solucionadas por colaboradores da empresa. A necessidade de conjugar o normal funcionamento do laboratório com a realização do trabalho de estágio, obrigou a uma concertação de esforços no sentido de encontrar horas de utilização dos equipamentos que não comprometessem as rotinas diárias do Departamento, o que foi conseguido.

Limitação significativa foi o estado físico das amostras de solo disponíveis. A presença excessiva de água impossibilitou, numa primeira fase, a sua preparação, nomeadamente o seu peneiramento.

Apesar das limitações apontadas foi possível cumprir o objectivo inicial e chegar a conclusões que permitem a realização de novos trabalhos. Importa, no futuro, realizar análises dos solos mais profundas com o objectivo de efectuar uma mais completa caracterização dos mesmos. Estes resultados, em articulação com outras características ambientais dos locais de exploração da cortiça, permitirão estabelecer a relação entre as características de cada local e o grau de contaminação da cortiça explorada em cada um.

6.4 Apreciação final

Este trabalho desenvolve o estudo realizado por Marques (2009) na mesma empresa. Sendo objectivo da empresa Amorim & Irmãos disponibilizar aos clientes um produto final, rolhas de cortiça, com elevada qualidade, o que implica produzir rolhas isentas de contaminantes do vinho engarrafado, torna-se imprescindível caracterizar os solos dos montados de sobreiro e aquilatar da relação existente entre a presença de contaminantes nesses solos e a presença de contaminantes nas rolhas de cortiça. A compreensão global de todo o processo de contaminação da cortiça é pois fundamental na estratégia da empresa.

A autora optimizou o processo de análise de amostras de solo desenvolvido por Marques (2009) que permite identificar e quantificar os marcadores químicos apontados como mais responsáveis pela contaminação dos montados de sobreiro: TCP e DCP. O novo processo assentou, no essencial, na substituição dos ultra-sons por micro-ondas no processo de extracção dos compostos voláteis da matriz dos solos levando a uma significativa melhoria qualitativa e quantitativa das extracções e, concomitantemente, das análises. Estas constituirão um contributo importante no processo de tomada de decisão respeitante à escolha dos melhores locais de exploração de cortiça.

O trabalho realizado é pois passível de utilização no processo de controlo de qualidade da cortiça utilizada no fabrico de rolhas e uma contribuição científica com utilização comercial,

dadas as novas possibilidades de oferta de produtos com mais qualidade, logo mais do agrado dos clientes.

Todo o trabalho realizado, pela sua diversidade e complexidade, contribuiu para o enriquecimento pessoal da autora como complemento imprescindível da formação académica realizada ao longo do curso.

A constante e cada vez mais rápida evolução dos conhecimentos, da tecnologia e da técnica implicam uma constante actualização. Os profissionais da engenharia devem estar cada vez mais abertos e receptivos à necessária aquisição e actualização dos conhecimentos de forma a poderem responder aos constantes e novos desafios colocados pela sociedade.

7 Referências

- Alves, C., *Migração de compostos voláteis através de diferentes rolhas de vinho*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2010.
- Amon, J.M., Simpson, R. F., *Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance*, Australian Grapegrower and Winemaker, 286, 63-80, 1986.
- APOR, *Anuário da Associação Portuguesa de Cortiça*, 2009.
- Barker, D.A., Capone, D.L., Pollnitz, A.P., Mclean, H.J., Francis, I.L., Oakey, H., Sefton, M.A., *Adsorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 7, 40-46, 2001.
- Bouton, S., Chatonnet, P., *Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine*, Journal of Chromatography A, 1141, 1-9, 2007.
- Buser, H.R., Zanier, C., Tanner, H., *Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30, 359-362, 1982.
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Barker, D.A., McLean, H.J., Pollnitz, A.P., Sefton, M.A., *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 5, 91-98, 1999.
- Capone, D.L., Skouroumounis, G.K., Sefton, M.A., *Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 8, 196-199, 2002.
- Capone, D.L., Leeuwen, K. A. Van, Pardon, K.H., Daniel, M.A., Elsey, G.M., Coulter, A.D., Sefton, M.A., *Identification and analysis of 2-chloro-6-methylphenol, 2,6-dichlorophenol and indole: causes of taints and off-flavours in wine*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 8, 196-199, 2009.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Bouton, S., Labadie, M.D., *Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1255-1262, 2004.
- Chatonnet, P., Bouton, S., *Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine*, Journal of Chromatography A, 1141, 1-9, 2007.

- Coelho, J., *Migração de TCA e TCP através de diferentes rolhas. Influência da barreira Acquamark*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Coque, J.J.R., Pérez, E.R., Goswami, M., Martínez, R.F., García, S.C., Rodríguez, M.L.A., Martín, J.F.M., *Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis*, Versão Portuguesa, INBIOTEC, APCOR, Santa Maria de Lamas, Portugal, 2006.
- Coque, J.J.R, Rodríguez, M.L.A., Goswami, M., Martínez, R.F., *Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles)*, INBIOTEC, ASECOR, 7-26, Espanha, 2006.
- Descout, J.J., Bertrand, A., *Observations exploratoires sur la formation des polychlorophénols sur les cênes lieges en forêt*, Revue des OEnologues, 101, 59-62, 2000.
- Drevenkar, V., Fingler, S., Frobe, Z., Vasilic, Z., *Persistent organochlorine compounds in water and soil environments*, *Environmental Management and Health*, 7/4, 5-8, 1996.
- Fortes, M.A., Rosa, M.E., Pereira, H., *A Cortiça*, 2ª Edição, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal, 2006.
- Hervé, E., Price, S., Burns, G., Weber, P., *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for nature corks*, The Cork Quality Council, <http://www.corkqc.com> (Maio 2000).
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulos, D., McLean, H.J., Sefton, M.A., *The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141-145, 1997.
- Insa, S., Salvadó, V., Anticó, E., *Assays on the simultaneous determination and elimination of chlorophenols from contaminated cork samples*, *Journal of Chromatography A*, 1122, 215-221, 2006.
- Laine, M.M., Jørgensen, K.S., *Effective and safe composting of chlorophenol-contaminated soil in pilot scale*, *Environmental Science & Technology*, Vol. 31, No. 2, 1997.
- Juanola, R., Subirá, D., Salvadó, J.A.G., *Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine*, *European Food Research and Technology*, 220, 347-352, 2005.
- Lino, J.M., *Migração de d₅-TCA através de rolhas em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Lopes, T., *Estudos de migração de 2,4,6-tricloroanisol através de rolhas*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Marques, J.C., *Determinação da variação da humidade da prancha de cortiça durante o processo de cozedura e avaliação do teor de clorofenóis em prancha*, Relatório do Trabalho de Fim de Curso, Engenharia Florestal, Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Castelo Branco, 2006.

- Marques, J., *Desenvolvimento de um método para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Pereira, C.S., Danesh, P., Marques, J.J.F., Romão, M.V.S., *O gosto a rolha em vinhos - estado actual dos conhecimentos*, Ciência Téc. Vitiv, 14(2), 79-99, 1999.
- Pimenta, M., *Migração de compostos voláteis através de diferentes rolhas e embalagens*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Pollintz, A.P., Pardon, K.H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G.K., Sefton, M.A., *The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 2, 184-190, 1996.
- Riboulet, J.M., Alves, L.A.R, Urreizti, N., *Quantificação dos cloroanisóis por microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (GS) com detecção por espectrometria de massa (MS) em maceradas de lotes de rolha de cortiça ou em vinhos*, Ciência Téc. Vitiv., 17(2), 61-71, 2002.
- Sampaio, J.M., *Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de rolhas*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Saxby, M.J., Reid, W.J., Wragg, G.S., *Index of chemical taints*. Leatherhead Food., 1982.
- Sefton, M.A., Simpson, R.F., *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 226-240, 2005.
- Simões, O., *A regulação do Mercado do vinho em Portugal: uma análise de longo prazo*, V Colóquio Hispano-Português de Estudos Rurais, trabalho disponível em (<http://www.sper.pt/VCHER/Pdfs/OrlandoSimoes.pdf>), Coimbra, Outubro 2003.
- Simpson, R.F., *Cork taint in wines: a review of the causes*, Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 5, 286-296, 1990.
- Simpson, R.F., Sefton, M.A., *Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks*, Australian Journal of Grape and Wine Research, 13, 106-116, 2007.
- Thévenet, Y.; Woller, R.; Bosch, L.R., *Quercus - qualitative experiments to determine the components responsible and eliminate the causes of undesirable sensory characteristics in drinks stoppered with cork*. Practical Winery and Vineyard, 17(5), 59, sem data.
- Wei, M.C., Jen, J.F., *Determination of chlorophenols in soil samples by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography - electron-capture detection*, Journal of Chromatography A, 1012, 111-118, 2003.

- Wennrich, L., Popp, P., Moder, M., *Determination of chlorophenols in soils using accelerated solvent extraction combined with solid-phase microextraction*, Analytical Chemistry, Vol. 72, No. 3, 2000.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 - Método de Extracção de Cloroanisóis e Clorofenóis de amostras de solo

- Micro-ondas: *BLUEsky*

Referência	MOF800L20.1
Potência máxima de micro-ondas	800 W
Consumo de energia	1200 W
Capacidade	20 L
Dimensões Externas	458(L) x 365 (P) x 295 (H) mm
Fonte de alimentação	220 ~ 230 V 50 Hz
Frequência	2450 MHz
Tempo	30 minutos
Diâmetro do prato giratório	270 mm

8.2 Anexo 2 - Método de Análise Cromatográfica de Cloroanisóis e Clorofenóis de amostras e solo

- SPME-GC/MS/MS: Microextracção em fase sólida e cromatografia gasosa - espectrometria de massa.

Características do equipamento de SPME-GC/MS/MS:

O equipamento usado na análise das amostras de solo foi um cromatógrafo gasoso *Varian* acoplado com um detector de espectroscopia de massa (GC/MS/MS) *CP-3800 Saturn 2200* equipado com um multifuncional Auto-Sampler (MPS2) de CTC Analytics no modo de operação SPME.

Os vials com as amostras são transportados para o agitador e são pré-incubados durante 3 minutos a 55 °C, seguindo-se uma extracção de 11 minutos, ambos à velocidade de agitação (250 rpm). A desorção da fibra (*Supelco, Bellefonte, PA, USA*) com 100 µm de revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS) no injector, ocorre durante 4 minutos a 270 °C em modo splitless. Os componentes são separados numa coluna *Varian, FactorFour™* Capillary Column

VF-5ms 30 m x 0,32 mm I.D. com 0,25 μm de espessura de filme. O gás de arraste é o Hélio, que foi programado para um fluxo constante, durante toda a operação, de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O programa de temperaturas começa a 90 $^{\circ}\text{C}$, aumentando depois 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 205 $^{\circ}\text{C}$ e de seguida 30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$, o que perfaz um tempo total de 14 minutos.

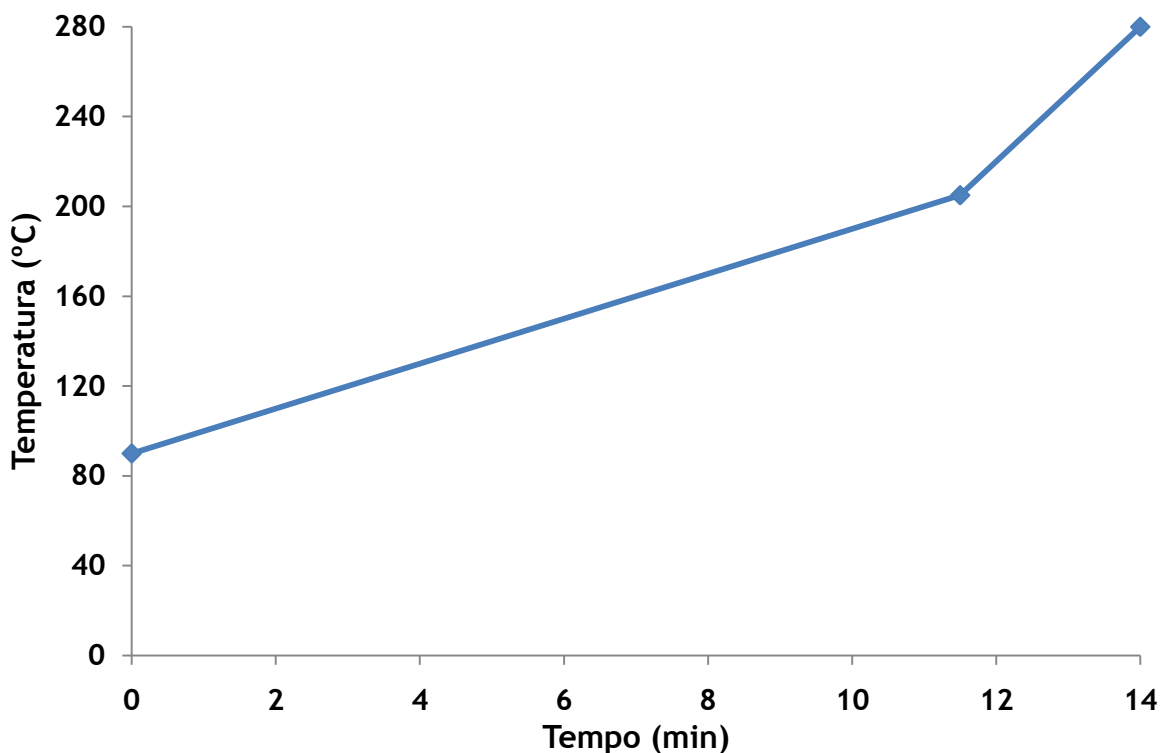


Figura 22 - Rampa de temperaturas do programa de temperaturas correspondentes às condições de detecção do GC-MS/MS.

O MS opera através da ionização por impacto de electrões (EI auto) em modo MS/MS. Os iões de quantificação seleccionados foram 197 para o TCA, 246 para o TeCA, 265 para o PCA, 196 para o TCP, 232 para o TeCP, 266 para o PCP, 162 para o DCP e 349 para o padrão interno d_5 -TBA.

Os limites de detecção e de quantificação dos compostos analisados foram de 1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para os cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e de 5 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para os clorofenóis (TCP, TeCP, PCP e DCP).

- Programa de aquisição de dados: Varian MS Workstation, System Control Version 6.9.1, Copyright © 1989-2008, Varian, Inc.

Compostos analisados:

- Cloroanisóis (TCA, TeCA, PCA);
- Clorofenóis (TCP, TeCP, PCP e 2,6-DCP);
- Padrão interno: d₅-TBA (100 µg. L⁻¹).

Preparação da amostra para a análise por SPME-GC/MS:

- Colocar 4,9 mL de amostra e 4,9 mL de água, num vial de SPME de 20 mL, que contém cerca de 3 g de NaCl;
- Adicionar 100 µL de padrão interno d₅-TBA de concentração 100 µg. L⁻¹ e 100 µL de Ácido Anidrido Acético.

Calibração:

Para a quantificação de todos os compostos que se pretende analisar é necessário efectuar rectas de calibração dos vários compostos para as gamas de concentração de interesse. Para os cloroanisóis, foi feita uma curva de calibração para uma gama de concentração entre os 0 e os 50 ng.L⁻¹ e, relativamente aos clorofenóis, a gama de concentração para a curva de calibração foi entre os 0 e os 1000 ng.L⁻¹.

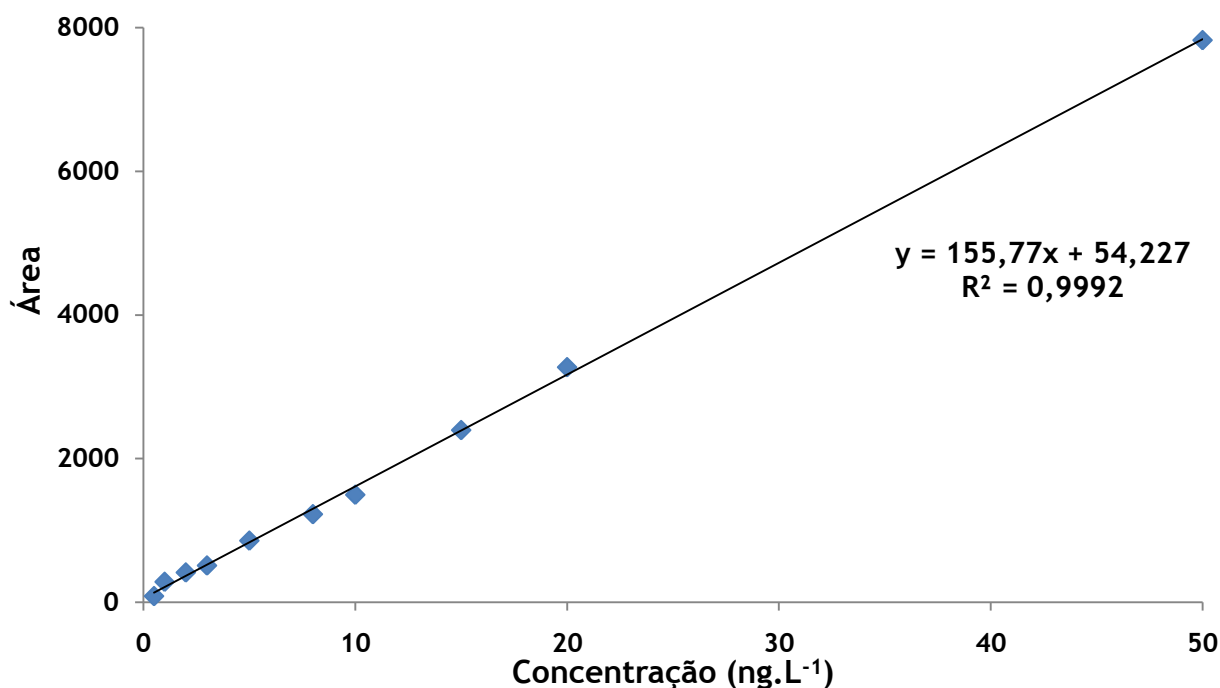


Figura 23 - Curva de calibração do TCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹.

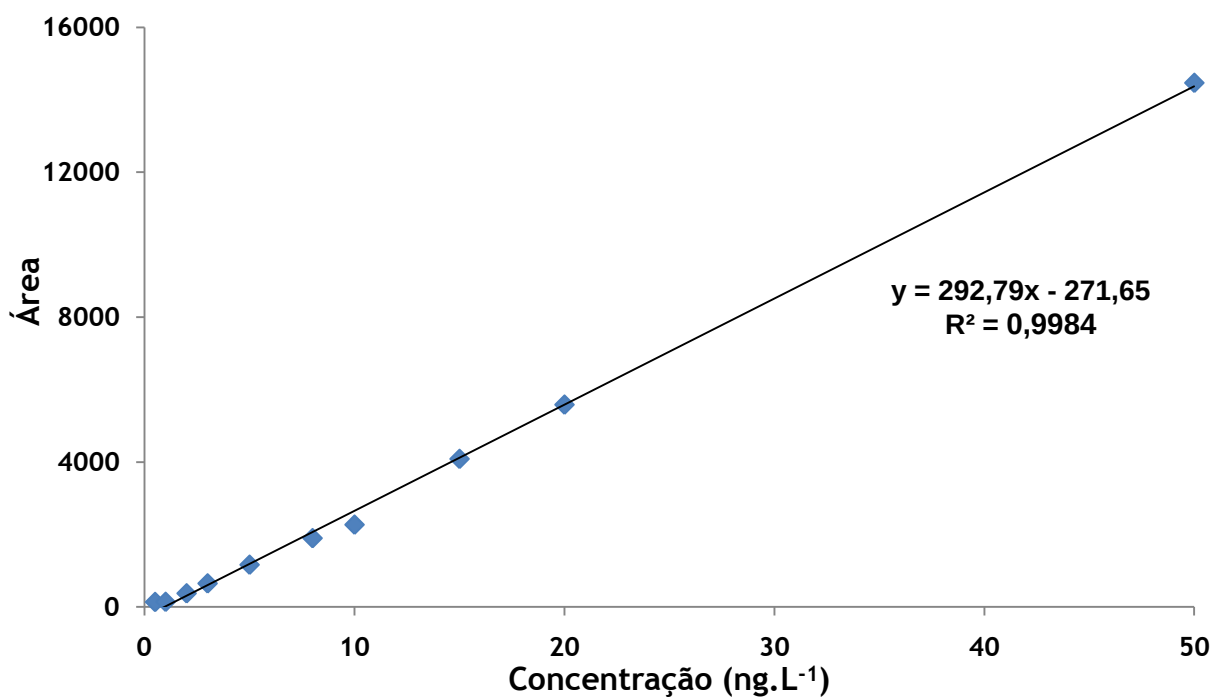


Figura 24 - Curva de calibração do TeCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹.

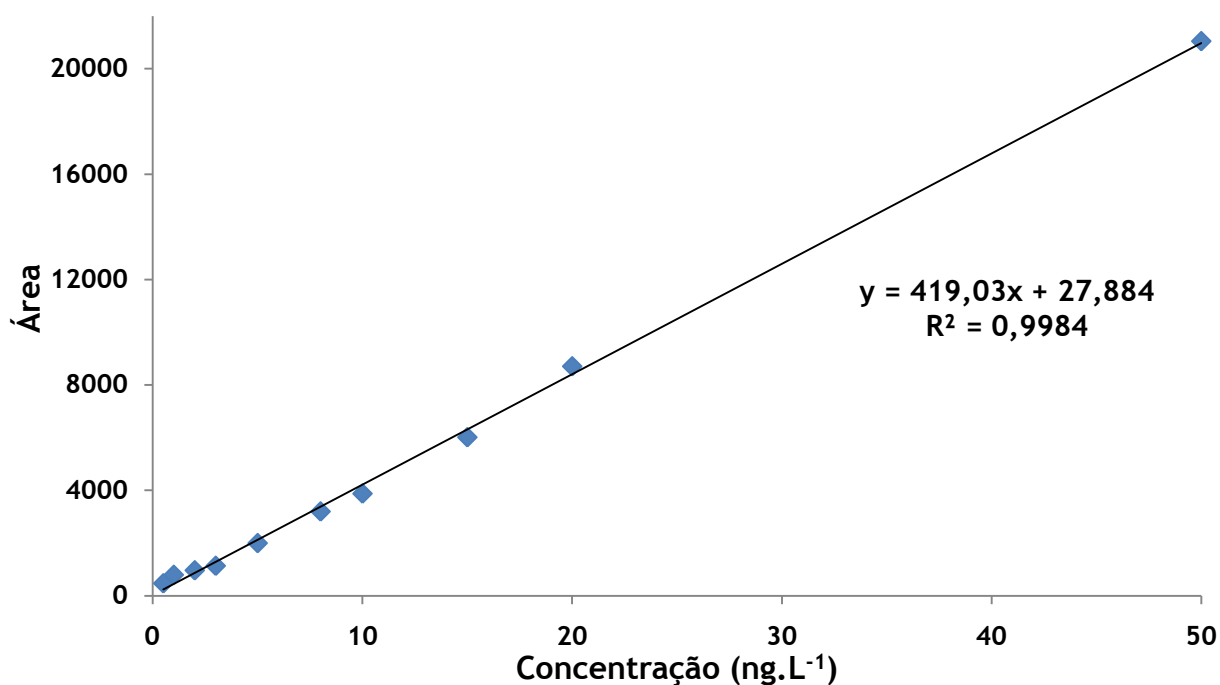


Figura 25 - Curva de calibração do PCA, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 50 ng.L⁻¹.

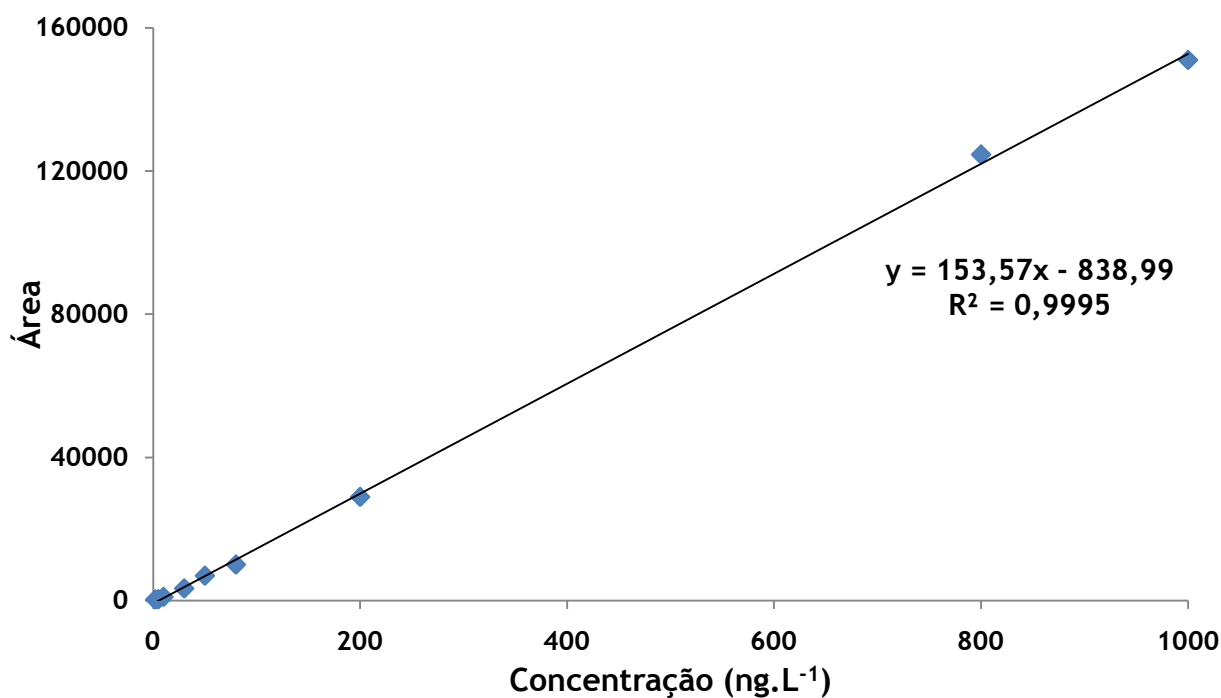


Figura 26 - Curva de calibração do TCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹.

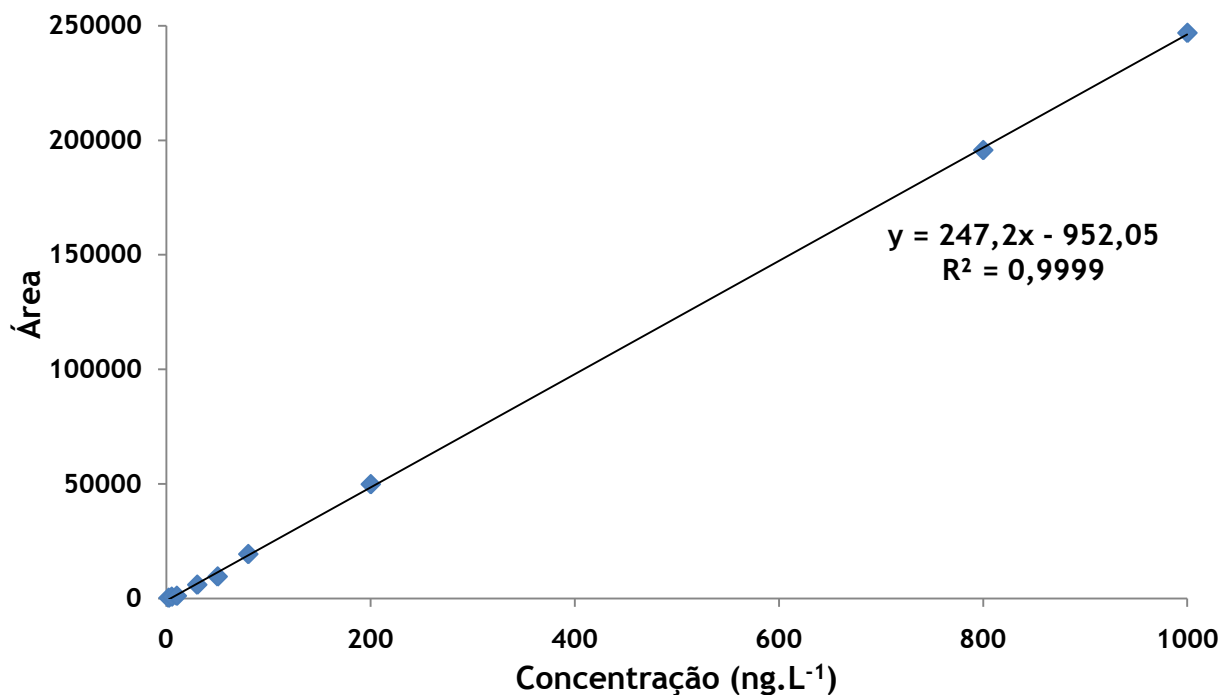


Figura 27 - Curva de calibração do TeCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹.

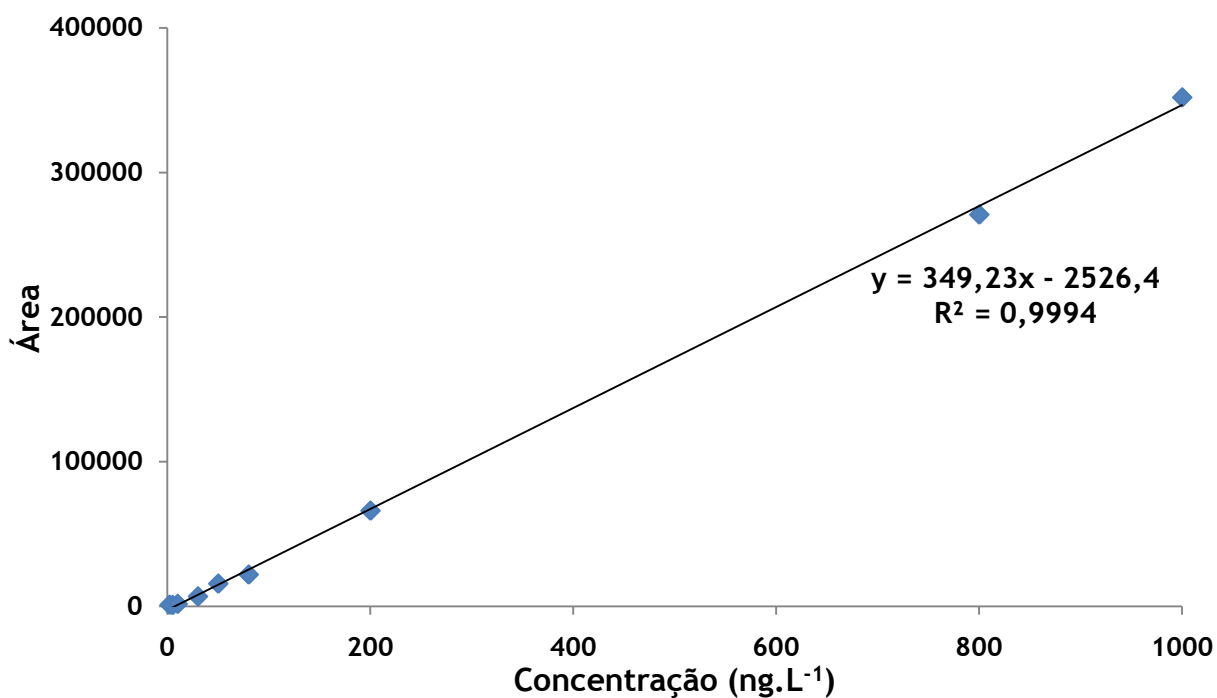


Figura 28 - Curva de calibração do PCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹.

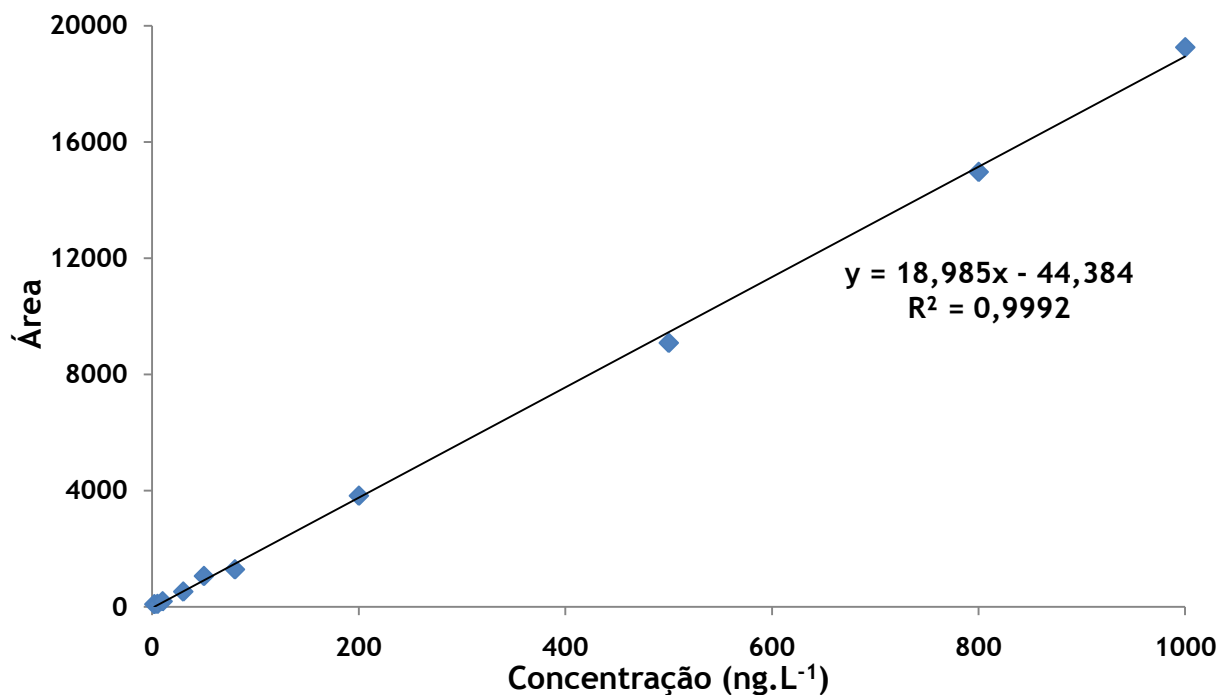


Figura 29 - Curva de calibração do DCP, em solução hidroalcoólica (6% etanol v/v) de carbonato de potássio, para uma gama de concentrações de 0 a 1000 ng.L⁻¹.

Tratamento dos resultados obtidos por GC-MS/MS:

Para a quantificação dos contaminantes nativos dos solos analisados (TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, PCP e DCP) foi necessário efectuar uma relação entre a área do pico do contaminante (A_{cont}) e a área do pico do respectivo padrão interno, d₅-TBA ($A_{p.i.}$). A correcção do valor dos picos da área do contaminante (A_{cont}^*) é efectuada tendo ainda em conta o valor médio das áreas dos picos do padrão interno ($A_{média p.i.}$).

Por fim e com o objectivo de obter o valor da concentração do contaminante (C_{cont}), torna-se ainda necessário substituir os valores da área dos picos cromatográficos corrigidos (A_{cont}^*) na curva de calibração de cada contaminante em estudo.

Os procedimentos descritos nos parágrafos anteriores podem ser traduzidos pelas seguintes equações:

$$A_{cont}^* = \frac{A_{média p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (8.1)$$

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (8.2)$$

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (8.3)$$