

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Desenvolvimento de um método para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da unidade curricular

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Empresarial

Juliana Isabel Fernandes Marques

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



Departamento de Engenharia Química

Orientador na FEUP: Professor Doutor Adélio Mendes

Orientador na empresa: Professor Doutor Miguel Cabral

Setembro de 2009

Agradecimentos

O projecto realizado durante o estágio no Departamento de I&D da Amorim & Irmãos só foi desenvolvido graças à colaboração de diversas pessoas a quem gostaria de dirigir os meus mais sinceros agradecimentos.

Começo por agradecer ao Professor Doutor Miguel Cabral e ao Professor Doutor Adélio Mendes, os orientadores do projecto, pela oportunidade oferecida para realizar o projecto na Amorim & Irmãos e por prestarem a sua preciosa ajuda ao longo de todo o estágio.

Um especial agradecimento ao Doutor Paulo Lopes pela total dedicação, paciência e disponibilidade, pelos inúmeros ensinamentos e conselhos enriquecedores e sem o qual não teria sido possível a realização deste projecto.

À Doutora Isabel Roseira pela simpatia, colaboração e interesse demonstrado.

Um muito obrigado a todas as meninas do I&D, Salomé, Patrícia, Eliana, Carla, Ana e Joana, pelos bons momentos passados, pela companhia e boa disposição. Para além disso, agradeço todo o apoio e ajuda oferecidos constantemente durante as diversas fases do projecto.

A toda a equipa da *Amorim Cork Research* pela prontidão em me ajudarem sempre que necessário.

Por fim, um muito obrigado aos meus pais, restante família e amigos mais chegados por me continuarem a acompanhar, apoiar e encorajar constantemente ao longo de toda a minha vida.

Resumo

Foi desenvolvido um método para análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo, utilizando extracção por ultra-sons seguida de microextracção em fase sólida (SPME) conjugada com GC-MS. Parâmetros importantes que afectam a eficiência da extracção foram optimizados, tais como: solvente, tempo e temperatura de extracção. Os resultados experimentais indicaram que a extracção de 15 g de amostra de solo seco com 90 mL de solvente, a uma temperatura de extracção de 90 °C durante 15 min no sonificador, origina as melhores recuperações para os compostos analisados. Este método foi aplicado para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo recolhidas de zonas de produção de cortiça, em Portugal e em Espanha, em função do potencial risco de contaminação com TCA da cortiça desses locais. A contaminação das diferentes amostras de solos com cloroanisóis e clorofenóis é muito variável, dentro do mesmo local, mas sobretudo entre locais diferentes. Verificou-se uma relação positiva dos níveis de contaminação e a humidade do solo com a contaminação com TCA da cortiça dos lotes de recolha.

Palavras-chave: Cloroanisóis, clorofenóis, extracção, SPME/GC-MS, solo

Abstract

A method for the detection and quantification of chloroanisoles and chlorophenols in soil samples using ultrasonic solvent extraction combined with solid-phase microextraction (SPME) and GC-MS has been developed. Important parameters affecting the extraction efficiency such as extraction solvent, temperature and time, were optimized. The experimental results indicated that the extraction of 15 g of dry soil sample with 90 mL of solvent during 15 min in ultrasonic bath at 90°C achieved the best extraction efficiency for all compounds. This procedure was applied to the determination of chloroanisoles and chlorophenols in real-soil samples collected from cork forests in Portugal and Spain in light of their potential risk of cork contamination with TCA. The contamination of different soil samples with chloroanisoles and chlorophenols is quite variable within the same site, but especially among different locations. It was observed a positive relationship between the levels of soil contamination and moisture with TCA contamination from the cork of the local collection.

Keywords: Chloroanisoles, chlorophenols, extraction, SPME/GC-MS, soil

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Apresentação do Projecto	1
1.1.1	Haloanisóis: Compostos responsáveis por aromas fúngicos no vinho	1
1.1.2	Importância dos clorofenóis no problema de contaminação	4
1.2	Contributos do Trabalho	6
1.3	Organização da Tese	6
2	Estado da Arte.....	7
3	Descrição Técnica.....	10
3.1	Desenvolvimento de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo	10
3.2	Optimização de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo	11
3.3	Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de produção de cortiça	12
3.3.1	Condições experimentais da análise de solos	12
3.3.2	Amostras de solos analisadas	13
3.3.3	Análise de dados	14
4	Discussão dos Resultados	15
4.1	Desenvolvimento de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo	15
4.2	Optimização de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo	16
4.2.1	Ensaio 1: Selecção do solvente de extracção	16
4.2.2	Ensaio 2: Optimização do tempo de extracção	18
4.2.3	Ensaio 3: Optimização da temperatura de extracção	19

4.2.4	Ensaio 4: Reoptmização do tempo de extração	19
4.3	Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de produção de cortiça	22
4.3.1	Análise de amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Portugal	22
4.3.2	Análise de amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Espanha.....	24
4.3.3	Comparação entre as amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Portugal e Espanha.....	27
5	Conclusões	31
6	Avaliação do trabalho realizado	32
6.1	Objectivos Realizados	32
6.2	Outros Trabalhos Realizados	32
6.3	Limitações e Trabalho Futuro	33
6.4	Apreciação final.....	33
7	Referências	35
8	Anexos.....	38
8.1	Anexo 1 - Método Analítico	38

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA, que exemplifica as possíveis vias de formação dos cloroanisóis.</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 - Origem ambiental dos clorofenóis e cloroanisóis (adaptado de Coque et al., 2006).</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3 - Esquema representativo da metodologia utilizada para análise de solos.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4 - Localização geográfica das herdades que foram analisadas (Google Earth).</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5 - Contaminação artificial de amostras de solo com d5-TCA, de diferentes concentrações (5, 125,8 e 629 ng, em quantidade absoluta) e tempos de contaminação (5, 11 e 18 dias) (n=3).</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6 - Contaminação artificial de amostras de solo com cloroanisóis (TCA, TeCA, PCA) e clorofenóis (TCP, TeCP, PCP), com uma quantidade absoluta de 5 ng por cada composto (n=3).</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7 - Recuperações obtidas para cada cloroanisol e clorofenol utilizando como solvente de extracção as seguintes soluções: solução hidroalcoólica (12% etanol v/v), solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) com pH = 2, solução de K₂CO₃ (0,1 M) e solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de K₂CO₃ (0,1 M) (n=3).</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador a 30°C e fazendo variar o tempo de extracção (15, 30 ou 60 min) (n=3).</i>	<i>18</i>
<i>Figura 9 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador durante 15 min e fazendo variar a temperatura de extracção (30, 50, 70 ou 90 °C) (n=3).</i>	<i>19</i>
<i>Figura 10 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador a 90°C e fazendo variar o tempo de extracção (15, 30 ou 60 min) (n=3).</i>	<i>20</i>
<i>Figura 11 - Contaminação de amostras de solo com 0,5 ng cada cloroanisol (TCA, TeCA, PCA) e clorofenol (TCP, TeCP, PCP), realizada após maceração (n=3).</i>	<i>21</i>
<i>Figura 12 - Quantidade de TCA das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizados em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo lote (n=5). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote.</i>	<i>23</i>

<i>Figura 13 - Quantidade de TCP das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizadas em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo lote (n=5). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 14 - Quantidade de PCP das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizadas em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo lote (n=5). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 15 - Quantidades de cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo de 4 lotes de produção de cortiça localizadas no sul de Espanha (n=20). Letras iguais (A, B ou C), na mesma série (TCA, TCP, TeCP ou PCP), indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 16 - Análise de componentes principais (ACP) das amostras de solo dos lotes que correspondem a 4 herdades de produção de cortiça localizadas no sul de Espanha.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 17 - Resultados da análise de cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo das 5 herdades portuguesas e das 4 herdades espanholas.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 18 - Teores de humidade das amostras de solo, dos diferentes lotes de produção de cortiça. ...</i>	<i>28</i>
<i>Figura 19 - Análise de componentes principais (ACP) dos cloroanisóis e clorofenóis e teor de humidade das amostras de solo dos diferentes lotes analisados.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 20- Programa de temperaturas correspondente às condições de detecção do GC-MS.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 21 - Curva de calibração do TCA, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 22 - Curva de calibração do TeCA, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 23 - Curva de calibração do PCA, em solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 24 - Curva de calibração do TCP, em solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 25 - Curva de calibração do TeCP, em solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹.</i>	<i>42</i>

Figura 26 - Curva de calibração do PCP, em solução hidroalcoólica (12% etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ngL⁻¹. 42

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Estrutura química e limites de percepção sensorial dos cloroanisóis e bromoanisóis responsáveis pela contaminação do vinho com aromas fúngicos. 2

Tabela 2 - Descrição dos ensaios realizados: tipo de solvente de extracção, tempo e temperatura de extracção no sonicador. 12

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
d5-TBA	Deutério 2,4,6-Tribromoanisol
TCA	2,4,6-Tricloroanisol
d5-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
CPOMT	Clorofenol O-metiltransferase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
SPME	Microextração em fase sólida
SPME/GC-MS	Microextração em fase sólida conjugada com cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa
PDMS	Polidimetilsiloxano
ANOVA	Análise de variância
ACP	Análise de componentes principais
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

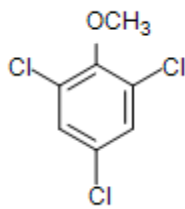
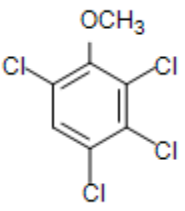
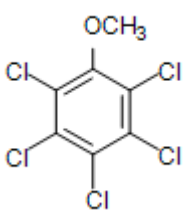
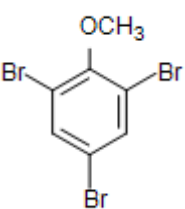
Os defeitos sensoriais do vinho são os principais responsáveis pelas perdas económicas ocorridas na indústria vitivinícola (Sefton *et al.*, 2005). Os principais defeitos sensoriais estão relacionados com problemas microbiológicos e químicos, tais como o "gosto a rolha" ou, mais correctamente, aromas fúngicos (mofo e bafio) (Coque *et al.*, 2006). Este defeito sensorial ocorre quando o vinho contacta com produtos ou atmosferas contaminadas com haloanisóis, mais concretamente cloroanisóis e bromoanisóis. Embora as rolhas de cortiça sejam considerados como as principais fontes de contaminação do vinho, estudos recentes demonstram que existem outros agentes, presentes no transporte e armazenamento dos vinhos engarrafados, que também podem ser responsáveis pela contaminação (Barker *et al.*, 2001). Embora seja difícil estabelecer estatísticas fiáveis sobre a contaminação de rolhas de cortiça, aponta-se que 1 a 5 % dos vinhos engarrafados estejam contaminados com tricloroanisol (TCA) (Simpson *et al.*, 2007).

1.1.1 Haloanisóis: Compostos responsáveis por aromas fúngicos no vinho

Os haloanisóis são compostos responsáveis por destruir os aromas varietais dos vinhos, conferindo-lhes aromas a mofo e bafio. São compostos muito voláteis, facilmente detectados ao olfacto e ao paladar pois têm um limiar de percepção muito baixo, em água e em vinho (Tabela 1). Estas características justificam o facto destes compostos serem contaminantes de diversos alimentos, mesmo em concentrações baixas, produzindo sensações fúngicas desagradáveis e tornando o seu consumo desagradável (Coque *et al.*, 2006).

Os principais haloanisóis identificados como agentes contaminantes são os cloroanisóis e os bromoanisóis, entre eles: o tricloroanisol (2,4,6-TCA), o tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o tribromoanisol (2,4,6-TBA) (Coque *et al.*, 2006). As estruturas químicas destes compostos e os seus limites de percepção sensorial estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Estrutura química e limites de percepção sensorial dos cloroanisóis e bromoanisóis responsáveis pela contaminação do vinho com aromas fúngicos.

Composto	Estrutura	Limite de percepção sensorial (Boutou <i>et al.</i> , 2006; Coque <i>et al.</i> , 2006)
2,4,6-TCA		Água: 30-300 pg·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 1,5-3 ng·L ⁻¹ (branco) 6 ng·L ⁻¹ (tinto)
2,3,4,6-TetraCA		Água: 4 ng·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 10-15 ng·L ⁻¹ (branco e tinto)
PCA		Limite de percepção sensorial: >10 µg·L ⁻¹
2,4,6-TBA		Água: 8-30 pg·L ⁻¹ Solução Alcoólica e Vinho: 3 ng·L ⁻¹

A formação de cloroanisóis ocorre no meio ambiente por biometilação de clorofenóis realizada por diferentes microrganismos, fundamentalmente, fungos filamentosos que crescem nas pranchas de cortiça e em elementos de madeira presentes nas caves, por exemplo *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.*, *Cephalosporium sp.* e *Chrysomya Sitophilae* (Capone *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 1999; Coque *et al.*, 2006).

Esta reacção dá-se quando os fungos filamentosos entram em contacto com os clorofenóis. É uma reacção conduzida por uma enzima, clorofenol O-metiltransferase (CPOMT), que pode metilar uma série de clorofenóis, altamente tóxicos, de forma a produzir os cloroanisóis correspondentes que são inofensivos aos microrganismos (Coque *et al.*, 2006).

Os clorofenóis são, por sua vez, formados a partir de uma reacção directa entre os produtos resultantes da degradação da lenhina e de açúcares com fontes de cloro presentes no meio ambiente, e/ou a partir de compostos organo-clorados, que fazem parte da composição química de diferentes produtos (preservantes de madeiras, pesticidas, desinfetantes, etc.),

como veremos mais à frente. Estes mecanismos de formação dos cloroanisóis estão representados na Figura 1.

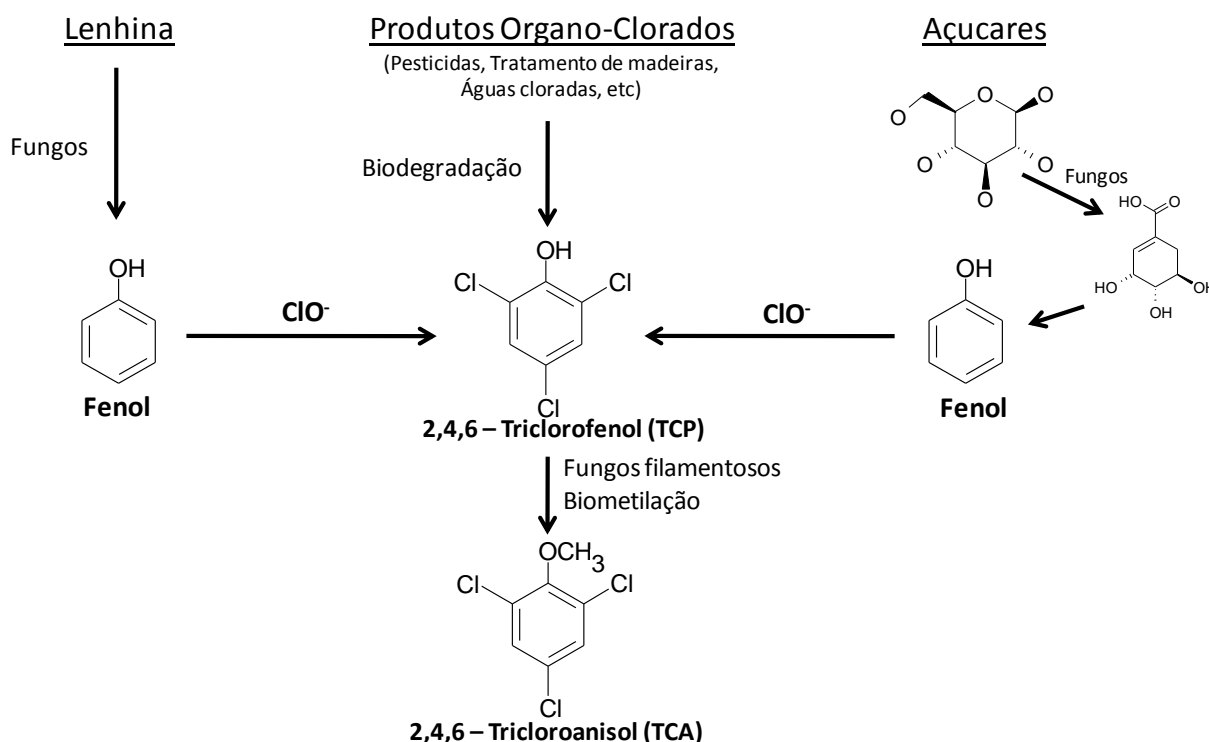


Figura 1 - Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA, que exemplifica as possíveis vias de formação dos cloroanisóis.

Uma grande parte do TCA presente na cortiça contaminada pode já estar presente na árvore (Simpson *et al.*, 2007). No entanto, existem várias oportunidades para posterior formação de TCA e contaminação secundária da cortiça e das rolhas (Simpson *et al.*, 2007). Muitas das vezes as pranchas de cortiça chegam limpas às indústrias mas durante o processo produtivo os haloanisóis originados por diversas fontes vão sendo absorvidos pela cortiça, acabando por contaminar a rolha (Coque *et al.*, 2006). Por outro lado, as rolhas de cortiça podem ser contaminadas nas caves por exposição à atmosfera ou em contacto com materiais contaminados. A rolha absorve os compostos, que mais tarde são transmitidos ao vinho; assim a rolha de cortiça actua como veículo transmissor da contaminação (Coque *et al.*, 2006).

1.1.2 Importância dos clorofenóis no problema de contaminação

Os clorofenóis, precursores dos cloroanisóis, são compostos orgânicos sintéticos facilmente obtidos à escala industrial, através de cloração fenólica ou de hidrólise de clorobenzenos. São muito recalcitrantes podendo permanecer no meio ambiente durante um longo período de tempo. Devido à sua elevada toxicidade para qualquer organismo vivo, são muito usados como pesticidas. (Coque *et al.*, 2006). Os clorofenóis mais utilizados na indústria em processos químicos são: 2,4,6-TCP (triclorofenol), 2,3,4,6-TeCP (tetraclorofenol) e PCP (pentaclorofenol).

A principal causa da presença de clorofenóis no ambiente foi a introdução do PCP, como agente preservante da madeira, por parte de grandes empresas químicas, na década de 30. O PCP é o biocida (herbicida, pesticida e insecticida) mais eficiente dos três clorofenóis acima referidos, devido à sua grande toxicidade e persistência. Pode ainda ser usado em diversas aplicações como termicida. Preparações comerciais de PCP também contêm pequenas quantidades de TeCP e TCP (Pollnitz *et al.*, 1996; Maarse *et al.*, 1985). Estima-se que aproximadamente 200 000 toneladas por ano de clorofenóis tenham sido mundialmente utilizadas na década de 70, da qual perto de metade sob a forma de PCP (Simpson *et al.*, 2007).

A utilização de biocidas no montado de sobre é vista como uma das principais fontes de precursores clorofenólicos (Pollnitz *et al.*, 1996).

A origem dos clorofenóis pode, também, estar relacionada com produtos de desinfecção de água potável e piscinas (Coque *et al.*, 2006). O cloro está presente em abastecimentos de águas, produtos de limpeza e desinfectantes e, assim, é capaz de entrar em sistemas de drenagem e cursos de água e reagir com o fenol derivado de material vegetal, produzindo clorofenóis (Paasivirta *et al.* 1985; Simpson *et al.*, 2007). Podem ser formados na cortiça durante a cozedura das pranchas e durante a “lavação” ou branqueamento das rolhas com solução de hipoclorito de sódio, processo este abandonado há alguns anos pela indústria corticeira devido ao elevado risco de formação de TCP na cortiça (Buser *et al.* 1982; Simpson *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2006).

Os clorofenóis foram utilizados em larga escala durante décadas, o que levou à sua acumulação em cursos de água e nos solos, tornando-se assim num dos grupos mais importantes de contaminantes e podendo ser detectados em qualquer ecossistema (Simpson *et al.*, 2007; Coque *et al.*, 2006) (Figura 2).

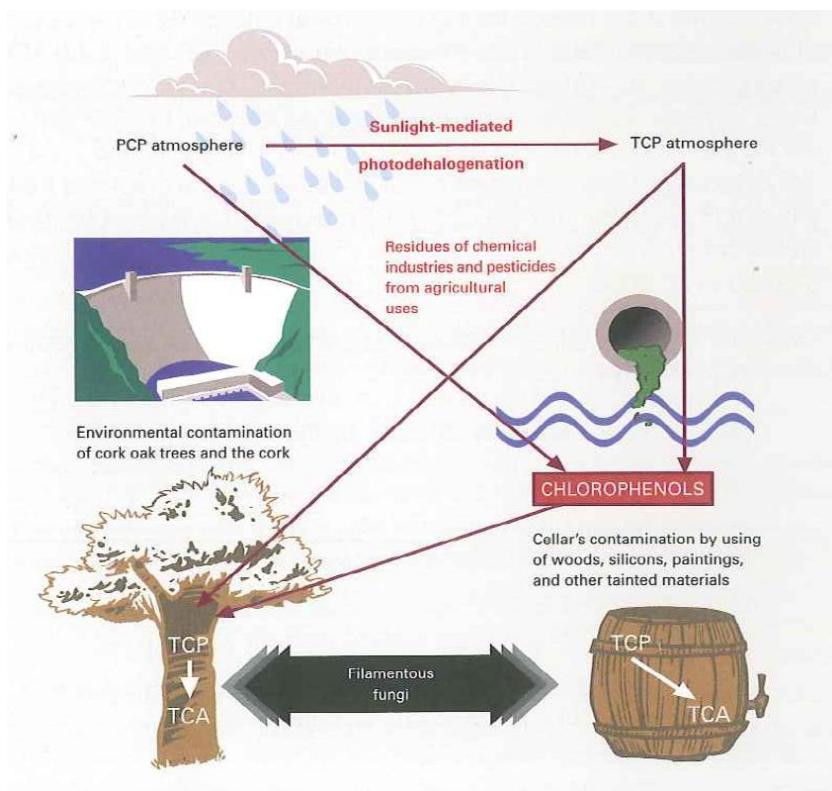


Figura 2 - Origem ambiental dos clorofenóis e cloroanisóis (adaptado de Coque et al., 2006).

Os solos do montado de sobro de Portugal são pobres em matéria orgânica, arenosos, sem drenagem e maioritariamente ácidos. Os sobreiros são relativamente tolerantes a solos pobres e muito pouco férteis e com baixa precipitação. Estas condições aeróbias, dos solos com pouca matéria orgânica e baixo pH, favorecem a persistência de clorofenóis e a sua conversão aos cloroanisóis correspondentes. A sua migração e acumulação na cortiça podem ocorrer durante um longo período de tempo (Simpson et al., 2007) (Figura 2).

Devido à enorme preocupação com as propriedades tóxicas e recalcitrantes para se degradar por processos químicos que ocorrem no ambiente ou por microflora natural, o uso de biocidas de clorofenóis foi proibido em muitos países nos anos 80 e 90 (Simpson et al., 2007). Actualmente, é proibido utilizar estes compostos nos países da União Europeia (Coque et al., 2006).

Como já foi mencionado anteriormente, a aplicação passada de biocidas, constituídos maioritariamente por clorofenóis, nas florestas é uma possível fonte de formação do TCA encontrado na cortiça. Outra possível fonte é a formação de TCP no meio ambiente por diversos caminhos e o seu transporte, deposição na cortiça dos sobreiros e posterior degradação a TCA (Figura 2). Este tipo de contaminação pode arrastar-se ao longo do processo produtivo acabando por contaminar as rolhas (Simpson et al., 2007, Coque et al., 2006).

1.2 Contributos do Trabalho

O Departamento de I&D da Amorim & Irmãos foi constituído em 2000 com o objectivo de “combater” o TCA de modo a melhorar o desempenho sensorial e técnico das rolhas de cortiça, bem como, estudar o seu papel como vedantes de vinhos.

Assim sendo, este projecto de investigação visa dar continuidade ao estudo sobre a incidência de TCA, focando-se especialmente na origem dessa contaminação no montado de sobro. Desenvolveu-se e optimizou-se um método capaz de analisar cloroanisóis e clorofenóis presentes no solo o que levou à identificação dos principais marcadores químicos dos solos de diferentes locais de produção de cortiça.

É de frisar que se trata do primeiro projecto deste tipo que o Departamento de I&D realiza e que tem uma enorme importância, pelo facto de abrir horizontes na compreensão da origem ambiental dos problemas de contaminação e poder levar a Amorim & Irmãos a dar uma resposta cada vez mais eficaz às exigências do mercado na procura de novas soluções e melhoramento da produção de cortiça.

1.3 Organização da Tese

A presente tese encontra-se dividida em seis capítulos. O capítulo 1 diz respeito à Introdução e começa por dar ao leitor uma perspectiva geral sobre o problema da contaminação do vinho e os principais responsáveis. Foca-se, depois, nas possíveis origens dessa contaminação, fornecendo as informações necessárias para enquadramento do projecto.

O capítulo seguinte, o Estado da Arte, descreve o estado actual dos estudos relacionados com o problema da contaminação do vinho e a sua origem a partir do solo. Os dados presentes neste capítulo servem de apoio ao projecto realizado.

No capítulo 3 encontram-se descritas todas as metodologias testadas, bem como o método adoptado para determinação dos compostos responsáveis pelo problema de contaminação (cloroanisóis e os precursores clorofenólicos) em amostras de solo.

No seguimento da descrição técnica, encontra-se o capítulo 4 que diz respeito à discussão dos resultados dos diversos ensaios realizados para desenvolver o método e da análise de amostras de solo de diversos locais de produção de cortiça.

O capítulo 5 refere-se às conclusões gerais mais importantes do projecto, baseadas em todos os resultados obtidos no capítulo anterior.

Por último, é descrito no capítulo 6 a avaliação geral do trabalho realizado. São apresentados os objectivos realizados, os outros trabalhos de menor importância realizados em paralelo com o projecto, as limitações do trabalho, o desenvolvimento futuro do projecto e a apreciação final de todo o trabalho desenvolvido durante o tempo de estágio.

2 Estado da Arte

As rolhas de cortiça são uma das principais fontes de contaminação dos vinhos com TCA (Barker *et al.*, 2001; Pollnitz *et al.*, 1996). No entanto, existem casos em que rolhas de cortiça contendo TCA não contaminam os vinhos, o que sugere que a contaminação está dependente da localização e distribuição do TCA na rolha de cortiça (Howland *et al.*, 1997, Barker *et al.*, 2001). A contaminação do vinho só acontece quando a superfície da rolha se encontra em contacto com o vinho (Simpson *et al.*, 2007).

O TCA pode ser encontrado na cortiça mas, por ser perdido e regenerado em várias etapas do fabrico e transporte das rolhas de cortiça, não é claro em qual das etapas é acumulada uma quantidade suficiente para causar problemas de contaminação (Capone *et al.*, 2002).

Os clorofenóis estão fortemente implicados na origem do TCA pois são os precursores dos cloroanisóis (Simpson *et al.*, 2007). Todas as vias de formação de cloroanisóis requerem a metilação de clorofenóis por microrganismos (Capone *et al.*, 2002). É essencialmente um mecanismo de destoxificação no qual os fungos filamentosos neutralizam os clorofenóis do meio ambiente (Pollnitz *et al.*, 1996).

Segundo Jensen *et al.* (1996), os clorofenóis exibem diferentes susceptibilidades para uma biodegradação no solo, que pode ser afectada pelas condições ambientais tais como: composição da mistura, composição da matéria orgânica, temperatura, pH, potencial redox, concentração de oxigénio e o número e tipo de microrganismos presentes. Embora a utilização de biocidas clorofenólicos na floresta seja apontada como uma das causas de contaminação da cortiça com TCA, nenhum estudo foi realizado com o objectivo de perceber a relação existente entre a contaminação dos solos com clorofenóis e a contaminação da cortiça com cloroanisóis.

O TCP foi encontrado a baixas concentrações na superfície da água e nas recolhas realizadas em Portugal pelo Instituto da Água, entre 1999 e 2000, mas não existem evidências sobre a origem deste composto (Simpson *et al.*, 2007).

Rigaud *et al.* (1984) demonstraram que a cortiça retirada das árvores contém TCP, TeCP, PCP e os cloroanisóis correspondentes e que as camadas centrais e exteriores das pranchas contêm sucessivamente maiores níveis de TCA e PCA. Estes resultados são consistentes com a absorção desses contaminantes do ar circundante e do solo pelas árvores (Simpson *et al.*, 2007). Duncan *et al.* (1997) demonstraram que uma grande parte de TCA encontra-se presente na cortiça dos sobreiros e está localizado, maioritariamente, no tronco e na parte inferior da árvore. A cortiça em contacto com o solo tem um intenso aroma a mofo e bolor, sugerindo elevadas concentrações de cloroanisóis. Segundo Duncan *et al.* (1997), a migração de TCA de reservas concentradas deste composto, ou uma reserva de TCP que dê origem a TCA, para outras partes da árvore acontece já na própria floresta (Simpson *et al.*, 2007). Num

estudo recente levado a cabo no departamento de I&D da Amorim & Irmãos, mostrou-se que a contaminação das pranchas de cortiça com TCA é muito mais elevada nas zonas próximas do solo (“calços”), sendo dependente da localização geográfica do montado. Estes resultados levam-nos a pensar que o uso de biocidas policlorinados no tratamento do montado poderá ser uma das fontes primárias de contaminação e de formação de cloroanisóis na cortiça. Segundo Thevénet *et al.*, as pranchas de cortiça que contêm níveis elevados de TCA, na floresta, produzem rolhas com níveis de TCA susceptíveis de contaminar o vinho. Estes pressupostos são consistentes com a proposição que a contaminação posterior da cortiça é menos importante que a contaminação da cortiça nas árvores (Simpson *et al.*, 2007).

Estudos recentes mostraram que a utilização indiscriminada e extensiva de biocidas policlorinados leva a uma forte contaminação dos solos com clorofenóis, sendo extremamente elevada em países como o Canadá, a Finlândia, Suécia, Grécia (Danis e Albanys *et al.*, 1999, ano; Knuutinen *et al.*, 1990; Coque *et al.*, 2006). Este tipo de estudo, segundo o nosso conhecimento, nunca foi realizado em Portugal nem tão pouco nos locais de produção de cortiça.

A maior parte dos métodos de análise de clorofenóis em amostras de solo são baseados em técnicas de cromatografia (Wei *et al.*, 2003). Antes desta análise, é necessário realizar um tratamento prévio das amostras para limpeza ou enriquecimento das espécies a analisar. Para este fim são utilizadas metodologias de extracção líquido-líquido, extracção em fase sólida, métodos Soxhlet e utilização de ultra sons, entre outros (Wei *et al.*, 2003). Embora estes métodos mostrem resultados eficientes e precisos, exigem uma preparação de amostras demorada, utilizando solventes orgânicos tóxicos perigosos para a saúde (Wei *et al.*, 2003). Assim, vários estudos têm sido levados a cabo para análise e determinação de clorofenóis em amostras de solo utilizando metodologias mais rápidas, sem utilização de solventes orgânicos e que realizem a amostragem, extracção e enriquecimentos das espécies no menor número possível de operações. Wei *et al.* (2003) desenvolveram um método de extracção assistida por microondas, acoplada a micro extracção em fase sólida e quantificação por cromatografia gasosa com detector de captura de electrões. Wennrich *et al.* (2000) desenvolveram um método de extracção acelerada de solventes com água, combinada com micro extracção em fase sólida e cromatografia gasosa com espectroscopia de massa. Tölgyessy *et al.* (2008) desenvolveram uma metodologia de extracção de solvente ultra sónica seguida da utilização da metodologia de *stir bar sorptive*. Também, Podehradská *et al.* (1999) desenvolveram um estudo sobre a determinação de clorofenóis do solo de modo a investigar diversos factores, tais como: preparação das amostras, concentração de contaminantes, tipo de matriz dos solos e envelhecimento das amostras. Todas estas metodologias têm mostrando boas recuperações e vantagens a nível da sensibilidade, simplicidade, baixo preço e elevada praticabilidade (Tölgyessy *et al.*, 2008).

O presente projecto visa completar e aprofundar a bibliografia existente, desenvolvendo e optimizando um método para determinar e quantificar os cloroanisóis e clorofenóis presentes no solo, com o objectivo de estudar a origem da contaminação no montado de sobro. Este desenvolvimento permitirá caracterizar e identificar os principais marcadores químicos de contaminação dos solos dos diferentes locais de produção de cortiça.

3 Descrição Técnica

Este capítulo descreve de forma pormenorizada o trabalho realizado durante todo o projecto. Inicialmente, foi necessário desenvolver e otimizar um método, com base em alguns estudos anteriores, para quantificar os cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e clorofenóis (TCP, TeCP e PCP) presentes no solo de diferentes locais de produção de cortiça.

3.1 Desenvolvimento de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo

Para a realização dos ensaios de desenvolvimento e optimização do método de contaminação artificial de amostras de solo, foram recolhidas e enviadas para o Departamento de I&D amostras de solo de uma propriedade de montado de sobro próxima de Coruche.

Contaminaram-se algumas amostras de solo com d5-TCA, de modo a distinguir a contaminação “artificial” realizada com uma possível contaminação nativa do solo e, verificar a quantidade que se conseguia recuperar usando essa metodologia. Antes de se efectuar a contaminação do solo, as amostras de terra foram previamente secas, numa estufa a 105 °C, até obter um peso constante. Posteriormente, colocaram-se amostras de 15 g de solo em frascos de 60 mL e contaminaram-se com 1 mL de soluções etanólicas de d5-TCA com as seguintes concentrações: 5, 126 e 629 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, o que equivale a uma quantidade absoluta de 5, 126 e 629 ng, respectivamente. Após 5, 11 e 18 dias de contaminação, as amostras de solo foram maceradas com 50 mL de solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v), durante 24 horas, e analisadas por SPME/GC-MS (método descrito no Anexo 1).

Numa segunda fase de desenvolvimento do método, testaram-se as recuperações obtidas para contaminação com todos os cloroanisóis e clorofenóis que se pretende analisar no solo. Assim, adicionaram-se 500 μL de cada cloroanisól (TCA, TeCA e PCA) e de cada clorofenól (TCP, TeCP e PCP), a partir das respectivas soluções de concentração 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (quantidade absoluta de 5 ng de cada composto) e deixou-se contaminar durante 4 dias. A metodologia de análise das amostras é a mesma que a utilizada no ponto anterior e encontra-se descrita no Anexo 1.

3.2 Optimização de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo

Nesta fase do projecto, foi necessário otimizar o método de contaminação desenvolvido no ponto anterior, de modo a melhorar algumas variáveis importantes no processo de extracção dos cloroanisóis e clorofenóis do solo, tais como: tratamento prévio das amostras, tipo de frascos a utilizar, relação sólida/líquido, tipo de solvente de extracção, método de extracção dos compostos, entre outros. Para atingir esse fim, realizou-se uma nova e mais extensa pesquisa bibliográfica sobre extracção de cloroanisóis e clorofenóis do solo (Wei *et al.*, 2003; Wennrich *et al.*, 2000; Tölgyessy *et al.*, 2008; Drevenkar *et al.*, 1997; Insa *et al.*, 2006; Podehradská *et al.* 1999)

Após a pesquisa realizada, optou-se por fazer um tratamento prévio para preparar as amostras antes de efectuar a sua contaminação. Assim, peneirou-se a amostra com um crivo (malha de 2 mm), para remover as pedras e algum material orgânico presente no solo, e secou-se o solo, na estufa a 105 °C, até obter um peso constante. Em seguida colocou-se 15 g de solo seco em frascos de 100 mL (escuros, para proteger da luz, e com tampa de rosca, para melhor isolamento), para macerar com 90 mL de solvente de extracção (Wei *et al.*, 2003). Para contaminação, adicionou-se 500 µL de cada cloroanisól (TCA, TeCA e PCA) e de cada clorofenól (TCP, TeCP e PCP), com soluções etanólicas de concentração 10 µg·L⁻¹ (quantidade absoluta de 5 ng de cada composto). Posteriormente, as amostras foram colocadas no sonicador (*Ultrasonic Cleaner, Fungilab S.A.*), para melhorar a extracção dos compostos, e analisadas por SPME/GC-MS (método descrito no Anexo 1).

Utilizando a metodologia referida, foram realizados diferentes ensaios de modo a maximizar a extracção dos cloroanisóis e dos clorofenóis do solo. Com este objectivo, optimizaram-se as seguintes variáveis: o solvente de extracção, o tempo e a temperatura de extracção por ultrasons. A descrição dos ensaios realizados encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição dos ensaios realizados: tipo de solvente de extracção, tempo e temperatura de extracção no sonicador.

Ensaio	Solvente de Extracção	Sonicador	
		Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v)	30	30
	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v) pH = 2		
	Sol. K ₂ CO ₃ 0,1 M		
	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de K ₂ CO ₃ 0,1 M		
2	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de K ₂ CO ₃ 0,1 M	15	30
		30	
		60	
3	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de K ₂ CO ₃ 0,1 M	15	30
			50
			70
			90
4	Sol. Hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de K ₂ CO ₃ 0,1 M	15	90
		30	
		60	

3.3 Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de produção de cortiça

3.3.1 Condições experimentais da análise de solos

As condições experimentais utilizadas para análise de amostras de solo foram as seguintes: peneirou-se o solo com um crivo (malha de 2 mm); pesou-se 15 g de solo por frasco (frasco de 100 mL, escuro com tampa de rosca); adicionou-se 90 mL de solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M) por frasco; macerou-se no sonicador durante 15 min a 90 °C e analisou-se por SPME/GC-MS (método descrito no Anexo 1).

Determinou-se o teor de humidade para cada amostra de solo, de modo a reportar todos os resultados finais em $\text{ng} \cdot \text{g}_{\text{solo seco}}^{-1}$, utilizando a seguinte equação:

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

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

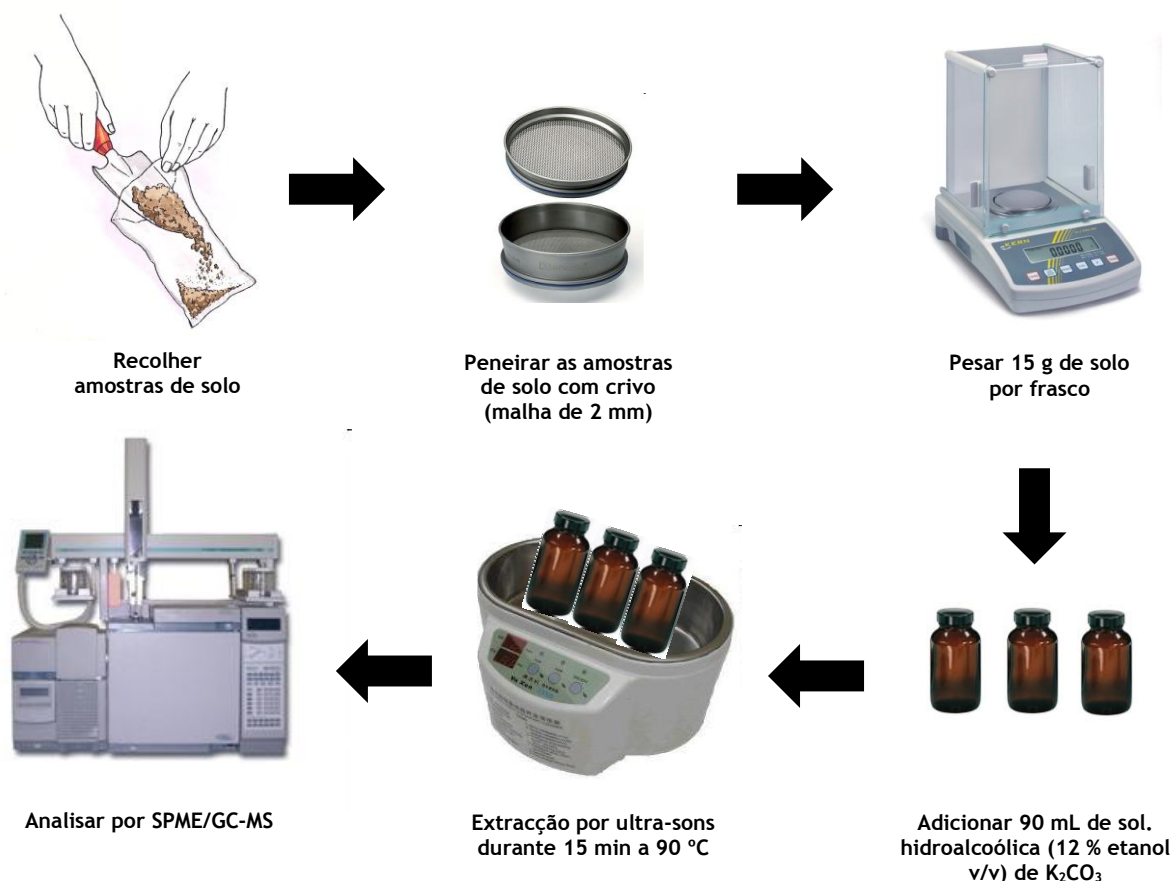


Figura 3 - Esquema representativo da metodologia utilizada para análise de solos.

3.3.2 Amostras de solos analisadas

Os solos analisados foram recolhidos em herdades, em função do risco potencial de contaminação com TCA da cortiça desse local. Na Figura 4 estão representados os diferentes locais de recolha de amostras de solo: os locais identificados a verde representam locais de baixo potencial de contaminação com TCA e a vermelho os locais de elevado risco.

Todas as amostras de solo foram recolhidas em zonas próximas de sobreiros, após se retirar a matéria orgânica presente na superfície do solo. Posteriormente, foram embaladas em sacos de plástico e enviadas para o Departamento de I&D, para se proceder à sua análise.

Foram realizadas dois tipos de amostragem. Numa primeira amostragem foram recolhidas, aleatoriamente, 7 amostras de cada lote (herdade de produção de cortiça), num total de 35 amostras correspondentes a 5 herdades localizadas em Portugal (lotes 1, 2, 3, 4, e 5). Com este ensaio pretendia-se avaliar a contaminação de cloroanisóis e clorofenóis em diferentes locais dentro do mesmo lote. Numa segunda amostragem foi recolhida apenas 1 amostra por cada uma das 4 herdades de produção de cortiça, localizadas no sul de Espanha (lotes 6, 7, 8 e 9). O objectivo deste ensaio foi verificar a contaminação dos solos com cloroanisóis e clorofenóis em locais onde, geralmente, a cortiça apresenta elevados valores de TCA.



Figura 4 - Localização geográfica das herdades analisadas (Google Earth).

3.3.3 Análise de dados

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

4 Discussão dos Resultados

4.1 Desenvolvimento de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo

No ensaio de contaminação “artificial” com diferentes quantidades de d5-TCA e durante diferentes períodos de tempo, observou-se que as recuperações deste composto foram muito baixas, entre 5 % a 10 %, independentemente do nível e do tempo de contaminação (Figura 5).

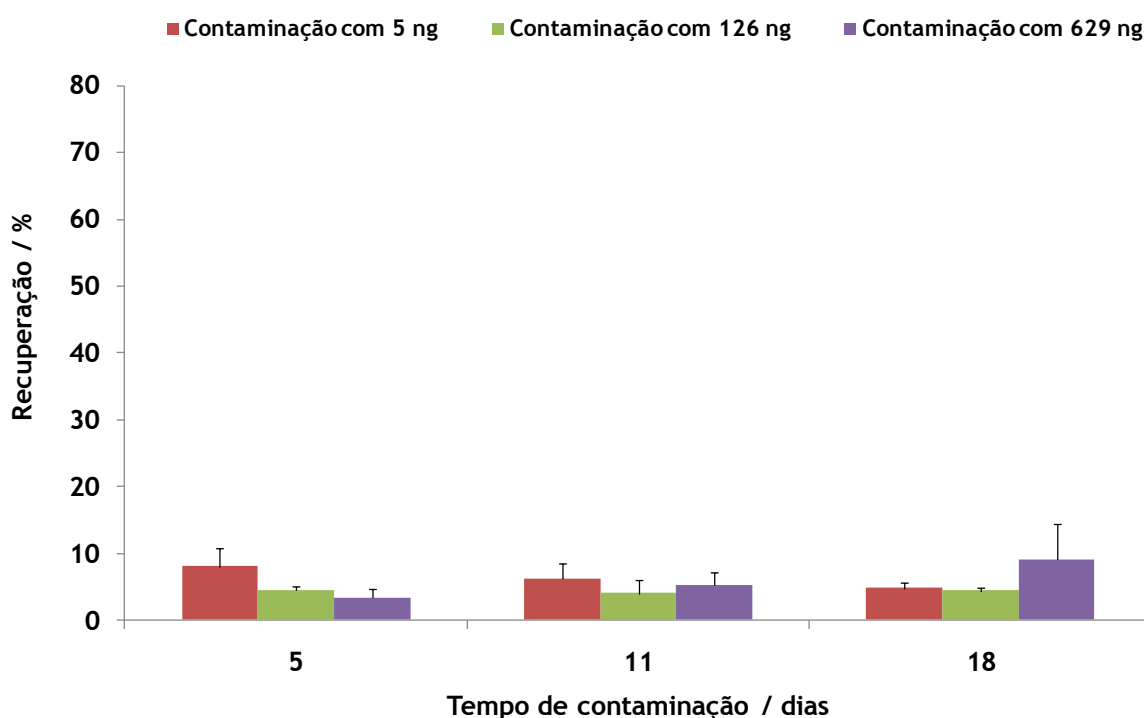


Figura 5 - Contaminação artificial de amostras de solo com d5-TCA, de diferentes concentrações (5, 126 e 629 ng, em quantidade absoluta) e tempos de contaminação (5, 11 e 18 dias) (n=3).

Na contaminação “artificial” com os diferentes cloroanisóis, observou-se uma recuperação de cerca de 5 %. No caso dos clorofenóis as recuperações foram significativamente mais elevadas, perto de 20 % para o TCP e 30 % para o PCP (Figura 6). Os resultados obtidos mostram, claramente, que esta metodologia não é a mais apropriada para a detecção e quantificação de cloroanisóis no solo. Possivelmente, existem grandes perdas de cloroanisóis durante o procedimento de análise ou, por outro lado, os compostos adicionados são absorvidos irreversivelmente no solo, da mesma forma que acontece com a cortiça. Este

material liberta, no máximo, cerca de 0,05 % a 2 % do TCA total para soluções hidroalcoólicas (Hervé *et al.*, 2000).

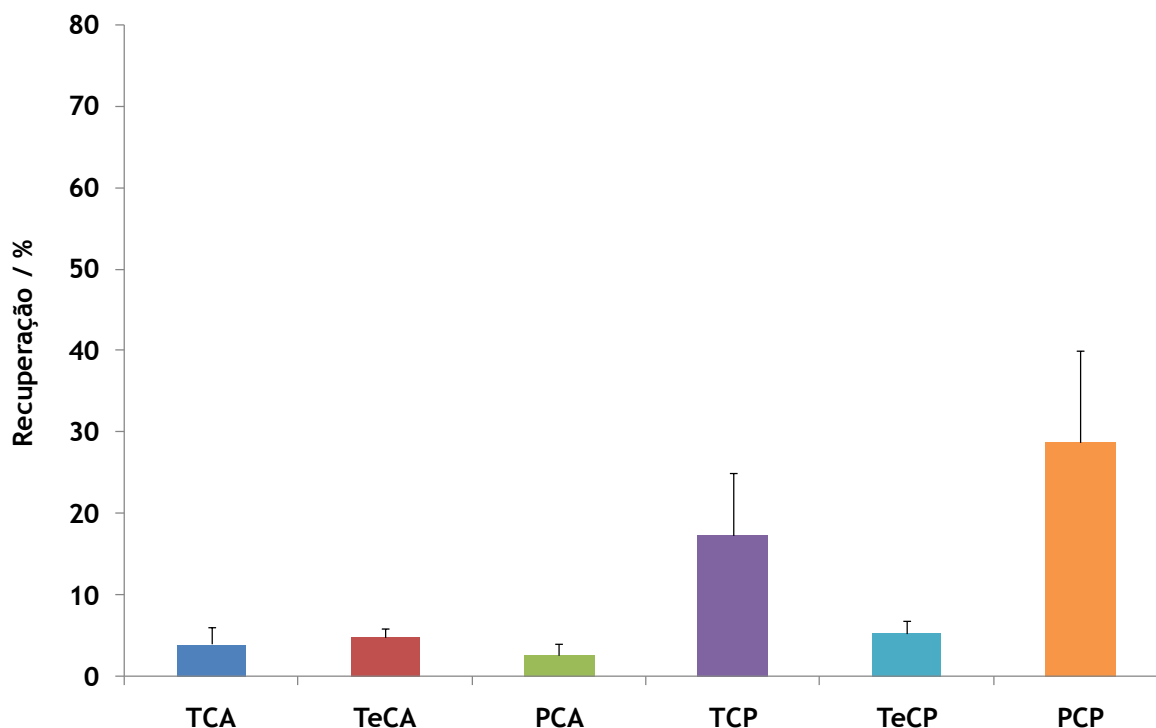


Figura 6 - Contaminação artificial de amostras de solo com cloroanisóis (TCA, TeCA, PCA) e clorofenóis (TCP, TeCP, PCP), com uma quantidade absoluta de 5 ng por cada composto (n=3).

4.2 Optimização de uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo

4.2.1 Ensaio 1: Selecção do solvente de extracção

Utilizando a metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo (ver secção 3.2), foram realizados diferentes ensaios de modo a maximizar a extracção destes compostos das amostras de solo.

O ensaio 1 diz respeito à selecção do melhor solvente de extracção: solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v), solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) com pH = 2, solução de carbonato de potássio (0,1 M) e uma mistura das anteriores, solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M). Foi testada a solução de carbonato de potássio (0,1 M) pelo facto da utilização de um solvente com pH básico aumentar significativamente a eficiência de extracção dos clorofenóis. Com valores de pH mais baixos, a presença de quantidades

consideráveis de matéria orgânica nos solos (por exemplo, ácido húmico) conduz a uma diminuição significativa nas recuperações dos clorofenóis (Wennrich *et al.* 2000).

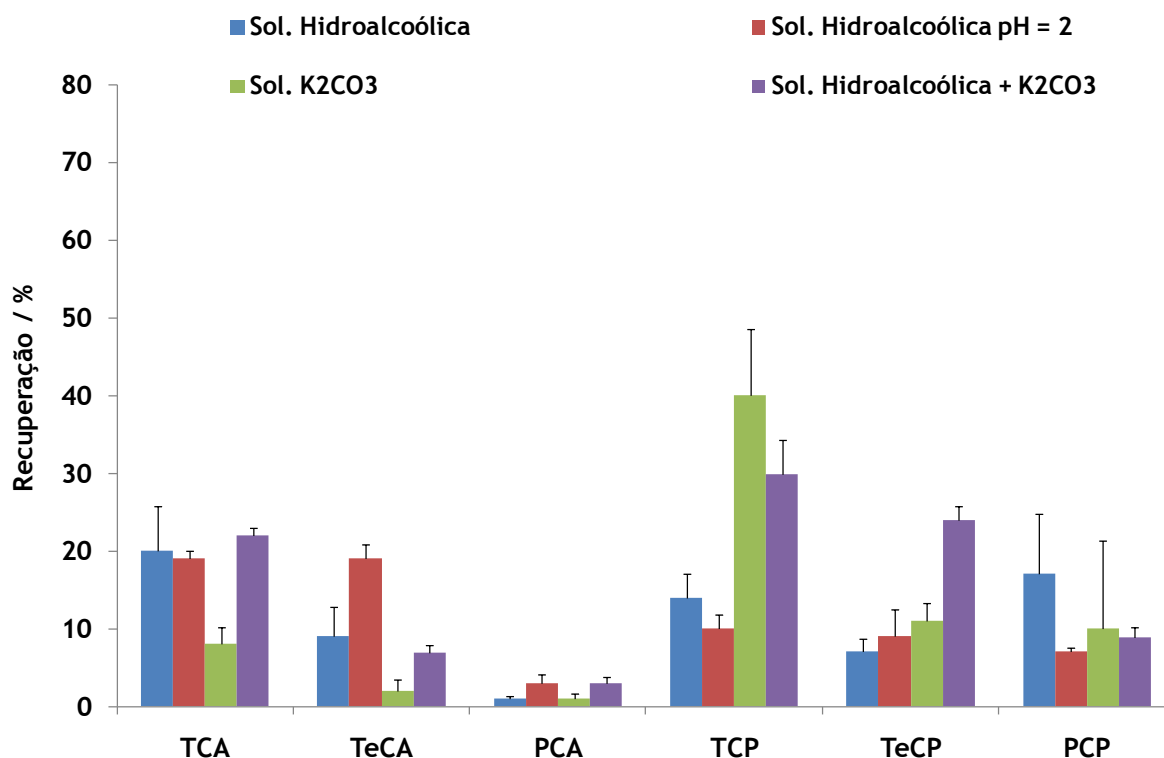


Figura 7 - Recuperações obtidas para cada cloroanisol e clorofenol utilizando como solvente de extracção as seguintes soluções: solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v), solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) com pH = 2, solução de K₂CO₃ (0,1 M) e solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de K₂CO₃ (0,1 M) (n=3).

Pela análise da Figura 7 verificou-se que as recuperações obtidas são mais elevadas para os cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) utilizando uma solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v). O ajuste do pH da solução não melhora significativamente as recuperações dos compostos, com excepção para o TeCA. Os resultados mostram que a metodologia utilizada permite obter recuperações de cloroanisóis superiores às observadas na secção 4.1, ainda assim os valores obtidos ficam aquém da expectativa.

Relativamente aos clorofenóis, as melhores recuperações foram observadas nas soluções de extracção que continham carbonato de potássio, nomeadamente para o TCP e TeCP, enquanto que para o PCP os níveis de recuperação diminuem ligeiramente. Relativamente aos resultados da secção 4.1, observou-se um aumento significativo das recuperações dos clorofenóis, na ordem dos 100 % para o TCP e TeCP.

Assim, em função dos resultados obtidos decidiu-se prosseguir os testes de optimização do método utilizando um solvente de extracção que fosse constituído por uma solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) com carbonato de potássio (0,1 M), de modo a obter uma boa extracção combinada dos cloroanisóis e dos clorofenóis mais representativos.

4.2.2 Ensaio 2: Optimização do tempo de extracção

Nesta fase de optimização do método de análise de amostras de solo, testou-se o tempo de extracção no sonicador (método de extracção), observando-se que a duração da extracção que maximiza a recuperação de cloroanisóis e clorofenóis, é de 15 min. Tempos de extracção superiores a 15 min conduzem a diminuições nos rendimentos de extracção. Relativamente ao ensaio 1 observou-se uma ligeira diminuição nas recuperações de todos os compostos, quando submetidos às mesmas condições experimentais (30 min a 30 °C) (Figura 8). Este facto deverá estar relacionado com a variabilidade de absorção/desorção destes compostos pela matriz terra.

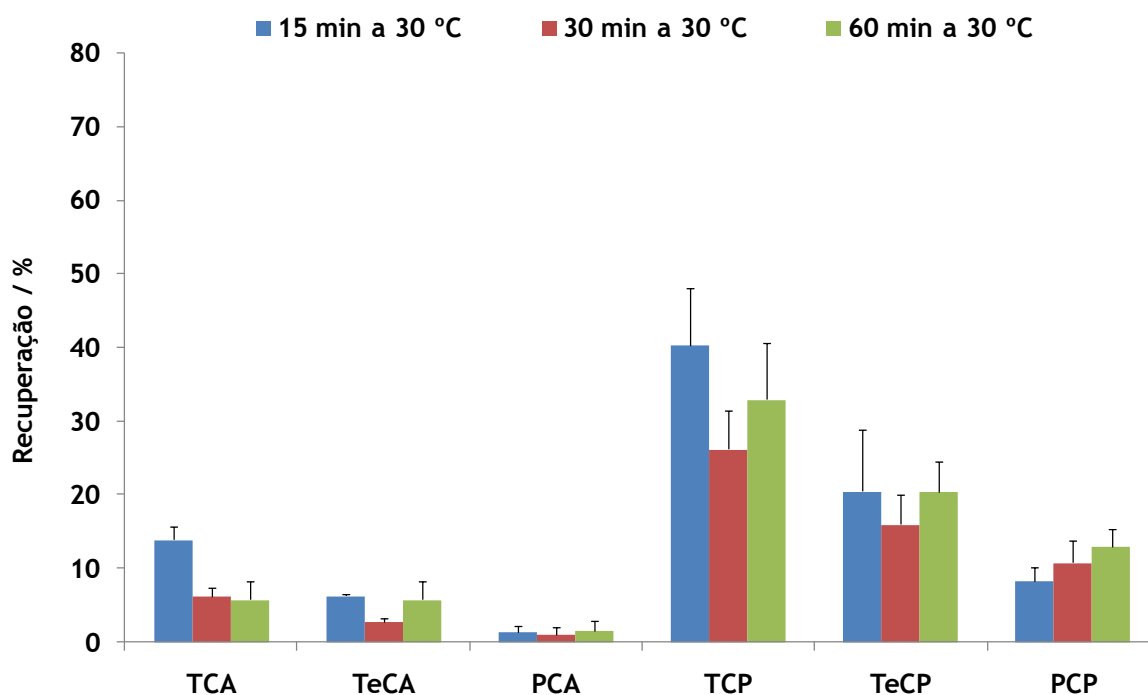


Figura 8 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador a 30 °C e fazendo variar o tempo de extracção (15, 30 ou 60 min) (n=3).

4.2.3 Ensaio 3: Optimização da temperatura de extracção

No ensaio 3, testou-se a temperatura de maceração das amostras de solo. Este ensaio permitiu constatar que a temperatura tem um papel fundamental na extracção dos diferentes compostos. Observou-se que a recuperação dos cloroanisóis e clorofenóis aumenta com a temperatura de extracção, sendo máxima a 90 °C (capacidade máxima de aquecimento do sonicador utilizado) (Figura 9). Face aos resultados obtidos anteriormente, este aumento é particularmente significativo no PCA, TeCP e PCP.

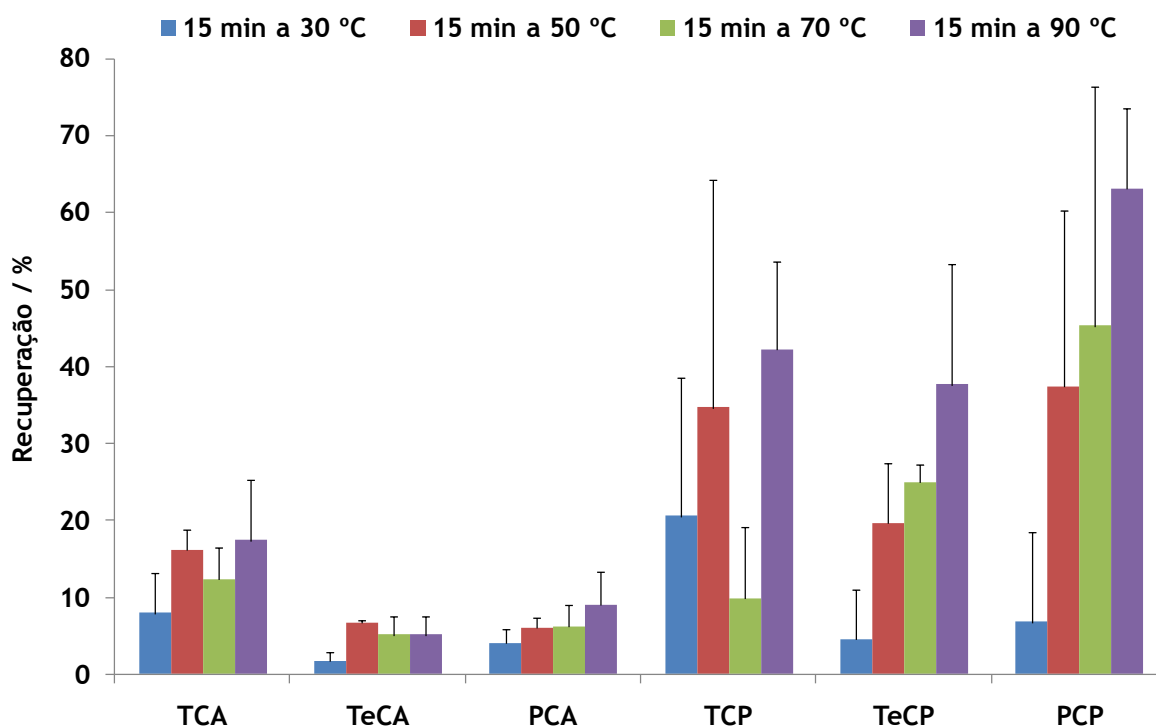


Figura 9 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador durante 15 min e fazendo variar a temperatura de extracção (30, 50, 70 ou 90 °C) (n=3).

4.2.4 Ensaio 4: Reoptimização do tempo de extracção

Numa última tentativa para aumentar as recuperações observadas nos pontos anteriores, efectuou-se um ensaio, para otimizar o tempo de extracção no sonicador à temperatura de 90 °C. Os resultados obtidos mostraram novamente que o tempo que otimiza a extracção dos cloroanisóis e dos clorofenóis é 15 min a uma temperatura elevada, 90 °C (Figura 10).

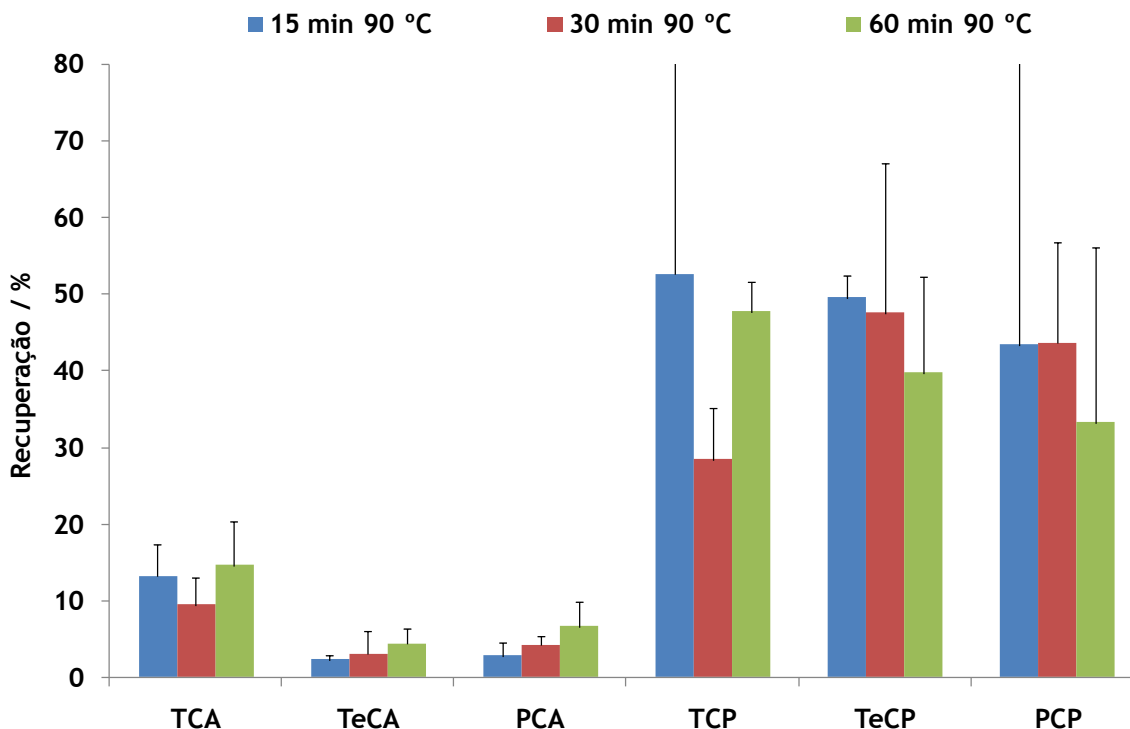


Figura 10 - Recuperações obtidas utilizando o sonicador a 90 °C e fazendo variar o tempo de extração (15, 30 ou 60 min) (n=3).

Após a realização dos 4 ensaios descritos anteriormente, observou-se alguma variabilidade nas recuperações dos compostos, dentro de cada ensaio e entre ensaios. Este facto pode ser verificado pela análise dos desvios padrão, que apresentam valores muito elevados, especialmente para os clorofenóis. As recuperações variaram entre 10 e 20 % para o TCA, entre 5 e 10 % para o TeCA e PCA, entre 40 e 50 % para o TCP e TeCP e entre 40 e 60 % para o PCP. As recuperações obtidas são muito aceitáveis, em função das condições disponibilizadas para o projecto (tempo, equipamento disponível, técnica utilizada, etc.), embora, ainda possam ser ligeiramente melhoradas.

Assim, conclui-se que as condições experimentais que levam à obtenção das melhores recuperações combinadas de cloroanisóis e clorofenóis de amostras de solo são as seguintes: utilização de solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M), como solvente de extração; realização da extração com ultra-sons durante 15 min a uma temperatura de 90 °C.

Numa tentativa de compreender as recuperações dos cloroanisóis e clorofenóis obtidas, realizou-se um ensaio para verificar se a matriz do solo pode ter influência na absorção/desorção desses compostos. Esse ensaio consistiu na realização de uma contaminação de uma amostra de solo (macerada segundo as condições experimentais

descritas no parágrafo anterior) directamente no vial de análise com 0,5 ng de cada cloroanisol e clorofenol. Este ensaio tinha por objectivo verificar se a terra após maceração no vial de análise pode interferir com a análise dos diferentes compostos. O procedimento utilizado foi idêntico ao da realização de padrões de controlo do GC-MS e das curvas de calibração, mas com uma matriz diferente, terra macerada (método de análise descrito no Anexo 1).

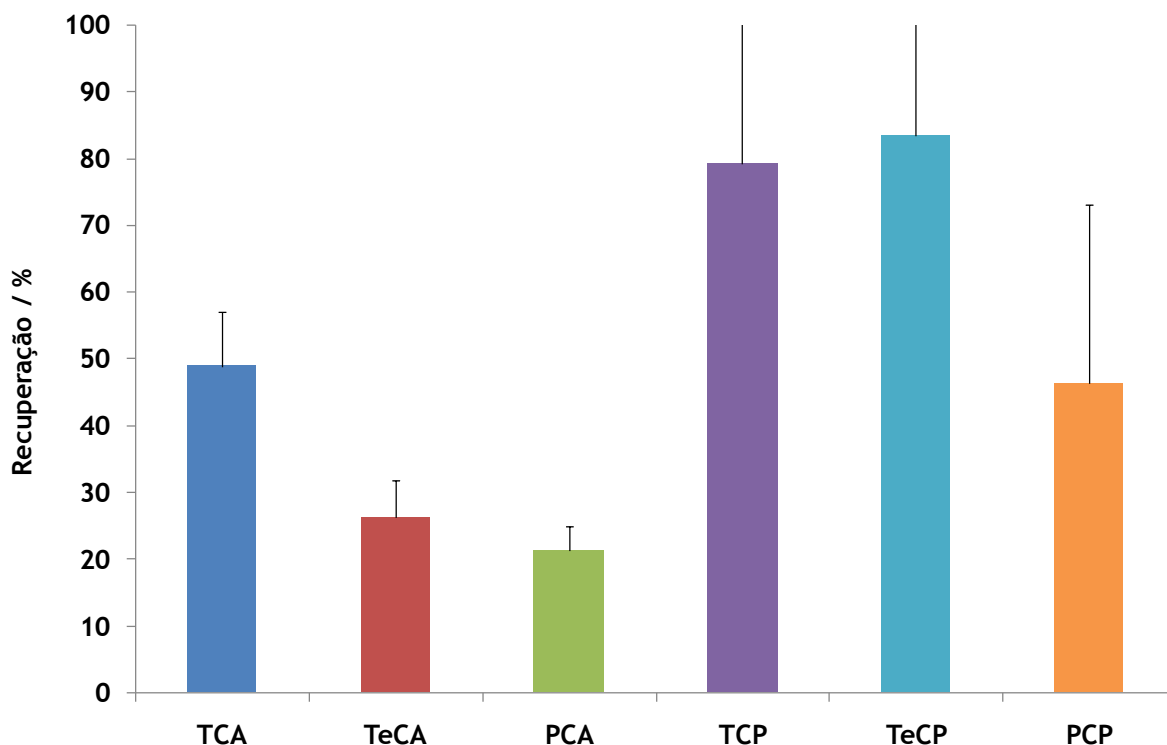


Figura 11 - Contaminação de amostras de solo com 0,5 ng cada cloroanisol (TCA, TeCA, PCA) e clorofenol (TCP, TeCP, PCP), realizada após maceração (n=3).

Constatou-se que as recuperações para todos os compostos são muito mais elevadas (entre 2 a 3 vezes superiores para os cloroanisóis e 2 vezes superiores para os clorofenóis) que as obtidas na contaminação dos frascos, o que indica que existe uma perda de compostos durante a fase de contaminação e extracção do procedimento de análise (Figura 11). Contudo, observou-se que ainda assim as recuperações de TCA, TeCA, PCA e PCP são inferiores a 50 %. Estes resultados parecem sugerir que a matriz do solo pode absorver irreversivelmente os cloroanisóis e clorofenóis numa extensão que depende das características da terra, i.e. composição, quantidade de matéria orgânica, humidade, etc. Por outro lado, não se pode excluir a hipótese da matriz terra afectar a volatilização dos compostos. Fromberg *et al.* (1996) indicaram que os efeitos da matriz na extracção de compostos dependem

principalmente do teor de carbono orgânico (por exemplo, o ácido húmico) no solo. Também Wennrich *et al.* (2000) indicaram que as eficiências de extracção dos clorofenóis são influenciadas negativamente pela presença de quantidades relativamente elevadas de matéria orgânica nos solos.

4.3 Análise de cloroanisóis e clorofenóis no solo dos diferentes locais de produção de cortiça

4.3.1 Análise de amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Portugal

Os resultados relativos à análise de cloroanisóis e clorofenóis mostraram que os únicos compostos que são quantificáveis nas amostras de solo, provenientes das 5 herdades localizadas em Portugal, são o TCA, TCP e o PCP, embora em quantidades relativamente baixas (Figura 12, 13, 14), sendo que as de TCA são completamente residuais face aos restantes compostos (TCP e PCP).

A análise de variância (ANOVA) realizada aos resultados obtidos mostrou a inexistência de diferenças significativas de contaminação entre os diferentes lotes, para os 3 compostos (TCA, TCP e PCP) ($p = 0,05$).

Os resultados obtidos mostraram, também, que existe uma grande variabilidade de contaminação entre as diferentes amostras recolhidas de diferentes locais dentro do mesmo lote, independentemente do tipo de composto considerado (TCA, TCP e PCP). Isto leva-nos a pensar que, possivelmente, o tipo de solo e as condições do local de recolha têm uma grande influência no grau de contaminação do solo, isto é, na absorção dos cloroanisóis e clorofenóis. Assim, o estudo das características do solo e do local de recolha pode ser muito importante para uma melhor compreensão da origem da contaminação.

Estes resultados estão de acordo com dados obtidos pelo departamento de I&D da Amorim & Irmãos, que verificaram que a cortiça proveniente destes locais apresentava um baixo potencial de contaminação com TCA, com excepção do lote 4 que era duvidoso quanto à intensidade de contaminação.

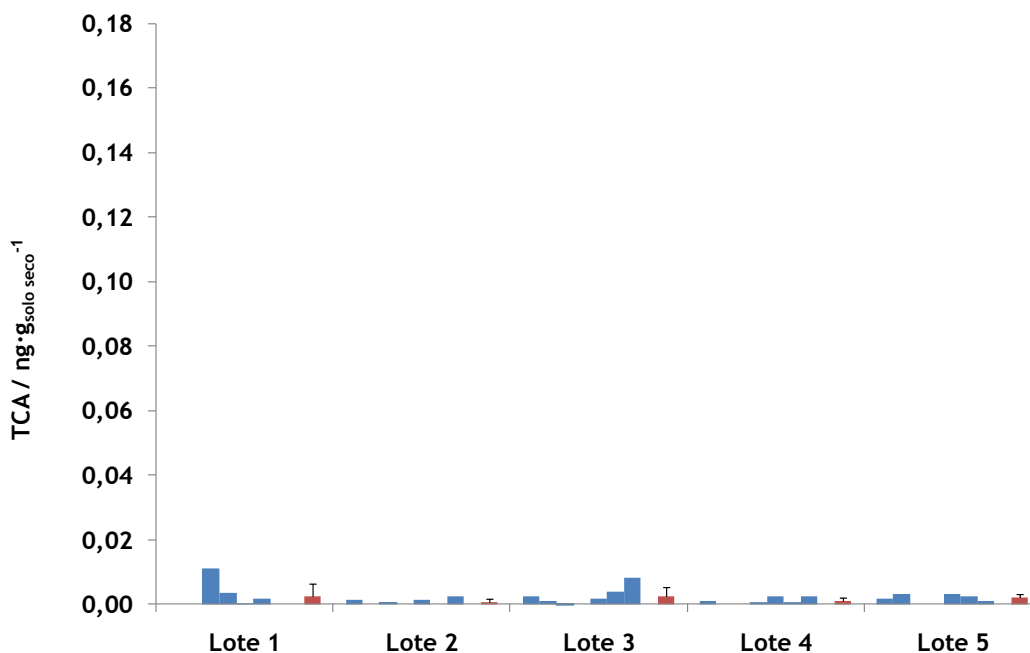


Figura 12 - Quantidade de TCA das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizados em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo lote (n=5). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote (n=35).

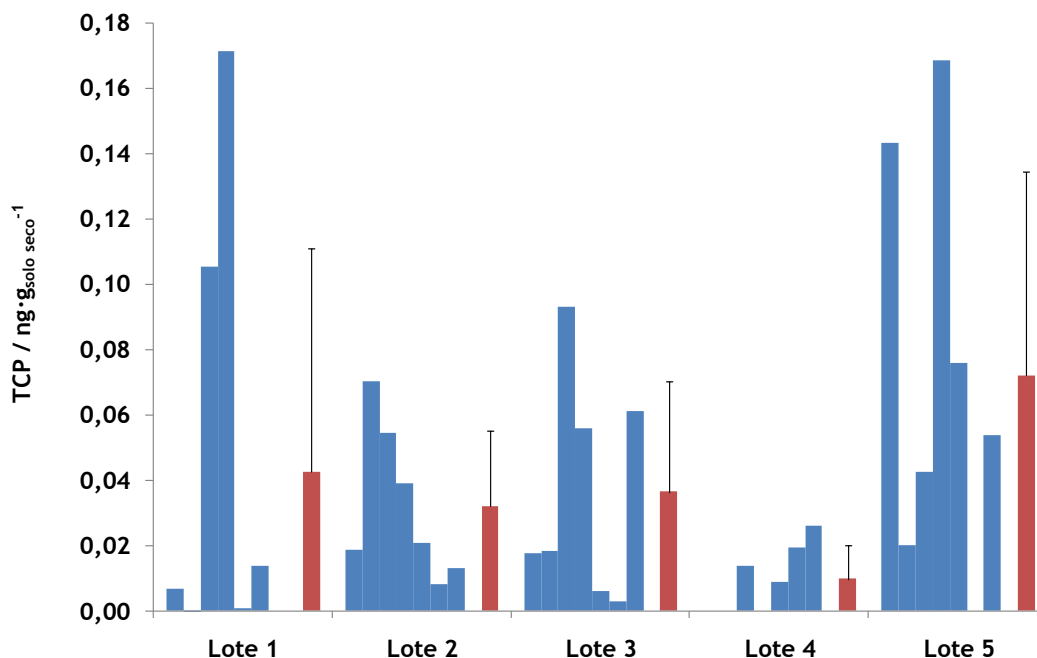


Figura 13 - Quantidade de TCP das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizadas em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo

lote ($n=5$). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote ($n=35$).

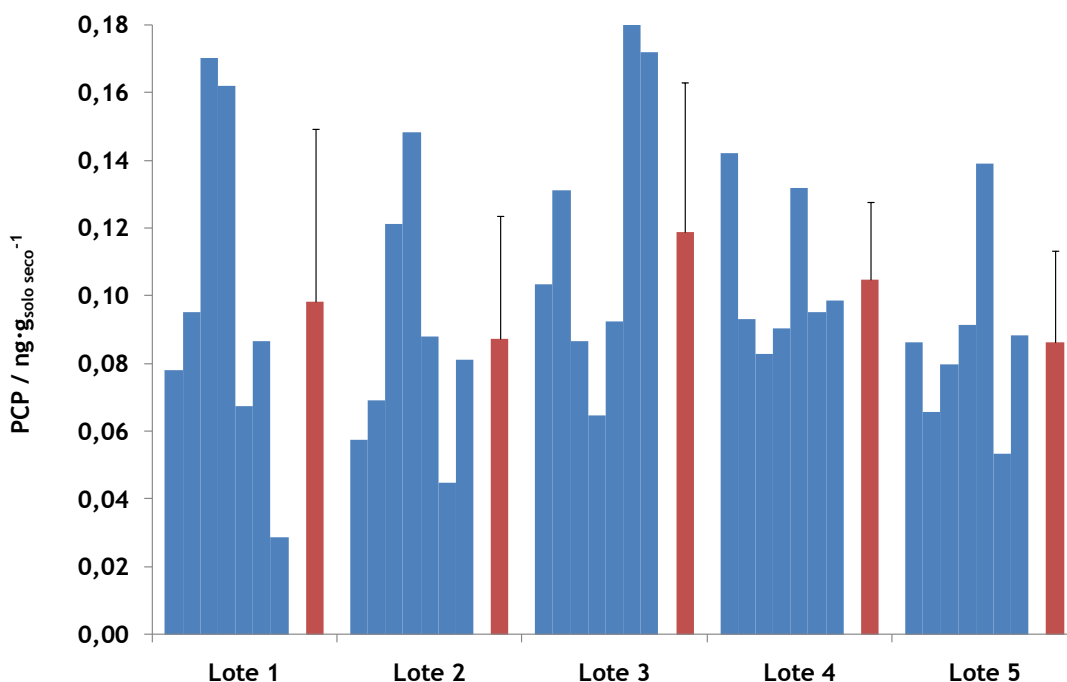


Figura 14 - Quantidade de PCP das 7 amostras de solo recolhidas nos cinco lotes de produção de cortiça localizadas em Portugal. As barras azuis representam os 7 locais de recolha dentro do mesmo lote ($n=5$). As barras vermelhas indicam a média e respectivo desvio padrão dos diferentes locais dentro do mesmo lote ($n=35$).

4.3.2 Análise de amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Espanha

Os resultados obtidos mostraram a presença de TCA e dos três clorofenóis (TCP, TeCP e PCP) nos 4 lotes provenientes do sul de Espanha (lotes 6, 7, 8 e 9). Como se pode verificar, os lotes 6 a 9 apresentam níveis muito elevados de contaminação, nomeadamente de TCP e o PCP (Figura 15). Após a realização da análise de variância (ANOVA), constatou-se que existem diferenças significativas entre os diferentes compostos e entre os diferentes lotes analisados. Assim, observou-se que as amostras de terra dos lotes 8 e 9 estão significativamente mais contaminadas com TCA que as dos lotes 6 e 7 ($p < 0,001$). Relativamente ao TCP, verificou-se que o lote 9 é significativamente mais contaminado que o lote 8, que por sua vez apresenta quantidades deste composto significativamente superiores aos lote 6 e 7 ($p < 0,001$). No caso

do PCP, a relação observada é inversa à TCP, isto é, os lotes 6 e 7 apresentam as maiores quantidades deste composto, sendo as menores observadas no lote 9 ($p = 0,001$) (Figura 16).

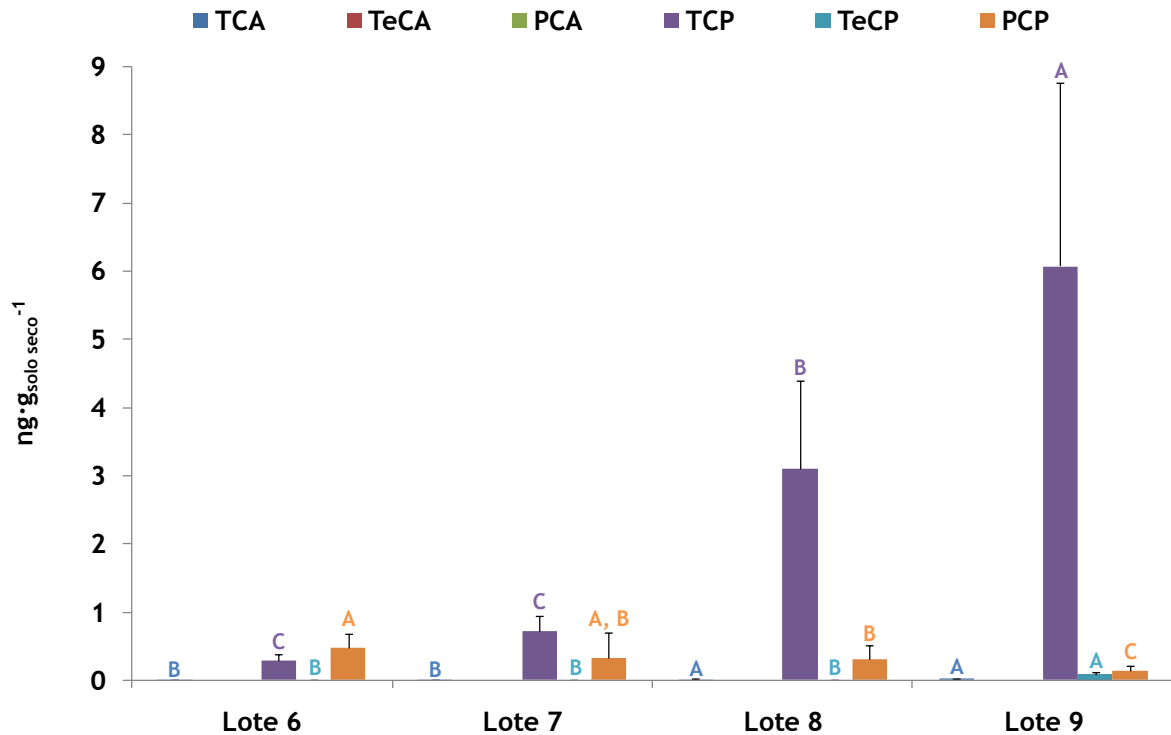


Figura 15 - Quantidades de cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo de 4 lotes de produção de cortiça localizadas no sul de Espanha ($n=20$). Letras iguais (A, B ou C), na mesma série (TCA, TCP, TeCP ou PCP), indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si.

Para facilitar a visualização dessas diferenças significativas existentes entre os compostos analisados e os diferentes lotes, realizou-se a análise de componentes principais (ACP).

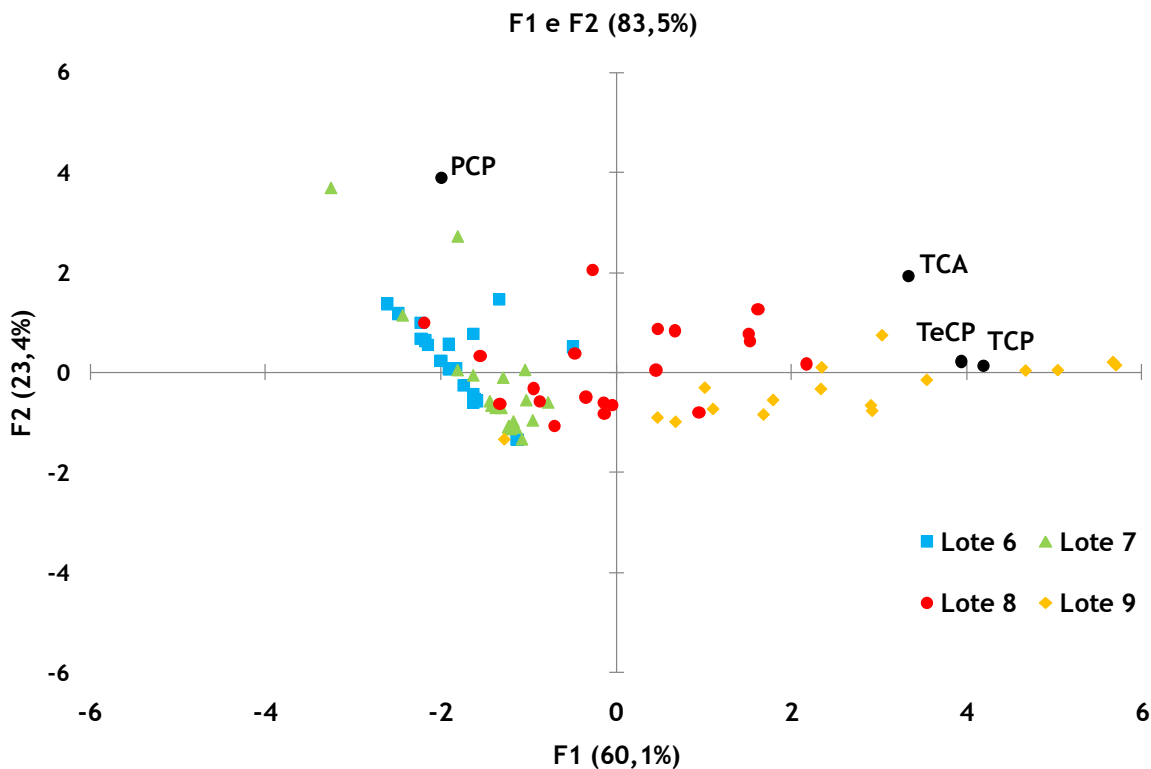


Figura 16 - Análise de componentes principais (ACP) das amostras de solo dos lotes que correspondem a 4 herdades de produção de cortiça localizadas no sul de Espanha.

Os dois primeiros factores (F1 e F2) representam 83,5 % da variabilidade total. O primeiro eixo (F1) representa 60,1 % da variância total e o eixo dois (F2) representa somente 23,4 % dessa variância. As variáveis TCA, TCP e TeCP têm uma maior contribuição e estão, positivamente, relacionadas com o eixo F1. Para o eixo dois (F2), o PCP tem a maior contribuição. O TCA, TCP e TeCP estão, positivamente, correlacionados entre si e, negativamente, correlacionados com o PCP. Estes dados demonstram a relação positiva existente entre o TCA e o TCP, o que é lógico pois o TCA forma-se a partir do TCP por acção microbiológica.

Quando se projecta os indivíduos (diferentes amostras de terra dos lotes), verifica-se que os lotes 6 e 7 estão relacionados com a variável PCP. O lote 8 e, principalmente, o lote 9 estão relacionados com o TCA, TCP e TeCP.

4.3.3 Comparação entre as amostras de solo provenientes de herdades localizadas em Portugal e Espanha

Embora as amostras de solo dos lotes localizados em Portugal e no sul de Espanha tenham amostragens diferentes, elaborou-se uma figura com os resultados médios e respectivos desvios padrão de todos os lotes analisados. Esta representação tem por objectivo facilitar a visualização das diferenças na ordem de grandeza de contaminação existente nos diferentes lotes (Figura 17).

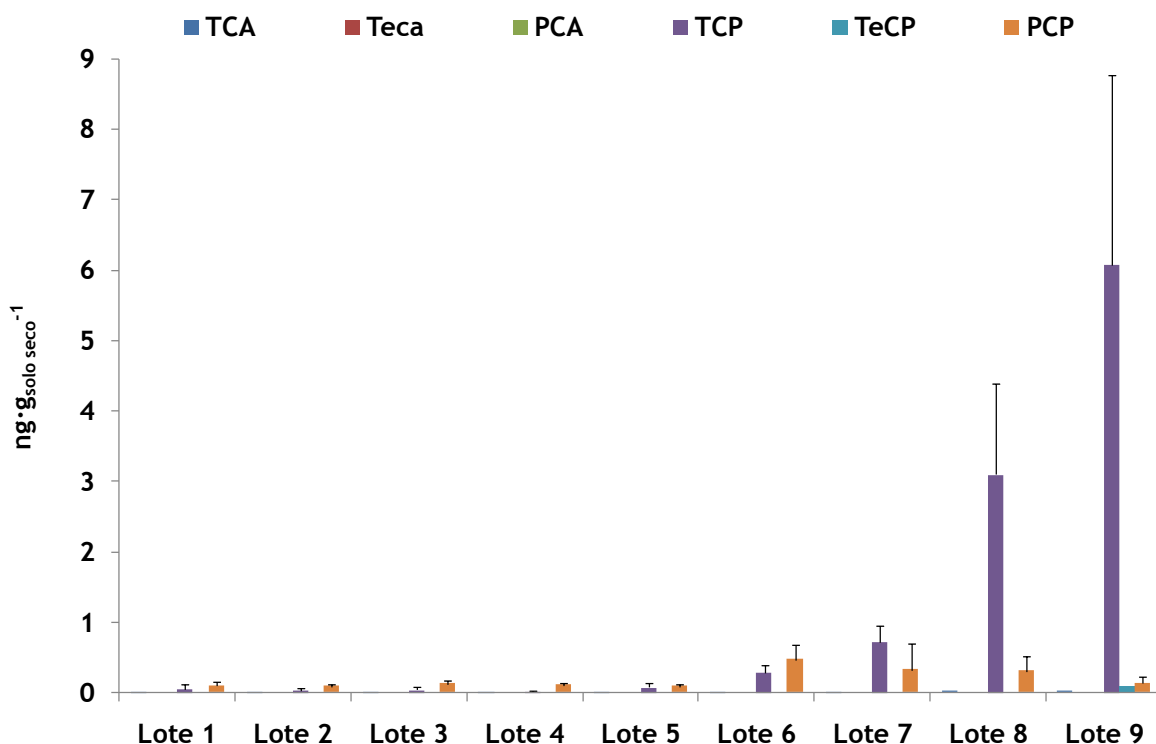


Figura 17 - Resultados da análise de cloroanisóis e clorofenóis das amostras de solo das 5 herdades portuguesas e das 4 herdades espanholas.

Pela leitura da Figura 17 verifica-se que os níveis de contaminação dos lotes 6 a 9 são muito superiores aos observados para os lotes 1 a 5. No caso do TCA, observa-se que a contaminação entre a média dos lotes portugueses e os lotes do sul de Espanha aumenta 2 vezes (lote 6) e 8 vezes (lote 9). O TCP aumenta 7 vezes (lote 6) e 158 vezes (lote 9) e o PCP aumenta 5 vezes (lote 6) e 2 vezes (lote 9). O TeCP, como foi dito anteriormente, só foi observado no lote 9. Estes resultados estão de acordo com dados obtidos pelo departamento de I&D da Amorim & Irmãos, que verificaram num estudo recente que a cortiça proveniente dos lotes 1 a 5 (Portugal) apresentavam um baixo potencial de contaminação com TCA, com excepção do

lote 4 que era duvidoso quanto à intensidade de contaminação. No caso dos lotes 6 a 9, confirma-se as suspeitas existentes relativamente ao elevado grau de contaminação da cortiça destes lotes com TCA, pois estes locais apresentam elevado grau de contaminação com precursores de TCA.

Observaram-se também grandes diferenças nos teores de humidades dos solos analisados. Os solos dos lotes 1 a 5 apresentam teores de humidade, da ordem dos 5 %, significativamente inferiores aos dos lotes 6 a 9, que apresentam teores superiores a 10 % (Figura 18).

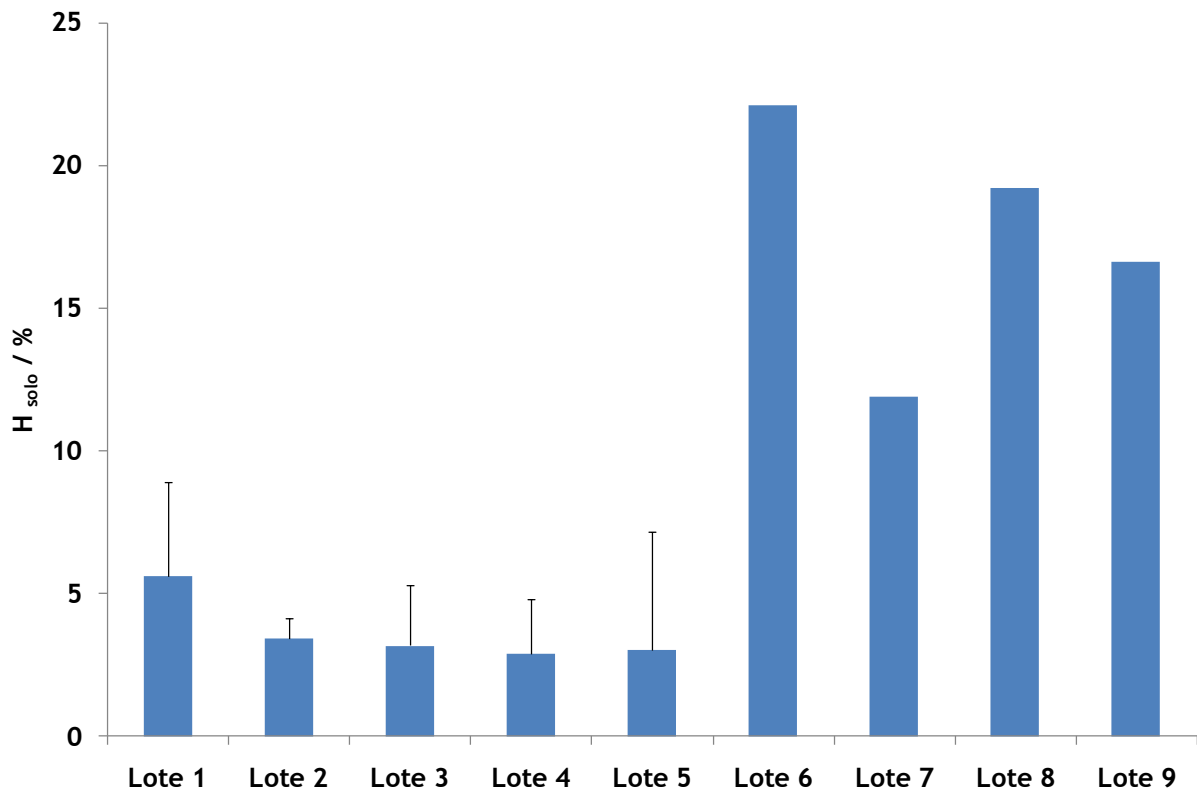


Figura 18 - Teores de humidade das amostras de solo, dos diferentes lotes de produção de cortiça.

Para verificar, de uma forma esquemática, se existem relações significativas entre os níveis de humidade dos solos e a contaminação de cada lote analisado, realizou-se uma nova análise de componentes principais (ACP) com os resultados médios obtidos (Figura 19).

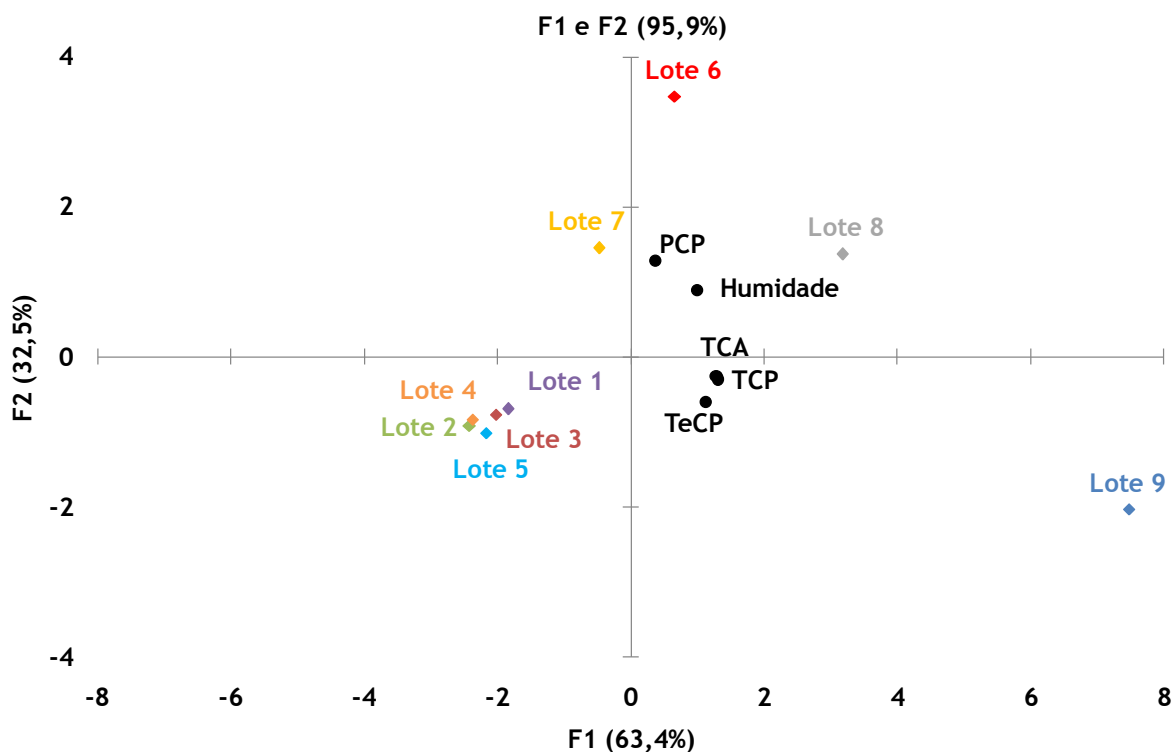


Figura 19 - Análise de componentes principais (ACP) dos cloroanisóis e clorofenóis e teor de humidade das amostras de solo dos diferentes lotes analisados.

Os dois primeiros factores (F1 e F2) representam 95,9 % da variabilidade total. O primeiro eixo (F1) representa 63,4 % da variância total e o eixo dois (F2) representa somente 32,5 % dessa variância. As variáveis TCA, TCP e TeCP têm uma maior contribuição e estão, positivamente, relacionadas com o eixo F1. Para o eixo dois (F2), o PCP tem a maior contribuição. A humidade tem contribuição semelhante para ambos os eixos. O TCA, TCP e TeCP estão positivamente correlacionados entre si e com a humidade. Contudo, a humidade apenas está correlacionada com o PCP de forma significativa.

Quando se projecta os indivíduos (amostras de terra dos lotes), verifica-se que estes estão distribuídos ao longo de todo o referencial. Mesmo assim, é possível verificar que existe uma relação positiva entre todas as variáveis e os lotes 6 a 9 que apresentaram níveis mais elevados de contaminação e de humidade. Ao contrário, os lotes 1 a 5 estão próximos entre si, o que significa que são semelhantes, estando negativamente relacionados com as variáveis analisadas, uma vez que possuem os menores teores de contaminação e de humidade.

Os resultados obtidos sugerem que, possivelmente, os solos com maior teor de humidade são mais susceptíveis a absorver os cloroanisóis e clorofenóis na matriz. Isto leva-nos a ponderar que todas as condições edafo-climáticas podem afectar a acumulação de clorofenóis no solo e favorecer, posteriormente, as condições necessárias ao crescimento dos fungos indispensáveis

à conversão destes compostos a cloroanisóis, por biometilação, como foi referido por Simpson *et al.* (2007).

Para compreender como uma possível contaminação da cortiça pode ocorrer através do solo, é necessário um estudo mais aprofundado sobre as características de cada tipo de solo analisado, bem como o historial dos produtos químicos utilizados no montado de sobro e que podem conter clorofenóis na sua composição.

Porém, o problema da origem da contaminação no montado de sobro está a ser analisado de uma forma simplista. Para se chegar a conclusões mais concretas é necessário estudar um maior número de amostras, para confirmar todos os resultados obtidos neste projecto.

5 Conclusões

No âmbito do projecto, desenvolveu-se e optimizou-se um método de análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo, utilizando, como solvente de extracção, uma solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) com carbonato de potássio (0,1 M) e extracção por ultra-sons. Trata-se de um método simples, rápido, sensível e com elevada praticabilidade para extrair de uma forma combinada cloroanisóis e clorofenóis da matriz do solo.

A metodologia desenvolvida foi utilizada para analisar amostras de solos recolhidos de locais de produção de cortiça. Os cloroanisóis e clorofenóis mais facilmente observados e quantificados nas amostras de solos analisadas foram o TCA, TCP, TeCP, PCP.

A contaminação das diferentes amostras de solos com cloroanisóis e clorofenóis é muito variável, dentro do mesmo local, mas sobretudo entre locais diferentes. Foi possível estabelecer uma relação positiva entre os níveis de contaminação e o teor humidade dos solos e o potencial de contaminação de TCA da cortiça desses mesmos locais.

O TCP e o PCP foram identificados como os principais marcadores químicos dos solos dos locais de produção de cortiça. Em perspectiva, a análise destes compostos permitirá caracterizar os diferentes solos do montado de sobro relativamente ao seu potencial de contaminação e poderá funcionar, no futuro, como uma ferramenta útil na decisão dos locais com níveis mais elevados de contaminação da cortiça.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objectivos Realizados

Este projecto teve como principal objectivo desenvolver uma metodologia para análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo. Depois de se ter desenvolvido a metodologia, esta foi utilizada para analisar amostras de solos reais recolhidos de locais de produção de cortiça e desse modo, verificar a existência de uma relação entre a contaminação dos solos e a contaminação com TCA da cortiça desses locais.

A duração de todos os ensaios deste projecto aliada a certas limitações técnicas que surgiram, fez com que o estudo ocupasse a totalidade do tempo de estágio.

Este foi o primeiro projecto do Departamento de I&D da Amorim & Irmãos a focar-se, única e exclusivamente, na origem ambiental dos problemas de contaminação. Como tal, o estudo está muito longe de estar concluído mas foram asseguradas todas as condições necessárias para lhe dar continuidade.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Durante toda a duração do estágio houve inteira colaboração com o laboratório de controlo de qualidade do departamento de I&D da Amorim & Irmãos, de modo a auxiliar em todos os trabalhos de rotina diária do laboratório, aproveitando a experiência da equipa de trabalho na análise cromatográfica de haloanisóis.

Das tarefas realizadas menciona-se as seguintes: preparação de amostras de rotina para análise de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), preparação de soluções mãe, análises de TBA, TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP e PCP em amostras de rotina e em reclamações de clientes. Além disso, devido às limitações técnicas existentes, foi necessário aprender a trabalhar com os dois GC-MS existentes no departamento de I&D (*Agilent* e *Shimadzu*), incluindo a sua manutenção. Para isso, calculou-se para diferentes métodos os limites de detecção de cada equipamento e optimizou-se e calibrou-se métodos analíticos para utilização futura em diversos projectos do departamento de I&D.

A autora colaborou, também, nos projectos: “Migração de d5-TCA do interior de rolhas para o vinho”, “Efeito barreira do tratamento *Acquamark* à passagem de TCA de rolhas naturais para soluções hidroalcoólicas”, “Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes”, “Detecção de TCA *in situ*, por uma técnica rápida de cromatografia gasosa com detector de

captura electrónica (GC-ECD)”, “Permeabilidade gasosa de diferentes vedantes”, entre outros, a decorrer na empresa.

A autora realizou ainda algumas visitas a instalações pertencentes ao grupo Amorim, nomeadamente a Amorim & Irmãos, Portocork e Champcork todas localizadas em Santa Maria de Lamas.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo da realização do projecto surgiram alguns problemas técnicos, tais como avarias nos GC-MS e no sonicador utilizados, escassez de certos equipamentos (micro-ondas) para melhoramento das técnicas de extracção. Existiram também algumas limitações na utilização de equipamento devido às necessidades prioritárias das análises de rotina do laboratório. A realização de todas as tarefas inerentes ao trabalho exigiu, assim, uma eficiente articulação funcional do trabalho em equipa.

No entanto, foi possível chegar a algumas conclusões bastante interessantes e que abrem caminho para o trabalho futuro nesta nova área.

Para compreender como uma possível contaminação da cortiça pode ocorrer através do solo, sugere-se a realização de um estudo mais aprofundado sobre a composição química e microbiológicas de cada tipo de solo, condições climatéricas, historial de utilização de produtos fitossanitários (pesticidas, herbicidas, etc.) e a respectiva relação com os níveis de haloanisóis na cortiça.

Pode, também, ser necessário levar a cabo melhoramentos da metodologia implementada para diminuir o tempo de análise e aumentar o número de amostras, por exemplo, substituir a extracção por ultra-sons por uma extracção por micro-ondas.

6.4 Apreciação final

Este trabalho é o primeiro projecto a ser realizado no Departamento de I&D da Amorim & Irmãos focando-se somente sobre o tema da origem ambiental dos problemas de contaminação da cortiça. A compreensão global deste problema é fundamental para a estratégia de prevenção da Amorim & Irmãos e visa dar continuidade ao seu vasto estudo sobre a incidência de TCA.

A autora desenvolveu e optimizou um método capaz de analisar cloroanisóis e clorofenóis presentes no solo e que levou à identificação dos principais marcadores químicos de contaminação dos montados de sobreiros, triclorofenol (TCP) e pentaclorofenol (PCP). Em perspectiva, a análise destes compostos permitirá caracterizar os diferentes solos do montado

de sobro relativamente ao seu potencial de contaminação e poderá funcionar, no futuro, como uma ferramenta útil na decisão dos locais com níveis mais elevados de contaminação da cortiça.

O presente estudo apresenta-se assim como uma contribuição importante no controle da qualidade da cortiça produzida, sendo sem dúvida uma mais-valia científica e comercial na resposta às exigências do mercado de rolhas de cortiça sem TCA.

A grande variedade de actividades realizadas durante o estágio permitiu amplificar a experiência bem como alargar os conhecimentos sobre as áreas envolvidas. Assim, o estágio tornou-se numa mais-valia a nível pessoal, permitindo o enriquecimento da formação contínua adquirida no curso e evidenciando que a actividade profissional de um engenheiro exige uma aprendizagem permanente e uma actualização constante dos conhecimentos, experiências e competências de modo a acompanhar a mudança tecnológica.

7 Referências

- Amon, J.M., Simpson, R.F., *Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance*, Australian Grapegrower and Winemaker, 286, 63-80, 1986;
- APCOR, *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., *Absorption 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.
- Bertrand, A., Barrios, M.L., *Contamination de bouchons par les produits de traitements de palettes de storage des bouteilles*, Revue Française d'Enologie, 34, 29-32, 1994.
- Boutou, S., Chatonnet, P., *Rapid headspace solid-phase microextraction/gás chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the mais 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.
- 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.
- Coelho, J., *Migração de TCA e TCP através de diferentes vedantes. 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, 1-66, 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 chênes lieges en forêt*, Revue des OEnologues, 101, 59-62, 2000.
- Drevenkar, V., Fingler, S., Fröbe, Z., Vasilic, Ž., *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.
- 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.
- Lino, J.M., *Migração de d5-TCA através de vedantes em vinho e método para envelhecimento acelerado de um vinho*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L., Glories, Y., *Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 6741-6746, 2006.
- Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L., Glories, Y., *Main routes of oxygen ingress through different closures into wine bottles*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 5167-5170, 2007.
- Lopes, T., *Estudos de migração de 2,4,6-tricloroanisol através de vedantes*, 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.

- 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 vedantes e embalagem*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2009.
- Podehradská, J., Voznáková, Z., Tesarová, E., *Determination of chlorophenols in soil*, *Toxicological & Environmental Chemistry*, Vol. 69, No. 3-4, 1999.
- Pollnitz, 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.
- Sampaio, J.M., *Desenvolvimento de um método para envelhecimento acelerado de um vinho engarrafado com diferentes tipos de vedantes*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2008.
- Sefton, M.A., Simpson, R.F., *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 226-240, 2005.
- Simpson, R.F., *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.
- Tölgyessy, P., Vrana, B., Bartal, M., Krascšenits, Z., Šilhárová, K., *Determination of chlorophenols in sediments using ultrasonic solvent extraction followed by stir bar sorptive extraction coupled to TD-GC-MS*, *Chromatographia*, Vol. 69, No. 3-4, 2009.
- 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., Möder, M., *Determination of chlorophenols in soils using accelerated solvent extraction combined with solid-phase microextraction*, *Analytical Chemistry*, Vol. 72, No. 3, 2000.
- Riboulet, J.M., Alves, L.A.R., Urreizti, N., *Quantificação dos cloroanisóis por micro extracção em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (GC) com detecção por espectrometria de massa (MS) em macerados de lotes de rolha de cortiça ou em vinhos*, *Ciência Téc. Vitiv.*, 17(2), 61-71, 2002.

8 Anexos

8.1 Anexo 1 - Método Analítico

Método de Análise:

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

Equipamento utilizado:

- Cromatógrafo Gasoso: Agilent 6890;
- Detector: Espectroscopia de Massa Agilent 5973;
- Auto-Sampler: Gerstel MPS2, nº série 121694;
- Programa de aquisição de dados: Enhanced Chemstation, G1701 CA Version C.00.00 21-Dec-1999, Copyright © Agilent Technologies 1989-1999;
- Fibra Sigma-Aldrich Co., com 100 µm de revestimento de polidimetilsiloxano (PDMS);
- Coluna Varian, FactorFour™ Capillary Column VF-5ms 30 m x 0,32 mm, 0,25 µm.

Compostos a analisar:

- Cloroanisóis (TCA, TeCA, PCA);
- Clorofenóis (TCP, TeCP, PCP);
- Padrão Interno: d5-TBA (50 µg·L⁻¹)

Preparação da amostra:

- Colocar 9,6 mL da amostra num vial de SPME de 20 mL, contendo ± 3 g de NaCl.
- Adicionar 200 µL de solução de Carbonato de Potássio 5 M, 100 µL do padrão interno d5-TBA de concentração 50 µg·L⁻¹ e 100 µL de Anidrido Acético.
- O vial é analisado por SPME/GC-MS com uma fibra de PDMS condicionada de acordo com as recomendações do fornecedor (30 min a 270 °C).
- A pré-incubação ocorre durante 3 min a 55 °C (250 rpm) e depois segue-se uma extracção de 11 min a 55 °C (250 rpm). A desorção da fibra no injector ocorre durante 4 min a 270 °C.

Análise e condições de detecção:

- O injector opera a 270 °C. O programa começa a uma temperatura de 90 °C, aumentando depois 10 °C·min⁻¹ até 205 °C (11,5 min) e de seguida 30 °C·min⁻¹ até 280 °C (2,5 min). Tempo total de 14 min.

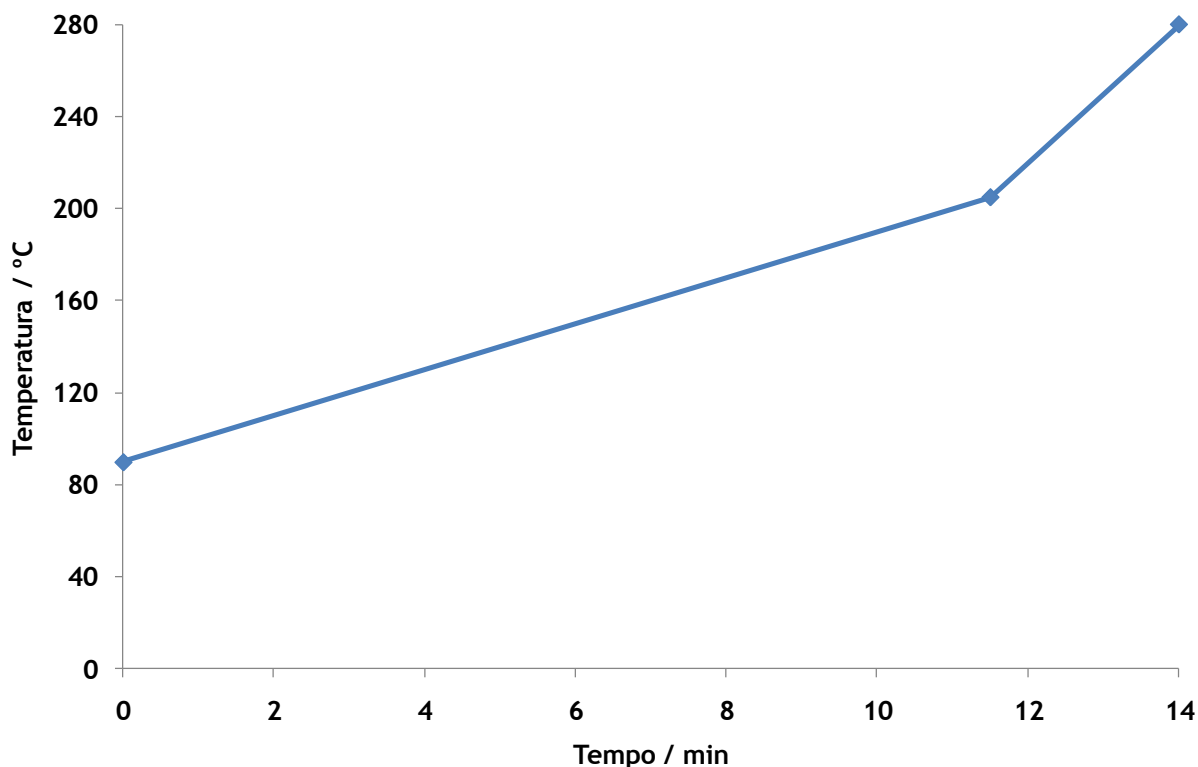


Figura 20- Programa de temperaturas correspondente às condições de detecção do GC-MS.

Calibração:

- Para quantificação de todos os compostos que se pretende analisar é necessário efectuar rectas de calibração para as gamas de concentrações de interesse. Assim, realizou-se rectas de calibração para todos os compostos para uma gama de concentrações entre 0 e 50 ng·L⁻¹, numa matriz de solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio (0,1 M). As soluções etanólicas de cloroanisóis (TCA, TeCA, PCA) e clorofenóis (TCP, TeCP, PCP), utilizadas para realização das curvas de calibração, tinham uma concentração de 10 µg·L⁻¹.
- Os padrões de controlo são realizados na mesma matriz e com uma concentração de 10 ng·L⁻¹.

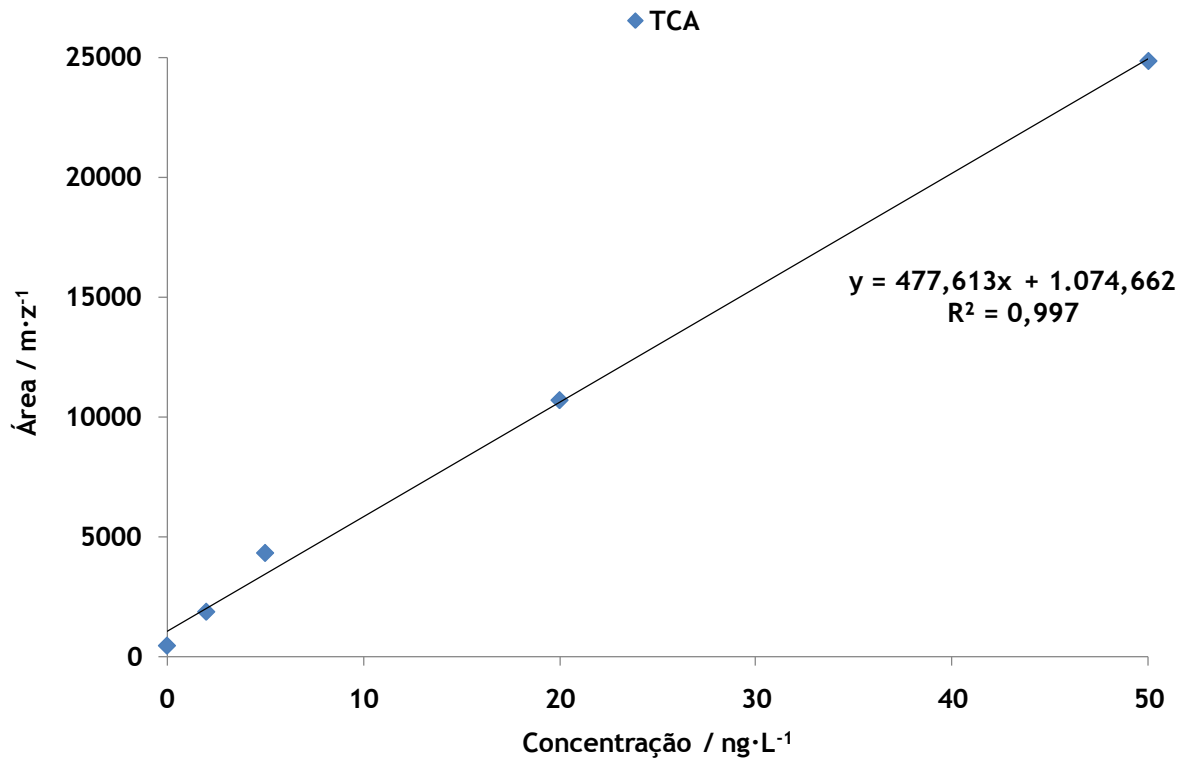


Figura 21 - Curva de calibração do TCA, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

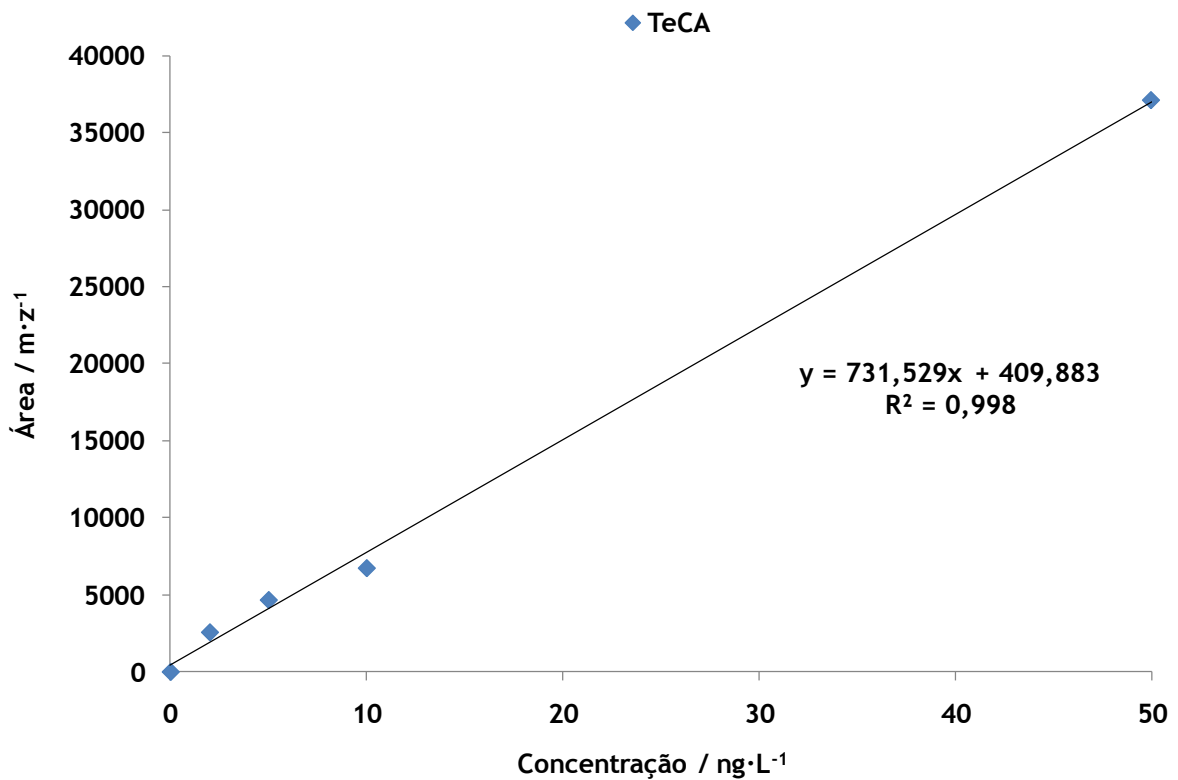


Figura 22 - Curva de calibração do TeCA, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

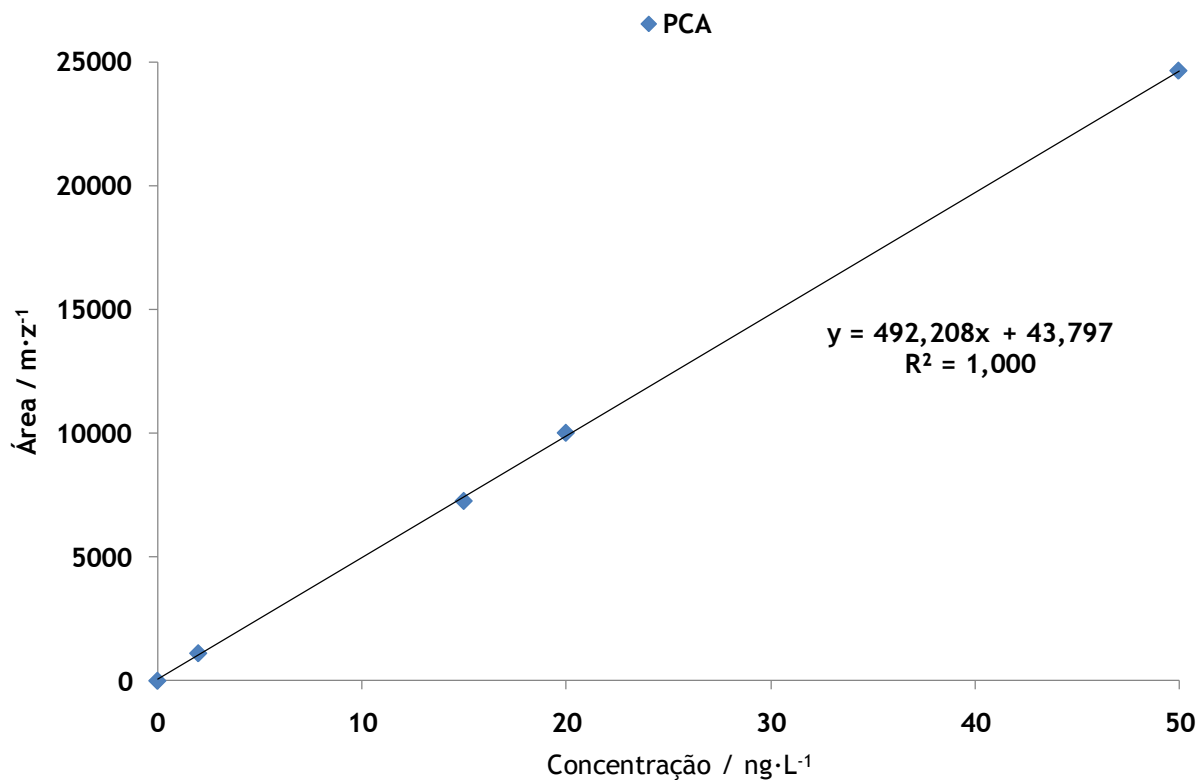


Figura 23 - Curva de calibração do PCA, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

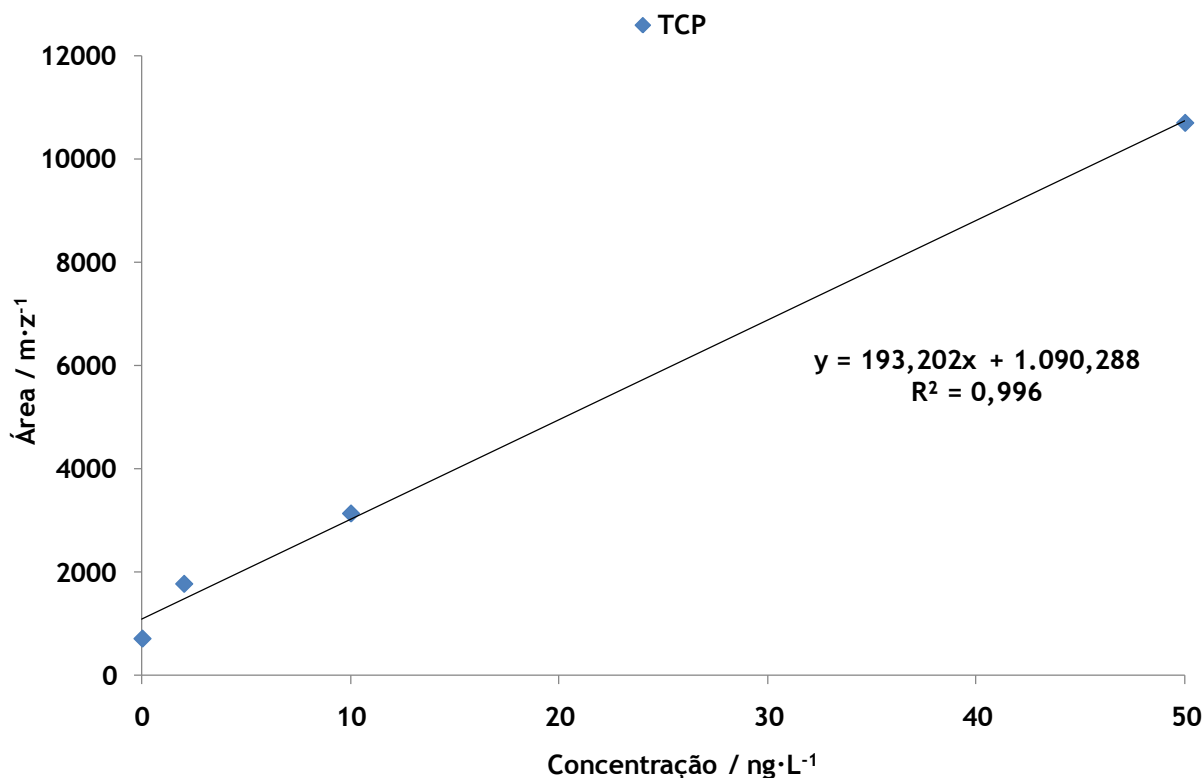


Figura 24 - Curva de calibração do TCP, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

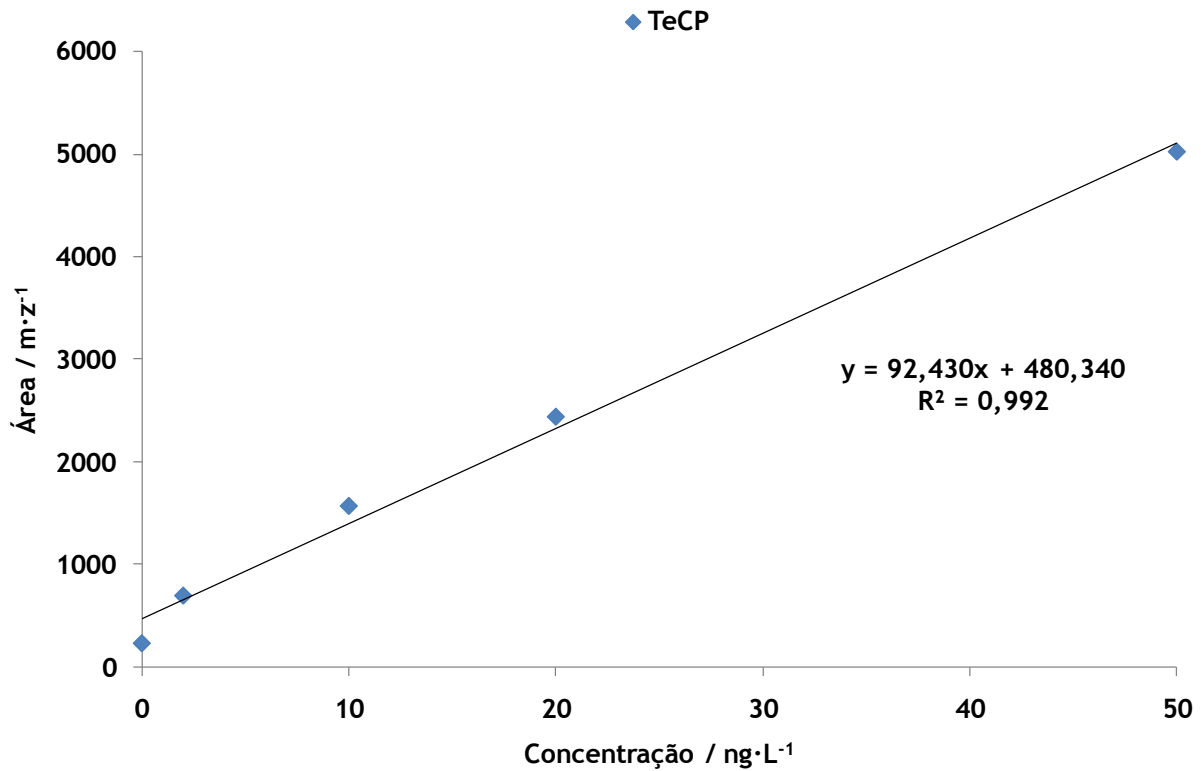


Figura 25 - Curva de calibração do TeCP, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

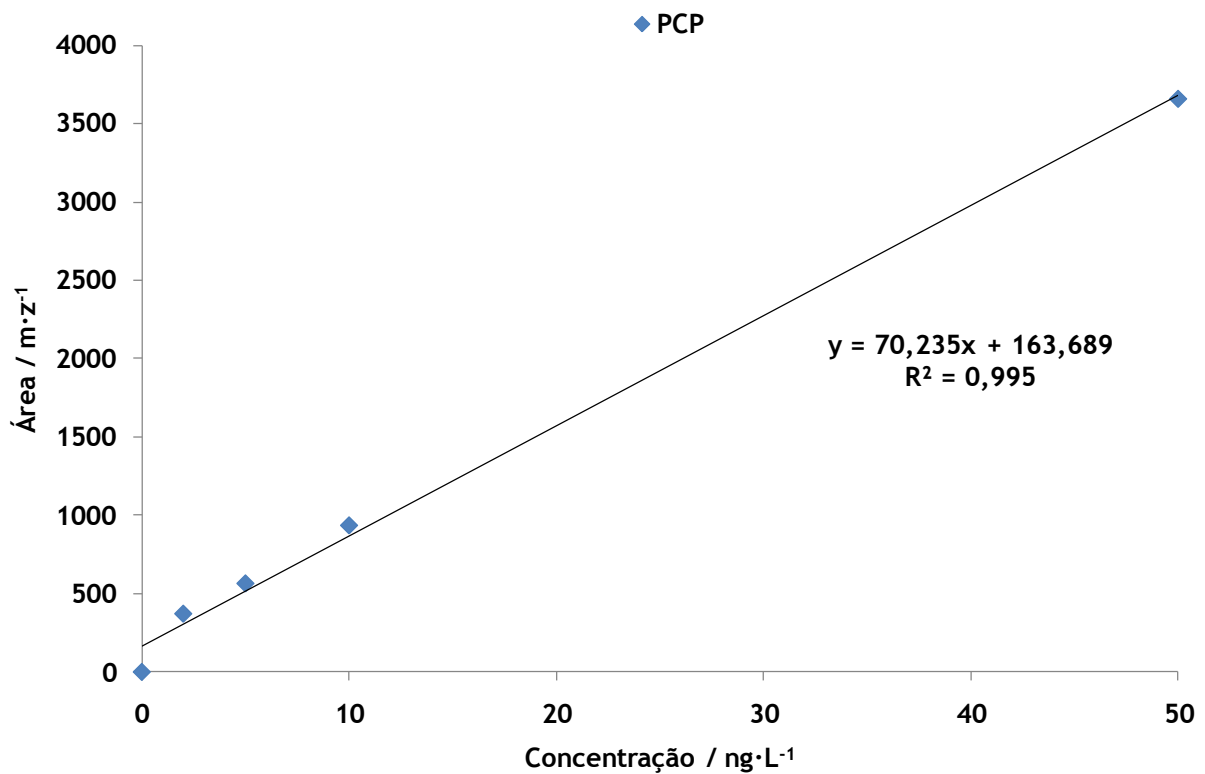


Figura 26 - Curva de calibração do PCP, em solução hidroalcoólica (12 % etanol v/v) de carbonato de potássio, para a gama de concentrações de 0 a 50 ng·L⁻¹.

Tratamento de resultados do GC-MS:

- Para quantificar os compostos é necessário integrar os picos correspondentes ao padrão interno (d5-TBA) e ao contaminante a analisar. Assim obtém-se, para cada amostra, a área do pico cromatográfico do contaminante (A_{cont}) e a área do pico cromatográfico do respectivo padrão interno ($A_{p.i.}$). Posteriormente, calcula-se o valor médio das áreas dos picos cromatográficos do padrão interno ($A_{média\ p.i.}$) para se corrigir o valor das áreas dos picos cromatográficos dos contaminantes (A_{cont}^*) com base na equação (1.1).
- Para se obter o valor da concentração do contaminante (C_{cont}), é necessário substituir o valor da área dos picos cromatográficos corrigida (A_{cont}^*) na equação da curva de calibração (1.2 e 1.3).

$$A_{cont}^* = \frac{A_{média\ p.i.}}{A_{p.i.}} \times A_{cont} \quad (1.1)$$

$$A_{cont}^* = declive \times C_{cont} + ordenada \quad (1.2)$$

$$C_{cont} = \frac{A_{cont}^* - ordenada}{declive} \quad (1.3)$$