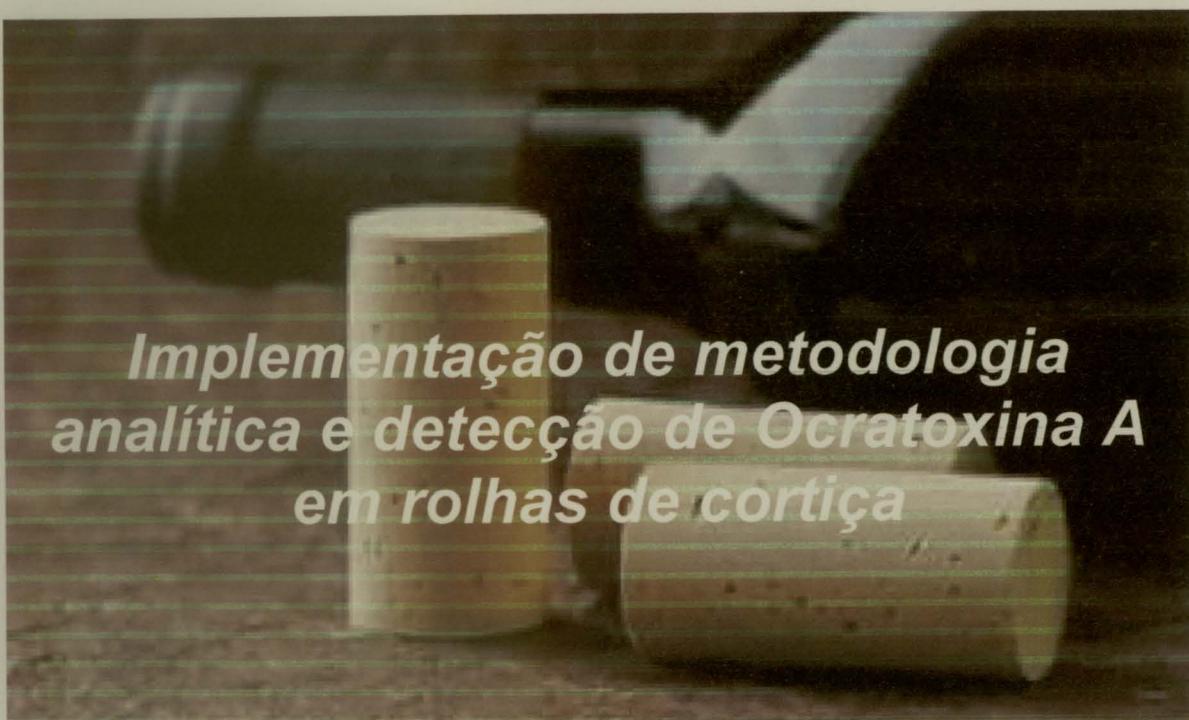


Acção 3.2 Programa de Estágios no Ensino Superior
PRODEP III- Programa Operacional de Desenvolvimento Educativo
para Portugal



***Implementação de metodologia
analítica e detecção de Ocratoxina A
em rolhas de cortiça***

***Estágio com a colaboração do Departamento I&D da
empresa Amorim & Irmãos, S.A.***

Márcia Gonçalves

**Supervisionado por: Prof. Doutora Arminda Alves (FEUP-DEQ)
Com a orientação de: Prof. Doutor Miguel Cabral (Amorim & Irmãos,S.A.)**

66(047.3)
LEQ 2003/GONm

Dezembro 2004



6647.3) / LEG 2003 / GONM

Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
Biblioteca

Nº	43394
CDU	593
Data	/ /20

Índice

1- Resumo	2
2- Introdução	3
2.1- Possível presença de Ocratoxina A em Rolhas de Cortiça	3
2.2- Contaminação por fungos na Indústria da Cortiça	3
2.3- O que é a Ocratoxina A (OTA)	5
3- Material e Métodos	7
3.1- Reagentes e Equipamento	7
3.2- Analise de OTA em rolhas de cortiça	8
3.2.1- Método de extracção	8
3.2.2- Análise Cromatográfica	9
3.3- Ensaios de adsorção em rolhas de cortiça	10
3.3.1- Método de extracção	10
3.3.2- Análise cromatográfica	10
4- Resultados e Discussão	11
4.1- Análise de OTA em rolhas de cortiça	11
4.2- Validação do método	12
4.2.1- Linearidade da resposta	12
4.2.2- Limites Analíticos	12
4.2.3- Precisão	12
4.2.4- Exactidão	14
4.2.5- Análise de Incertezas	15
4.3- Adsorção de OTA em rolhas de cortiça	15
4.4- Análise da matéria-prima	16
4.5- Análise das águas de cozedura	17
5- Conclusões	18
Referências	19
Anexo A- Carta de Controlo	20
Anexo B- Cromatogramas	21

1- Resumo

Este estágio foi realizado, no âmbito do Programa de Desenvolvimento Educativo para Portugal - PRODEP, no Departamento de I&D da Amorim & Irmãos, S.A. e no Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia - LEPAE no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, durante um período de três meses.

Como principal objectivo foi proposto ao estagiário efectuar a Implementação de metodologia analítica para a detecção de Ocratoxina A em rolhas de cortiça. Esta metodologia foi ainda utilizada para a análise de pranchas de cortiça (sem qualquer tipo de tratamento) e águas provenientes da etapa de cozedura do processo de fabrico das rolhas. Foi ainda objectivo estudar a possibilidade da Ocratoxina A ser adsorvida por rolhas de cortiça.

Nos ensaios realizados foram usados 4 tipos de rolhas diferentes: *naturais extra e de 2^a classe e aglomeradas* com granulado de 1-2 mm e 3-7 mm. Estas rolhas têm um processo de fabrico diferente (*naturais/aglomeradas*) o que faz com que apresentem características finais diferentes. As placas de cortiça eram de dois tipos: '*com barriga e com costas*' e '*sem barriga e sem costas*' e pertenciam a três fases do processo: *crua, cozida com água após 24 horas de mudada e cozida com água após 48 horas de mudada*.

Para a determinação de Ocratoxina A utilizou-se o método recomendado na Norma Europeia - prEN 14133 (CEN - Comité Europeu de Normalização), com algumas alterações, nomeadamente na fase de extracção do sólido. Consiste na passagem da solução etanólica, que esteve em contacto com a rolha/prancha em estudo, por coluna de imunoafinidade (purificação da solução), seguida de análise cromatográfica em fase líquida (HPLC) com detecção por fluorescência.

Com os métodos usados a Ocratoxina A não foi detectada em nenhum dos quatro tipos de rolha, o mesmo aconteceu com as pranchas de cortiça e as águas de cozedura.

No que diz respeito à adsorção da Ocratoxina A pelas rolhas os resultados são inconclusivos. Seria necessário mais tempo para: optimizar o tempo de contacto entre a rolha e a solução etanólica e perceber todas as potencialidades que apresenta um material natural tão heterogéneo e complexo como a cortiça.

Convém referir que relativamente ao HPLC, não foi efectuado um estudo das incertezas associadas ao método e os resultados obtidos na validação deste evidenciam (inesperadamente tendo em consideração o tipo de equipamento) problemas de repetibilidade e precisão. Estes problemas não foram solucionados devido à curta duração do estágio. No entanto variações tão acentuadas em ensaios de repetibilidade são incompatíveis com o rigor que é exigido em controlo de qualidade deste tipo, pelo que enquanto não dominarmos este problema todos os resultados devem ser apenas utilizados como qualitativo e não quantitativos.

2- Introdução

2.1- Possível presença de Ocratoxina A em Rolhas de Cortiça

Portugal é o maior produtor mundial de cortiça, deste modo a produção de rolhas de cortiça ocupa um lugar de destaque na indústria transformadora e consequentemente na economia Portuguesa.

A diversidade microbiana associada à cortiça, ao longo de todo o processo de manufactura das rolhas, não é fácil de definir uma vez que em cada uma das etapas processuais as condições laborais são distintas, nomeadamente no que se refere à temperatura e humidade. Este factores fazem antever desde logo uma grande diversidade da microflora existente na cortiça em cada uma dessas etapas.

No período de maturação, longo período de repouso das pranchas de cortiça após a cozedura, os bolores cobrem totalmente as pranchas de cortiça. A importância do desenvolvimento microbiano sobre as pranchas de cortiça é controversa, havendo autores que consideram a actividade microbiana a grande responsável pelo aparecimento de fungos do género *Penicillium* e *Aspergillus*, produtores de micotoxinas como a Ocratoxina A.

As micotoxinas são produtos secundários do metabolismo dos fungos com propriedades toxicológicas para os humanos. Em particular a Ocratoxina A, composto resultante da contaminação fúngica, tem sido alvo de preocupação da indústria vitivinícola, por terem sido detectados teores (embora baixos) em vinhos provenientes das regiões do Sul da Europa (quente e húmida).

No caso de se confirmar a presença de Ocratoxina A em rolhas de cortiça após tratamento final, seria necessário averiguar a possibilidade de ocorrer migração desta micotoxina das rolhas de cortiça para os vinhos. A comprovação da presença de Ocratoxina A em vinhos por contaminação das rolhas de cortiça poderia ter impactes a vários níveis nomeadamente económico, em especial em Portugal, visto ser o maior produtor mundial de rolhas de cortiça. Assim é necessário clarificar quais os passos quer na indústria corticeira, quer da indústria vitivinícola, que podem estar na origem deste tipo de contaminação. É neste contexto que a Amorim & Irmão, S.A., a maior empresa mundial produtora de rolhas de cortiça e o seu laboratório de I&D tem interesse na clarificação da presença ou não de Ocratoxina A nas suas rolhas.

2.2- Contaminação por fungos na Indústria da Cortiça

A cortiça é um meio de elevada complexidade, o qual pode sustentar o desenvolvimento de uma grande variedade de populações de microrganismos. A visão da natureza da cortiça como um ecossistema microbiológico tem como base a própria estrutura e composição química da cortiça, assim como o método tradicionalmente utilizado na produção de rolhas de cortiça^[1].

O processo de produção de rolhas de cortiça tem início com o **descasque** (descortiçamento) do sobreiro que é feito de Maio até Agosto, de seguida as pranchas de cortiça ficam empilhadas na mata ou na fábrica durante no mínimo 6 semanas, para a sua **estabilização**.

As espécies mais frequentes após o descasque pertencem ao género *Penicillium*, foram também encontradas *Paecilomyces sp.* e *Endothiella gyroza*

[2] e ainda com uma frequência relativamente baixa, populações do género *Aspergillus*. Na fase em que as pranchas são empilhadas no campo, não foram verificadas grandes alterações relativamente à situação anterior, continua-se a verificar uma predominância de populações do género *Penicillium*. Quando empilhadas na fábrica há uma tendência para a diminuição da diversidade e uma alteração qualitativa acentuada das populações mais frequentes. As únicas que se mantêm do campo para a fábrica são as do género *Penicillium* [2]. Foram também detectados *Trycoderma viride*, *Monilla sitophila*, *Neurospora sitophila* e *Xylocladium sp.*

De seguida as pranchas são cozidas durante aproximadamente 60 minutos em água à temperatura de ebulação. Depois da **cozedura** há uma diminuição do número de populações mas um aumento da frequência de ocorrência das populações que se mantêm, o que significa que esta fase é caracterizada por uma microflora pouco diversificada mas com grande capacidade colonizadora [2]. Deste modo mantiveram-se da fase anterior *Trycoderma viride*, *Monilla sitophila*, *Neurospora sitophila* e *Xylocladium sp.*, *Penicillium sp.*.

Após a cozedura, as pranchas passam para a fase de estabilização pós-cozedura ou **maturação**, durante esta fase do processo, que dura 1 a 3 semanas, verifica-se um desenvolvimento microbiológico acentuado. Este desenvolvimento fungico na cortiça deve-se não só aos microrganismos que conseguiram "sobreviver" à cozedura (os que se encontram no interior dos poros) como também à recontaminação por ambiente fabril [3]. Quando a humidade da cortiça desce a níveis aceitáveis inicia-se o desenvolvimento de microrganismos que pode ir até ao aparecimento de extensas hifas de fungos. Esta observação funciona como indicador de que a cortiça atingiu um grau de humidade que permite a sua transformação mecânica [4]. Apesar das condições serem favoráveis ao rápido desenvolvimento de microrganismos, não são detectadas novas espécies, relativamente à fase de cozedura.

Após a maturação, a prancha de cortiça toma forma de rolha, passando para isso pelos processos de **traçado**, **rabanear**, **brocagem** e **rectificação**, as rolhas ficam então prontas para a **lavação**, **secagem** e **tratamento final**. A partir das rolhas lavadas e secas todas as unidades, salvos raras excepções, apresentam um reduzido número de $\text{UFC}_{\text{fúngicas}}/\text{g}_{\text{cortiça}}$.

No caso das cortiça granulada e das rolhas aglomeradas, observa-se um decréscimo acentuado de população microbiana, tal facto pode ser consequência da combinação de tratamentos químicos e mecânicos que foram conduzidos para a sua obtenção. Os microrganismos isolados na cortiça granulada e das rolhas aglomeradas foram a *Chrysonilia sitophila*, *Cladosporium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* (apenas nas rolhas aglomeradas), *P. citreonigrum*, *P. purpurogenum*, *Trichoderma longibrachiatum* e *T. viride*.

O nível mais baixo de contaminação microbiano foi observado nas rolhas onde foi efectuado o tratamento final com SO_2 nas quais foram apenas isolados *Cladosporium oxysporum*, *P. citreonigrum*, *Trichoderma longibrachiatum*.

De todas as espécies encontradas durante o processo de fabrico de rolhas as espécies *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*, permanecem em todas as etapas e

correspondem a fungos que foram identificados como potenciais produtores de Ocratoxina A. O facto de serem isolados em amostras de cortiça fungos que são considerados produtores de Ocratoxina A justifica a necessidade de se conhecer melhor a contaminação das rolhas de cortiça por esta micotoxina.

2.3- O que é a Ocratoxina A (OTA)

As micotoxinas podem permanecer nos alimentos mesmo após a eliminação dos fungos, muitas delas são mesmo resistentes aos processos industriais, como o caso do cozimento, por isso só a determinação dos níveis de toxinas no produto em questão pode garantir a qualidade deste.

Por outro lado, a presença de fungos em produtos alimentares não implica a contaminação por micotoxinas, visto que a sua produção só é verificada quando está reunido um conjunto de condições favoráveis no que respeita à temperatura, actividade da água, pH, potencial redox, tipo de substrato, crescimento competitivo ou associativo com outros microrganismos, etc.

As principais micotoxinas são as aflotoxinas, as fumonisinas; a zearaleona, os tricotecenos e as ocratoxinas^[5].

No caso das Ocratoxinas são produzidas predominantemente por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium viricum*, podendo também ser produzidas por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus sulphureus* e *Petromyces alliaceus*^[4], a Ocratoxina A especificamente é produzida por vários tipos de *Penicillium* e *Aspergillus*, nomeadamente o *Aspergillus ochraceus*

A ocratoxina A pertence a um grupo que possui oito tipos diferentes de metabolismos aos quais são genericamente denominados por ocratoxinas: ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina α, ocratoxina β, (4R)- e (4S)-4-Hidroxi-ocratoxina A, 4-Hidroxi-ocratoxina B, e ocratoxina C [5], sendo a ocratoxina A, a que assume maior importância^[6].

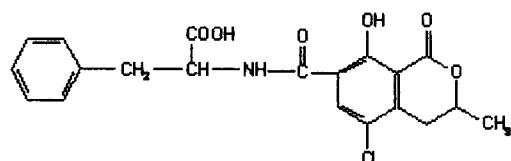


Figura 1- Estrutura química da Ocratoxina A

Destes compostos a Ocratoxina A é o mais tóxico, sendo classificada como potencialmente carcinogénica para humanos^[7], e frequente em milho, trigo, centeio, vinho, sumo, grãos de café^[5].

A Ocratoxina A (R)-N-[5-Cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benopiran-7-il]-L-fenilalanina)[5 a] é um cristal incolor cujas principais características físico-químicas são apresentadas em seguida^[5]:

- Formula empírica: C₂₀H₁₈O₆NCI
- Peso molecular (10): 403.8 (g/mol)
- Ponto de fusão: 94-96°C

- Solubilidade: é altamente solúvel em solventes orgânicos polares, moderadamente solúvel em solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio e francamente solúvel em água.

3- Material e Métodos

3.1- Reagentes e Equipamento

Utilizaram-se colunas de imunoafinidade Ochratest da Vicam, um multi-extractor de 12 entradas Whatman, uma bomba de vácuo D-70112 da KNF Neuberger. Os reagentes (padrão de OTA), e solventes foram obtidos através da Merk, Sigma-Aldrich e Pronalab. As referências do rotavapor, banho de arrefecimento e sistema de vácuo são respectivamente R-1140, B-480, B-1169 da Büchi. No que diz respeito à cromatografia utilizou-se: detector de flurescência da Merck- Hitachi F-1080, programador Auto Sampler L-7250, interface Merck- Hitachi D-7000, programa de aquisição de dados HPLC System Manager (HSM) com software versão 3.1 (Hitachi).

Com os reagentes e solventes prepararam-se padrões de OTA, assim como soluções necessárias ao procedimento experimental:

Preparação da fase móvel

Para a preparação de 1 L de fase móvel:

Misturar 495 ml de água destilada, 495 de acetonitrilo e 10 ml de ácido acético com a ajuda de um agitador magnético.

Filtrar a mistura por vácuo e desgaseificar com Hélio.

Solução de lavagem

Para 1 L de solução de lavagem:

Dissolver 25 g de cloreto de sódio e 5 g de hidrogenocarbonato de sódio em 950 ml de água destilada e perfazer até os 1000 ml com água destilada.

Solução de diluição (PEG)

Para 1 L de solução de diluição:

Dissolver 10 g de polietileno glicol e 50 g de hidrogenocarbonato de sódio em 950 ml de água e perfazer até os 1000 ml com água.

Preparação dos padrões para:

- Recta de Calibração

Partindo de uma solução mãe de 3,92 ppb em solução de Tolueno/ ácido acético (99:1) pipetamos o volume necessário à preparação de cada padrão da recta de calibração (0.2 ppb- 20 ppb) colocamos num balão volumétrico de 100 ml e perfazemos o volume com fase móvel.

- Adição a rolhas, ensaios de adsorsão (padrão de OTA 6ppb em solução etanólica)

Preparamos duas soluções etanólicas a 10 e 40%. Neste caso foi necessário preparar duas soluções - mãe, uma com 10% e outra com 40% de etanol, para tal pesamos o padrão de Ocratoxina A adquirido e dissolvemos em cada uma das soluções etanólicas em balões de 250 ml. Só depois pipetamos, dessas soluções-mãe, a quantidade necessária à preparação dos padrões de OTA.

3.2- Analise de OTA em rolhas de cortiça

3.2.1- Método de extracção

Nos ensaios para a determinação da Ocratoxina A em rolhas de cortiça foram usados 4 tipos de rolhas: *naturais extra*, *naturais de 2^a classe*, *aglomeradas* com granulado de 1-2 mm e *aglomeradas* com granulado de 3-7 mm.

Cada uma das rolhas foi pesada e colocada em frascos com 100 ml de solução etanólica a 10 e 40%, durante dois períodos de extracção, 10 dias e 40 dias. Apenas para a rolha *natural superior* foi realizado um estudo mais detalhado, o período de extracção variou entre 1 e 40 dias.

A percentagem de etanol de cada uma das duas soluções foi escolhida de modo a ser o mais próxima da que as rolhas estão em contacto, uma vez que as rolhas são maioritariamente usada para vinhos de mesa, baixo grau alcoólico (~12%) e para bebida espirituosas, de elevado grau de alcoólico (~40%).

De cada amostra, ao fim do tempo de extracção, retiramos a rolha e pipetamos 10 ml da solução, transferimos para um matraz ao qual adicionamos 10 ml de solução de diluição (PEG).

Antes de iniciarmos a extracção, abrimos a torneira da coluna de extracção até o respectivo nível de líquido baixar até meio desta.

Em seguida, transferimos 20 ml do filtrado para a seringa representada no esquema e com um leve movimento na peça de ligação enchemos a coluna de filtrado. Ligamos a bomba (pressão muito próxima de zero) e abrimos a torneira (1 gota por segundo). Esta etapa acaba quando o nível do líquido na coluna ficar a meio desta.

Após a passagem do filtrado, procedemos à lavagem da coluna: pipetamos 5 ml de solução de lavagem para a seringa e procedemos de forma exactamente igual à anterior e em seguida, 5 ml de água destilada (2 gotas por segundo). Para esta última deixamos secar a coluna aumentando um pouco a pressão. Refez-se a montagem substituindo os gobelés de recolha por balões periformes.

Pipetamos 2 ml de metanol para a seringa, ligamos a bomba e abrimos a torneira a um caudal de 1 gota por segundo.

Finalmente, evaporamos até à secura o extracto no rotavapor com pressão máxima de 800 mbar (rotação máxima) e banho a cerca de 60°C.

Quando terminada esta fase, adicionamos 1 ml de fase móvel agitamos no vórtex, transferimos para um vial e colocamos no congelador para posteriormente ser analisado no HPLC.

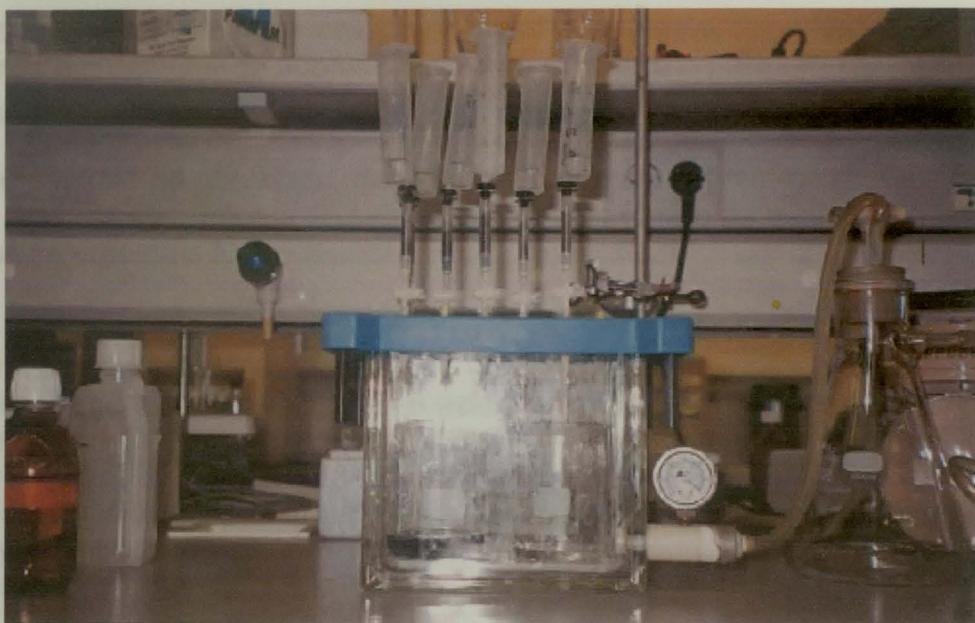


Figura 2- Instalação usada para a extracção.

3.2.2- Análise Cromatográfica

O procedimento foi o comum a análises deste tipo e que consistiu na injecção de padrões de diferentes concentrações e o respectivo traçado da recta de calibração. Esta recta permitiu-nos relacionar as áreas obtidas nos cromatogramas com as respectivas concentrações de OTA nas amostras.

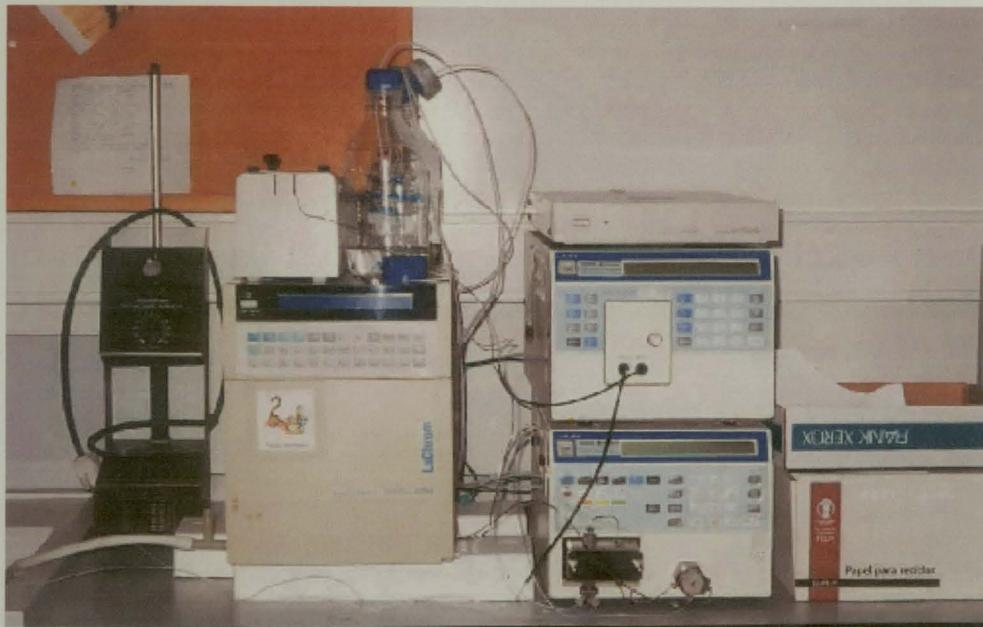


Figura 3- Equipamento de HPLC

Após descongelados os extractos, procedemos à análise cromatográfica.

A fase móvel utilizada na cromatografia era constituído por água destilada, acetonitrilo e ácido acético nas percentagens de 49.5; 49.5 e 1 %

respectivamente. O fluxo era de 1 ml/min. O tempo de análise era de 15 minutos e o detector de fluorescência estava regulado para um λ_{EM} de 470 nm e λ_{EX} de 330 nm.

Como controlo de qualidade, diariamente preparamos fase móvel e injectamos uma amostra de branco e de padrão de controlo (6 ppb da recta de calibração). Todas as amostras foram analisadas em duplicado.

3.3- Ensaios de adsorção em rolhas de cortiça

3.3.1- Método de extracção

Nestes segundos ensaios, para o estudo da adsorção de Ocratoxina A pelas rolhas de cortiça, as rolhas foram pesadas e colocadas em frascos com 100 ml com padrão de Ocratoxina A em solução etanólica a 10 e 40% com concentração de 6 ppb, durante 1 dia. Nestes ensaios, as rolhas do tipo *natural superior* também tiveram um estudo mais detalhado, variando o período de adsorção entre 1 minuto e 30 dias.

Depois do período de contacto entre a rolha e o padrão de OTA 6ppb em solução etanólica, retira-se a rolha do frasco e prosseguimos com o método de extracção por imunoafinidade descrito em 3.2.1.

3.3.2- Análise cromatográfica

Esta fase do trabalho segue o método descrito em 3.2.2.

4- Resultados e Discussão

O principal objectivo deste estágio foi efectuar a Implementação de metodologia analítica para a detecção de Ocratoxina A em rolhas de cortiça, uma vez que não existia metodologia adequada. Assim levantaram-se dois problemas principais: como extrair a Ocratoxina A das rolhas e qual o tempo necessário à extracção. Os ensaios foram realizados para 4 tipos de rolhas que diferem na porosidade, massa, superfície de contacto e tecnologia de fabrico, estes factos podem provocar variações na presença de OTA.

4.1- Análise de OTA em rolhas de cortiça

Inicialmente como não era conhecido o tempo necessário para efectuar completamente a dessorção de OTA das rolhas, foram colocadas rolhas de cortiça apenas do tipo natural superior em solução etanólica a 10 e 40% de 1 dia até 40 dias. Verificou-se que os extractos das rolhas, em ambas as soluções, apesar de sempre inferior ao limite de detecção (ver 4.2.2.- Limites Analíticos), apresentavam maior área de pico cromatográfico ao fim de 10 dias (Tabela 1).

Tabela 1- Resultados da presença de Ocratoxina A em rolhas de cortiça *natural superior* (nota – o limite de detecção, em área, é 19583).

Rolha de Cortiça Natural Superior		
Duração	Área do pico	
	10% etanol	40% etanol
1 dia	---	---
5 dias	---	6359
10 dias	1827	4519
15 dias	8628	---
20 dias	1086	---
40 dias	---	3730

Deste modo colocamos, de seguida os 4 tipos de rolhas em contacto com as soluções etanólicas durante 10 dias - **tempo de extracção**. Os resultados obtidos foram os apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Resultado da presença de Ocratoxina A em todas as rolhas de cortiça. (nota – o limite de detecção, em área, é 19583).

Tipo de rolha		Área do pico			
		10 % etanol		40 % etanol	
		10 dias	40 dias	10 dias	40 dias
Natural	superior	1827	---	4519	3730
	2ª classe	---	---	---	1838
Aglomeradas	1-2 mm	---	---	---	---
	3-7 mm	1396	---	---	3969.5

Para todas as rolhas, em todos os períodos de dessorção, não foi detectada a migração de OTA das rolhas para as soluções etanólicas. Podemos assim garantir que não existe o perigo de bebidas engarrafadas com rolhas de cortiça serem contaminadas com OTA eventualmente presente nestas.

Para avaliar a efectiva presença de OTA nas rolhas, seria desejável em trabalho futuro, estudar outros solventes de extracção, nomeadamente o tolueno, de forma a responder à questão: - a OTA não foi detectada porque não existe nas rolhas ou porque não foi extraída com as soluções etanólicas?

4.2- Validação do método de análise

4.2.1- Linearidade da resposta

A calibração do HPLC permite-nos relacionar a resposta deste com uma concentração ou quantidade conhecida. É com base na calibração que se pode aferir sobre a linearidade e os limiares analíticos.

A gama de trabalho já tinha sido previamente estudada e definida: 0.2 a 20 ppb, pelo que a linearidade foi avaliada para esta gama de concentrações. Assim procedeu-se:

- à prepararam-se padrões de concentração 0.2, 0.6, 2, 6, 12, 20 ppb;
- à medição do sinal dos padrões no equipamento, nas mesmas condições das amostras a analisar;
- à construção da recta de calibração que relaciona o sinal do equipamento com a concentração do padrão;

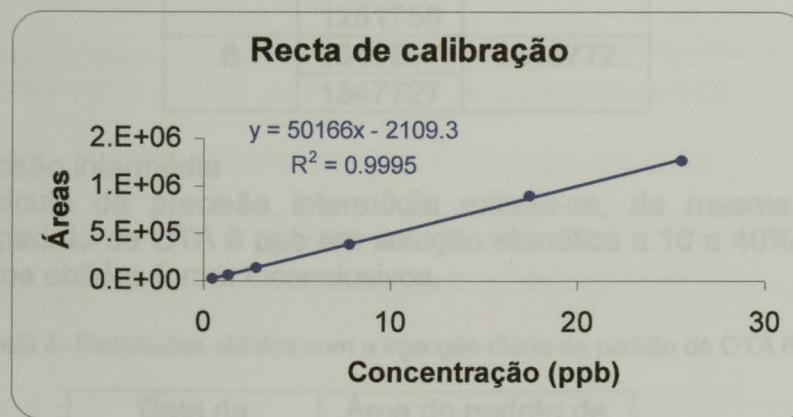


Figura 4: Recta de calibração

A recta de calibração obtida é descrita na figura 4, o coeficiente de correlação associado respeita a condição de linearidade - ser superior a 0.995. De acordo com os resultados obtidos a recta de calibração cumpre as exigências admitidas para métodos analíticos devidamente validados, pois o erro do declive é de 3.5%, o que é inferior a 5% e o intervalo de confiança para a ordenada na origem é [-25121.2; 20902.6], o que inclui a própria origem.

4.2.2- Limites Analíticos

Novamente com base na recta de calibração, calculou-se o limite de detecção para a cromatografia como sendo 0.086 ppb, que em área corresponde a 19583.

4.2.3- Precisão

➤ Repetibilidade

Uma vez que não foi detectada OTA nas rolhas analisadas, foi necessária a adição de OTA às amostras usadas para verificar a eficiência de extracção e também a repetibilidade; foi usada a amostra de padrão de OTA 6ppb em

solução etanólica a 10%, com período de adsorção de 12h à temperatura ambiente (Tabela 3).

Com estes valores calculamos a média, desvio padrão e o coeficiente de variação. Desprezando o valor obtido para a amostra 4, que difere muito dos restantes provavelmente devido a erro experimental, obtemos um coeficiente de variação de 4% para a concentração de 6ppb.

Tabela 3- Resultados dos ensaios para o cálculo da repetibilidade

Amostra	Área	Área média
1	1349626	1310907
	1272188	
2	1280591	1280273
	1279954	
3	1374849	1376672
	1378495	
4	857209	851103
	844997	
5	1245053	1248405
	1251756	
6	1349817	1348772
	1347727	

➤ Precisão intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia extraiu-se, da mesma forma das amostras, padrão de OTA 6 ppb em solução etanólica a 10 e 40%, no entanto os resultados obtidos foram inconclusivos.

Tabela 4- Resultados obtidos com a injeção diária de padrão de OTA 6 ppb.

Data da injeção	Área do padrão de 6ppb
21/Outubro	383850.5
22/Outubro	378907
25/Outubro	389353.5
26/Outubro	397883
11/Novembro	407736
12/Novembro	405395
15/Novembro	415438.5
16/Novembro	433328.5
17/Novembro	418966
22/Novembro	422526.5
23/Novembro	423507.5
24/Novembro	435983
26/Novembro	465506
2/Dezembro	418728
3/Dezembro	428639.5
6/Dezembro	445268
9/Dezembro	420793
10/Dezembro	429510.5

13/Dezembro	428668
14/Dezembro	430196.5
15/Dezembro	428900.5
17/Dezembro	425798
20/Dezembro	430052

Diariamente era injectado um padrão de controlo de 6ppb, pertencente à recta de calibração (Tabela 4), este sim permite-nos ter ideia da precisão intermédia, para os 22 ensaios, verificou-se um coeficiente de variação de 4,7%. Com estes resultados construímos um acarta de controlo diário (Apêndice A).

4.2.4- Exactidão

Para avaliar as possíveis interferências que pudesse comprometer a exactidão do método de detecção da OTA, recorreu-se a amostras de rolha com adição de padrão. Uma vez que não foi detectada OTA nas rolhas de cortiça e é conhecida a resposta do HPLC para o padrão de 6ppb, pode-se prever a resposta que o mesmo HPLC deveria dar para cada uma das amostras. A recuperação é calculada com base nesse valor teórico previsto e no valor que foi realmente obtido.

Para as recuperações foi usada novamente a amostra de padrão de OTA 6 ppb em solução etanólica a 10%, com período de adsorção de 12h.

Tabela 5- Resultados obtidos na avaliação da exactidão

Amostra	Área	Área média	Área padrão 6ppb	Recuperação %
1	1349626	1310907	260846.5	100.5
	1272188			
2	1280591	1280273	260846.5	98.2
	1279954			
3	1374849	1376672	260846.5	105.6
	1378495			
4	857209	851103	260846.5	65.3
	844997			
5	1245053	1248405	260846.5	95.7
	1251756			
6	1349817	1348772	260846.5	103.4
	1347727			

Se desprezarmos novamente o valor da amostra 4 verificamos que as recuperações obtidas estão bastante próximas dos 100%, no entanto estes valores podem apenas ser coincidência uma vez que quando calculadas as recuperações para os padrões de OTA 6 ppb em solução etanólica a 10 e 40% as recuperações rondavam os 10% (4.2.3- Precisão Intermédia). Assim os resultados relativos à exactidão são inconclusivos, e seria necessário mais tempo para encontrar a origem do problema que conduz a tão baixos valores de recuperação e tal discrepancia de resultados.

4.2.5- Análise de Incertezas

A avaliação das incertezas não foi feita neste trabalho, no entanto é importante determinar as várias contribuições das fontes de erro consideradas significativas como as associadas à preparação dos padrões, à recta de calibração, à precisão e à exactidão. Esta análise deverá ser feita em trabalho futuro uma vez que é importante para a validação do método e só não foi efectuada por escassez de tempo.

4.3- Adsorção de OTA em rolhas de cortiça

Inicialmente a adsorção só foi estudada em rolhas do tipo natural superior, uma vez que não conhecíamos a adsorção de OTA pela cortiça ao longo do tempo. No entanto os resultados que obtivemos, em Outubro apenas com uma parte das amostras prontas para análise, não foram conclusivos. Assim decidimos repetir as extrações e posterior análise em HPLC por mais duas vez. Mas os resultados obtidos continuam a ser inconclusivos pois não há uma tendência certa para a adsorção da OTA por parte da rolha, quer para os ensaios com solução etanólica de 10% quer para os de 40%. Verificamos que as recuperações não variam muito com o tempo de contacto entre a rolha e a solução, mas sim de período para período de análise. Tratando-se da mesma amostra os resultados de Outubro, Novembro e Dezembro deveriam ser idênticos, como não o são não podemos afirmar qual eles é o correcto!

Tabela 6- Resultados de adsorção de OTA em rolhas de cortiça natural superior obtidos para padrão de 6ppb em solução etanólica a 10%.

Duração	Áreas em Outubro			Áreas em Novembro			Áreas em Dezembro		
	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup
1 min	1107674.5	258303	85.77	231516.0	253412.5	18.27	966105.5	268692	71.91
12 h	1396792.0	258303	108.15	-	253412.5	-	-	268692	-
1 dia	1171983.5	258303	90.74	1430068.5	253412.5	112.86	503507.0	268692	37.48
2 dias	1176965.0	258303	91.13	883011.0	253412.5	69.69	455179.0	268692	33.88
6 dias	312926.5	268834	23.28	1320546.5	253412.5	104.22	453440.5	268692	33.75
15 dias	-	-	-	330613.0	253412.5	26.09	515111.0	268692	38.34
20 dias	-	-	-	1161543.0	253412.5	91.67	455437.0	268692	33.90
30 dias	-	-	-	-	-	-	1096723.5	268692	81.63

Tabela 7- Resultados de adsorção de OTA em rolhas de cortiça natural superior obtidos para padrão de 6ppb em solução etanólica a 40%.

Duração	Áreas em Outubro			Áreas em Novembro			Áreas em Dezembro		
	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup	Amostra	Padrão _{6 ppb}	% Recup
1 min	636319	214792	59.25	479228	217251.5	44.12	309260.0	222524	27.80
12 h	647969	214792	60.33	642568	217251.5	59.15	239321	222524	21.51
1 dia	809559	214792	75.38	126326	217251.5	11.63	22710.0	222524	2.04
2 dias	799038	214792	74.40	437364	217251.5	40.26	27040.0	222524	2.43
6 dias	448953.5	218935.5	41.01	462752	217251.5	42.60	40086.0	222524	3.60
15 dias	-	-	-	80382.5	217251.5	7.40	124494.0	222524	11.19
20 dias	-	-	-	140041	217251.5	12.89	111645.0	222524	10.03
30 dias	-	-	-	-	-	-	818205.0	222524	73.54

Uma vez que, pelo resultados obtidos, a adsorção é indiferente ao tempo de contacto entre a rolha e a solução decidiu-se testar a adsorção agora com todos os tipos de rolhas durante um dia.

Mais uma vez os resultados não foram conclusivos e aparentemente as recuperações obtidas não fazem sentido. Tais resultados são inconclusivos, pois uma vez que não conseguimos obter valor plausíveis para as recuperações apenas dos padrões agora não podemos afirmar que estas baixas percentagens de recuperação se devem à adsorção da cortiça, ou a problemas experimental ainda não detectados.

Tabela 8- Resultados de adsorção de OTA em todas as rolhas de cortiça, obtidos para padrão de 6ppb em solução etanólica a 10 e 40%.

Tipo de rolha		Área do pico					
		10% etanol			40% etanol		
		Amostra	Padrão 6ppb	Recuperação (%)	Amostra	Padrão 6ppb	Recuperação (%)
Natural	superior	503507	268692	37.48	22710	222524	2.04
	2ª classe	142639.3	268692	10.62	281506.8	222524	25.30
Aglomeradas	1-2 mm	151191	268692	11.25	238021.5	222524	21.39
	3-7 mm	281176.3	268692	20.93	353201.3	222524	31.75

4.4- Análise da matéria-prima

Apesar de não ser detectada OTA nas rolhas de cortiça analisada, esta poderia existir inicialmente nas pranchas de cortiça e ser degradada ao longo do processo de fabrico, deste modo foram analisadas, pelo mesmo método usado nas rolhas, pranchas de cortiça.

Esta amostragem ao longo das várias etapas de transformação para permitir, no caso de ser detectada Ocratoxina A, aferir em que etapas é que a produção se processa e se existe algum procedimento no tratamento da cortiça capaz de eliminar esta toxina

As pranchas foram todas colocadas em solução etanólica a 10 e 40% durante 10 dias, mas uma vez não foi detectada a presença de Ocratoxina A.

Tabela 9- Resultados da presença de OTA para pranchas de cortiça em solução etanólica a 10 e 40%.

Tipo de prancha		Área do pico	
		10%	40%
Crua	Com barriga e com costa	---	---
	Sem barriga e sem costa	---	---
Cozida após 24h de mudada	Com barriga e com costa	---	---
	Sem barriga e sem costa	---	---
Cozida após 48h de mudada	Com barriga e com costa	---	---
	Sem barriga e sem costa	---	---

4.5- Análise das águas de cozedura

Como a matéria prima fornecida, pranchas de cortiça, não se encontrava toda crua, foram também analisadas as águas de cozedura das mesmas. As águas de cozedura de 24 e 48 horas depois de ser mudada foram extraídas por imunoafinidade e de seguida analisadas por HPLC.

Tabela 10- Resultados obtidos com a análise das águas de cozedura

Água de cozedura	Área do pico
Após 24 horas de mudada	4051.5
Após 48 horas de mudada	1481.0

Verificamos que em nenhuma das amostras foi detectada a presença de Ocratoxina A.

5- Conclusões

O principal objectivo deste estágio que era a implementação de metodologia analítica para a detecção de Ocratoxina A em rolhas de cortiça foi totalmente cumprido uma vez que foi desenvolvido, implementado e validado um novo método para rolhas.

No que respeita à validação do método era necessário mais tempo para que todos os parâmetros fossem avaliados, assim ficará para um trabalho futuro a análise de incertezas assim como a resolução de alguns problemas relacionados com os resultados da repetibilidade e precisão intermédia.

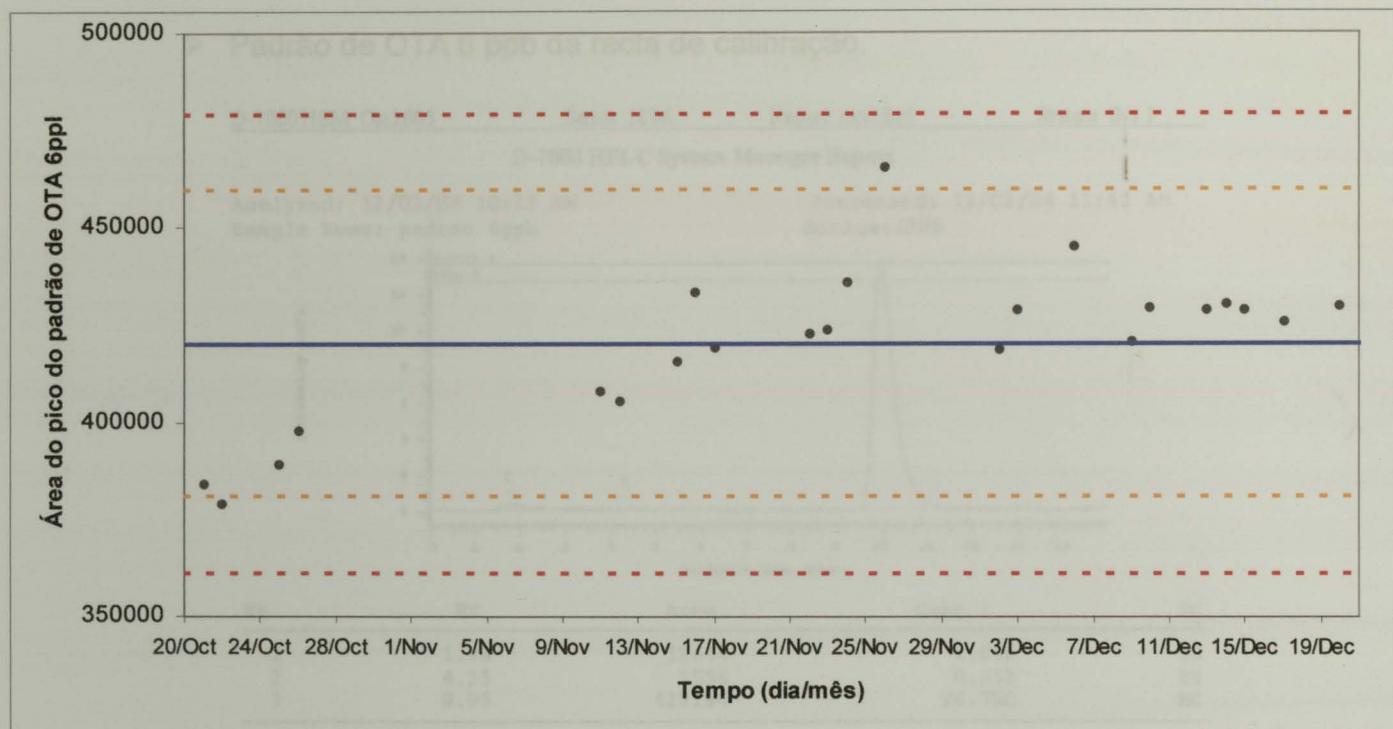
De todas as rolhas e pranchas de cortiça assim como nas águas de cozedura não foi detectada a presença de Ocratoxina A em nenhuma. Uma vez que as rolhas e as pranchas de cortiça são provenientes das várias etapas do processo de transformação da cortiça podemos concluir que apesar de serem identificados fungos, pertencentes ao género *Penicillium* e *Aspergillus*-potencialmente produtores de Ocratoxina A, ao longo de todo o processo esta toxina não é produzida. Ou então é produzida em quantidades tão pequenas que não são detectadas pelos métodos usados.

No que diz respeito aos ensaios realizados para o estudo da possível adsorção da OTA pela cortiça, são inconclusivos.

Referências

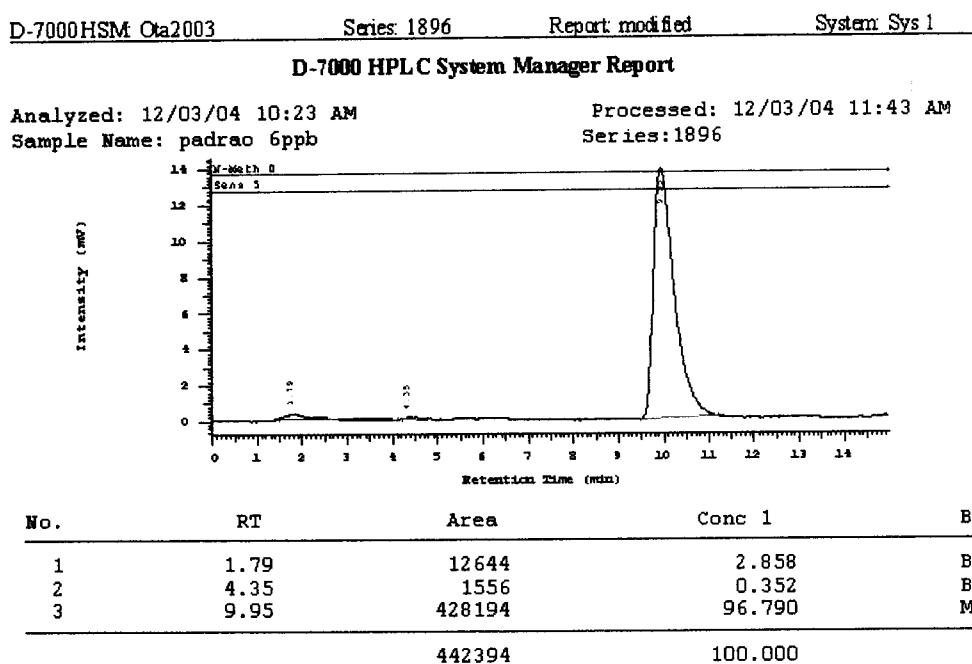
- [1] - Coque, Juan José; Larriba, Germán; Alvarez, María Luisa; *Cork taint of wines: A microbiological problem with a biotechnological solution?*; Microrganisms for Health Care, Food, and Enzyme Production; 2002.
- [2] - Bragança, Maria; Santos, Maria; Lopes, Raquel; Contribuição para a caracterização da microflora da cortiça desde o descortiçamento à cura; E.F.N; 1993.
- [3]- Pereira, C.; Pire, A.; Boas, L.; Marques, J. J; Romão, MV; Role of Chrysonilia sitophila in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles; Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology; Vol. 24; p.256-261; 2000.
- [4]- Quercus, CTCOR; Apresentação em Portugal; Maio 1997.
- [5] - Pereira, Luís João Abrunhosa; *Isolamento de fungos filamentosos e produção de micotoxinas em uvas* - Dissertação para Mestrado em Biotecnologia/Engenharia de Bioprocessos; Escola de Engenharia da Universidade do Minho; Departamento de Engenharia Biológica; 2001.
- [6] - Lima, Nelson; Venâncio, Armando; Santos, Isabel M.; *Fungos Contaminantes na Indústria Alimentar*; Micoteca da Universidade do Minho; Centro de Engenharia Biológica; Braga; 1998.

Apêndice A- Carta de Controlo



Apêndice B- Cromatogramas

- Padrão de OTA 6 ppb da recta de calibração.

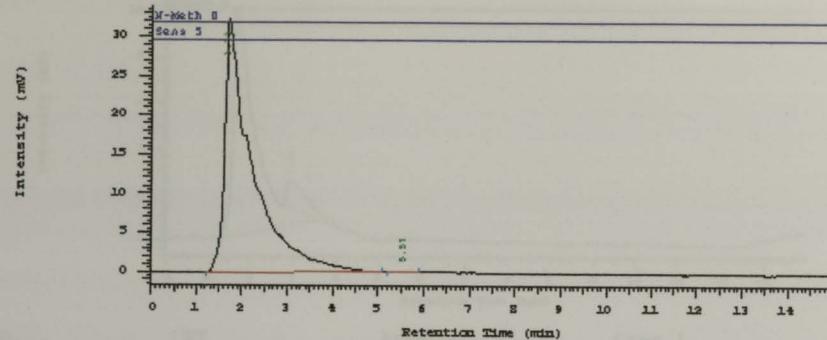


- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 1 dia.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1843 Report: modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 01:54 PM Processed: 11/22/04 03:08 PM
 Sample Name: amostra Aa 1 dia Series: 1843

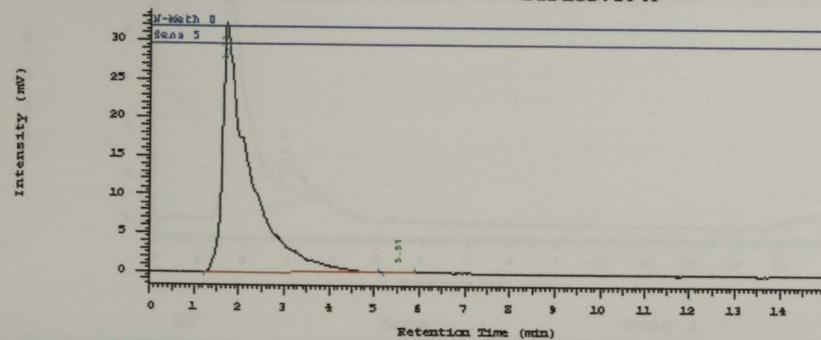


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	1324864	99.860	BB
2	5.57	1853	0.140	BB
1326717				100.000

D-7000HSM Ota2003 Series: 1843 Report: modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 01:54 PM Processed: 11/22/04 03:08 PM
 Sample Name: amostra Aa 1 dia Series: 1843



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	1324864	99.860	BB
2	5.57	1853	0.140	BB
1326717				100.000

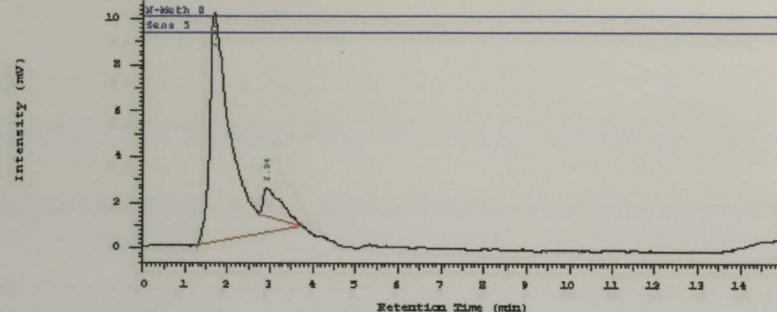
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 5 dias.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1844 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 02:25 PM
 Sample Name: amostra Aa 5 dias

Processed: 11/22/04 03:10 PM
 Series: 1844



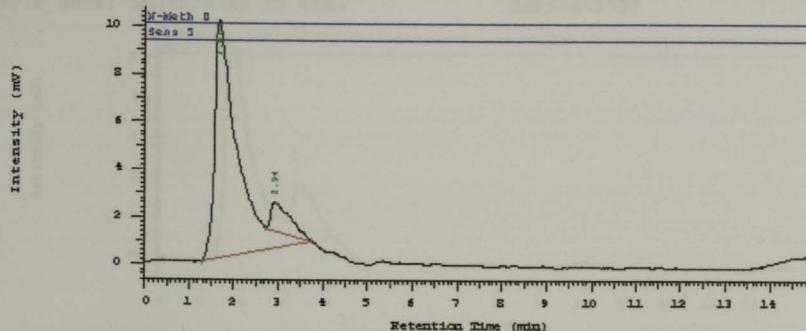
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	348005	90.995	BV
2	2.94	34438	9.005	TBB
		382443	100.000	

D-7000HSM Ota2003 Series: 1844 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 02:25 PM
 Sample Name: amostra Aa 5 dias

Processed: 11/22/04 03:10 PM
 Series: 1844



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	348005	90.995	BV
2	2.94	34438	9.005	TBB
		382443	100.000	

- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000HSM Ota2003

Series: 1852

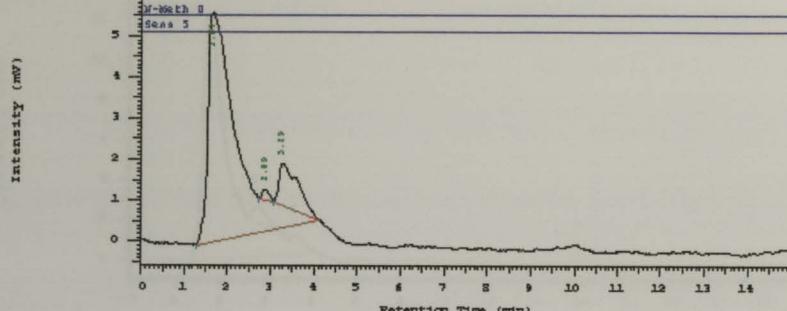
Report: modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/23/04 11:57 AM
 Sample Name: amostra Aa 10 dias

Processed: 11/23/04 12:15 PM
 Series: 1852



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	257747	88.029	BV
2	2.89	2997	1.024	TBB
3	3.29	32052	10.947	TBB
			292796	100.000

D-7000HSM Ota2003

Series: 1852

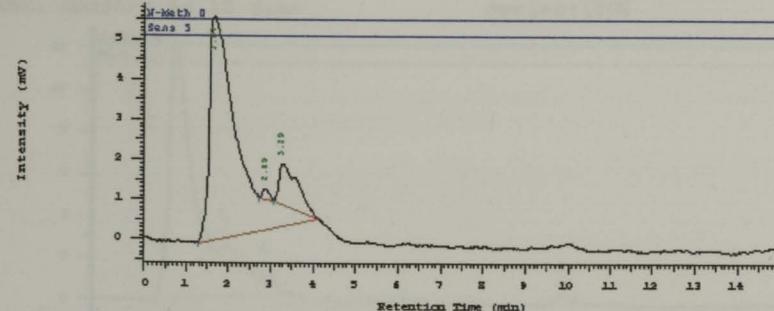
Report: modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/23/04 11:57 AM
 Sample Name: amostra Aa 10 dias

Processed: 11/23/04 12:15 PM
 Series: 1852



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	257747	88.029	BV
2	2.89	2997	1.024	TBB
3	3.29	32052	10.947	TBB
			292796	100.000

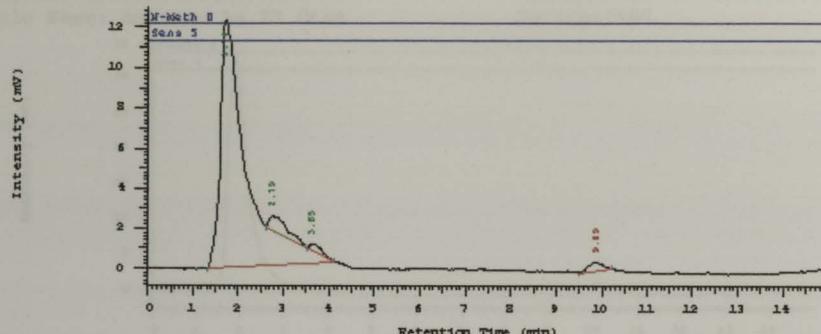
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 15 dias.

D-7000HSM: Ota2003

Series: 1898

Report: modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/03/04 11:26 AM
Sample Name: amostra Aa 15 diasProcessed: 12/03/04 11:46 AM
Series: 1898

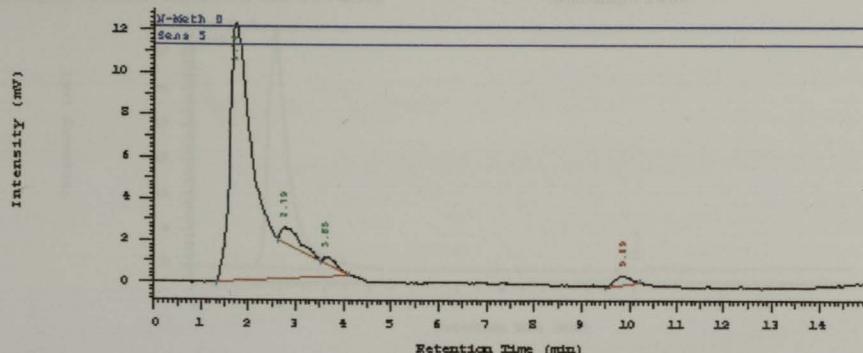
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.74	488113	92.898	BV
2	2.79	21606	4.112	TBB
3	3.65	6124	1.166	TBB
4	9.89	9583	1.824	MC

D-7000HSM: Ota2003

Series: 1898

Report: modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/03/04 11:26 AM
Sample Name: amostra Aa 15 diasProcessed: 12/03/04 11:46 AM
Series: 1898

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.74	488113	92.898	BV
2	2.79	21606	4.112	TBB
3	3.65	6124	1.166	TBB
4	9.89	9583	1.824	MC

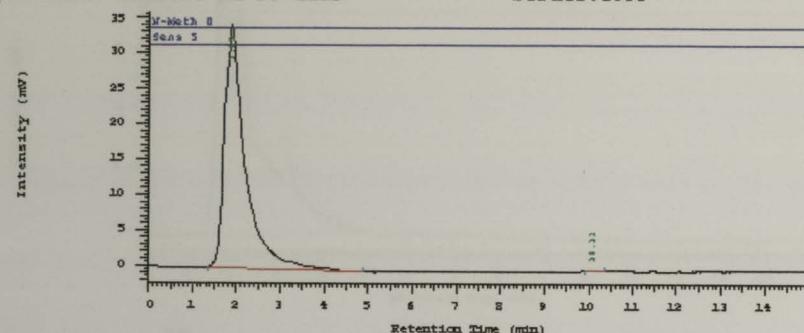
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 20 dias.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1899 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 11:58 AM
 Sample Name: amostra Aa 20 dias

Processed: 12/03/04 12:18 PM
 Series: 1899



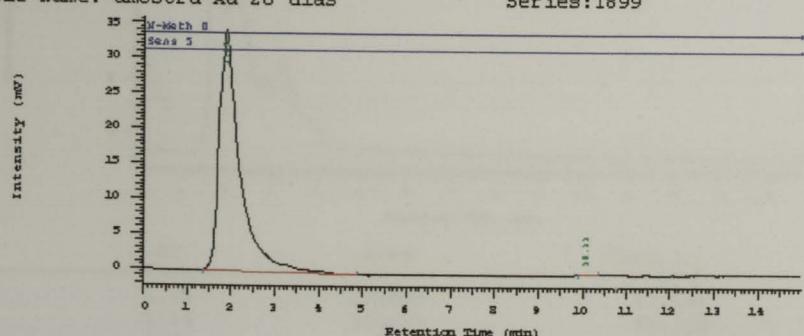
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.89	1110200	99.902	BB
2	10.11	1086	0.098	BB
1111286			100.000	

D-7000HSM Ota2003 Series: 1899 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 11:58 AM
 Sample Name: amostra Aa 20 dias

Processed: 12/03/04 12:18 PM
 Series: 1899



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.89	1110200	99.902	BB
2	10.11	1086	0.098	BB
1111286			100.000	

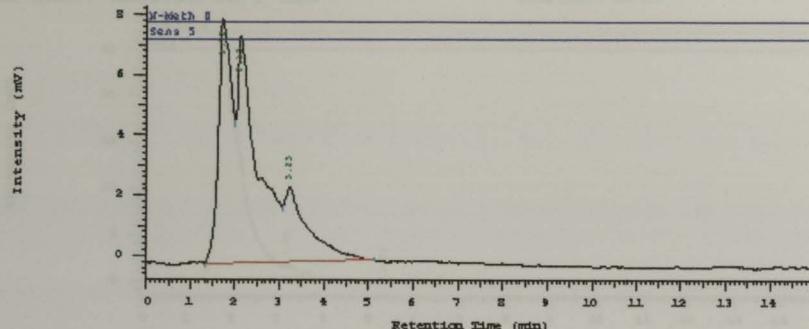
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 10% durante 40 dias.

D-7000 HSM Ota2003

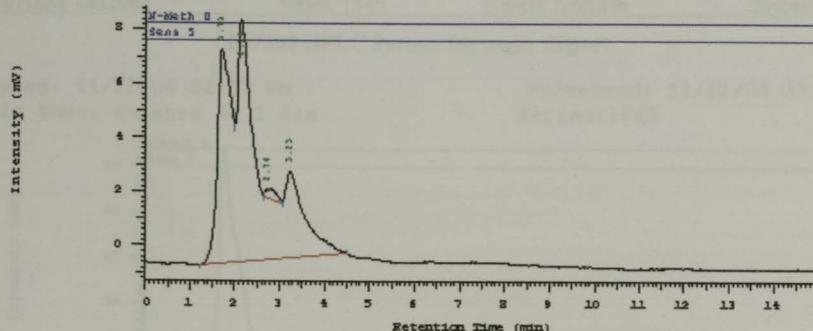
Series: 1981

Report original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 05:26 PM
Sample Name: amostra Aa 40 diasProcessed: 12/15/04 05:41 PM
Series: 1981

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.72	166232	33.692	BV
2	2.13	232763	47.177	VV
3	3.23	94386	19.131	VB
493381				100.000

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 05:42 PM
Sample Name: amostra Aa 40 diasProcessed: 12/15/04 05:57 PM
Series: 1981

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	171492	31.648	BV
2	2.14	260833	48.135	VV
3	2.74	5373	0.992	TBB
4	3.23	104178	19.225	VB

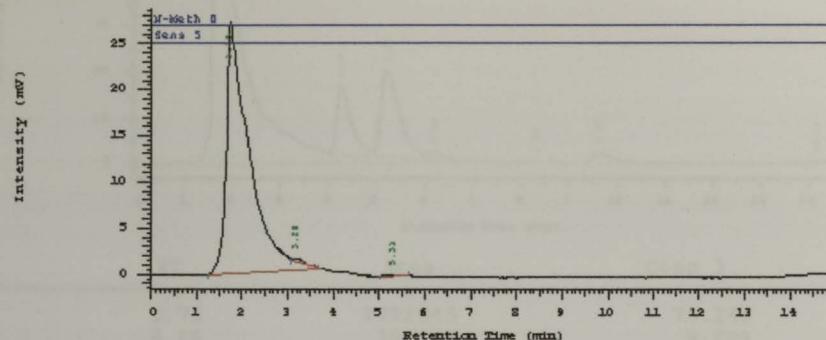
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 1 dia.

D-7000HSM: Ota2003 Series: 1845 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 02:57 PM
 Sample Name: amostra Ba 1 dia

Processed: 11/22/04 03:15 PM
 Series: 1845



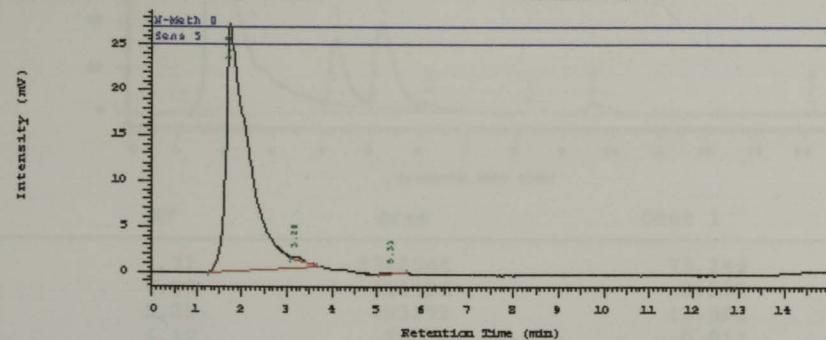
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	949520	99.192	BV
2	3.20	4618	0.482	TBB
3	5.31	3120	0.326	BB
				957258
				100.000

D-7000HSM: Ota2003 Series: 1845 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/22/04 02:57 PM
 Sample Name: amostra Ba 1 dia

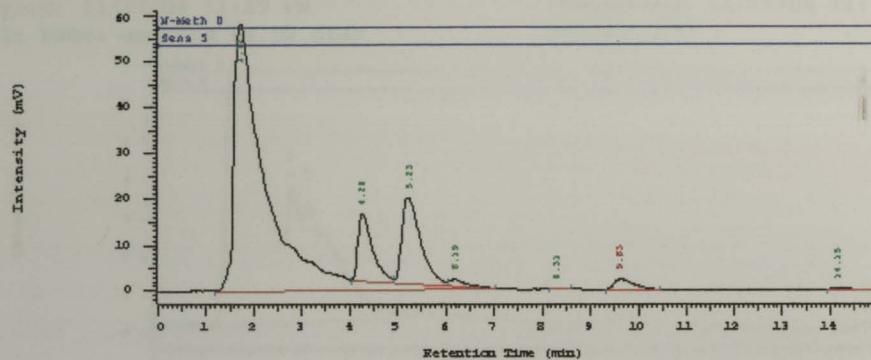
Processed: 11/22/04 03:15 PM
 Series: 1845



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	949520	99.192	BV
2	3.20	4618	0.482	TBB
3	5.31	3120	0.326	BB
				957258
				100.000

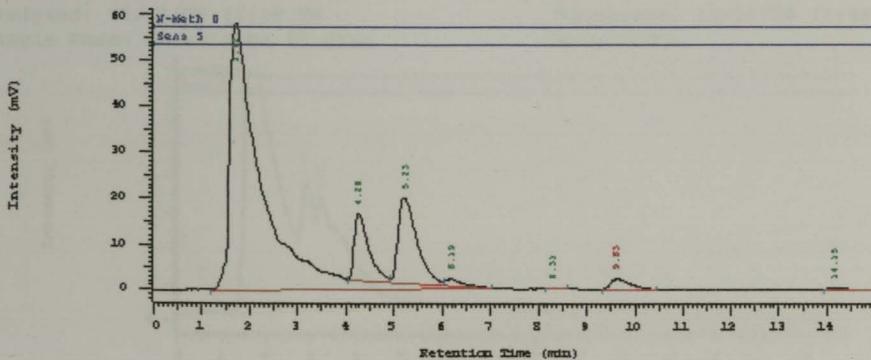
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 5 dias.

Sample Name: amostra Ba 5 dias Series:1846



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.72	2732945	75.249	BV
2	4.28	301185	8.293	TBV
3	5.23	493272	13.582	TVV
4	6.19	33078	0.911	TVB
5	8.31	2909	0.080	BB
6	9.63	60833	1.675	MC
7	14.15	7653	0.211	BB
			3631875	100.000

Sample Name: amostra Ba 5 dias Series:1846



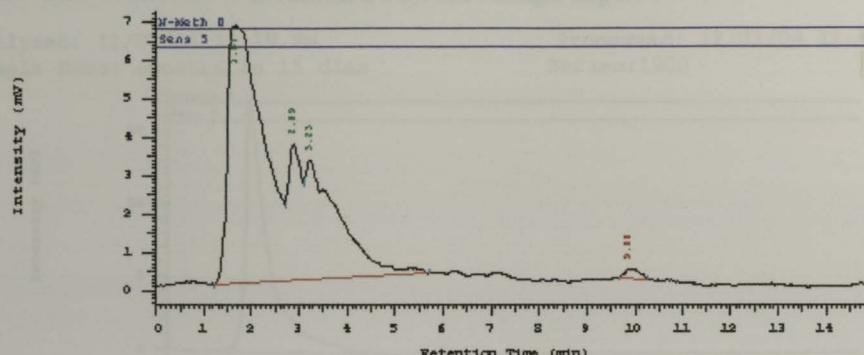
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.72	2732945	75.249	BV
2	4.28	301185	8.293	TBV
3	5.23	493272	13.582	TVV
4	6.19	33078	0.911	TVB
5	8.31	2909	0.080	BB
6	9.63	60833	1.675	MC
7	14.15	7653	0.211	BB
			3631875	100.000

- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/23/04 12:29 PM
 Sample Name: amostra Ba 10 dias

Processed: 11/23/04 12:48 PM
 Series: 1853



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	342487	60.011	BV
2	2.89	66892	11.721	VV
3	3.23	156587	27.438	VB
4	9.88	4737	0.830	MC

D-7000HSM Ota2003

Series: 1853

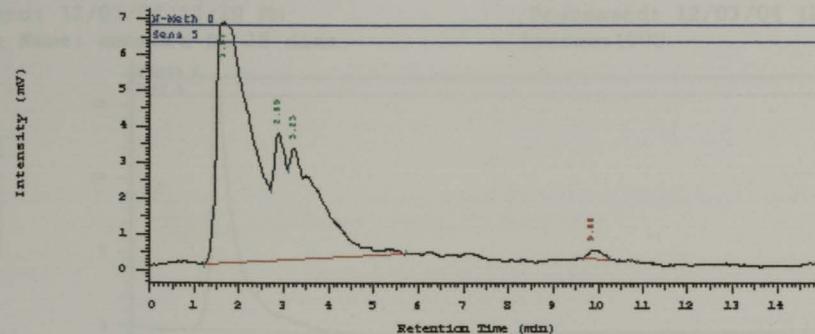
Report modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 11/23/04 12:29 PM
 Sample Name: amostra Ba 10 dias

Processed: 11/23/04 12:48 PM
 Series: 1853



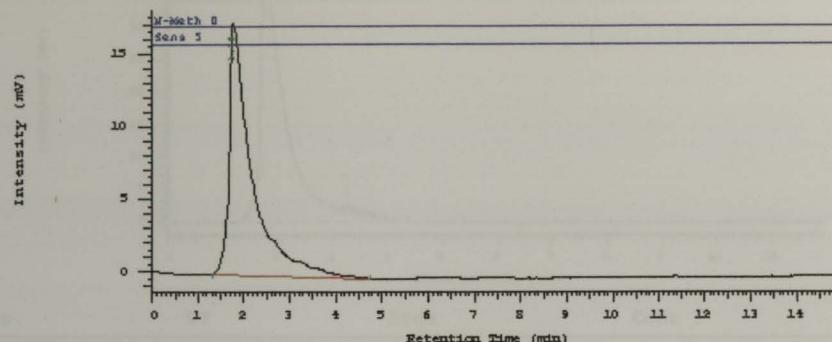
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.67	342487	60.011	BV
2	2.89	66892	11.721	VV
3	3.23	156587	27.438	VB
4	9.88	4737	0.830	MC

- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 15 dias.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1900 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 12:29 PM Processed: 12/03/04 12:47 PM
 Sample Name: amostra Ba 15 dias Series: 1900

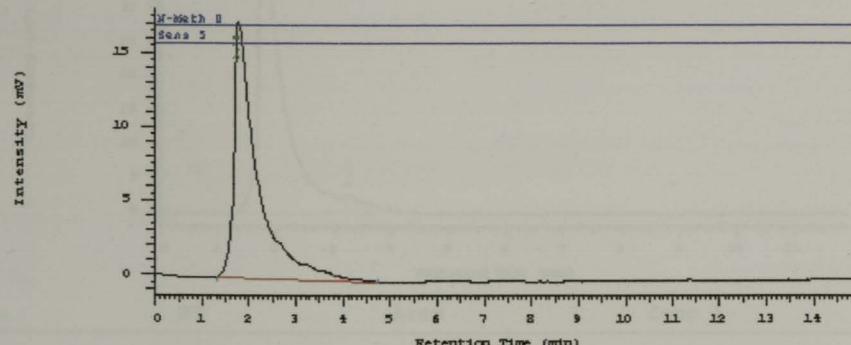


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.78	585667	100.000	BB
		585667	100.000	

D-7000HSM Ota2003 Series: 1900 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 12:29 PM Processed: 12/03/04 12:47 PM
 Sample Name: amostra Ba 15 dias Series: 1900



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.78	585667	100.000	BB
		585667	100.000	

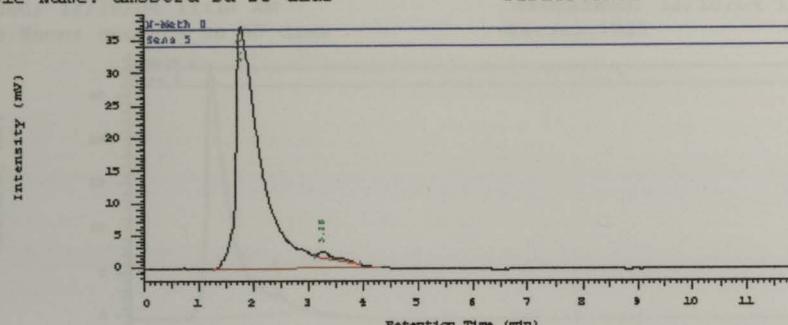
- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 20 dias.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1901 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 01:01 PM
 Sample Name: amostra Ba 20 dias

Processed: 12/03/04 04:07 PM
 Series: 1901



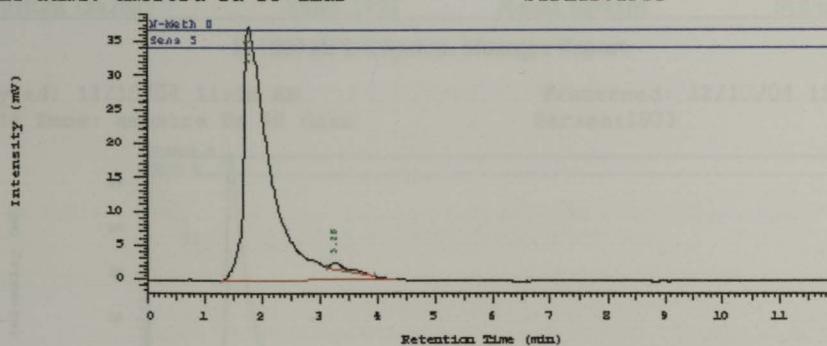
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	1214034	98.578	BV
2	3.26	17515	1.422	TBB
1231549				100.000

D-7000HSM Ota2003 Series: 1901 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/03/04 01:01 PM
 Sample Name: amostra Ba 20 dias

Processed: 12/03/04 04:07 PM
 Series: 1901



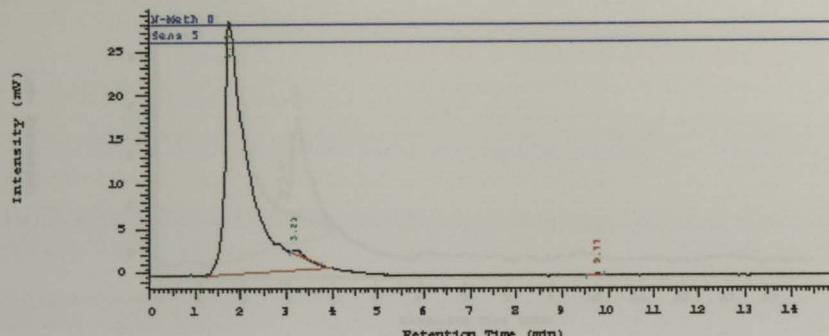
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	1214034	98.578	BV
2	3.26	17515	1.422	TBB
1231549				100.000

- Rolha de cortiça natural superior em solução etanólica a 40% durante 40 dias.

D-7000HSM Ota2003 Series: 1933 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/10/04 11:18 AM Processed: 12/10/04 11:58 AM
 Sample Name: amostra Ba 40 dias Series: 1933

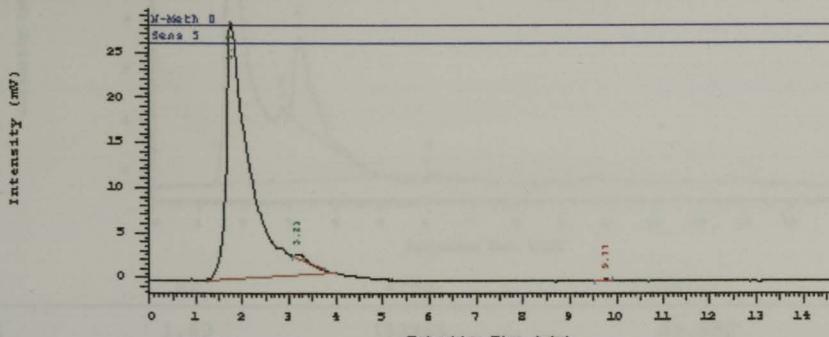


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	994526	98.955	BV
2	3.21	9387	0.934	TBB
3	9.77	1117	0.111	MC
		1005030	100.000	

D-7000HSM Ota2003 Series: 1933 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/10/04 11:18 AM Processed: 12/10/04 11:58 AM
 Sample Name: amostra Ba 40 dias Series: 1933



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	994526	98.955	BV
2	3.21	9387	0.934	TBB
3	9.77	1117	0.111	MC
		1005030	100.000	

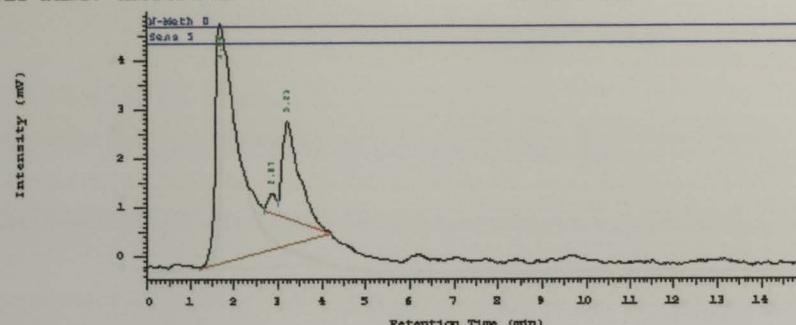
- Rolha de cortiça natural 2^a classe em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000HSM Ota2003

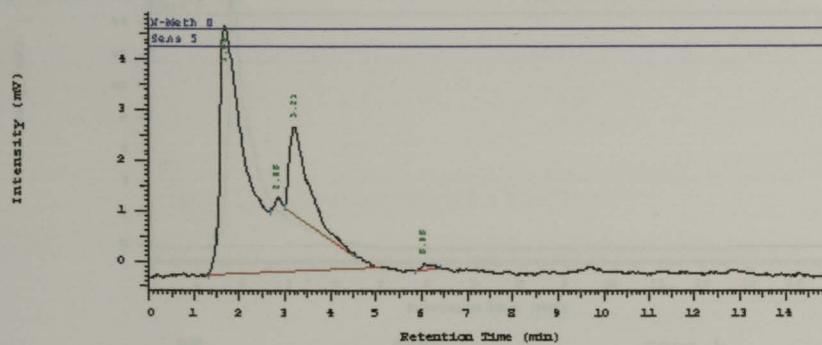
Series: 2019

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/17/04 02:41 PM
Sample Name: amostra AbProcessed: 12/17/04 02:56 PM
Series: 2019

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.68	210786	78.745	BV
2	2.87	4895	1.829	TBV
3	3.21	52001	19.426	TVB
		267682	100.000	

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/17/04 02:57 PM
Sample Name: amostra AbProcessed: 12/17/04 03:12 PM
Series: 2019

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.69	183361	55.550	BV
2	2.86	96183	29.139	VV
3	3.21	48471	14.685	TBB
4	6.06	2067	0.626	BB

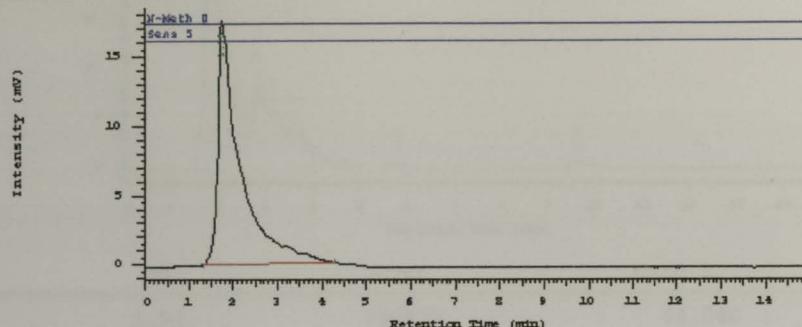
- Rolha de cortiça natural 2^a classe em solução etanólica a 10% durante 40 dias.

D-7000HSM Ota2003

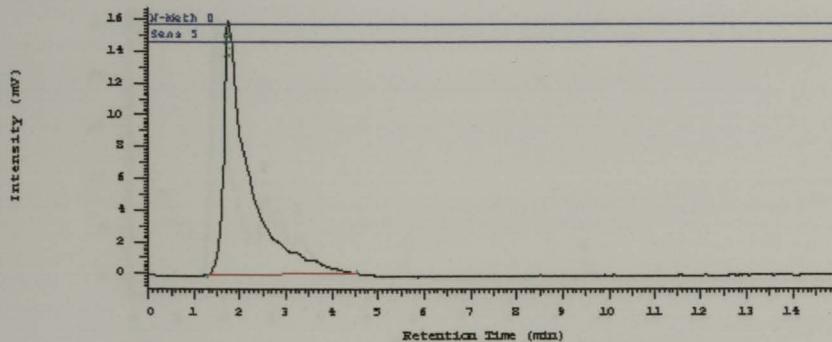
Series: 1982

Report: original

System: Sys 1

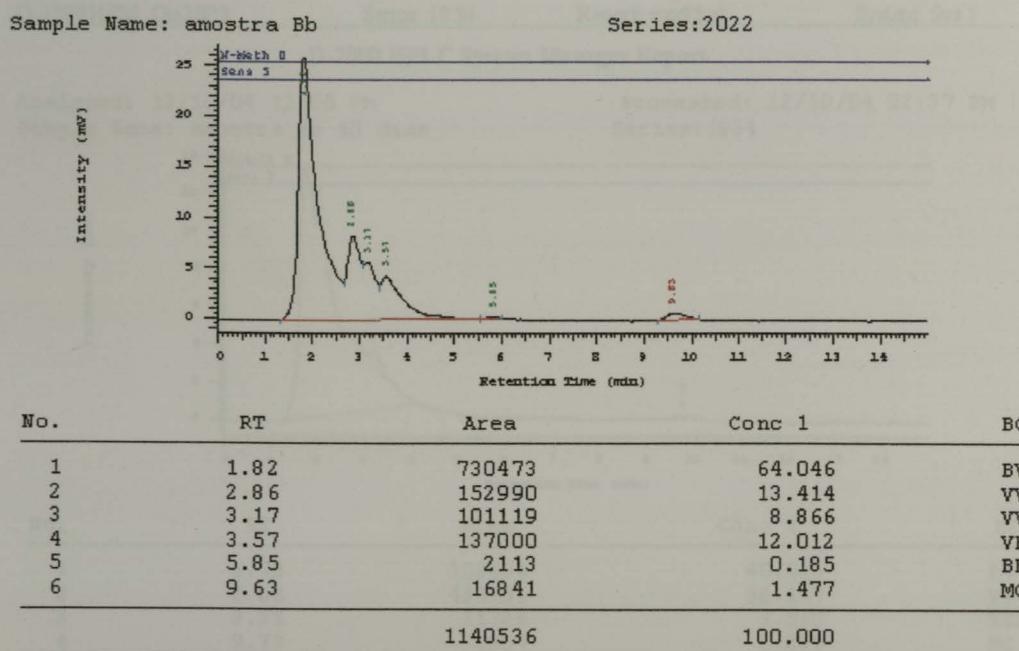
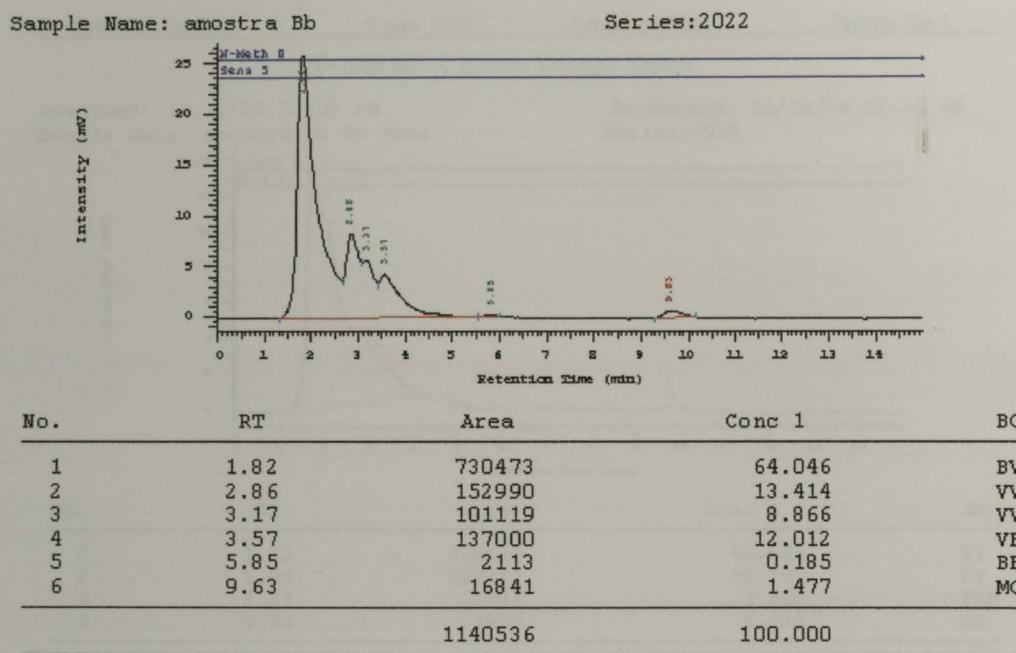
D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 05:58 PM
Sample Name: amostra Ab 40 diasProcessed: 12/15/04 06:13 PM
Series: 1982

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	605597	100.000	BB
		605597	100.000	

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 06:14 PM
Sample Name: amostra Ab 40 diasProcessed: 12/15/04 06:29 PM
Series: 1982

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	593255	100.000	BB
		593255	100.000	

- Rolha de cortiça natural 2^a classe em solução etanólica a 40% durante 10 dias.



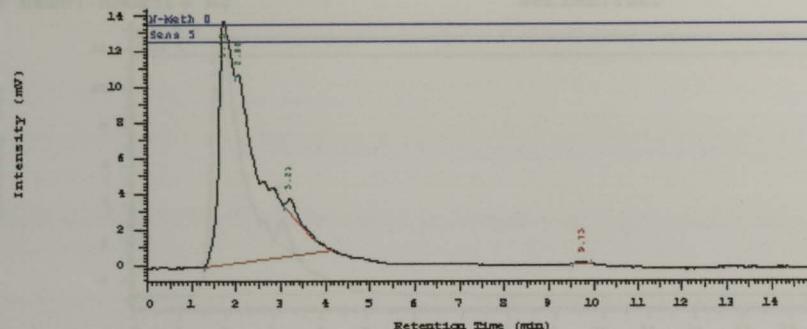
- Rolha de cortiça natural 2^a classe em solução etanólica a 40% durante 40 dias.

D-7000HSM Ota2003

Series: 1934

Report modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/10/04 12:05 PM
Sample Name: amostra Bb 40 diasProcessed: 12/10/04 02:37 PM
Series: 1934

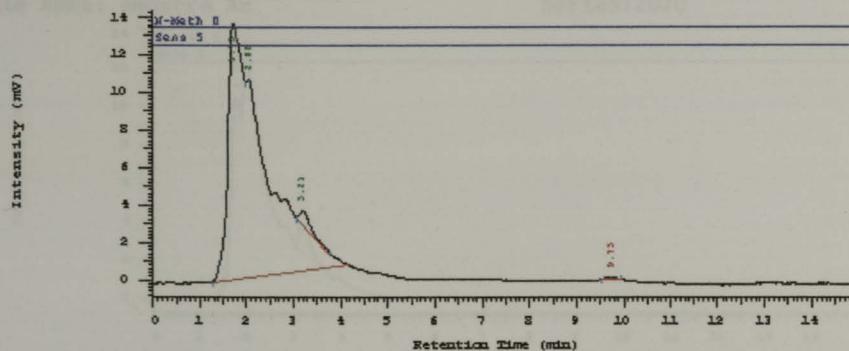
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.73	302636	40.053	BV
2	2.06	439351	58.147	VV
3	3.21	11786	1.560	TBB
4	9.73	1807	0.239	MC

D-7000HSM Ota2003

Series: 1934

Report modified

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/10/04 12:05 PM
Sample Name: amostra Bb 40 diasProcessed: 12/10/04 02:37 PM
Series: 1934

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.73	302636	40.053	BV
2	2.06	439351	58.147	VV
3	3.21	11786	1.560	TBB
4	9.73	1807	0.239	MC

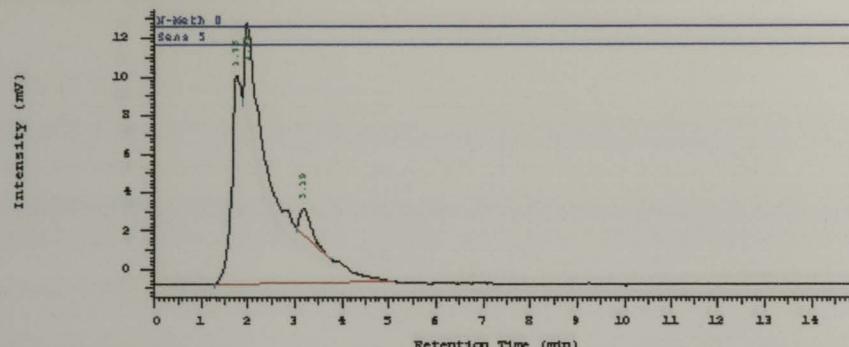
- Rolha de cortiça aglomerada 1-2 mm em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000 HSM: Ota2003

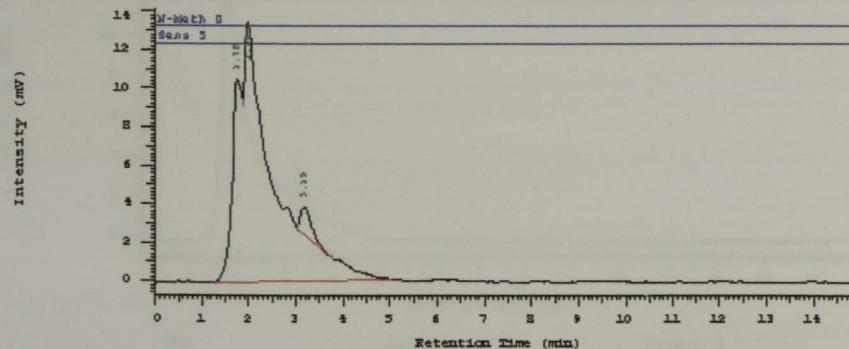
Series: 2020

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/17/04 03:13 PM
Sample Name: amostra AcProcessed: 12/17/04 03:28 PM
Series: 2020

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	156573	20.612	BV
2	1.99	579911	76.343	VV
3	3.19	23128	3.045	TBB
			759612	100.000

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/17/04 03:29 PM
Sample Name: amostra AcProcessed: 12/17/04 03:44 PM
Series: 2020

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	149816	19.952	BV
2	1.98	578223	77.006	VV
3	3.19	22843	3.042	TBB

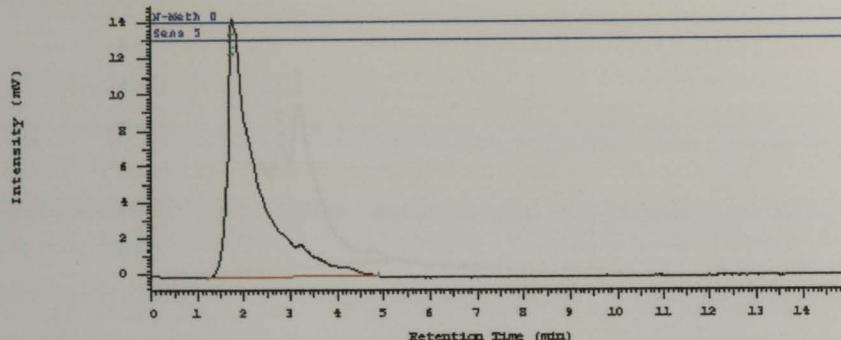
- Rolha de cortiça aglomerada 1-2 mm em solução etanólica a 10% durante 40 dias.

D-7000 HSM Ota2003

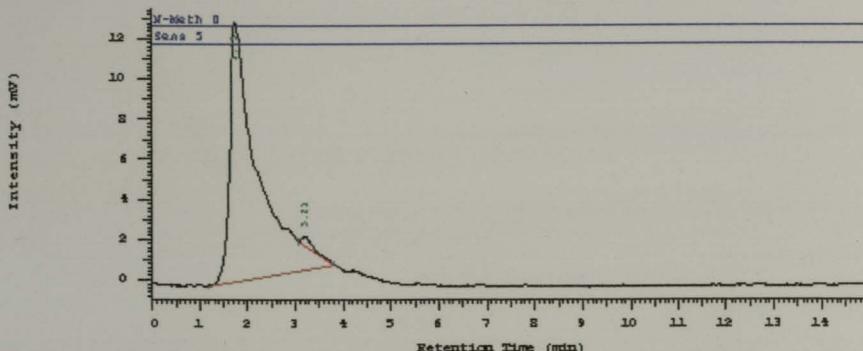
Series: 1983

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 06:30 PM
Sample Name: amostra Ac 40 diasProcessed: 12/15/04 06:45 PM
Series: 1983

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	611749	100.000	BB
		611749	100.000	

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/15/04 06:45 PM
Sample Name: amostra Ac 40 diasProcessed: 12/15/04 07:01 PM
Series: 1983

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	515134	98.643	BV
2	3.21	7084	1.357	TBB
		522218	100.000	

- Rolha de cortiça aglomerada 1-2 mm em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000HSM: Ota2003

Series: 2023

Report: original

System: Sys 1

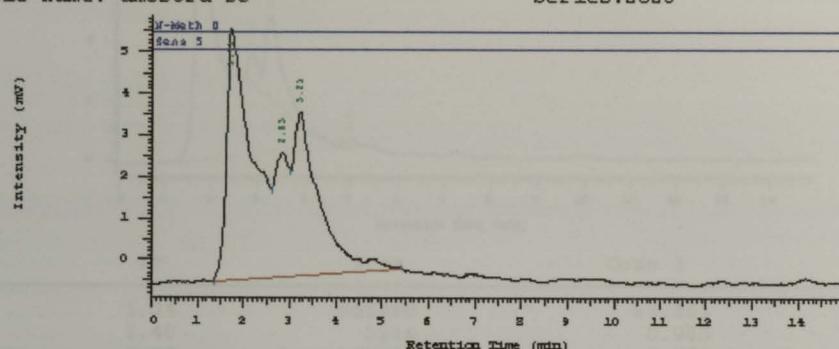
D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/17/04 05:03 PM

Processed: 12/17/04 05:19 PM

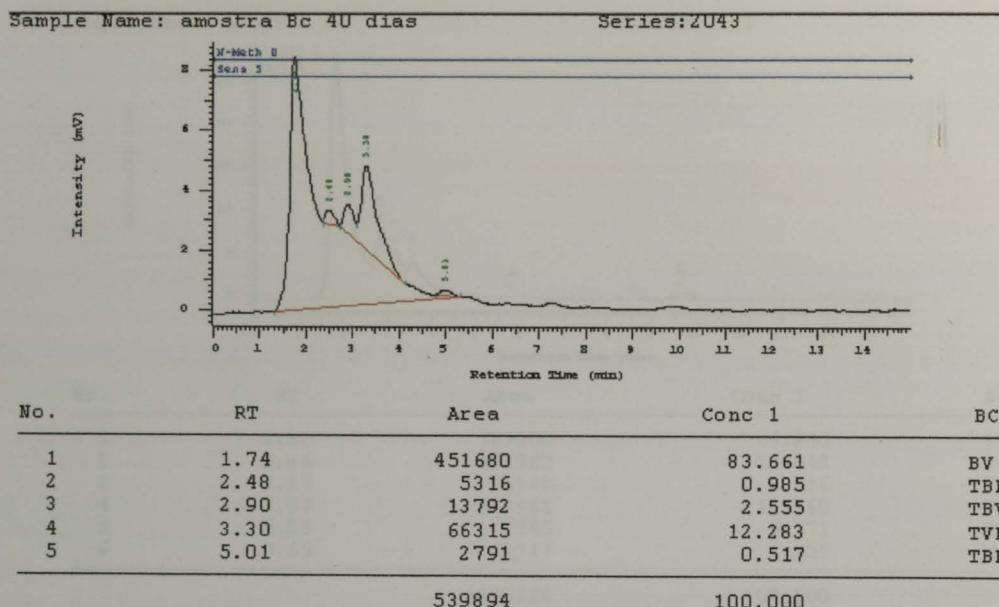
Sample Name: amostra Bc

Series: 2023



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	224437	50.700	BV
2	2.83	63660	14.381	VV
3	3.21	154575	34.919	VB
				442672 100.000

- Rolha de cortiça aglomerada 1-2 mm em solução etanólica a 40% durante 40 dias.

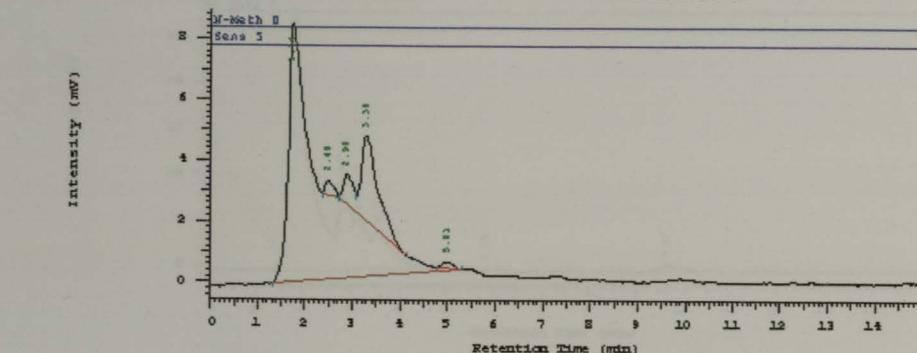


D-7000HSM Ota2003 Series: 2043 Report modified System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

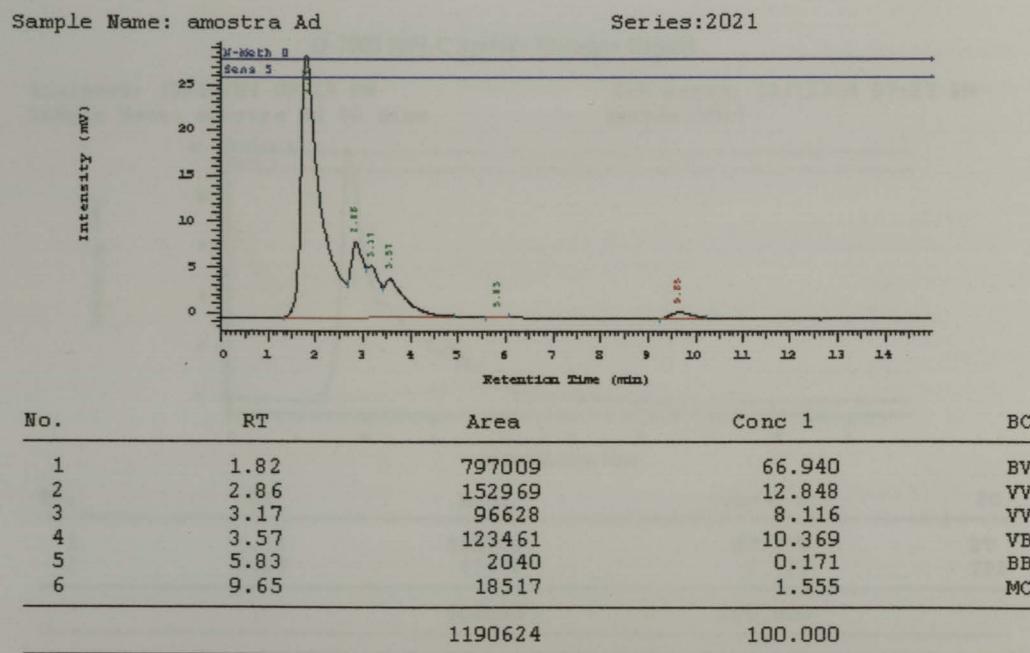
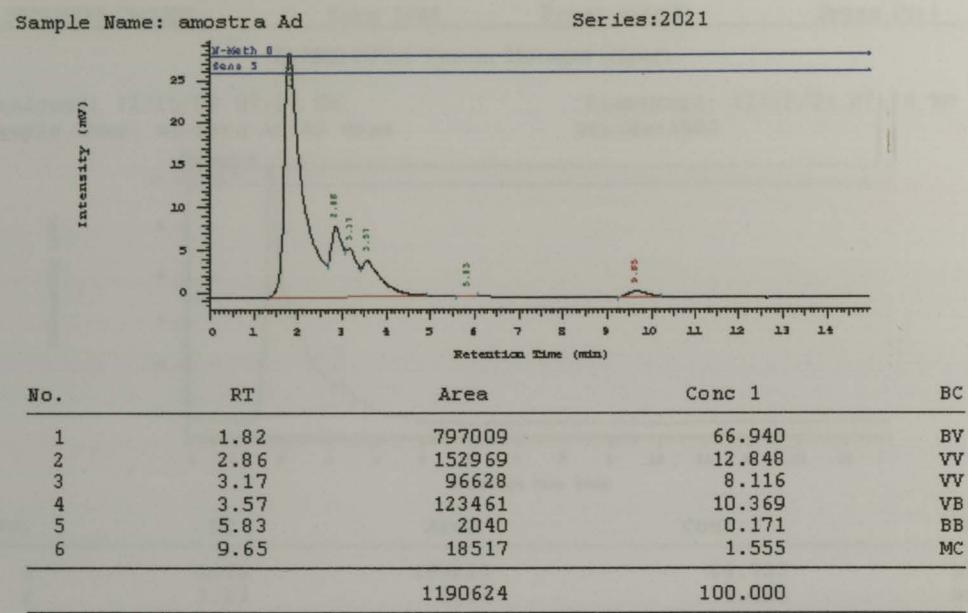
Analyzed: 12/22/04 12:55 PM
 Sample Name: amostra Bc 40 dias

Processed: 12/22/04 02:53 PM
 Series: 2043



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.74	451680	83.661	BV
2	2.48	5316	0.985	TBB
3	2.90	13792	2.555	TBV
4	3.30	66315	12.283	TVB
5	5.01	2791	0.517	TBB

- Rolha de cortiça aglomerada 3-7 mm em solução etanólica a 10% durante 10 dias.



- Rolha de cortiça aglomerada 3-7 mm em solução etanólica a 10% durante 40 dias.

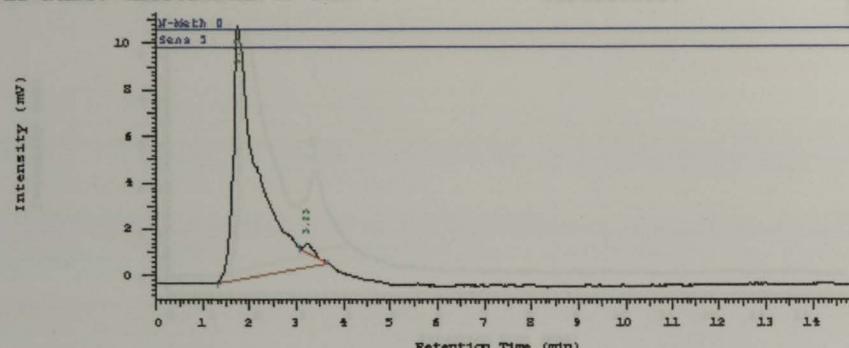
D-7000 HSM: Ota2003

Series: 1984

Report original

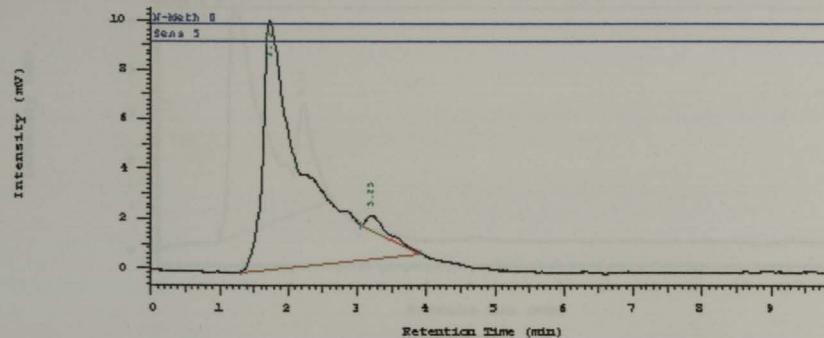
System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/15/04 07:01 PM
Sample Name: amostra Ad 40 diasProcessed: 12/15/04 07:16 PM
Series: 1984

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	389813	98.705	BV
2	3.23	5116	1.295	TBB
		394929	100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/15/04 07:17 PM
Sample Name: amostra Ad 40 diasProcessed: 12/15/04 07:27 PM
Series: 1984

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.73	410133	97.279	BV
2	3.23	11472	2.721	TBB
		421605	100.000	

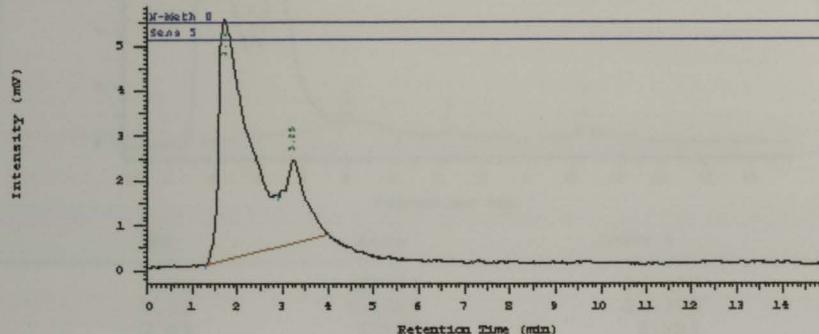
- Rolha de cortiça aglomerada 3-7 mm em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000HSM Ota2003

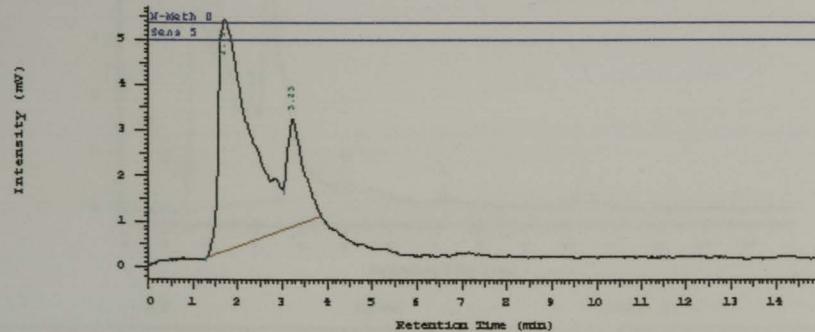
Series: 2027

Report: original

System: Sys 1

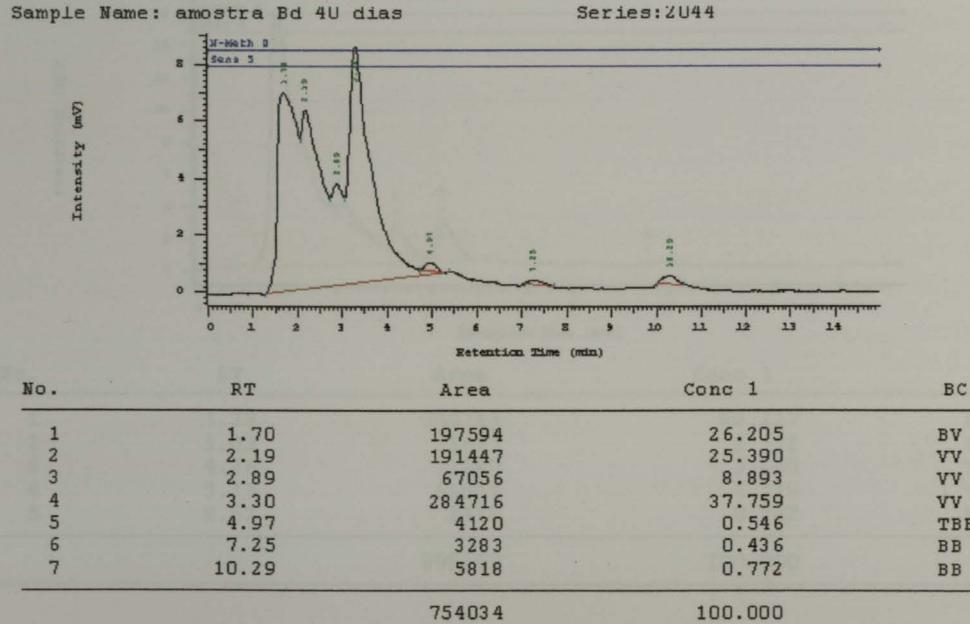
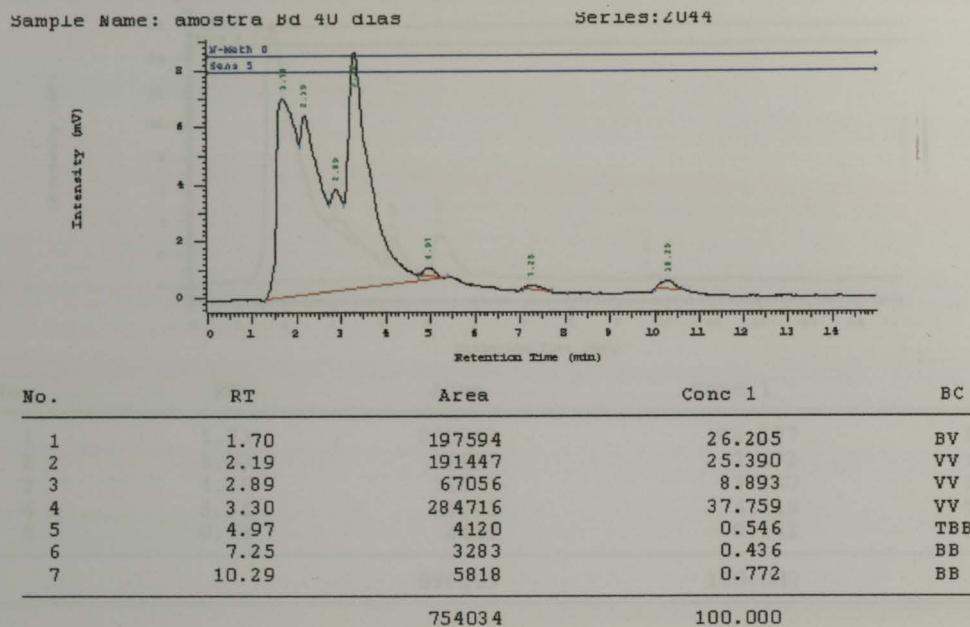
D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 12:11 PM
Sample Name: amostra BdProcessed: 12/20/04 12:26 PM
Series: 2027

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.72	236516	79.111	BV
2	3.25	62451	20.889	VB
298967			100.000	

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 12:27 PM
Sample Name: amostra BdProcessed: 12/20/04 12:42 PM
Series: 2027

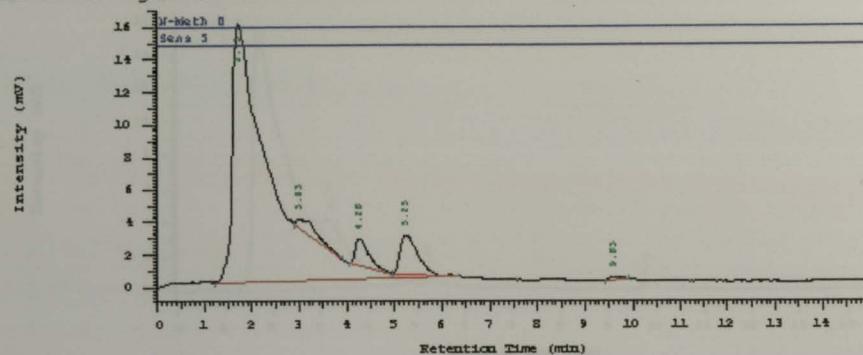
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	238433	80.066	BV
2	3.23	59362	19.934	VB
297795			100.000	

- Rolha de cortiça aglomerada 3-7 mm em solução etanólica a 40% durante 40 dias.



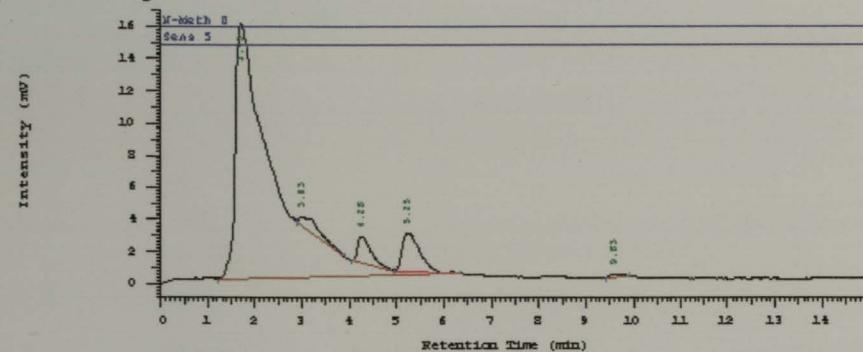
➤ Água de cozedura 24 horas depois de mudada.

Sample Name: água de cozedura 24 h Series:1847



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.73	880743	88.227	BV
2	3.03	21677	2.172	TBB
3	4.26	32347	3.240	TBB
4	5.25	61083	6.119	TBB
5	9.63	2419	0.242	BB
			998269	100.000

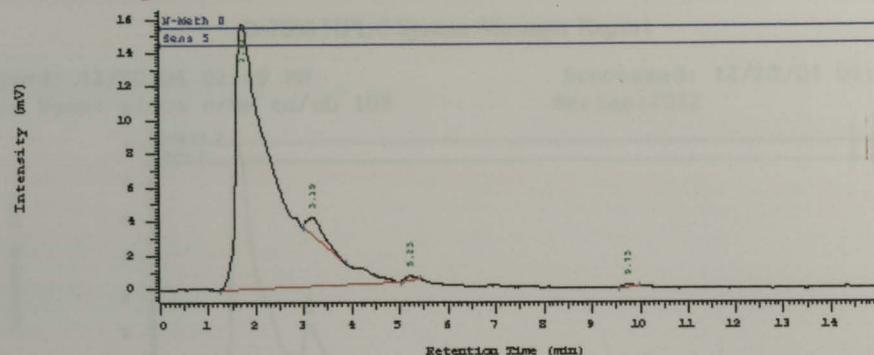
Sample Name: água de cozedura 24 h Series:1847



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.73	880743	88.227	BV
2	3.03	21677	2.172	TBB
3	4.26	32347	3.240	TBB
4	5.25	61083	6.119	TBB
5	9.63	2419	0.242	BB
			998269	100.000

➤ Água de cozedura 48 horas depois de mudada.

Sample Name: água de cozedura 48 h Series: 1848

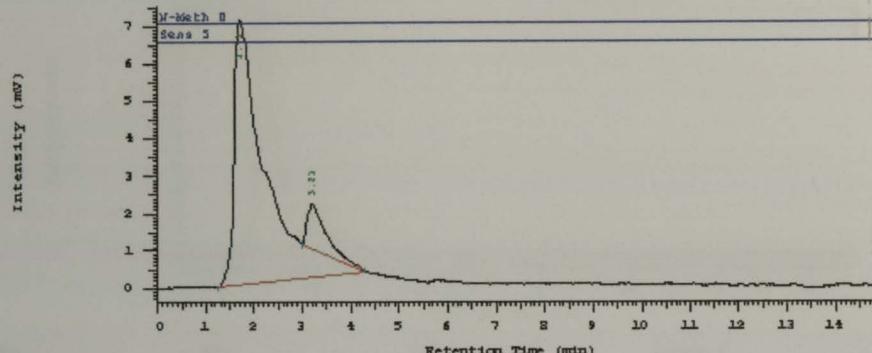


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	883488	96.533	BV
2	3.19	26781	2.926	TBB
3	5.23	3463	0.378	BB
4	9.73	1481	0.162	BB
		915213	100.000	

- Placa de cortiça crua com barriga e costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

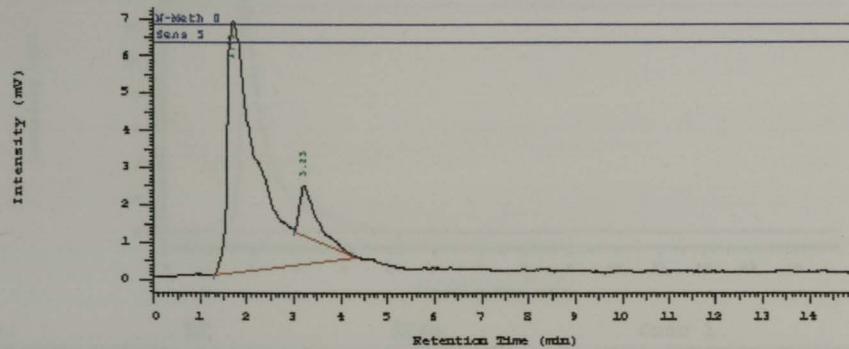
Analyzed: 12/20/04 02:49 PM Processed: 12/20/04 03:04 PM
 Sample Name: placa crua cc/cb 10% Series:2032



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	314296	91.043	BV
2	3.21	30920	8.957	TBB
		345216	100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 03:05 PM Processed: 12/20/04 03:20 PM
 Sample Name: placa crua cc/cb 10% Series:2032



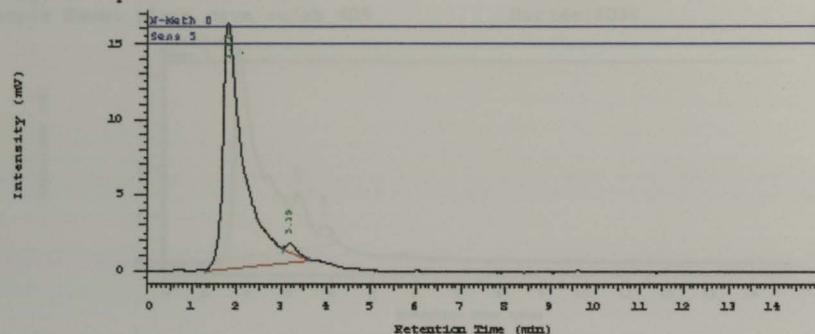
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	311646	90.444	BV
2	3.23	32928	9.556	TBB
		344574	100.000	

- Placa de cortiça crua sem barriga e sem costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 03:21 PM
 Sample Name: placa crua sc/sb 10%

Processed: 12/20/04 03:36 PM
 Series: 2033

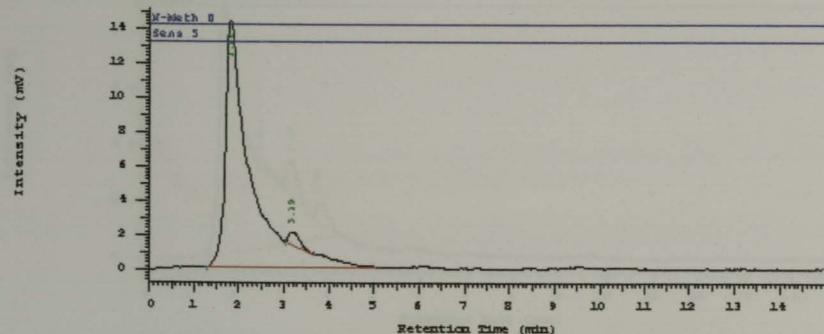


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.81	518548	98.340	BV
2	3.19	8751	1.660	TBB
		527299	100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 03:36 PM
 Sample Name: placa crua sc/sb 10%

Processed: 12/20/04 03:52 PM
 Series: 2033



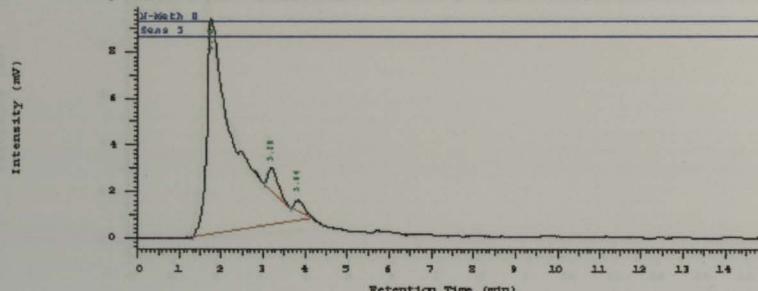
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.82	550815	97.726	BV
2	3.19	12816	2.274	TBB
		563631	100.000	

- Placa de cortiça crua com barriga e costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 05:59 PM
 Sample Name: placa crua cc/cb 40%

Processed: 12/20/04 06:14 PM
 Series:2038

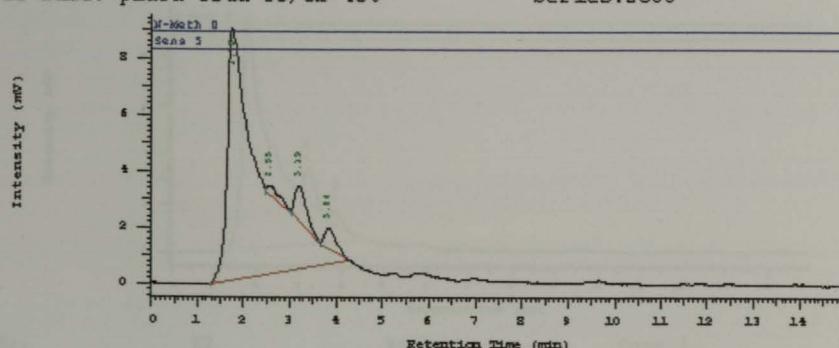


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	433521	94.691	BV
2	3.20	16832	3.677	TBB
3	3.84	7471	1.632	TBB
457824				100.000

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 06:15 PM
 Sample Name: placa crua cc/cb 40%

Processed: 12/22/04 10:31 AM
 Series:2038



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	443873	91.820	BV
2	2.55	6316	1.307	TBB
3	3.19	20939	4.332	TBB
4	3.84	12286	2.541	TBB

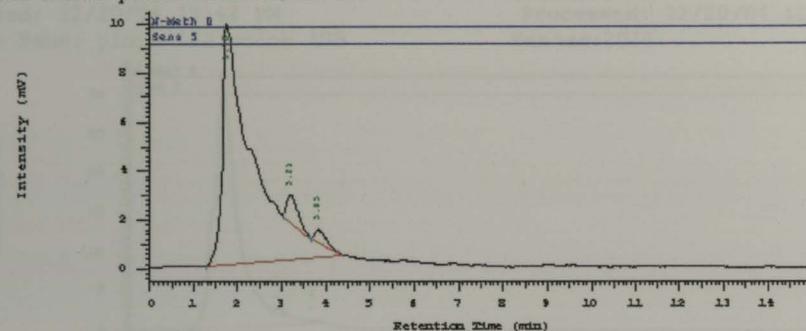


- Placa de cortiça crua sem barriga e sem costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 06:30 PM
 Sample Name: placa crua sc/sb 40%

Processed: 12/20/04 06:46 PM
 Series: 2039

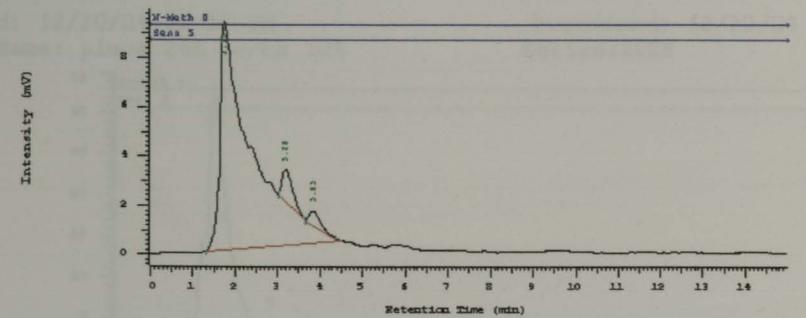


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.76	473646	94.576	BV
2	3.21	19251	3.844	TBB
3	3.83	7911	1.580	TBB

500808 100.000

Analyzed: 12/20/04 06:46 PM
 Sample Name: placa crua sc/sb 40%

Processed: 12/20/04 07:02 PM
 Series: 2039



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	481420	93.683	BV
2	3.20	22561	4.390	TBB
3	3.83	9901	1.927	TBB

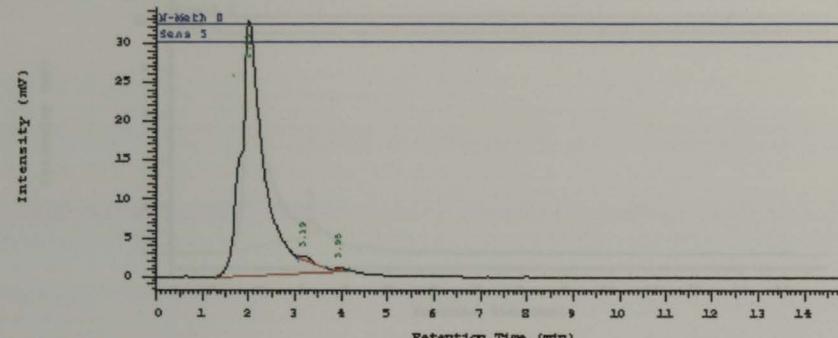
- Placa de cortiça cozida após 24h de mudada com barriga e costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000 HSM: Ota2003

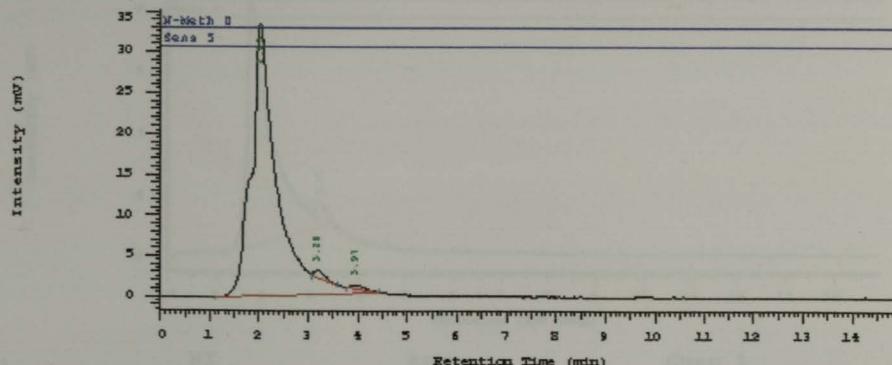
Series: 2028

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 12:42 PM
Sample Name: placa 24h cc/cb 10%Processed: 12/20/04 12:58 PM
Series: 2028

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	2.01	1119213	98.861	BV
2	3.19	8970	0.792	TBB
3	3.95	3921	0.346	TBB
1132104				100.000

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 12:58 PM
Sample Name: placa 24h cc/cb 10%Processed: 12/20/04 01:13 PM
Series: 2028

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	2.03	1170893	98.170	BV
2	3.20	12315	1.033	TBB
3	3.97	9509	0.797	TBB

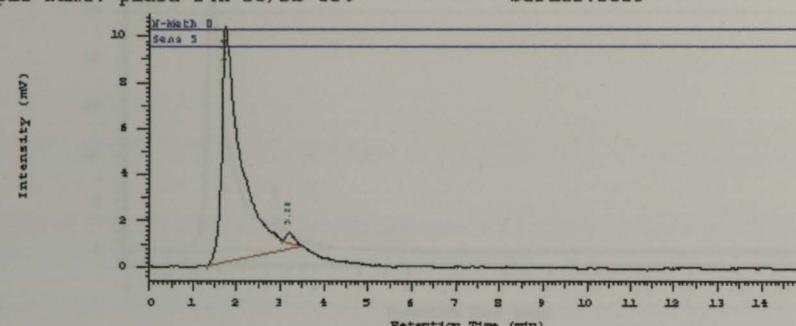
- Placa de cortiça cozida após 24h de mudada sem barriga e sem costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000 HSM Ota2003

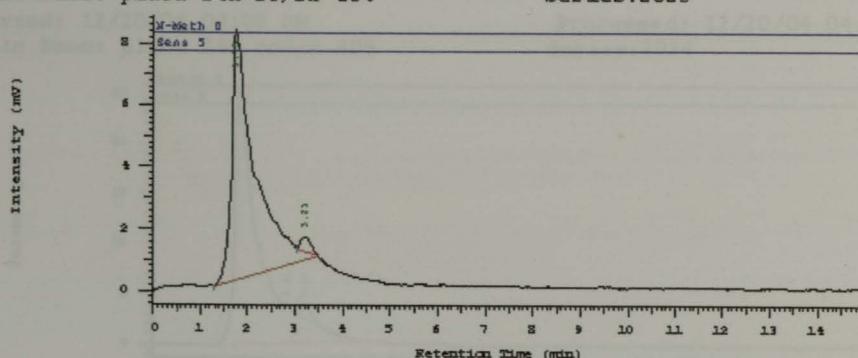
Series: 2029

Report original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 01:14 PM
Sample Name: placa 24h sc/sb 10%Processed: 12/20/04 01:29 PM
Series: 2029

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	309273	98.280	BV
2	3.20	5412	1.720	TBB
			314685	100.000

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 01:30 PM
Sample Name: placa 24h sc/sb 10%Processed: 12/20/04 01:45 PM
Series: 2029

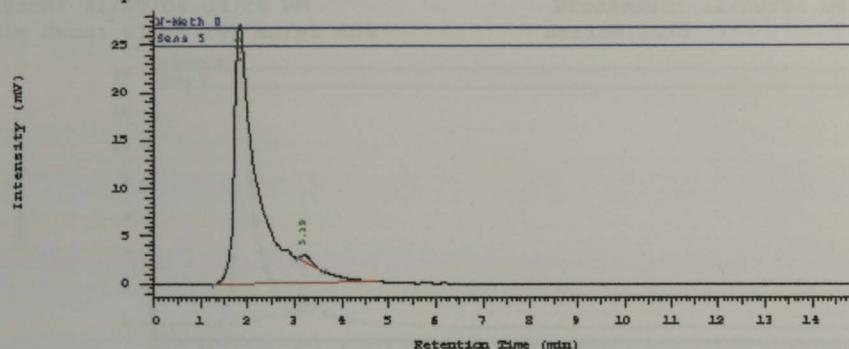
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.75	268713	97.571	BV
2	3.21	6689	2.429	TBB
			275402	100.000

- Placa de cortiça cozida após 24h de mudada com barriga e costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 03:52 PM
 Sample Name: placa 24h cc/cb 40%

Processed: 12/20/04 04:07 PM
 Series: 2034

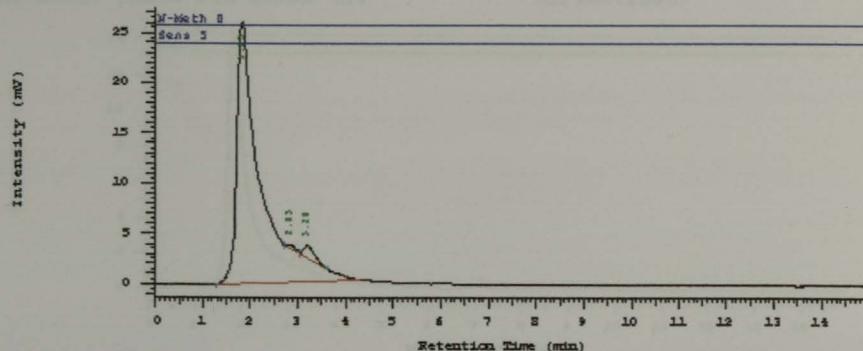


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.83	938584	98.725	BV
2	3.19	121211	1.275	TBB
950705			100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 04:08 PM
 Sample Name: placa 24h cc/cb 40%

Processed: 12/20/04 04:23 PM
 Series: 2034

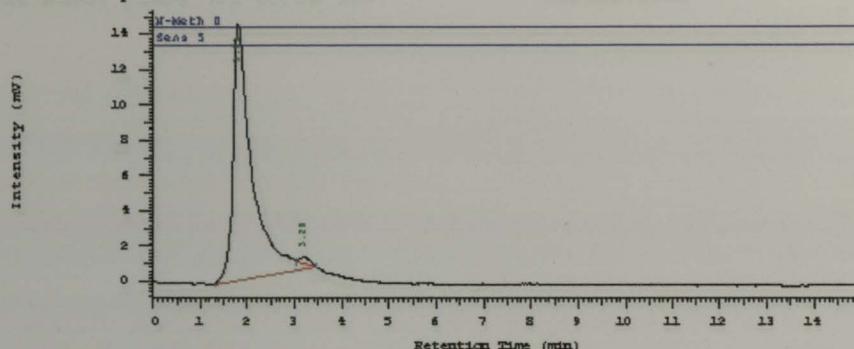


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.83	916450	97.613	BV
2	2.83	4149	0.442	TBB
3	3.20	18261	1.945	TBB
938860			100.000	

- Placa de cortiça cozida após 24h de mudada sem barriga e sem costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

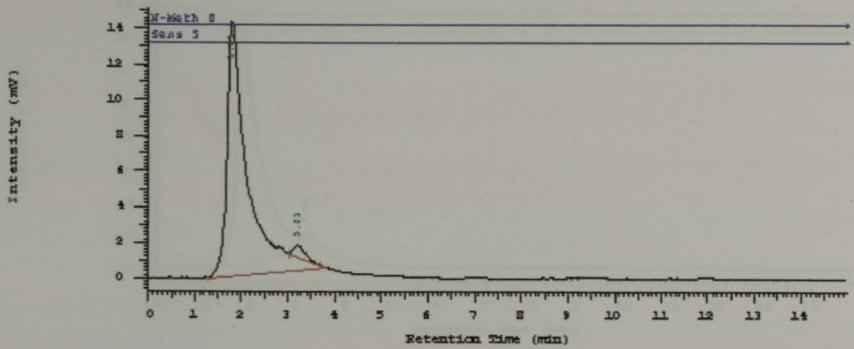
Analyzed: 12/20/04 04:24 PM Processed: 12/20/04 04:39 PM
 Sample Name: placa 24h sc/sb 40% Series:2035



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.81	398968	98.560	BV
2	3.20	5831	1.440	TBB
404799			100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 04:40 PM Processed: 12/20/04 04:55 PM
 Sample Name: placa 24h sc/sb 40% Series:2035



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.81	431258	97.443	BV
2	3.21	11318	2.557	TBB
442576			100.000	

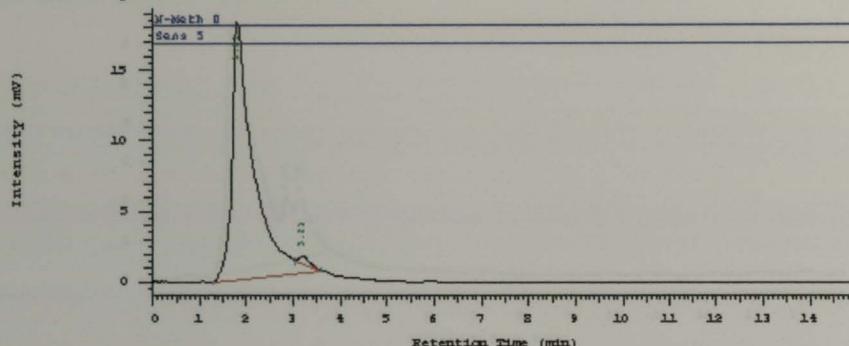
- Placa de cortiça cozida após 48h de mudada com barriga e costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000HSM Ota2003

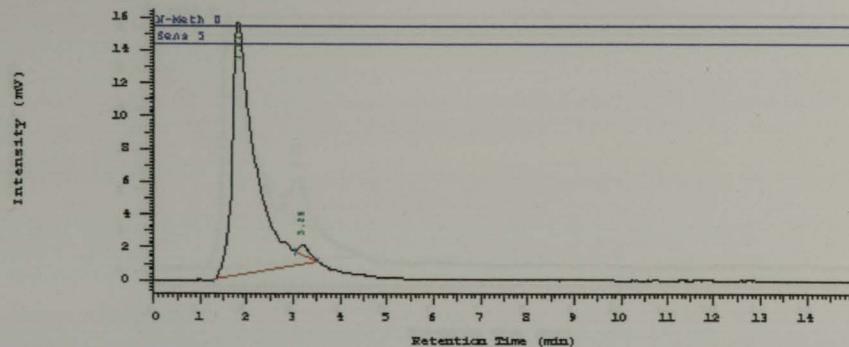
Series: 2030

Report: original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 01:46 PM
Sample Name: placa 48h cc/cb 10%Processed: 12/20/04 02:01 PM
Series: 2030

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.81	571036	98.682	BV
2	3.21	7624	1.318	TBB
		578660	100.000	

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 02:02 PM
Sample Name: placa 48h cc/cb 10%Processed: 12/20/04 02:17 PM
Series: 2030

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.81	525629	98.327	BV
2	3.20	8942	1.673	TBB
		534571	100.000	

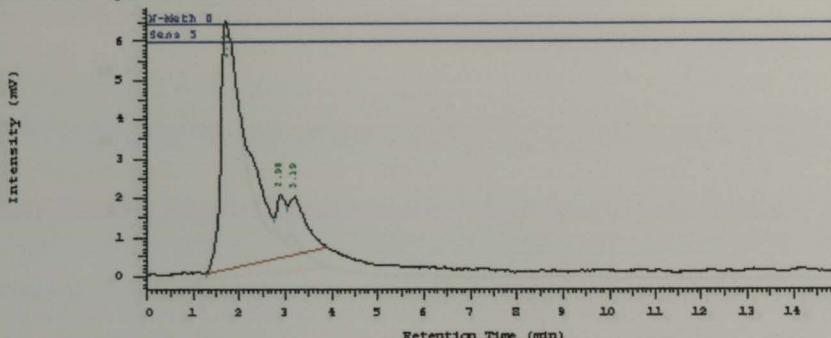
- Placa de cortiça cozida após 48h de mudada sem barriga e sem costa em solução etanólica a 10% durante 10 dias.

D-7000HSM Ota2003

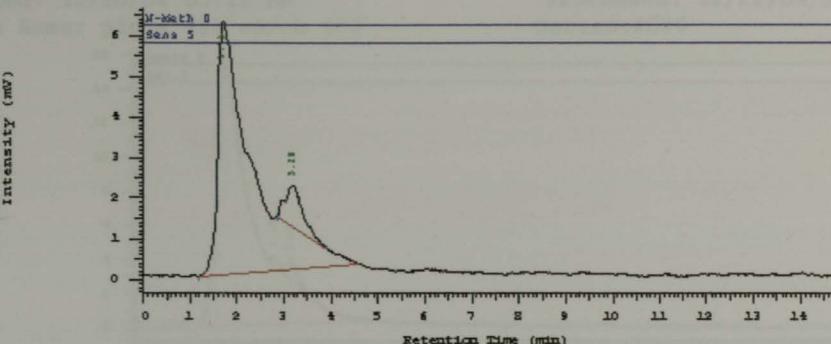
Series: 2031

Report original

System: Sys 1

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 02:17 PM
Sample Name: placa 48h sc/sb 10%Processed: 12/20/04 02:33 PM
Series: 2031

No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	240919	79.934	BV
2	2.90	23927	7.939	VV
3	3.19	36549	12.127	VB
301395				100.000

D-7000 HPLC System Manager ReportAnalyzed: 12/20/04 02:33 PM
Sample Name: placa 48h sc/sb 10%Processed: 12/20/04 02:48 PM
Series: 2031

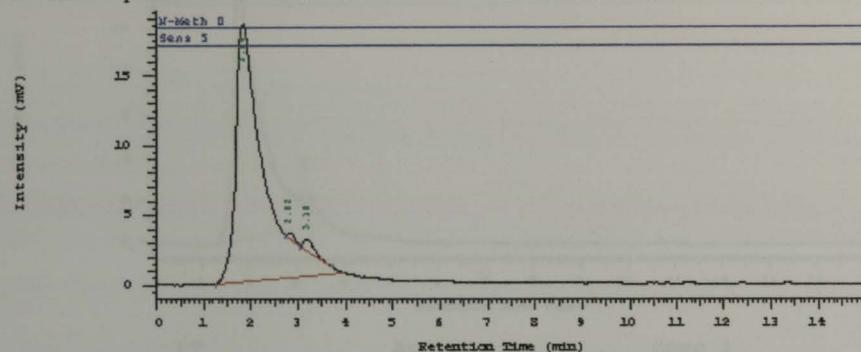
No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.71	318266	92.264	BV
2	3.20	26684	7.736	TBB
344950				100.000

- Placa de cortiça cozida após 48h de mudada com barriga e costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 04:55 PM
 Sample Name: placa 48h cc/cb 40%

Processed: 12/20/04 05:11 PM
 Series: 2036

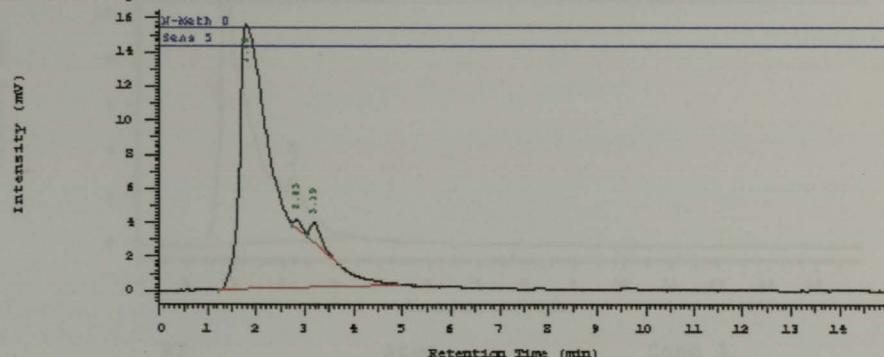


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.84	758395	97.827	BV
2	2.82	4334	0.559	TBB
3	3.18	12511	1.614	TBB
775240			100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 05:11 PM
 Sample Name: placa 48h cc/cb 40%

Processed: 12/22/04 10:56 AM
 Series: 2036

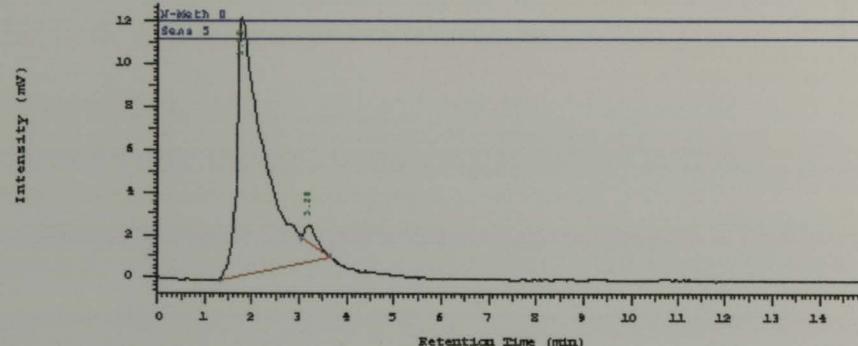


No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.80	821546	97.308	BV
2	2.83	5211	0.617	TBB
3	3.19	17515	2.075	TBB
844272			100.000	

- Placa de cortiça cozida após 48h de mudada sem barriga e sem costa em solução etanólica a 40% durante 10 dias.

D-7000 HPLC System Manager Report

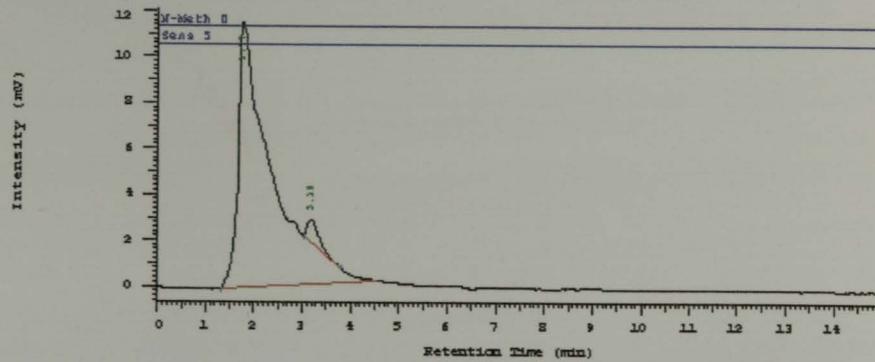
Analyzed: 12/20/04 05:27 PM Processed: 12/20/04 05:42 PM
 Sample Name: placa 48h sc/sb 40% Series:2037



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.79	478132	97.383	BV
2	3.20	12848	2.617	TBB
		490980	100.000	

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 12/20/04 05:43 PM Processed: 12/22/04 10:27 AM
 Sample Name: placa 48h sc/sb 40% Series:2037



No.	RT	Area	Conc 1	BC
1	1.77	553775	96.961	BV
2	3.18	17354	3.039	TBB
		571129	100.000	





FACULDADE DE ENGENHARIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000088394