FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE QUÍMICA DE ROLHAS DE CORTIÇA

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

QUITÉRIA PRECIOSA MOREIRA DA SILVA

LICENCIADO EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO

2001

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

IMPLEMENTAÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE QUÍMICA DE ROLHAS DE CORTIÇA

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

QUITÉRIA PRECIOSA MOREIRA DA SILVA

LICENCIADA EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO
2001

De acordo com diligências
do inquérito, foram efectuadas,
de um modo geral, as comissões
exigidas pelo júri.

Maria dos Prazeres de Pina
29/ Abril/2002

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ANÁLISE QUÍMICA DE ROLHAS DE CORTIÇA

UNIVERSIDADE DO PORTO
BIBLIOTECA
Sala
Coloc. IMUP-14
N.º 48858
FACULDADE DE CIÊNCIAS

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

QUITÉRIA PRECIOSA MOREIRA DA SILVA

LICENCIADA EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO
2001

RESUMO

Nesta dissertação, pretendeu-se implementar metodologias de análise química em FIA, com formas distintas de detecção de sinal, para a determinação de cloretos, oxalatos e de oxidantes em extractos de rolhas de cortiça, no sentido de as comparar com os processos descritos nas normas portuguesas, ou na ausência destas, com métodos de análise bem estabelecidos para efectuar a mesma determinação noutro tipo de amostras. Para o efeito, numa primeira fase, foram aplicados os processos descritos nas NP 3384/1988 e NP 4296/1995, respectivamente para o controlo de cloretos e oxidantes em diferentes tipos de amostras de rolhas de cortiça. Posteriormente, foram desenvolvidas metodologias de análise química em sistemas de FIA para a determinação de cloretos e de oxalatos. Foi também efectuado um breve estudo de um sistema de FIA para a determinação de oxidantes com detecção de quimioluminescência.

O desenvolvimento dos métodos de análise de FIA envolveu uma primeira fase de optimização recorrendo a técnicas de planeamento de experiências. Foram utilizados planeamentos factoriais completos e fraccionados, planeamentos de Plackett-Burman e de Box-Behnken. A análise da significância dos factores estudados e dos modelos de regressão múltipla propostos foi efectuada por ANOVA. Nas fases seguintes do desenvolvimento dos métodos as características de resposta dos sistemas optimizados foram avaliadas.

A análise química de cloretos em extractos de rolhas de cortiça, foi efectuada através da implementação de um sistema de pseudo-titulação em FIA com detecção potenciométrica. Neste sistema as amostras são injectadas num fluxo de solução padrão de nitrato de prata, a reacção de precipitação ocorre num tubo de gradiente e a diminuição da concentração de prata, decorrente desta reacção, é monitorizada pela variação de potencial entre o eléctrodo tubular de prata e o eléctrodo de referência.. Para a optimização do sistema foram considerados os seguintes factores experimentais: caudal, comprimento do tubo de gradiente e a concentração de nitrato de prata. O factor mais importante para a resposta do sistema é o comprimento do tubo de gradiente. O sistema optimizado apresenta um limite de detecção de $5x10^{-5}$ M e permite efectuar a

determinação de cloreto na gama de concentração $5x10^{-5}$ a 10^{-2} M, com um coeficiente de variação entre 5 e 7 % e uma frequência de amostragem de cerca de 100 amostras/hora.

Os oxalatos foram determinados em extractos de rolhas de cortiça através de um método enzimático baseado na utilização da enzima oxalato-oxidase, largamente difundido na determinação de oxalato em urina. Foi também implementado um sistema de FIA para a determinação de oxalato com detecção de quimioluminescência, Neste sistema a amostra previamente acidulada com ácido clorídrico, é injectada num fluxo de peróxido de hidrogénio e de seguida ocorre a mistura com um fluxo de solução etanólica de bis-ciclohexil-carbodiimida e difenilantraceno, ocorrendo uma reacção na célula de quimioluminescência. Para a optimização do sistema foram considerados os seguintes factores experimentais: concentrações de ácido, peróxido de hidrogénio e de bis-cicloexilcarbodiimida, volume do reactor, volume de injecção e caudal total. Os factores mais importantes para a resposta do sistema são o caudal total e a concentração de ácido e de peróxido.

Por último, para a análise de oxidantes, foi montado um sistema de FIA com detecção de quimioluminescência, em que os oxidantes são determinados com base numa reacção de decomposição de H_2O_2, catalisada pelo cobalto, em que se produz um radical que oxida o luminol na presença de oxigénio, originando um composto com emissão fluorescente. Para a optimização do sistema foram considerados os seguintes factores experimentais: concentração de luminol, concentração de cobalto, pH da solução tampão carbonato, volume de injecção e o caudal. O factor mais importante é o valor do pH da solução tampão.

Os resultados obtidos permitem concluir que os sistemas de FIA para a determinação de cloretos e de oxalatos permitem efectuar a análise destes parâmetros com grande rapidez, baixo consumo de amostras e reagentes e possuem fortes potencialidades de serem automatizados. Nesta dissertação os sistemas de FIA em associação com métodos de detecção distintos, foram implementados com sucesso, de forma a permitir pesquisar cloretos e oxalatos em extractos de rolhas de cortiça.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se a orientação do Prof. Doutor Joaquim C.G. Esteves da Silva e da Doutora Júlia M.C.S. Magalhães.

Agradece-se à empresa J.J.Ferreira dos Santos as amostras de rolhas utilizadas nesta Dissertação.

ÍNDICE GERAL

RESUMO i

AGRADECIMENTOS iii

ÍNDICE iv

ABREVIATURAS viii

1 – INTRODUÇÃO GERAL 1

1.1 – GÉNESE DO TRABALHO 1

1.1.1 – Matéria prima 1

1.1.2 – Distribuição do sobreiro 4

1.1.3 - A exploração do sobreiro 7

1.1.4 – A estrutura da cortiça 8

1.1.5 – Composição química da cortiça 9

1.1.6 – Propriedades físicas da cortiça e suas aplicações 10

1.1.7 – Alterações biológicas e estruturais da cortiça 11

1.1.8 – Produtos de cortiça 12

1.1.9 – Processo de transformação de cortiça em rolhas 14

1.1.10 – Controlo de Qualidade 18

1.1.10.1 - Oxidantes 18

1.1.10.2 - Cloretos 19

1.1.10.3 - Oxalatos 20

1.2 – OBJECTIVOS DO TRABALHO 21

1.4 – ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 22

1.5 – BIBLIOGRAFIA 23

2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL 25

2.1 – ORIGEM E AMOSTRAGEM DE ROLHAS 25

2.2 – REAGENTES E SOLUÇÕES 27

2.2.1 – Determinação de cloretos 27

2.2.1.1 – Solução de etanol a 12 % 27

2.2.1.2 – Soluções de transportador no sistema de FIA 27

2.2.1.3 – Soluções de cloreto de sódio 27

2.2.2 – Determinação de oxalatos 28

2.2.2.1 – Soluções padrão de oxalato 28

2.2.2.2 – Soluções para a determinação enzimática do oxalato 28

2.2.2.3 – Soluções para a determinação baseada num sistema de FIA+quimioluminescência 29

2.2.3 – Determinação de oxidantes 29

2.2.3.1 – Soluções de transportador no sistema de FIA 29

2.2.3.2 – Soluções de peróxido de hidrogénio 30

2.3 – MATERIAL, EQUIPAMENTO E MONTAGEM DOS SISTEMAS 31

2.3.1 – Equipamento e material 31

2.3.2 – Montagem dos Sistemas de Fuxo 33

2.3.2.1 – Sistema para a determinação de cloretos 33

2.3.2.2 - Sistema para a determinação de oxalatos 34

2.3.2.3 - Sistema para a determinação de oxidantes 35

2.4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 36

2.4.1 – Preparação dos extractos 36

2.4.1.1 – Preparação dos extractos para a determinação de cloretos e oxidantes 36

2.4.1.2 – Preparação dos extractos para a determinação de oxalatos 36

2.4.2 – Determinação enzimática dos oxalatos nas rolhas 36

2.4.2.1 – Preparação das amostras 37

2.4.2.2 - Ensaio 37

2.4.3 – Optimizaçâo da resposta dos sistemas 37

2.4.4 – Avaliação da Resposta dos Sistemas Optimizados 37

2.4.4.1 – Traçado de curvas de calibração 38

2.4.4.2 – Repetibilidade da Resposta dos Sistemas 38

2.5 - CÁLCULOS 39

2.6 – BIBLIOGRAFIA 40

3 - TEORIA 41

3.1 – ANÁLISE POR INJECÇÃO DE FLUXO (FIA) 41

3.1.1 – Fundamentos da FIA 41

3.1.2 – A dispersão nos sistemas de FIA 44

3.1.3 – As leituras em FIA e as dimensões dos picos 48

3.1.3.1 – Altura de Pico (H) 48

3.1.3.2 – Área de Pico (Apico) 49

3.1.3.3 – Largura de Pico (wpico) 50

3.1.4 – Fundamentos da FIA 51

3.2 – PLANEAMENTO DE EXPERIÊNCIAS E OPTIMIZAÇÃO 53

3.2.1 – Objectivos do Planeamento de Experiências 55

3.2.2 – Selecção dos Factores Experimentais e das Respostas 57

3.2.2.1 - Factores 57

3.2.2.2 - Respostas 57

3.2.3 – Estratégias de Optimização 58

3.2.4 – O Modelo da Superfície de Resposta 59

3.2.5 – Planeamentos Factoriais 60

3.2.5.1 – Planeamentos factoriais completos 61

3.2.5.2 – Planeamentos factoriais fracccionados 64

3.2.5.3 – Planeamentos de Plackett-Burman 66

3.2.5.4 – Planeamentos de Box-Benhken 66

3.2.6 – Regressão Múltipla 68

3.2.6.1 – Validação do modelo 69

3.2.7 – Superfícies de Resposta 71

3.2.7.1 – Superfícies de resposta planas 71

3.2.7.2 – Superfícies de resposta curvas 72

3.3 - BIBLIOGRAFIA 74

4 – NORMAS DE AMOSTRAGEM E ENSAIOS QUÍMICOS 76

4.1 - INTRODUÇÃO 76

4.2 – NORMA NP 2922/1996 – REGRAS E TABELAS DE AMOSTRAGEM 77

4.2.1 - Introdução 77

4.2.2 – Terminologia e definições 77

4.2.3 – Levantamento das amostras 78

4.2.4 – Planos de amostragem 79

3.2.4.1 – Nível de controlo 79

3.2.4.2 – Letra- código do efectivo da amostra 79

3.2.4.3 – Determinação de um plano de amostragem 80

3.2.4.4 – Tipos de planos de amostragem 80

4.3 – DETERMINAÇÃO DE OXIDANTES BASEADA NA NORMA NP 4296/1995 81

4.3.1 - Introdução 81

4.3.2 - Parte experimental 82

4.3.2.1 – Reagentes e soluções 82

4.3.2.2 – Material 82

4.3.2.3 – Técnica de ensaio 83

4.3.3 - Resultados e discussão 83

4.3.4 - Conclusão 84

4.4 – DETERMINAÇÃO DE CLORETOS BASEADA NA NORMA NP 3384/1988 85

4.4.1 - Introdução 85

4.4.2 - Parte experimental 86

4.4.2.1 – Reagentes e soluções 86

4.4.2.2 – Material 86

4.4.2.3 – Técnica de ensaio 87

4.4.3 - Resultados e discussão 87

4.4.4 - Conclusão 90

5 – DETERMINAÇÂO DE CLORETOS POR PSEUDO-TITULAÇÃO EM FIA 91

5.1 - INTRODUÇÃO 91

5.2 – OPTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA 95

5.2.1 - Estudo da resposta limite de detecção 95

5.2.2 - Estudo da resposta largura de pico 100

5.3 – CARACTERÍSTICAS DE RESPOSTA DO SISTEMA OPTIMIZADO 104

5.4 – ANÁLISE DE EXTRACTOS 108

5.5 - CONCLUSÃO 109

5.6 - BIBLIOGRAFIA 110

6 – DETERMINAÇÂO DE OXALATO

6.1 - INTRODUÇÃO

6.1.1 – Método de determinação enzimático 111

6.1.2 – Método de determinação FIA +quimiolumunescência 112

6.2 – MÉTODO DE DETERMINAÇÂO ENZIMÁTICO 113

6.3 – MÉTODO DE DETERMINAÇÂO FIA +quimioluminescência 115

6.3.1 – Optimização da resposta do sistema 115

6.3.1.1 – Estudo prévio dos factores que podem influenciar o sistema 115

6.3.1.2 – Estudo dos factores mais significativos 121

6.3.2 – Características de resposta do sistema optimizado 132

6. 3.3 – Análise das amostras 134

6.4 – COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE OXALATO 138

6.5 - CONCLUSÕES 139

6.6 - BIBLIOGRAFIA 140

7 - CONCLUSÕES 141

APÊNDICE

DETERMINAÇÃO DE OXIDANTES POR FIA COM DETECÇÃO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA 142

A.1 - INTRODUÇÃO 142

A.2 – Estudo dos factores que podem influenciar o sistema 144

A.3 - Bibliografia 150

ABREVIATURAS

A	amostra
ANOVA	análise de variância
b	coeficiente beta
C	concentração inicial de elemento de fluido considerado
C_A	concentração de ácido
C^o	concentração final de elemento de fluido considerado
C_B	concentração d oxalato
CE.Liege	comité europeen de liege
CFA	análise de fluxo segmentado
C_O	concentração de peróxido de hidrogénio
C_{max}	concentração de elemento de fluido correspondente ao max. de pico
D	coeficiente de dispersão
df	graus de liberdade
DMAB	ácido 3-(dimetilamino)benzoíco
DP_B	desvio padrão de b
EDTA	etilenodiaminatetracético
Eind	eléctrodo sanduíche
Em	ligação à terra
F	teste F (razão de Fisher)
FIA	análise por injecção em fluxo
Hpico	altura de pico
L.	liber
Luminol	5-amino-2,3-di-hidroftolazina-1,4-diona
LR	tubo de gradiente
MS	média dos quadrados
MS_{LOF}	estimativa de σ^2 se o modelo escolhido for correcto. Se o modelo não for correcto o MS_{LOF} estima $\sigma^2 + (\text{erro})^2$.
MSR	metodologias de superfície de resposta
MΩ	megaohm
nf	número de factores
nm	nanometros
np	número de pontos experimentais
NP	norma portuguesa
NQA	nível de qualidade aceitável
P	bomba peristáltica
PIB	produto interno bruto
QL	quimioluminescência
Q_T	caudal total
R^2	coeficiente de correlação múltipla
R^2_{aj}	coeficiente de correlação ajustado
s_e^2	variância residual
SQR	soma dos quadrados dos resíduos
SS	soma dos quadrados
SS_{LOF}	soma dos quadrados devido à falta de ajuste
SS_T	soma total dos quadrados
STY	serpentina de tubo TYGON
TCA	tricloroanisole

TFM	tubo fotomultiplicador
Tres	tempo de residência do pico
V_i	volume de injecção
V_R	volume do reactor
λex	limite superior de comprimento de onda necessário para ocorrer a excitação
σ^2	desvio padrão da Gaussiana
k	número de níveis do factor
Λ	condutividade molar
KU	quilo unidades de formação de colonia
W	esgoto
Wpico	largura de pico

1- INTRODUÇÃO

1.1 - GÉNESE DO TRABALHO

A cortiça representa uma valiosa fonte de divisas internas, e sobretudo externas. De modo a termos uma ideia, da importância da cortiça e seus derivados na economia Portuguesa, relativamente à exportação, esta é cerca de duas vezes maior que a exportação do Vinho do Porto, sendo graças a este que ficou a ser conhecida em todo o mundo. Relativamente à economia portuguesa, a industria corticeira portuguesa representa cerca de 3% do PIB nacional [1]. A industria da cortiça portuguesa é caracterizada por um grande número de empresas de pequena a média dimensão, 75% das quais se encontram localizadas na zona de Santa Maria de Lamas, num raio de aproximadamente 10 Km [1].

As rolhas de cortiça são as únicas capazes de fazer uma vedação perfeita e contribuir para o envelhecimento adequado do vinho [2]. Com a produção de rolhas de cortiça, obtinham-se grandes quantidades de desperdícios como subprodutos da manufactura da rolha. Para se conseguir o aproveitamento desses desperdícios, procedeu-se à sua aglutinação com colas específicas, obtendo-se assim outro produto da cortiça, o aglomerado [2].

No entanto, e apesar da importância crescente desta matéria prima, pouco se tem feito para melhorar o seu conhecimento, que remonta ao tempo dos Fenícios e Gregos. Os Romanos, por exemplo, vedavam com rolhas as suas ânforas que transportavam para todo o seu império, que continham as conservas de peixe, vinhos e azeites. Por volta do século III D.C. este método de transporte foi substituído, os Celtas invasores transportavam os vinhos e azeites em barricas que eram vedados com batoques de madeira envoltos em cânhamo ou cabedal, embebidos em azeite, deixando-se de utilizar a rolha de cortiça como vedante, durante cerca de 13 séculos [3].

A meio do século XVI, voltava a rolha de cortiça a ser utilizada, de tal forma que em 1598–1600 quando Shakespeare escreveu a peça "As you like it", uma das suas personagens faz alusão à rolha da cortiça [3].

Em 1681, um abade Francês, debatia-se com problemas de vedação nas garrafas do seu vinho espumante, vedadas com rolhas de madeira, embrulhadas com cânhamo ou cabedal embebidas em azeite, quando se lembrou de utilizar a rolha de cortiça.

D Perignon, assim se chamava o abade e a sua abadia de Hant–Villers, resolveram assim, os problemas do seu vinho, tornando-se o polo de expansão das rolhas de cortiça, no mundo vinícola de então.

A partir de meados do século XVIII, surge um novo método de fabricação utilizado em Inglaterra, que consistia em obter as rolhas por corte dos pedaços de cortiça, com forma cilíndrica, através de um elemento perfurador, tornando as rolhas de cortiça mais resistentes e fiáveis, o que contribuiu para a expansão deste tipo de vedante. Dentro das muitas propriedades da rolha de cortiça, uma das principais, é que estas possuem a capacidade de não deixar escorrer o vinho entre as paredes do gargalo da garrafa e as paredes da rolha, através de um efeito de "ventosa" provocado pelo contacto das células da cortiça (uma rolha tem cerca de 400 milhões de células), com o gargalo de vidro. Tal facto acontece porque quando da brocagem da rolha, as células cortadas da periferia da rolha, têm um efeito de sucção no gargalo, barrando e impedindo a passagem do vinho [3].

1.1.1 - Matéria prima

A cortiça trata-se da casca do sobreiro – *Quercus Suber L.*– que pertence à ampla família das quercíneas, constituída por centenas de variedades presentes em todo o hemisfério Norte [4].

Uma das principais características que distingue o sobreiro de outras árvores da sua família é a grande aplicação do invólucro subceroso do tronco (Fig.1.1) e dos ramos, com importantes propriedades físicas, mecânicas e químicas [4], que a árvore consegue regenerar sucessivamente ao longo da sua vida, permitindo assim a sua extracção cíclica. O sobreiro é uma árvore de aspecto robusto, que em função dos trabalhos de cultura (podas, descortiçamento), pode conseguir um porte majestoso, com uma altura superior a 10 metros, uma circunferência na base do tronco por vezes superior a 5 metros, e uma ramagem que chega a cobrir os 500 metros quadrados [4]. Esta estrutura é suportada por um sistema radicular muito desenvolvido, constituído por uma raiz central vertical, forte e profunda que garante, além da fixação ao solo, a busca de alimentos, bem escassos nos solos pobres característicos do sobreiral.

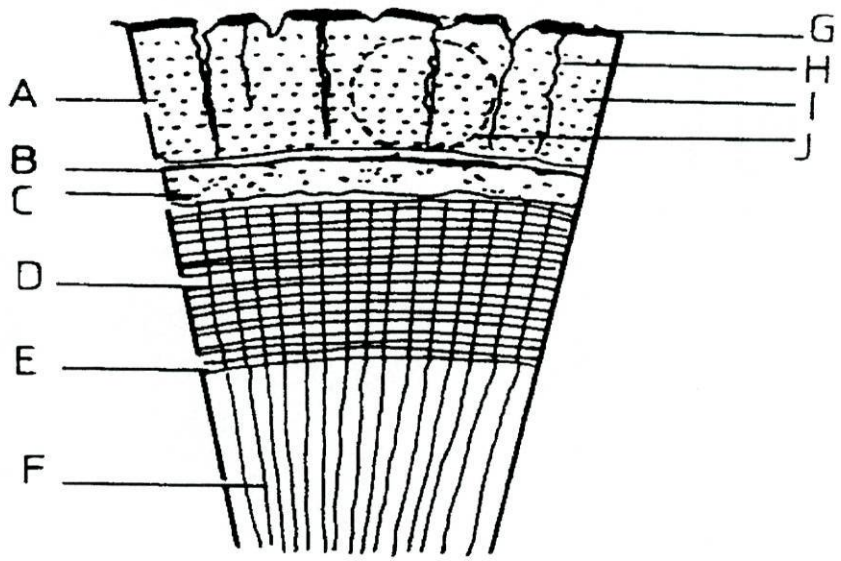


Fig. 1.1 – Representação esquemática de um corte de um tronco de sobreiro: A – cortiça (tecido subceroso); B – câmbio subero-felodérmico; C – feloderme; D – lieber; E – câmbio libero-lenhoso; F - lenho; G – costas; H – lenticelas; I – aneis anuais de crescimento; J – zona de brocagem das rolhas.

1.1.2 - Distribuição do sobreiro

As limitadas exigências climáticas e de solo do sobreiro, conduzem a que o seu descortiçamento em condições propícias e, a renovação espontânea da sua casca, aconteça na grande maioria do território Português, excepto em algumas zonas excessivamente calcárias, e em particular em algumas regiões montanhosas do Norte, onde as temperaturas mínimas no Inverno descem até cinco graus negativos e uma área do Sudeste Alentejano, onde o índice de chuvas anuais é inferior aos quatrocentos milímetros por ano [4].

O seu crescimento efectua-se em terrenos descalcificados, arenosos (com base de granito e areias), com pouca quantidade de azoto e fósforo, ricos em potássio, com pH entre 5 e 6 e com altitude de cem a trezentos metros [2]. Por consequência, a sua distribuição é o resultado da acção humana (ou da falta de acção) que, numa tentativa de tornar rentáveis as explorações agrícolas e florestais, tem deslocado o sobreiro para terrenos mais pobres, onde as outras culturas eram economicamente inviáveis.

Na actualidade, o sobreiro representa cerca de 22% da área florestal portuguesa e, aproximadamente, 8% da área produtiva. O pinheiro é o único que o supera, representando aproximadamente o dobro [5].

Apesar de se desconhecer a evolução da superfície ocupada pelo sobreiro ao longo dos séculos, esta encontra-se confinada à região mediterrânea ocidental (Fig.1.2), e parece indiscutível a redução progressiva da sua extensão [4] e [6]. As razões apontadas indicam principalmente, a utilização de solos para fins agrícolas, frequentemente incompatíveis com a suberícultura, e a substituição destas árvores por outras de crescimento mais rápido e que asseguram maior rentabilidade, como por exemplo o eucalipto. A exploração excessiva tanto no que diz respeito ao descortiçamento como à poda, à pastorícia e à caça; as pragas e enfermidades; e os frequentes períodos de seca que ocorrem nas regiões onde se encontra instalado são outras das razões apontadas para a sua redução.

De modo a ter-se uma ideia da evolução da distribuição do sobreiro em Portugal, representa-se na Fig.1.3, a distribuição provável do sobreiro no século XV, baseado na recompilação de outros documentos históricos, Bernardo [6].

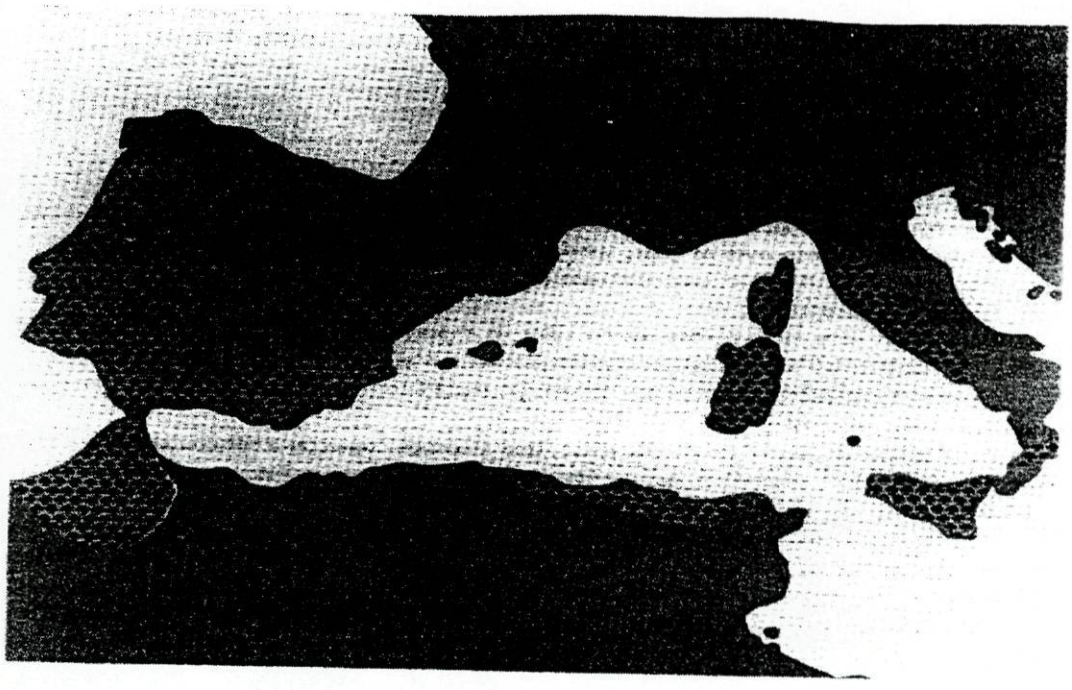


Fig.1.2 – Distribuição do sobreiro na zona Mediterrânea e Atlântica.

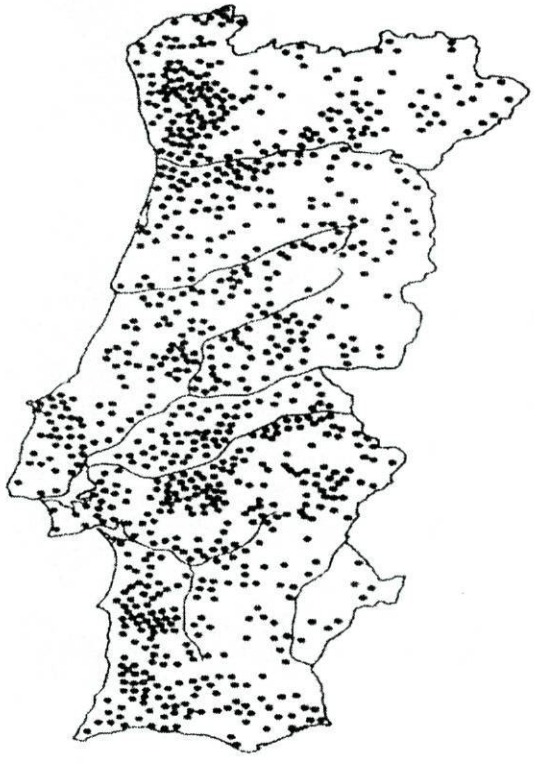


Fig.1.3 - Distribuição provável do sobreiro no território português no século XV.

De trabalhos realizados em meados do século XX sobre a distribuição do sobreiro, elaborou-se um mapa de distribuição da espécie referente ao ano de 1960 apresentado na Fig.1.4.

Pensa-se que a área ocupada pelo sobreiro em Portugal não diminuirá num futuro próximo, podendo inclusivamente aumentar. De acordo com um estudo realizado pela Direcção Geral de Florestas [8] sobre a situação dos sobreirais, concluiu-se que 72,3 % das árvores se encontram em fase jovem, ou de jovem passando a adulta, não havendo aumento da mortalidade.

Por outro lado, verifica-se um incremento dos apoios públicos ao sector corticeiro, permitindo corrigir densidades e fazer face a uma insuficiente regeneração natural, além de promover novas explorações. Finalmente, a defesa do sobreiral parece constituir uma das prioridades, estabelecidas pelas autoridades públicas para a política florestal, tendo sido criado o decreto Lei nº 172 / 88 de 16 de Maio.

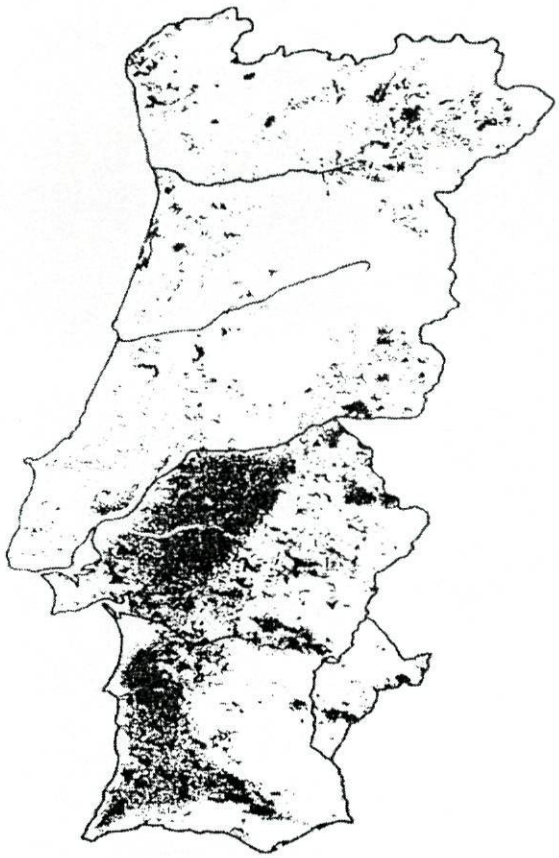


Fig.1.4 - Mapa de distribuição do sobreiro no território português no ano de 1960.

1.1.3 - A exploração do sobreiro

A primeira extracção de cortiça (cortiça virgem) denominada de desboia de valor comercial mínimo, realiza-se quando o sobreiro alcança os quinze ou vinte anos, ou quando o perímetro do tronco, medido à altura de 1,2 m do chão, chega aos setenta centímetros, (decreto de lei nº 1762 / 88, de 16 de Maio). Segundo este mesmo decreto lei, não se pode tornar a extrair cortiça até terem decorrido outros nove anos, momento no qual se pode efectuar novo descortiçamento, obtendo-se a cortiça "secundeira", cuja qualidade não é muito boa. Finalmente nove anos mais tarde (terceiro descortiçamento), decorrido portanto um período que pode ultrapassar os quarenta anos desde o plantio, será extraída a primeira cortiça de reprodução ou amadia. A partir desta altura, o sobreiro de nove em nove anos, fornecerá a preciosa matéria prima durante cerca de 130 a 150 anos, sendo cada sobreiro responsável por 15 descortiçamentos. De acordo com os factores enunciados anteriormente, pode–se constatar que a actividade subericula deve entender-se numa perspectiva de longo prazo (Fig.1.5), já que o retorno económico é tardio [2].

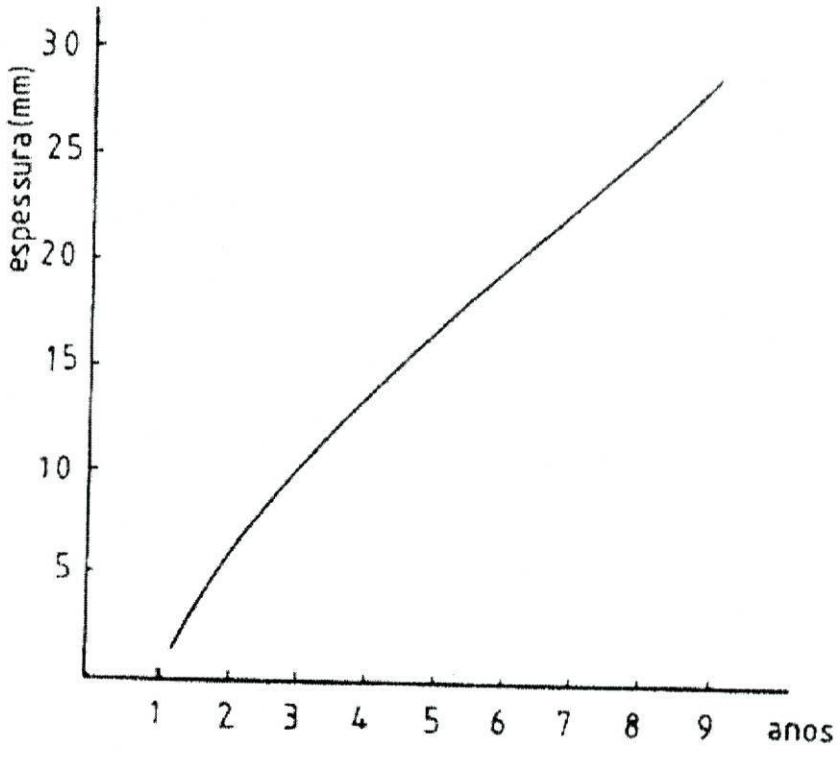


Fig.1.5 – Crescimento médio anual da cortiça.

1.1.4 - Estrutura da cortiça

A cortiça cuja estrutura após exame microscópico [4], foi definida pela Organização Internacional de Normalização, como "parênquima subceroso envolvido por um meristema suberofelodérmico do sobreiro (Quercus Suber L.) constituindo o revestimento do seu tronco e ramos".

Esta definição torna-se importante na medida em que, em outras regiões do mundo, se recorreu a diversas espécies vegetais que apresentam um maior desenvolvimento do seu revestimento para substituir a cortiça em algumas das suas aplicações, mas os esforços monstraram-se infrutíferos e os resultados obtidos ficaram longe dos alcançados pela cortiça.

Nem mesmo tentativas empreendidas no sentido de obter um sucedâneo, mediante processos químicos obtiveram sucesso [4]. Assim, apesar dos países produtores nem sempre lhe dedicarem a atenção devida, a cortiça continua a ser uma matéria prima rara no mundo.

Relativamente ao tecido vegetal que constitui a cortiça, este é formado por micro-células de forma poliédrica de 14 lados, encostadas umas às outras com os espaços intercelulares totalmente preenchidos (contendo uma mistura gasosa parecida com o ar).

A parede celular é constituída por camadas alternadas, de suberina e ceras, conforme se pode observar na Fig.1.6. São as camadas de suberina e ceras que conferem à cortiça a elasticidade característica deste material.

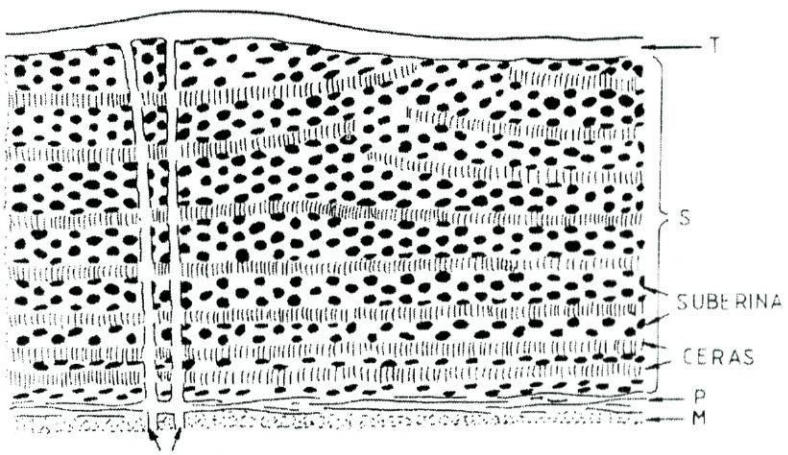


Fig.1.6 - Figura referente à parede celular: M – lamela média; P – parede primária; S – parede secundária; T – parede terciária; P_0 – poros.

1.1.5 - Composição química da cortiça

A cortiça é constituída quimicamente por seis grupos [2]:

Ceroídes – representam cerca de 5 % da cortiça , e são um grupo de baixa polaridade sendo responsáveis pela impermeabilidade;

Taninos – são compostos polifenólicos que podem ser extraídos com solventes polares, representam cerca de 6 % da cortiça;

Suberina – é o grupo maioritário da cortiça, representa cerca de 45 %;

Polisacáridos – representam cerca de 12 %, sendo formados por celulose;

Lenhina – é um poliéster complexo com estrutura desconhecida, representa cerca de 27 %

Constituintes diversos – correspondem a 5% da cortiça e são enumerados na seguinte tabela:

Tabela 1.1 - Composição química da cortiça [2].

Metal	Concentração (%)
Cálcio	0,450
Potássio	0,045
Magnésio	0,025
Ferro	0,015
Sódio	0,010
Zinco	0,003
Manganês	0,003
Cobre	0,001

1.1.6 - Propriedades físicas da cortiça e suas aplicações

A cortiça é formada por milhões de células que contêm, entre trinta e quarenta e dois milhões de células de forma hexagonal protegidas por paredes flexíveis de tecido celulósico, ceras e subcerinas que, lhe permitem uma impermeabilidade quase total à humidade e aos gases [4].

Com um conteúdo de cerca de 90 % de uma mistura gasosa semelhante ao ar, a cortiça trata-se de um material muito leve, apresentando uma densidade de cerca de 0,20. Da sua impermeabilidade e baixa densidade resulta a flotabilidade, propriedade que explica a sua utilização milenária nas artes da pesca [2].

A sua estrutura celular, garante as propriedades fundamentais de compressíbilidade e elasticidade, sendo a sua principal aplicação as rolhas de cortiça. Por exemplo, quando a cortiça é submetida à pressão, o ar contido nas células comprime-se permitindo a redução de volume, mas quando se liberta a pressão recupera cerca de 97 % do seu volume inicial.

A compressão sem dilatação lateral, trata-se de uma propriedade única, já que não existe em nenhum outro material, sendo importantíssima para o fabrico de juntas [2]. A cortiça é considerada um dos melhores isolantes, tanto térmico como vibrátil. Esta propriedade adicionada à de não absorver humidade, ser higiénico, inodoro, imputrescível resistente ao fogo [4], fazem da cortiça um material especialmente apropriado para a industria de construção, permitindo a sua aplicação em áreas tão diversas como a industria automóvel, aeronáutica e eléctrica. A boa resistência à fricção e a sua leveza, fazem da cortiça uma matéria prima para a industria do calçado, artigos desportivos e objectivos decorativos.

Além do que foi referido anteriormente, o facto da cortiça ser um material não tóxico aliado ao facto de ser resistente à humidade, permite a sua aplicação como vedante, sendo utilizado, em particular pela industria corticeira no fabrico de rolhas, sobre as quais incide esta dissertação.

1.1.7 - Alterações biológicas e estruturais da cortiça

A cortiça por ser um produto natural, está sujeito a uma série de "alterações" ou "defeitos" provocados por fenómenos genéticos e pelo meio ambiente, que condicionam para determinados fins, a sua utilização. A tabela seguinte, menciona os nomes tradicionais das alterações mais correntes, encontradas na cortiça com a respectiva definição [1].

Tabela 1.2 – Alterações biológicas e estruturais da cortiça

Alteração	Definição
Verde	Nódulos com humidade superior a 400 %
Marmoreado	Contaminação com fungos de coloração azul
Manchitas de mosca	Manchas cinzento-escuro
Prego	Células de esclerenquima
Bofe	Canais lenticulares alargados
Terra	Conteúdo pulverulento em canais lenticulares
Entrecasco	Camadas de floema aderentes ao ventre
Esfoliação	Adesão incompleta entre camadas
Insecto	Ataque de insecto ou larva no tecido subceroso produzindo galerias
Mancha amarela	Descoloração de tecido, bolor específico

1.1.8 - Produtos de cortiça

Tradicionalmente, dividem-se em três grupos os produtos obtidos da cortiça por simples corte, granulado e aglomerados. Estes últimos dividem-se em puros ou negros e compostos [9].

Os produtos obtidos por corte, têm como ponto de partida a prancha (cortiça já fervida e preparada), e são constituídos essencialmente, por produtos destinados ao tamponamento de líquidos, donde sobressaem as rolhas e discos em cortiça natural, permitindo além disso a fabricação de papel de cortiça e de ampla variedade de artigos de artesanato. As rolhas de cortiça podem distinguir-se em naturais e aglomeradas obtidas através dos granulados de cortiça

Relativamente às rolhas de cortiça natural tratam-se, de elementos vedantes, indispensáveis à conservação do vinho, pelo que deixam o vinho respirar através de canais microscópicos denominados de "plasmadesmos". Estes canais intercelulares, que atravessam as células de cortiça, deixam entrar ou sair ar da garrafa, conforme a temperatura dentro e fora da garrafa e da pressão exercida, fazendo trabalhar mais ou menos depressa os microorganismos que transformam o vinho numa bebida apetecível (processo de vinificação).

O processo de vinificação evolui ao longo dos anos, sendo melhoradas as qualidades sápidas e organoléticas do vinho, quando a sua respiração é controlada, de modo que os bons microoganismos trabalhem num ambiente ideal, promovendo o seu envelhecimento adequado [3].

Ainda relativamente às rolhas naturais, é possível classificá-las em sete classes: Extra,1ª,2ª,3ª,4ª,5ª e 6ª. Esta classificação é efectuada após apreciação óptica, tendo em conta o número de poros e a sua área [3].

Os granulados resultam da trituração dos desperdícios da industria rolheira e da cortiça virgem. Classificam-se [6] em várias dezenas de categorias em função da sua granulometria e da massa volúmica. Além disso, podem ser usados como isolantes térmicos e acústicos e para o acondicionamento de produtos frágeis, sendo a sua utilização fundamental, servir de matéria prima à industria de aglomerados.

Os aglomerados obtêm-se a partir da aglutinação dos granulados. A aglutinação pode conseguir-se, com as próprias matérias resinosas da cortiça submetendo-o ao calor e pressão, de onde resulta o chamado aglomerado puro ou negro, ou através de algum tipo de cola, resultando aglomerados compostos. Os primeiros são utilizados sobretudo como

isolantes térmicos acústicos, e vibráteis, artigos desportivos, decorativos, revestimento, calçado, juntas de dilatação, estanquícidade e muitos outros. Os segundos podem ser utilizados na produção de rolhas aglomeradas. Estas rolhas são produzidas artificialmente, existindo diversos tipos, as rolhas simplesmente aglomeradas, a rolha 1+1, ou seja, com o corpo de cortiça aglomerada e os topos de cortiça delgada natural, no sentido do comprimento da rolha e coladas entre si [3]. De seguida, apresenta-se na Fig.1.7 a distribuição dos diferentes tipos de cortiça para cada fim específico.

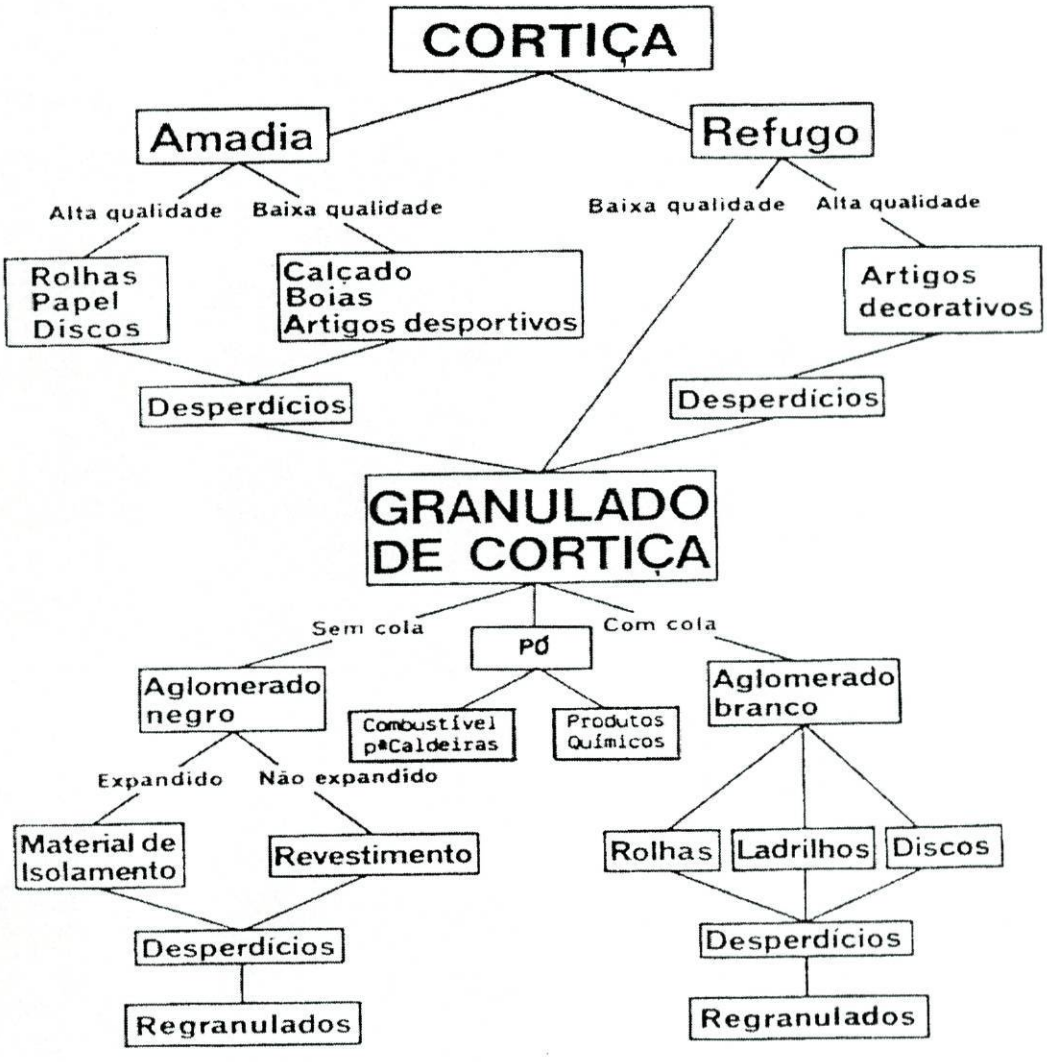


Fig. 1.7 – Distribuição dos diferentes tipos de cortiça para cada fim específico.

1.1.9 - Processo de transformação de cortiça em rolhas

O processo de transformação de cortiça em rolhas, que é referido de seguida, baseia-se no Código Internacional de Práticas Rolheiras, desenvolvido pelo C.E.Liège, em 1994, com o objectivo de uniformizar e qualificar os processos de transformação da cortiça, desde a produção à venda da rolha. A implementação do Código junto das empresas confere-lhes um grau de certificação concedido pelo C.E.Liège, e reconhecido pelos clientes finais como garantia de qualidade do produto [3].

A actividade preparadora inicia-se com a compra da cortiça no monte, à qual se segue um período de secagem para estabilizar a matéria prima que, de acordo com o Código Internacional de Práticas Rolheiras, deverá alcançar os seis meses [10].

A fase seguinte é o cozimento da cortiça em caldeiras, que permite dar mais elasticidade e incrementar a sua espessura, eliminando as substâncias solúveis em água, como os polifenólicos pigmentados, e outras impurezas (fungos e insectos). Esta operação consiste na imersão dos pedaços de cortiça, em água em ebulição durante cerca de 1 hora e 30 minutos. Após esta operação, a cortiça permanece em estabilização podendo ou não ser sujeita, a um novo processo de cozedura durante cerca de 30 minutos, seguindo-se um período de estabilização.

De seguida, os pedaços de cortiça são cortados em pranchas, o que facilita a sua classificação em função do calibre e qualidade [2]. As pranchas de cortiça são empilhadas e secam durante um período de quatro semanas [10], durante o qual perdem parte da sua humidade e se tornam mais planas, facilitando a posterior perfuração. Procede-se de seguida ao enfardamento das pranchas, que constituem a matéria prima da actividade transformadora. Das operações de selecção e recorte, sai o refugo e aparas que se destinam à actividade granuladora.

A actividade transformadora, inicia-se após 3 a 4 semanas de estabilização após cozedura, na qual as pranchas serão sujeitas a operações mecânicas destinadas à produção de rolhas. Esta etapa, inicia-se cortando a referida prancha em tiras ou "rabanadas" que serão perfuradas de seguida (brocagem), dando origem às rolhas de cortiça natural, com forma cilíndrica e de distintos diâmetros e tamanhos, em função da altura da tira de cortiça [2]. Procede-se de seguida à etapa de rectificação que consiste, em proceder ao acerto dimensional que engloba as operações de ponçagem, topetagem e eventualmente de chanfragem [10].

A operação de escolha é efectuada de seguida, fazendo-se a selecção para definir por atributos a classe de rolhas, operação que em algumas empresas, é efectuada por meios optoelectrónicos e complementada por uma inspecção visual, ou efectuada manualmente [10]. Depois de seleccionadas, as rolhas entram em fase de acabamento, da qual se destaca a "lavação", de modo a limpar a rolha e eliminar possíveis micoorganismos, que podem ser responsáveis pela deterioração do vinho.

A etapa de "lavação" trata-se de um processo, que pode ser efectuado com água, para desempoeirar as rolhas, e de seguida com desinfectantes com o objectivo de limpar e desinfectar as rolhas. Os desinfectantes utilizados podem ser [10]:

- o cloreto de cal ou hipoclorito de cálcio, seguido de banho de ácido oxálico, que apresenta a desvantagem de deixar resíduos tóxicos (compostos clorados e oxalatos);
- os peróxidos (água oxigenada), sendo o mais utilizado apresenta a prescrição de que a quantidade de resíduo por rolha não deve ser superior a 0,2 mg/rolha;
- o ácido sulfâmico;
- o metabissulfito (solução de SO_2).

Os dois últimos desinfectantes citados, apresentam o inconveniente de serem insuficientes para assegurar uma boa limpeza, devido a não serem activos em todos os microorganismos, e é por esta razão que são os menos utilizados na prática [10].

Relativamente às rolhas que são objecto de estudo nesta dissertação, na etapa de "lavação" o desinfectante utilizado foi o peróxido de hidrogénio, sendo esta etapa complementada com uma secagem controlada das rolhas, para que a humidade das mesmas se situe entre os valores especificados, de modo a impedir o desenvolvimento bacteriano.

As rolhas podem passar ainda, por outros tratamentos, como a coloração através da sua imersão num banho de corante, com o objectivo de uniformizar a cor das rolhas; a colmatagem, que consiste em obturar os poros na superfície das rolhas com uma mistura de pó de cortiça e colas, com o objectivo de melhorar a apresentação e obter uma melhor estanquicidade no engarrafamento; a parafinagem, que consiste em depositar na superfície das rolhas uma película de parafina, com o objectivo de lubrificar a superfície das rolhas e também de melhorar a estanquicidade, ou siliconagem, que consiste em depositar na superfície da rolha de uma camada de silicone que permite, além de lubrificar a superfície da rolha, facilitar o engarrafamento e a extracção; aplicação de um revestimento corado, de

modo uniformizar a cor e tornar a obturação mais estanque; e por fim a marcação, para escrever o nome do fabricante ou engarrafador [2].

De seguida representa-se na Fig.1.8 o fluxograma do processo produtivo das rolhas que são analisadas nesta dissertação, que exemplifica o processo industrial de transformação da cortiça em rolhas.

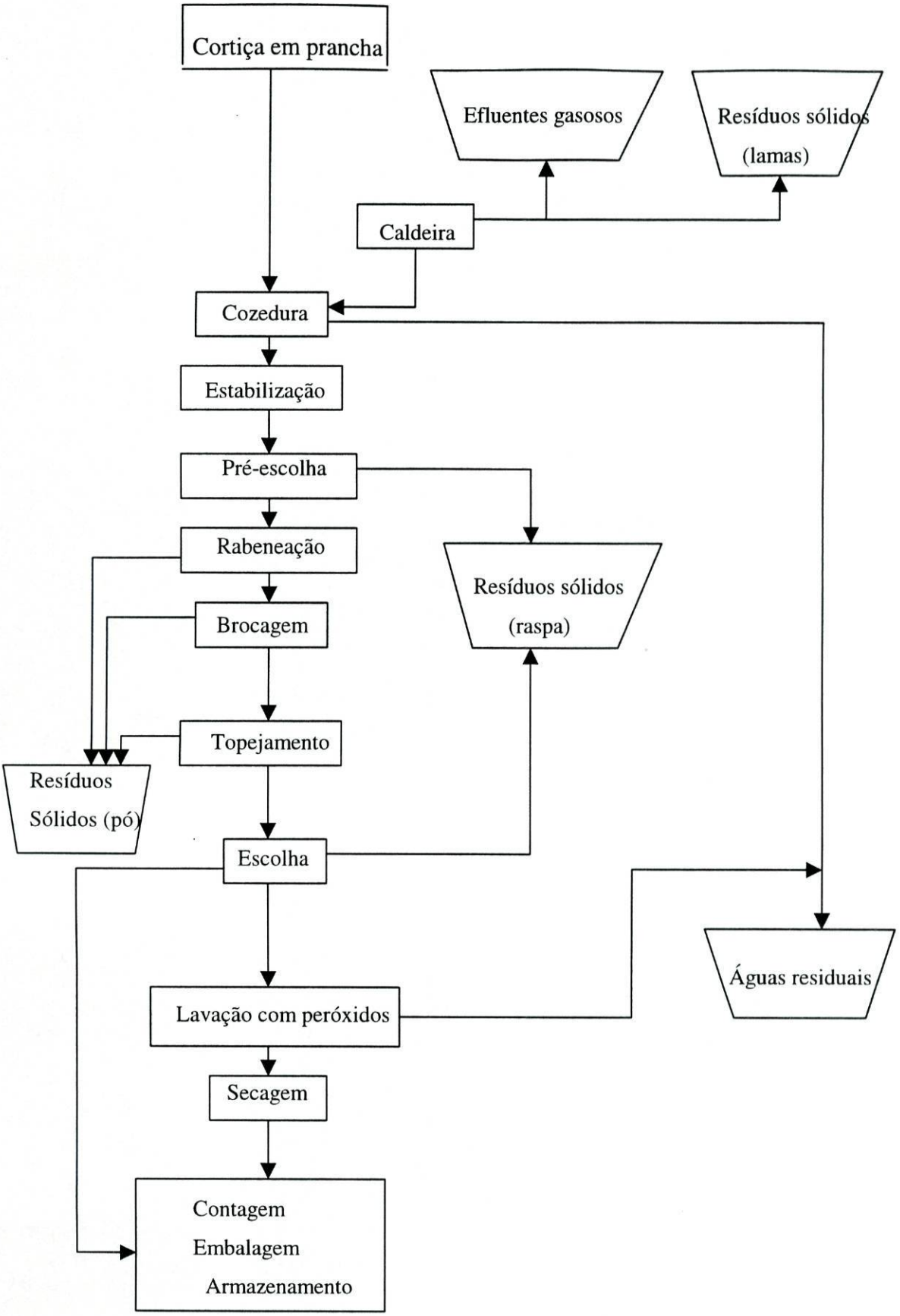


Fig.1.8 – Fluxograma do processo produtivo.

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIBLIOTECA

1.1.10 - Controlo de qualidade

A rolha de cortiça ocupa um lugar privilegiado como vedante, tornando-se portanto fundamental um controlo de qualidade sistemático e eficaz, quer na industria corticeira (durante a produção e no produto acabado), quer em casa do cliente onde por vezes por controlos fáceis de executar, se poderão evitar muitos problemas.

O cliente é que impõe, através de contrato com o produtor, a qualidade ou um conjunto de requisitos fundamentais para que o negócio seja efectuado [2]. Neste sentido, surge a necessidade de implementar medidas e métodos, para efectuar o controlo de qualidade das rolhas de cortiça, que pode ser dividido em três partes: análise da "qualidade visual"; análises físico-químicas e análises microbiológicas. No entanto e apesar da importância do controlo dos parâmetros químicos, as normas referentes às metodologias de análise são escassas ou mesmo inexistentes.

O processo de transformação das rolhas, exige especial atenção, tanto por parte dos industriais como por parte dos clientes, porque se trata de um material, que se encontra em contacto com um produto alimentar, podendo ser responsável pela introdução no vinho de produtos tóxicos [1], surgindo assim, a necessidade de controlar a concentração de resíduos da rolha. Nesta dissertação, far-se-á a análise de alguns parâmetros químicos, nomeadamente o controlo dos oxidantes, cloretos e oxalatos através de métodos químicos distintos.

1.1.10.1 – Oxidantes

A importância de controlar os parâmetros oxidantes, no produto acabado rolhas de cortiça, advém do facto de que estes em contacto com o vinho, poderem interferir no equilíbrio dos seus sistemas oxido-redutores. Os oxidantes influenciam a relação entre formas oxidadas e reduzidas, que caracterizam o nível mais ou menos oxidado do vinho, afectando as suas características redutoras, contribuindo desta forma para a sua oxidação e deterioração precoce [11]. A presença de oxidantes nas rolhas de cortiça, pode ter como origem, o processo de "lavação".

Os níveis admissíveis de concentração de oxidantes em extractos de rolhas de cortiça, estipulados pelo Código Internacional de Práticas Rolheiras é de 0,2 mg/l [10].

1.1.10.2 - Cloretos

A importância do controlo de qualidade do parâmetro cloretos está relacionada, em parte, com a política de descredito fomentada pelos fabricantes de rolhas artificiais em relação às rolhas de cortiça, devido à formação nas rolhas de uma substância vulgarmente designada por TCA, responsável pela eventual deturpação do sabor do vinho. Nos últimos anos, e apesar do crescimento da industria corticeira portuguesa, esta política de descredito, associada ao facto de as rolhas sintéticas se apresentarem de uso mais fácil por parte dos clientes, vem sendo responsável, por um aumento na quota de mercado portuguesa das rolhas sintéticas, especialmente de plástico [1].

O TCA é a abreviatura do composto 2,4,6-tricloroanisole, esta substância química, pode estar presente no ar, nos vegetais, nas madeiras, no vinho, na água e por vezes na rolha de cortiça [11]. A origem do TCA na cortiça, pode estar relacionada com a presença de cloretos, porque estes podem reagir com os compostos fenólicos da matriz da cortiça, produzindo compostos organoclorados, que actuam como percursores do 2,4,6-tricloroanisole [12].

A presença do TCA detecta-se, por análise organoléptica aos vinhos obturados com rolhas de cortiça, sendo identificada como "gosto a rolha", a mofo ou a bolor.

No sentido de estudar o problema dos gostos e aromas, foi desenvolvido um projecto comunitário, denominado QUERCUS ,em oito laboratórios europeus, nacionais e estrangeiros [11]. Segundo este estudo [11], os cloretos podem ter como origem várias fontes, tais como, produtos utilizados na desinfecção da rolha (constituídos por cloreto de cal/ácido oxálico), que desde à alguns anos caíram em desuso, ou poderão provir da própria água de abastecimento, pelo que deve ser do interesse dos fabricantes controlar este parâmetro, na água de abastecimento do processo.

Durante a fase de transformação da cortiça em rolha, as condições da água de cozedura, as condições de estabilização e duração pós cozedura, método de tratamento de superfície e o tipo de lubrificação, podem também contribuir para o aparecimento de cloretos.

Por outro lado, no mesmo estudo efectuado, constatou-se que existem alguns defeitos da cortiça que podem estar associados` a presença de TCA, como por exemplo a mancha amarela [11]. Segundo este estudo [11], as rolhas fabricadas a partir de cortiça com mancha amarela, apresentavam elevados índices de TCA, concluindo-se que a qualidade das rolhas poderia ser influenciada, pela qualidade original das pranchas.

Outra explicação plausível para o aparecimento de TCA nas rolhas, é que se as rolhas com clorofenois em níveis elevados, forem mal processadas ou armazenadas, podem ser contaminadas por certos tipos de bolores, e sob condições particulares, pode ocorrer a conversão para cloroanisois, responsáveis pela formação de gosto. No entanto, no mesmo estudo, não se conseguiu concluir acerca da relação entre a existência de bolores e a formação de TCA [11].

Ainda relativamente à origem dos cloretos, estudos efectuados anteriormente, conduziram à conclusão de que as rolhas produzidas a partir de cortiça, proveniente da base do sobreiro, cortiça que se encontrava em contacto com o solo, apresentavam maiores índices de TCA, quando comparadas com outras produzidas a partir de cortiça proveniente de zonas mais altas do sobreiro. Tal facto, deve-se a que o próprio sobreiro apresenta níveis mais elevados de TCA na base, o que pode ser devido ao efeito de lixiviação/lavagem da água pluvial, relacionado com a poluição atmosférica [11].

Pelo que já se referiu anteriormente, torna-se fundamental, no sentido de evitar o aparecimento de TCA, o controlo do parâmetro concentração de cloretos e a respectiva análise.

1.1.10.3 - Oxalatos

Relativamente ao parâmetro oxalato, trata-se de uma substância química, tóxica para o organismo humano, sendo responsável pela formação de sais de oxalato de cálcio, que por precipitação originam cálculos renais e urinários [13], pelo que se torna fundamental, o controlo da sua concentração em qualquer produto, que possa eventualmente se encontrar em contacto com alimentos.

Relativamente à proveniência do oxalato, este pode ter como origem o processo de lavação, que pode ser efectuado com produtos à base de oxalatos (ácido oxálico), como é referido no Código Internacional de Práticas Rolheiras [10]. No entanto, e apesar da importância crescente do controlo deste parâmetro, ainda não existe legislação nem normalização acerca do seu controlo.

1.2 - OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo global do presente trabalho é implementar técnicas de análise química de pesquisa de contaminantes de rolhas de cortiça, concretamente, o anião cloreto, o anião oxalato e os oxidantes. Para além da implementação de metodologias de pesquisa baseadas em normas, serão implementadas novas metodologias baseadas em técnicas potenciométricas (pesquisa de anião cloreto) e de quimioluminescência (pesquisa de anião oxalato e oxidantes).

A estratégia de desenvolvimento de novas metodologias de análise é a de desenvolver técnicas facilmente automatizáveis que possibilitem a análise de muitas amostras por hora com um mínimo tempo de operador especializado necessário. Atendendo a esta estratégia a técnica de análise por injecção em fluxo (FIA) foi a escolhida para este trabalho.

Efectuar-se-á uma análise preliminar da possibilidade de implementação das novas técnicas de pesquisa em laboratórios de controlo de qualidade de indústrias de rolhas de cortiça.

1.3 - ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Além deste **capítulo introdutório**, esta dissertação compreende um **segundo capítulo**, onde se descreve a preparação de soluções, equipamentos e procedimentos experimentais gerais utilizados; um **terceiro capitulo**, onde se apresentam os fundamentos teóricos que serviram de base à realização do trabalho; um **quarto capítulo**, onde se descrevem as normas implementadas para a análise de oxidantes e cloretos; **um quinto** e **sexto** capítulos onde se apresentam os resultados experimentais, a respectiva discussão e conclusão, relativamente aos métodos utilizados para análise de cloretos e oxalatos; e um **sétimo** capítulo onde se apresentam as conclusões globais do trabalho realizado. Por último, em anexo, apresentam-se os resultados obtidos num estudo preliminar de um método para a determinação de oxidantes baseado num sistema de fluxo com detecção de quimioluminescência.

1.4 - BIBLIOGRAFIA

1. Johanna Andréasson & Veronika Rundkvist, *"As rolhas e a inovação- Um estudo sobre a Industria rolheira Portuguesa"*, Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial da FEUP (2000).

2. António Vasconcelos Lima e Alberto Gomes Castro- cap.II – " A Cortiça".
" *Ciência e Tecnologia dos Materiais* " Universidade de Trás os Montes e Alto Douro (1980).

3. Boletim Informativo da Associação de Produtores Florestais do Vale do Sado (ANSUB): *Rolha de Cortiça passado, presente e futuro*, nº 2, 6º ano (2001).

4. Natividade, J., *Subericultura*, Imprensa Nacional – Casa da moeda, 2ª edição, Lisboa (1990).

5. Direcção Geral de Florestas: *Distribuição da Floresta em Portugal Continental*, Estudos e Informação, nº 303, Lisboa (1993).

6. Sampaio, J. : *À la recherche d` une politique économique pour le liège au Portugal* vol.I e II, Tesis doctoral, Paris – Sorbonne (1972).

7. Babot,J.: *Los alcornocales em Cataluna. Atuaciones de la generalitat para su conservación e mejora,* Simpósio mediterráneo sobre regeneracion del monte alcornocal, Instituto de Promoción del corcho, Mérida (1994).

8. Direcção geral de Florestas : *Inventário Florestal do sobreiro*, Estudos e Informação, nº 300, Lisboa (1990).

9. Gil, L. : *Cortiça – Tecnologia de processamento e constituição química*, Lab. Nacional de Eng. e Tecnologia Industrial, 2ª edição, Lisboa (1989).

10. Confederation Européene du Liège, *Código Internacional de Práticas Rolheiras*, edição Portuguesa – Maio 1997.

11. Centro Tecnológico da Cortiça: *Estudo Comparativo Rolhas de Cortiça vs Vedantes Sintéticos*, Relatório Final (1997).

12. Centro Tecnológico da Cortiça *: CTCOR magazine,* Julho (1997).

13. E.Koster, in H.Brusckke (Ed.), *Handbuch der Inneren Erkrankungen*, vol.2, Fisher, Jena, pp.250 – 262 (1991).

2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados os procedimentos experimentais, utilizados neste trabalho, relativamente aos métodos de análise da concentração de oxidantes, cloretos e oxalatos em rolhas de cortiça, descritos em alíneas distintas. A origem e colheita das rolhas encontra-se descrita na alínea 2.1. A preparação de todas as soluções, o material e o equipamento utilizado e a montagem dos sistemas, estão descritos respectivamente nas alíneas 2.2 e 2.3. Os procedimentos experimentais referentes à optimização e avaliação da resposta dos sistemas encontram-se descritos na alínea 2.4. Por último, na alínea 2.5 são referidos os programas utilizados para efectuar os cálculos.

2.1 - ORIGEM E AMOSTRAGEM DE ROLHAS

As rolhas analisadas foram recolhidas na empresa J.J. Ferreira dos Santos Lda, tendo sido efectuada a colheita de amostras de acordo com a norma NP–2922/1996 (descrita no capítulo 4), com nível de inspecção S-2. O acondicionamento das amostras foi efectuado em recipientes apropriados, limpos, secos, estanques e devidamente selados.

As rolhas que são objecto de estudo nesta dissertação, na etapa de "lavação" do processo de fabrico (ver figura 1.8) foram utilizados apenas peróxidos.

Na tabela 2.1 encontram-se resumidos os diversos tipos de rolhas analisadas ao longo do trabalho e a definição respectiva.

Tabela 2.1 – Definição dos tipos de rolhas analisadas.

Categoria	Definição
Rolha natural	Peça cilindrica de cortiça natural de espessura e diâmetro variáveis, obtida por brocagem a partir das pranchas cortadas em "rabanadas".
Rolha aglomerada	Peça cilíndrica de cortiça aglomerada, obtida por extrusão ou moldagem individual.
Rolha colmatada	Rolha de cortiça natural na qual são obturados os poros com uma mistura de pó de cortiça e colas.
Rolha natural corada	Rolha natural que sofre imersão num banho com corante.
Rolha colmatada corada	Rolha colmatada que sofre imersão num banho com corante.
Rolha natural timbrada	Rolha natural que sofre impressão do nome do fabricante ou produtor.

2.2 - REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho eram de qualidade p.a, salvo quando indicado em contrário. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada com resistividade superior a 4 $M\Omega.cm^{-1}$, utilizando material de vidro de classe A. As particularidades de cada solução encontram-se descritas em pormenor em cada secção.

2.2.1 - Determinação de Cloretos

2.2.1.1 - Solução de etanol a 12 %

Mediu-se um volume de 240 mL de álcool etílico absoluto, colocou-se num balão de 2 L de capacidade e ajustou-se o volume com água desionizada. Esta solução foi utilizada para a preparação dos extractos das rolhas utilizados na determinação de cloretos e para a preparação das soluções de cloreto utilizadas para a calibração do sistema.

2.2.1.2 - Soluções de transportador no sistema de FIA

Foi preparada uma solução de nitrato de potássio 0,1 M por pesagem de 10,10 g do sal e dissolução em 1 L de água desionizada.

Também foi preparada uma solução padrão de nitrato de prata 0,1 M a partir de uma ampola de Tritisol (Merck). As soluções de transportador foram preparadas a partir desta solução padrão de nitrato de prata, por diluição com a solução de nitrato de potássio 0,1 M.

2.2.1.3 - Soluções de cloreto de sódio

Procedeu-se à pesagem de 0,585 g de cloreto de sódio previamente condicionado em estufa e dissolveu-se em água desionizada, num balão volumétrico, até volume final de 100 mL. A partir desta solução padrão foram preparadas soluções padrão de cloreto de sódio por diluição com solução alcoólica a 12 %, preparada pelo processo descrito em 2.2.1.1.

2.2.2 - Determinação de Oxalatos

2.2.2.1 - Soluções padrão de oxalato

Preparou-se uma solução padrão de oxalato 14,89 mM. Para o efeito foram pesadas 1,34 g de ácido oxálico e dissolvidas em 1 L de água desionizada. A partir desta solução padrão foram preparadas duas soluções 1,94 e 1,49 mM em oxalato por diluição com água desionizada. Estas soluções foram utilizadas para o traçado da curva de calibração do método enzimático As soluções padrão de oxalato utilizadas no método de quimioluminescência foram preparadas por diluição a partir da mesma solução concentrada de oxalato e foram aciduladas por adição de ácido clorídrico concentrado.

2.2.2.2 - Soluções para a determinação enzimática do oxalato

Todos os reagentes utilizados para a determinação enzimática do oxalato eram da Sigma Diagnostics, St. Louis, Mo 63178 e constituem o kit (cat. Nº 591 – 20) que consiste dos seguintes reagentes [1]:

Solução diluente da amostra: EDTA (10 mmol/L) e estabilizantes. Este reagente é fornecido pela Sigma, sob a forma de um pó, sendo preparado por diluição com 100,00 mL de água desionizada. A solução obtida é estável durante uma semana à temperatura ambiente (18 – 26 ° C), e durante 3 meses quando guardada no frigorífico.

Purificador da amostra: carvão activado (300 mg / tubo). Este material é fornecido em tubos de ensaio prontos a utilizar.

Reagente oxalato A: ácido 3 – (dimetilamino)benzoíco (DMAB 3,2 mmol/L); 3 – metil – 2 – benzotiazolinona hidrazona (MBTH 0,22 mmol/L); tampão (pH 3,1 ± 0,1); estabilizantes e constituintes não reactivos. A preparação deste reagente, consiste em adicionar 10,00 mL de água desionizada e agitar até dissolver.

Reagente oxalato B : enzima oxalato-oxidase (> 3 KU/L); peroxidase (100 KU/L). A preparação deste reagente, consiste em adicionar 2,00 mL de água desionizada e agitar até dissolver.

As soluções de reagente A e reagente B podem ser conservadas durante um dia à temperatura ambiente (18 – 26 ° C). Se forem conservadas em frigorífico (2 – 6 °C). Não sofrem alteração apreciável durante cerca de um mês.

2.2.2.3- Soluções para a determinação de FIA com detecção de quimioluminescência

Foi preparada uma solução de bis-cicloexilcarbodiimida por pesagem de 5,7 g do sólido e dissolução em 100 mL de etanol. A partir desta solução foram preparadas as restantes soluções deste reagente por diluição numa solução com 50 mg/L de difenilantraceno em etanol.

As soluções de peróxido foram preparadas por diluição a partir de solução de peróxido a 30%.

2.2.3 – Determinação de oxidantes

2.2.3.1 - Soluções de transportador no sistema de FIA

Foi preparada uma solução de carbonato de sódio por pesagem de 10,599 g deste sal que se dissolveu em 1 L de água desionizada. A partir desta solução foram preparadas soluções tampão de pH por adição de solução de HCl 0,2 M ou de solução de NaOH 0,1 M até ajustar o valor do pH da solução ao valor pretendido. O valor do pH destas soluções foi controlado com um eléctrodo de vidro previamente calibrado.

Foi também preparada uma solução de luminol $3x10^{-3}$ M por pesagem de 0,53 g de luminol e dissolução em 1 L de água desionizada.

As soluções de luminol utilizadas no sistema de FIA foram preparadas por diluição rigorosa desta solução, utilizando como matriz as soluções tampão de carbonato 0,1 M.

As soluções de cobalto utilizadas no sistema de FIA foram preparadas por diluição rigorosa em água desionizada de uma solução de cobalto $1,24x10^{-3}$ M preparada por pesagem de 0,295 g de cloreto de cobalto com seis moléculas de água e dissolução em água desionizada até volume final de 1 L.

2.2.3.2 - Soluções de peróxido de hidrogénio

Foi preparada uma solução de peróxido de hidrogénio 10^{-3} M a partir de H_2O_2 a 30 %, para o efeito foram medidos 2840 µL desta solução e diluídos rigorosamente com água desionizada até volume final de 250 mL. A partir desta solução foram preparadas soluções de concentração inferior, por diluição com a solução de álcool etílico a 12 %. Estas soluções foram utilizadas para efectuar a calibração do sistema.

2.3 MATERIAL, EQUIPAMENTO E MONTAGEM DOS SISTEMAS

2.3.1 Equipamento e Material

Foi utilizado o seguinte material e equipamento:

Tubo fotomultiplicador (TFM): as medições de quimioluminescência foram efectuadas por um TFM de marca Hamamtsu (Bridgewater, NJ), referência HCl135-01, controlado por computador através de interface RS-232-C cuja aquisição de dados pode ser feita com um tempo de integração entre 0,01 e 0,1 segundos por leitura na gama de comprimentos de onda de 300 a 650 nm.

Células de quimioluminescência: foram utilizados tubos de Tygon® referência R3603 com diâmetro interno de 1 mm e diâmetro externo de 2 mm, enrolado em forma de serpentina e colocado em frente da janela do tubo fotomultiplicador. O comprimento do tubo da serpentina que constitui a célula é 51 cm.

Eléctrodos selectivos de iões: para a medição dos valores de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro de marca Crison. Para a pesquisa de cloreto foi utilizado um eléctrodo de fluxo, de configuração sanduíche [3], com membrana cristalina de sulfureto de prata. As pastilhas de sulfureto de prata (membranas sensoras) eram constituídas por 0,5 g de sulfureto de prata e tinham um diâmetro de 12 mm.

Eléctrodos de referência: para a medição dos valores de pH foi utilizado um eléctrodo de referência de prata/cloreto de prata com dupla junção de marca Crison . Para a pesquisa de cloreto também foi utilizado um eléctrodo de referência de prata/cloreto de prata com dupla junção de marca Orion referência 90-02-00.

PH-metro: Para a medição dos valores da diferença de potencial nas determinações do pH de soluções foi utilizado um pH-metro de marca Crison modelo micropH 2002.

Sistema de aquisição dos valores da diferença de potencial: Os valores da diferença de potencial no sistema de fluxo para a pesquisa de cloreto foram adquiridos através de um sistema automático constituído por uma caixa de circuitos de elevada impedância de

construção local, acoplada ao conversor analógico-digital de uma placa multifunção modelo Lab Master DMA de marca Scientific Solutions, instalada num computador de marca Compaq modelo Prolinea 325s.

Espectrofotometro: para as medições de absorvancia foi utilizado um espectrofotometro de marca UNICAM, modelo Helios γ.

Bombas Peristálticas: para a propulsão das soluções foram utilizadas bombas peristalticas de marca Gilson, modelo Minipuls 3, com a possibilidade de colocação de 4 tubos de fluxo da mesma marca.

Válvula de Injecção: a injecção das amostras foi efectuada através de uma válvula de injecção de marca Rheodyne, referência 5020.

Tubos de Fluxo: para a montagem dos sistemas foram utilizados tubos de Teflon ® (PTFE) de marca Omnifit com 0,8 mm de diâmetro interno.

2.3.2 Montagem dos Sistemas de Fluxo

2.3.2.1 - Sistema para a determinação de cloretos

No sistema para determinação de cloretos, que se encontra esquematizado na figura 2.2, a amostra (A na figura) é injectada num fluxo de solução padrão de nitrato de prata em nitrato de potássio 0,1 M, passa por um tubo de gradiente (L_R) em que ocorre a reacção entre os iões cloreto e prata e, por último, passa pelo eléctrodo sanduíche (E_{Ind}).

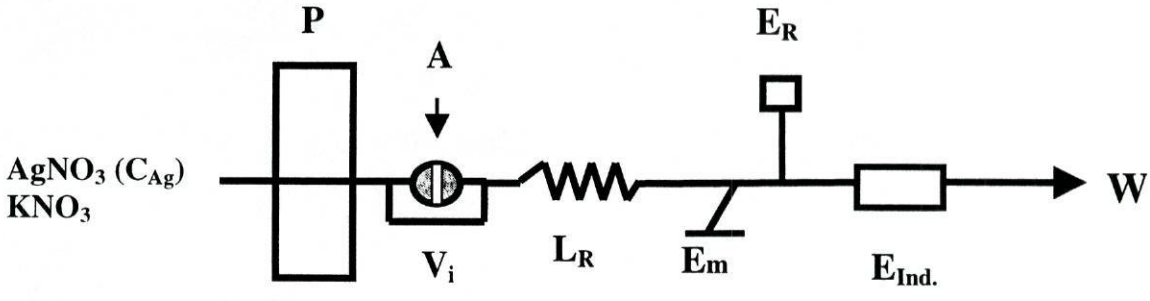


Fig 2.1 – Representação esquemática do sistema de fluxo para a determinação de cloretos. A – amostra; P - bomba peristáltica; V_i - volume de injecção; L_R – tubo de gradiente; E_m – ligação à terra; E_{Ind} - eléctrodo sanduíche; W - esgoto.

2.3.2.2 - Sistema para a determinação de oxalatos

No sistema para a determinação de oxalatos que se encontra esquematizado na figura 2.3, a amostra previamente acidulada com ácido clorídrico é injectada num fluxo de peróxido de hidrogénio. No reactor (V_R) ocorre a dispersão da amostra na solução de peróxido e seguidamente ocorre a mistura com um fluxo de solução etanólica de bis-ciclohexil-carbodiimida e difenilantraceno. Por último, a quimiluminescencia gerada pela reacção na célula de quimioluminescencia é detectada pelo tubo fotomultiplicador.

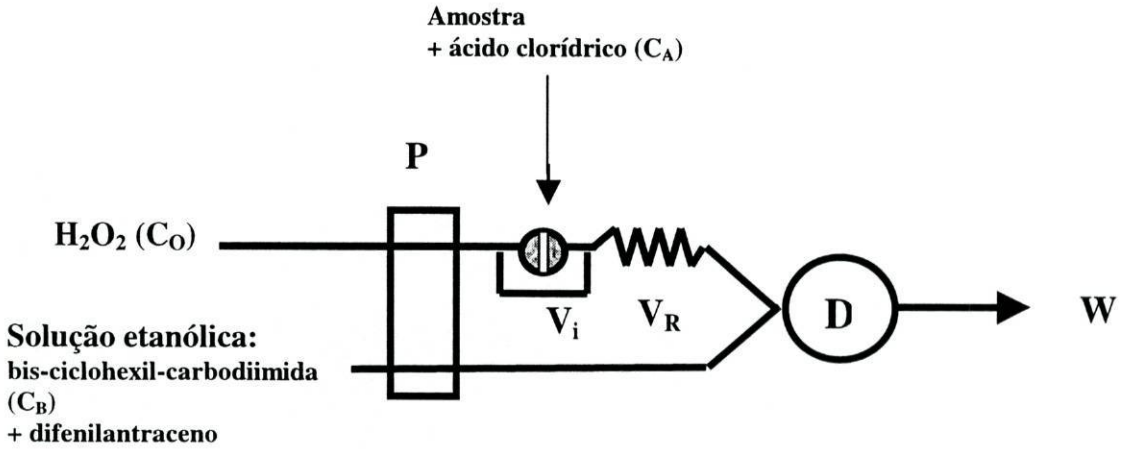


Fig 2.2 – Representação esquemática do sistema de fluxo para a determinação de oxalatos. P – bomba peristáltica; A – amostra; V_i - volume de injecção; V_R – volume de reactor; D – detector de quimioluminescencia (célula de quimioluminescencia em frente de tubo de fotomultiplicador); W – esgoto.

2.3.2.3 - Sistema para a determinação de oxidantes

No sistema para determinação de oxidantes, que se encontra esquematizado na figura 2.1, a amostra (A na figura) é injectada num fluxo de solução constituída por luminol dissolvido em solução tampão de pH carbonato 0,1 M. Este fluxo transportador é posteriormente misturado com um fluxo de solução aquosa de cloreto de cobalto (II) e por último, o tubo fotomultiplicador, que é o detector do sistema, detecta a luz produzida na célula de quimioluminescencia.

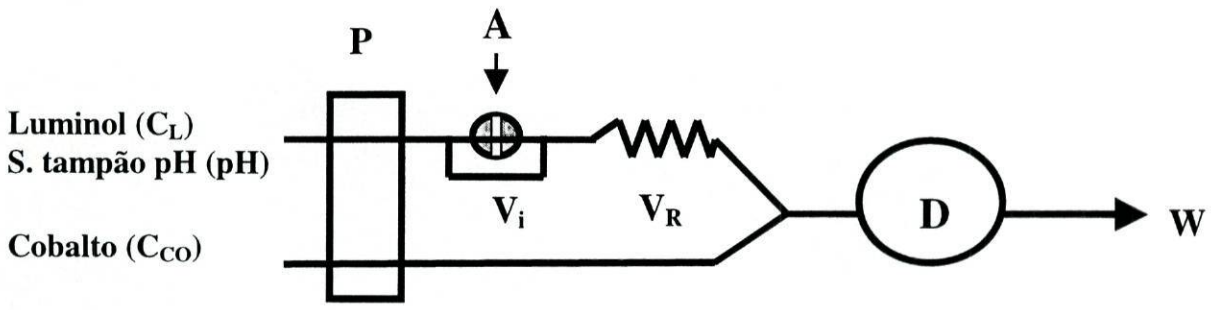


Fig 2.3 - Representação esquemática do sistema de fluxo para a determinação de oxidantes. P – bomba peristáltica; A – amostra: V_i - volume de injecção; V_R volume do reactor; D – detector (célula de quimioluminescencia colocada em frente do tubo fotomultiplicador); W – esgoto.

2.4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.4.1 - Preparação dos extractos das rolhas

2.4.1.1 – Preparação dos extractos para a determinação de cloretos e de oxidantes

Para a determinação dos oxidantes e dos cloretos foram preparados extractos etanólicos das rolhas pelo seguinte processo: num frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de solução etanólica a 12% fez-se mergulhar a rolha, de seguida vedou-se o frasco e colocou-se o conjunto na estufa regulada a 40 ± 2°C durante 24 horas; após este período, retirou-se imediatamente a rolha em ensaio e deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente. Os extractos obtidos por este processo foram filtrados antes de serem ensaiadas nos sistemas de FIA.

2.4.1.2 – Preparação dos extractos para a determinação dos oxalatos

Foram retiradas 5 rolhas de uma mesma amostra, cada uma foi cortada em três partes iguais, e cada parte em 4 partes iguais. Os fragmentos da rolha foram introduzidos num Erlenmeyer de 250 mL e foram adicionados 180 mL de HCl 0,01 M. As rolhas em contacto com a solução foram agitadas durante 2 horas, a solução obtida foi filtrada e transferida para um balão de 250 mL. O resíduo do filtrado foi lavado com HCl 0,01 M e adicionado ao conteúdo do balão. Por último o volume da solução do balão foi ajustado a 250 mL com ácido clorídrico 0,01 M. A utilização da solução de ácido baixa o pH do extracto obtido para valores entre 1 e 2, fazendo com que o oxalato presente nas rolhas não precipite, e que o crescimento bacteriano seja inibido [2].

2.4.2 – Determinação enzimática dos oxalatos nas rolhas

O procedimento experimental referente a este método consta de três partes, a extracção do oxalato a partir das rolhas, descrita em 2.4.1.2, a preparação de amostras e o ensaio.

2.4.2.1 - Preparação das amostras

Mediu-se 5 mL de extracto (ver preparação em 2.4.1.2) com uma pipeta volumétrica, e adicionou-se a 5 mL de solução diluente da amostra (pH:5-7). De seguida mediu-se 2 mL da amostra obtida da adição anterior, adicionou-se ao tubo de ensaio com purificador da amostra, agitou-se durante 5 minutos e filtrou-se a amostra [1].

2.4.2.2 - Ensaio

Pipetou-se 1 mL de reagente A, para dentro de cada um dos tubos de análise, adicionou-se 50 µL de amostra (ou de padrão para traçar a curva de calibração ou de água desionizada para obter o ensaio a branco) adicionou-se de seguida 100 µL de reagente B, aguardou-se durante 5 min para que ocorresse a reacção enzimática à temperatura ambiente (18–26°C), e mediu-se a absorvância a 590 nm.

2.4.3 - Optimização da resposta dos sistemas

A optimização da resposta dos três sistemas de FIA foi efectuada através de técnicas de análise factorial. As experiências efectuadas em cada planeamento foram realizadas aleatoriamente e foram efectuados três ensaios consecutivos para cada experiência.

2.4.4 - Avaliação da Resposta dos Sistemas Optimizados

As características de resposta dos sistemas optimizados foram avaliadas através do traçado de curvas de calibração, da caracterização da repetibilidade da resposta.

2.4.4.1 - Traçado de curvas de calibração

O traçado de curvas de calibração foi efectuado ensaiando as amostras por ordem aleatória da sua concentração. Também neste caso foram efectuados três ensaios para cada amostra.

2.4.4.2 - Repetibilidade da Resposta dos Sistemas

Para avaliar a repetibilidade da resposta dos sistemas, foram efectuados 15 ensaios sucessivos da mesma amostra no sistema em estudo.

2.5 - CALCULOS

Para a construção da matriz do planeamento de experiências e para a análise dos dados obtidos nessas experiências foi utilizado o programa The Unscrambler Designer (versão 7.51 da Camo Asa, Noruega).

Os parâmetros de regressão linear das curvas de calibração foram calculados por mínimos quadrados com o programa EXCEL (Microsoft).

2.6 - BIBLIOGRAFIA

1 . M. G. Li and M.M. Madappally, *Clinical Chemistry*, *35*, 2330, 1989.

2. J.A. Rodrigues and A. A. Barros, *Analytica Chimica Acta*, *273*, 531, 1993.

3 – TEORIA

Na primeira parte deste capítulo apresentam-se alguns aspectos fundamentais da análise por injecção em fluxo (FIA), a técnica de análise utilizada para implementar os sistemas para determinação de oxidantes, cloretos e oxalatos em rolhas de cortiça.

Na segunda parte do capítulo apresentam-se as metodologias de planeamento experimental e técnicas de análise dos dados utilizadas neste trabalho com o objectivo de estudar, modelar e optimizar os sistemas de FIA.

3.1 – ANÁLISE POR INJECÇÃO EM FLUXO (FIA)

O primeiro artigo de análise por injecção em fluxo (FIA) foi publicado em 1975 [1]. Após o aparecimento deste primeiro trabalho esta técnica foi explorada como um processo para a realização de ensaios em série, por exemplo como uma hipótese alternativa aos sistemas de análise em fluxo segmentado (CFA) [2]. No entanto a FIA rapidamente mostrou ser uma nova metodologia para o processamento de soluções e uma ferramenta a explorar em química analítica, permitindo o desenvolvimento de novas metodologias na análise em fluxo, por exemplo o desenvolvimento de técnicas de gradiente [3], em que se explora um aspecto único da FIA: a dispersão controlada da amostra.

3.1.1 - Fundamentos da FIA

O principio da FIA é muito simples, e consiste em injectar um volume bem definido de uma amostra líquida num fluxo não segmentado e contínuo de um líquido de composição adequada (ver Fig. 3.1.a) designado por transportador. A amostra injectada forma uma zona que começa a dispersar-se e/ou a reagir com o transportador à medida que vai sendo transportada para o detector formando o segmento de amostra. No

detector é efectuado um registo contínuo da absorvancia, do valor da diferença de potencial ou de qualquer outro parâmetro físico que varia continuamente à passagem do segmento da amostra pelo detector. O aspecto típico de um destes registos designado por fiagrama encontra-se na Fig. 3.1.b. A zona correspondente à passagem do segmento de amostra pelo detector tem o aspecto de um pico, com altura H, largura W_{pico} e área A_{pico} relacionadas com a concentração da espécie a determinar. O intervalo de tempo entre o momento da injecção da amostra S e o máximo do pico, corresponde ao tempo de residência do pico (T).

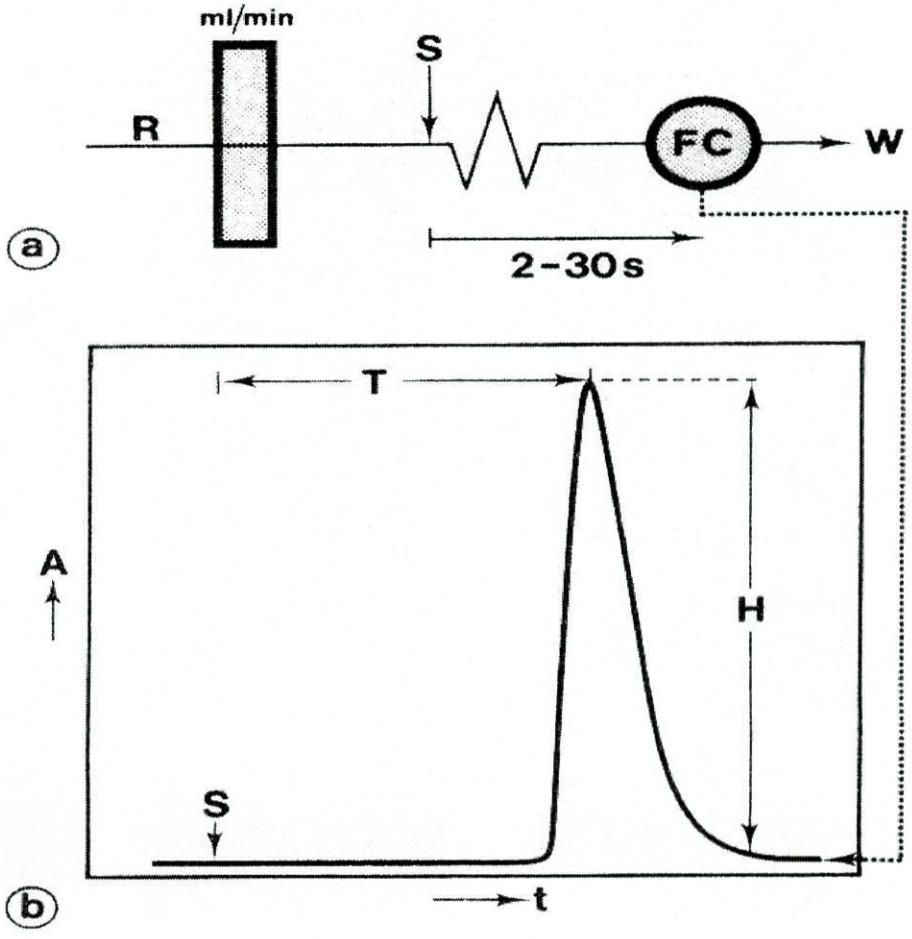


Fig. 3.1 – a) Representação esquemática de um sistema de FIA com um único canal; b) fiagrama típico obtido para o sistema esquematizado em a). R: fluxo de transportador; S: injecção da amostra; FC: detector de fluxo; W: esgoto; H: altura de pico; e T: tempo de residência [4].

A FIA baseia-se na combinação dos seguintes três factos: (i) injecção da amostra num transportador líquido; (ii) Dispersão controlada da amostra injectada no transportador durante o seu transporte desde o ponto de injecção até ao detector, dispersão esta que é manipulada de modo a conseguir executar um determinado processo analítico; e (iii) Reprodutibilidade no tempo de todos os processo envolvidos nos ciclos, que começam com a injecção da amostra e acabam com o registo no fiagrama do pico correspondente.

A FIA permite efectuar determinações com grande repetibilidade mesmo sem que a mistura da amostra com o transportador seja completa e sem que o estado de equilíbrio se atinja. A FIA é um método cinético de análise e o sinal observado, designado por fiagrama, é transitório e é o resultado de dois tipos de processos cinéticos que ocorrem no sistema de FIA em simultâneo: (i) o processo físico de dispersão da zona de amostra no fluxo transportador; e (ii) as reacções químicas. Para além destes dois tipos de processos, as características dinâmicas de resposta do detector também influenciam a resposta observada, especialmente se a velocidade da resposta do detector for da mesma ordem de grandeza da velocidade dos processos físicos e químicos que ocorrem no sistema.

Os fundamentos teóricos da FIA estão relacionados com o comportamento do segmento de amostra que é inserido no fluxo do transportador e que como se referiu é determinado pela dispersão e pela cinética das reacções que ocorrem no sistema. Embora não se conheçam modelos para uma descrição exacta dos processos de dispersão nos sistemas de FIA, alguns modelos permitem obter informação muito útil quanto ao efeito de diversos factores experimentais na resposta dos sistemas. A descrição teórica da cinética das reacções nos sistemas de FIA é um dos aspectos menos esclarecidos da FIA, verificando-se que para além de existir um escasso número de trabalhos neste domínio, a distancia entre a teoria e o funcionamento real dos sistemas [4] é muito grande e, nestas condições, a utilidade dos modelos teóricos é muito limitada. Por este motivo, na secção seguinte apenas são discutidos alguns aspectos relacionados com a dispersão que é uma característica e um aspecto fundamental desta técnica de análise.

3.1.2 - A dispersão nos sistemas de FIA

A dispersão pode ser definida como a diluição no transportador do segmento injectado e caracteriza-se pelo perfil que num determinado momento adquire o segmento da amostra, sendo a célula do detector o lugar com maior interesse sob o ponto de vista pratico uma vez que a forma do registo da FIA, o fiagrama, é determinada pela dispersão observada nessa célula ao longo do tempo.

Embora inicialmente se tenha suposto que as experiências na FIA [5,6] se realizavam num regime de fluxo turbulento, para explicar a mistura das amostras injectadas sucessivamente no sistema de fluxo, demonstrou-se [6,7] que na maior parte dos sistemas de FIA se trabalha em condições de fluxo laminar.

Quando se insere a amostra no fluxo esta é arrastada por este, a sua distribuição ou diluição no mesmo depende entre outros parâmetros, do momento que se considera. Inicialmente está controlada por convecção, depois por um fenómeno misto de difusão e convecção, e após um longo período de tempo é dominada por difusão. A situação intermédia, que corresponde ao controlo do processo de transporte por convecção-difusão é a situação mais habitual nos sistemas de FIA. Por este motivo não se podem aplicar as expressões clássicas de Taylor, porque estas apenas são válidas para o transporte controlado por difusão ou convecção puras. KK Stewart e colaboradores [8] estudaram o problema e propuseram diversas equações que regem estes fenómenos de transporte na FIA e que permitem elucidar a influencia de diversos parâmetros experimentais na diluição ou dispersão da amostra num determinado momento.

Os mesmos autores [8] mostraram também que a dispersão radial contribui mais significativamente do que a dispersão axial na dispersão da amostra no fluxo. Este tipo de movimento do fluxo chamado por Tijssen de "fluxo secundário" [9] tem um efeito de lavagem e é a justificação da baixa contaminação entre amostras injectadas sucessivamente no fluxo de transportador. Esta característica chave dos sistemas de FIA é alcançada porque a velocidade de fluxo e a largura dos tubos é menor do que os utilizados nos sistemas de CFA. Além disso devido a estes fenómenos, a largura dos picos da FIA diminui consideravelmente quando comparada com a CFA, e por este motivo aumenta o ritmo de amostragem.

A dispersão que se origina num sistema de FIA para umas dadas condições experimentais, pode avaliar-se através das características dos picos dos fiagramas, cuja

largura pode ser expressa por uma variância, sempre e quando se considere que o registro da FIA á uma curva de Gauss, o que em muitos casos não é válido. Se tivermos em consideração que a dispersão depende do volume de amostra injectada (V_i) no sistema, do desenho da célula do detector (C_d) e da zona do tubo correspondente ao reactor (R), a dispersão total pode expressar-se como a soma de todas estas contribuições [10]:

$$\sigma^2_{total} = \sigma^2_{Vi} + \sigma^2_{Cd} + \sigma^2_{R} \qquad \text{(Eq. 3.1)}$$

em que σ é o desvio padrão da gaussiana. Esta abordagem, traduzida pela equação 3.1, é baseada na metodologia de estímulo-resposta mas a aplicabilidade desta metodologia ao estudo dos sistemas de FIA é limitada [11]. Outra abordagem teórica dos processos de dispersão em sistemas de FIA baseia-se no modelo dos tanques em série [12], mas tal como no caso anterior, os modelos desenvolvidos não conseguem descrever de forma exacta os sistemas de FIA, nem mesmo os mais simples. Os modelos teóricos desenvolvidos para estudar a dispersão em sistemas de FIA apenas permitem definir o sentido do efeito de diversos factores na resposta dos sistemas.

Na figura 3.2 encontra-se esquematizado o efeito de diversos factores experimentais na dispersão da amostra. Da análise da figura deduz-se que a dispersão é facilmente manipulada para obter condições adequadas par as determinações analíticas.

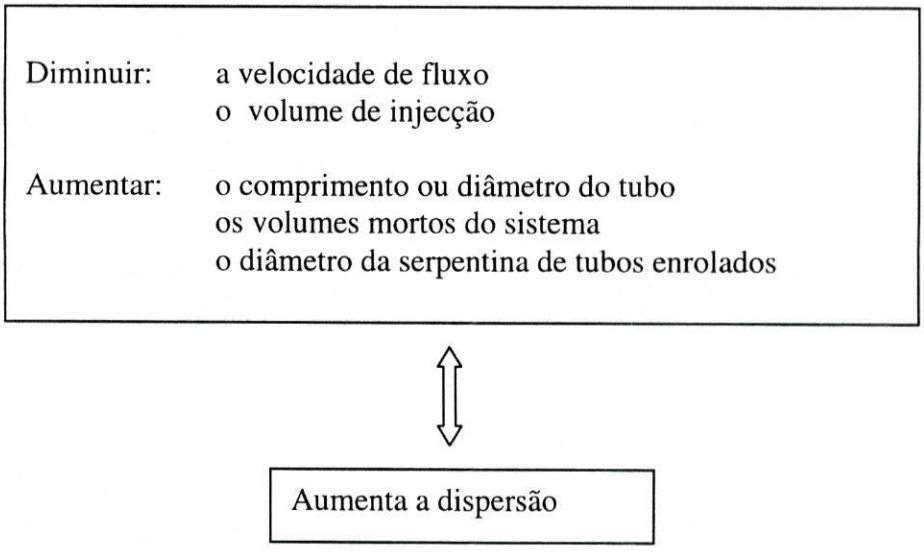


Fig. 3.2 - Influencia de alguns factores na dispersão em sistemas de FIA.

A utilização de tubos cheios de esferas de vidro cujo diâmetro é 60 a 80 % do diâmetros interno do tubo (reactor SBS) proposto por Van der Linden [13] proporciona uma dispersão que é aproximadamente dez vezes menor do que a que se consegue com os mesmos tubos do mesmo diâmetro e do mesmo comprimento sem as esferas de vidro, conseguindo-se um aumento notório da sensibilidade e do ritmo de amostragem.

O coeficiente de dispersão pratica (D) é uma expressão numérica do processo de dispersão do segmento de amostra num elemento de fluido particular. Este coeficiente é a razão de concentrações antes a pós este processo de dispersão ter lugar no elemento de fluido considerado

$$D = C^0 / C \qquad \text{(Eq. 3.2)}$$

Em que C^0 é a concentração inicial , na amostra antes da diluição, e C é a concentração no elemento de fluído considerado. No caso particular do máximo do pico podemos definir o coeficiente de dispersão para esta situação D_{max} que corresponde à concentração no máximo do pico C^{max}, e neste caso:

$$D_{max} = C^0 / C^{max} \qquad \text{(Eq. 3.3)}$$

Devido à sua definição, o valor do coeficiente de dispersão D encontra-se entre 1 e ∞. Os sistemas de FIA podem ser classificados de acordo com o valor de D. Deste modo podemos distinguir os seguintes tipos de sistemas:

- Sistemas de dispersão limitada: o valor do coeficiente de dispersão nestes sistemas varia entre 1 a 2. Regra geral o sistema de FIA com dispersão limitada serve apenas como processo rigoroso e preciso de transporte da amostra para o detector, por exemplo em determinações de pH, da condutividade ou em absorção atómica.

- Sistemas de dispersão média: em que o valor de D se encontra entre 2 e 10, são os que apresentam maior âmbito de aplicação porque permitem a ocorrência de reacções químicas após a mistura da amostra com o transportador ou com outros reagentes ao longo do sistema FIA.

- Sistemas de dispersão elevada: em que o valor de D é superior a 10, em geral são utilizados quando a concentração da amostra é demasiado elevada para a gama de resposta do detector.

3.1.3 – As leituras em FIA e as dimensões dos picos

O pico registado no fiagrama é caracterizado pelos valores do tempo de residência (T), altura de pico (H), largura de pico (W_{pico}), e área (A_{pico}) que contem informação analítica.

Na ausência de reacções químicas, por exemplo numa determinação por absorção atómica, quando o detector responde linearmente e instantaneamente à espécie injectada, é indiferente medir altura (H), largura (W_{pico}) ou área de pico (A_{pico}) uma vez que todos estes parâmetros contêm informação útil, embora todos eles se encontrem relacionados com a concentração da espécie a determinar de maneira diferente. O mesmo se aplica a determinações baseadas na formação de uma espécie determinável por exemplo nos métodos colorimétricos (espectrofotométricos) desde que através do processo de dispersão se garanta que existe sempre um excesso de reagente e que por conseguinte a concentração da espécie formada é limitada pela concentração da espécie a determinar.

O controlo do tempo é essencial para a reprodutibilidade de qualquer destas opções de medida nos sistemas de FIA, e o tempo é por este motivo um dos três parâmetros importantes (ver 3.1.1) no planeamento (desenho) de qualquer sistema de FIA.

3.1.3.1 - Altura de Pico (H)

A altura de pico (H) é a dimensão do pico mais vulgarmente medida, uma vez que é fácil de identificar e encontra-se directamente relacionada com a resposta do detector, por exemplo absorvancia, diferença de potencial , intensidade de corrente, e desta forma a relação entre a resposta do detector e a altura de pico pode ser traduziada por

$$H = k\,C \qquad \text{(Eq. 3.4)}$$

em que k é uma constante de proporcionalidade.

Adicionalmente é importante referir que para além da medição da distancia entre a linha de base e o máximo pode também ser efectuada essa leitura vertical em qualquer ponto da região ascendente ou descendente do pico. Este aspecto, traduzido por:

$$H' = k' C' \qquad \text{(Eq. 3.5)}$$

é explorado num conjunto de técnicas designadas por técnicas de gradiente [14]. Pode ainda ser obtida mais informação ou dimensões do pico se a detecção for efectuada num sistema multi-canal, por exemplo varrendo um espectro em vez de efectuar as leituras num único comprimento de onda.

A determinação da altura de pico é o processo de medida mais popular nos sistemas de FIA. Uma das razões para esta escolha é obviamente a simplicidade uma vez que o máximo do pico é de fácil localização no fiagrama.

3.1.3.2 - Área de Pico (A_{pico})

Tal como a altura de pico, a área de pico está directamente relacionada com a resposta do detector ou seja

$$A_{pico} = k_I C \qquad \text{(Eq. 3.6)}$$

No entanto este tipo de medida apresenta dois inconvenientes, que se prendem com o seu caracter de integração: (i) a área de pico não se pode relacionar com um espectro ou um gradiente de concentração; e (ii) a área de pico distorce de forma grosseira as leituras de detectores logarítmicos, por exemplo os eléctrodos selectivos de iões, porque a região próxima da linha de base tem um peso muito superior ao da região próxima do máximo do pico.

3.1.3.3 - Largura de pico (W_{pico})

A largura de pico é proporcional ao logaritmo da concentração, tem uma gama dinâmica ampla, mas é menos preciso do que as determinações baseadas na medição da altura ou área de pico. Ao ser uma medição horizontal não pode ser directamente relacionada com o espectro, mas produz uma leitura de diferença de tempo entre a zona ascendente e descendente do pico. Nesta classe de medições encontram-se as pseudo - titulações em sistemas de FIA [15].

3.1.4 - Características da FIA

A sensibilidade dos métodos de FIA é menor do que as técnicas em regime de partida em que se baseiam devido à dispersão física ou diluição e ao tempo de reacção, que em certos casos permite obter rendimentos parciais (a determinação é efectuada sem que se complete a reacção). Nos sistemas de FIA com reacção química ambos os processos se contrapõem, quando se variam as condições experimentais para aumentar o rendimento químico, a dispersão aumenta e vice-versa. Para cada sistema de FIA é imprescindível ajustar as condições para optimizar a sensibilidade através de um balanço entre ambos os efeitos. È neste contexto que se inserem as secções de optimização experimental que se apresentam em 3.2.

Dada a sua característica de método cinético de determinação, em regra geral, a FIA apresenta maior selectividade do que as técnicas manuais correspondentes. Em muitos casos, consegue-se um aumento relevante da selectividade porque as reacções laterais indesejáveis não ocorrem ou ocorrem em pequena extensão dado o curto intervalo de tempo em que são realizadas as determinações.

Apesar da FIA ser uma metodologia baseada em medições em sistemas em que não se alcançou o estado de equilíbrio, o que pressupõe um factor de maior potencial para o efeito de perturbações, é possível atingir elevados níveis de reprodutibilidade e repetibilidade mesmo a baixas concentrações da espécie a determinar. A precisão dos métodos baseados em FIA é comparável à obtida para os métodos desenvolvidos em sistemas de fluxo segmentado (CFA) ou nos métodos manuais.

A rapidez das determinações ou o ritmo de amostragem é talvez uma das características mais significativas da FIA sendo duas a dez vezes superior à dos métodos de fluxo segmentado e incomparavelmente superior à das técnicas manuais. Em casos especiais podem ser atingidos ritmos de amostragem da ordem das 300 ou 500 amostras por hora.

A simplicidade do seu fundamento, a utilização de montagens não muito sofisticadas e a facilidade de manipulação fazem da FIA uma metodologia que se caracteriza pela simplicidade em oposição a outras metodologias que envolvem a utilização de instrumentação cara sob o ponto de vista da aquisição, montagem e manutenção. Adicionalmente, os métodos desenvolvidos em sistemas de FIA são

facilmente automatizáveis o que amplia muito as potencialidades da técnica para o controlo de processos ou para a realização de um grande número de análises de rotina.

Sob o ponto de vista económico, a FIA apresenta também vantagens, designadamente no consumo de reagentes e de amostra que é duas a quinze vezes inferior ao dos métodos de fluxo segmentado, e dez a cem vezes inferior ao das técnicas manuais. Em certos casos em que a amostra é barata e abundante e os reagentes são caros pode-se utilizar uma modalidade da FIA designada por FIA invertida [16] em que os reagentes são injectados no fluxo de amostra.

A versatilidade é também uma característica muito importante da FIA. Dado o seu carácter modular, a substituição de componentes ou a integração de novos componentes nos sistemas de FIA é simples. Por conseguinte um mesmo sistema pode ser adaptado para diversos processos sendo no entanto necessário proceder em cada caso à optimização da resposta do sistema. Sem dúvida que esta característica é muito importante e explica a grande diversidade de modos de FIA que se podem encontrar na literatura.

3.2 – PLANEAMENTO DE EXPERIÊNCIAS E OPTIMIZAÇÃO

As metodologias de planeamento de experiências podem ser usadas com o objectivo de desenvolver um modelo de regressão ou um modelo ANOVA. As metodologias de planeamento de experiências podem também ser usadas num contexto de optimização, com o objectivo de determinar de uma forma eficiente as melhores condições (condições óptimas) de um processo tecnológico ou sistema químico em geral (denominado por sistema) necessárias para obter o melhor desempenho desse sistema. Um dos caminhos para se atingir a optimização envolve a modelação do sistema, e neste caso, as metodologias de planeamento experimental são utilizadas sequencialmente com o objectivo de atingir modelos óptimos.

Os modelos óptimos são caracterizados por um conjunto de condições, ou valores para os factores. Factor é o nome dado no planeamento de experiências às variáveis que são modificadas de forma controlada de modo a permitir o estudo do seu efeito no sistema. De uma maneira geral existem vários factores, o que faz do planeamento de experiências um problema de análise multivariável. Os factores em planeamento de experiências podem ser quantitativos (por exemplo, o pH) ou qualitativos (por exemplo, o tipo de catalisador). Os diferentes valores que o factor pode ter são denominados de níveis, por exemplo se um sistema necessita de ter o factor pH aos valores 5 e 9, então existem dois níveis de pH. A um factor qualitativo pode ser atribuído arbitrariamente um nível, de uma maneira geral atribui-se uma conotação quantitativa de nível alto e baixo.

As características dos sistemas que são objecto de um processo de optimização denominam-se de respostas e são as variáveis que descrevem o desempenho do sistema.

Na construção de modelos, as respostas são as variáveis dependentes e os factores as independentes. Representando as respostas pela letra y e os factores pela letra x, teremos

$$(y_1, y_2,..., y_p) = f(x_1, x_2,..., x_n) \qquad \text{(Eq. 3.7)}$$

Na maior parte dos casos, cada uma das respostas y é modelada separadamente pelo que a equação 3.7 vem:

$$y = f(x_1, x_2,..., x_n) \qquad \text{(Eq. 3.8)}$$

O modelo que relaciona a resposta com o efeito dos factores é denominado de função de resposta ou, devido ao seu caracter multivariável, de superfície de resposta.

Os modelos são obtidos a partir dos dados experimentais. Nas metodologias de planeamento de experiências as condições experimentais não são definidas de uma forma arbitrária mas segundo um protocolo bem estudado.

3.2.1. Objectivos do Planeamento de Experiências

O planeamento de experiências é usado para obter um sistema com umas características desejadas segundo um processo eficiente. Assim pretende-se: (i) compreender o efeito dos factores; e/ou (ii) modelar a relação entre y e x com um mínimo número de experiências. Para se atingir estes objectivos é necessário conhecer as características experimentais dos sistemas em análise. Se o planeamento experimental for bem aplicado obtém-se uma economia de custos.

Nos processos de optimização normalmente pretende-se analisar o efeito dos factores e modelar a resposta (Fig. 3.3) [17]. Inicialmente procede-se à determinação dos factores que influenciam a resposta e em que extensão. O passo seguinte é obter um modelo que descreva de forma quantitativa esses efeitos na resposta do sistema. Eventualmente, pode-se tentar obter as condições óptimas para os níveis dos factores que dão origem ao óptimo no desempenho do sistema. O óptimo pode corresponder ao valor máximo ou mínimo das respostas, mas, na maior parte dos casos reais o interesse está em obter resultados suficientemente bons.

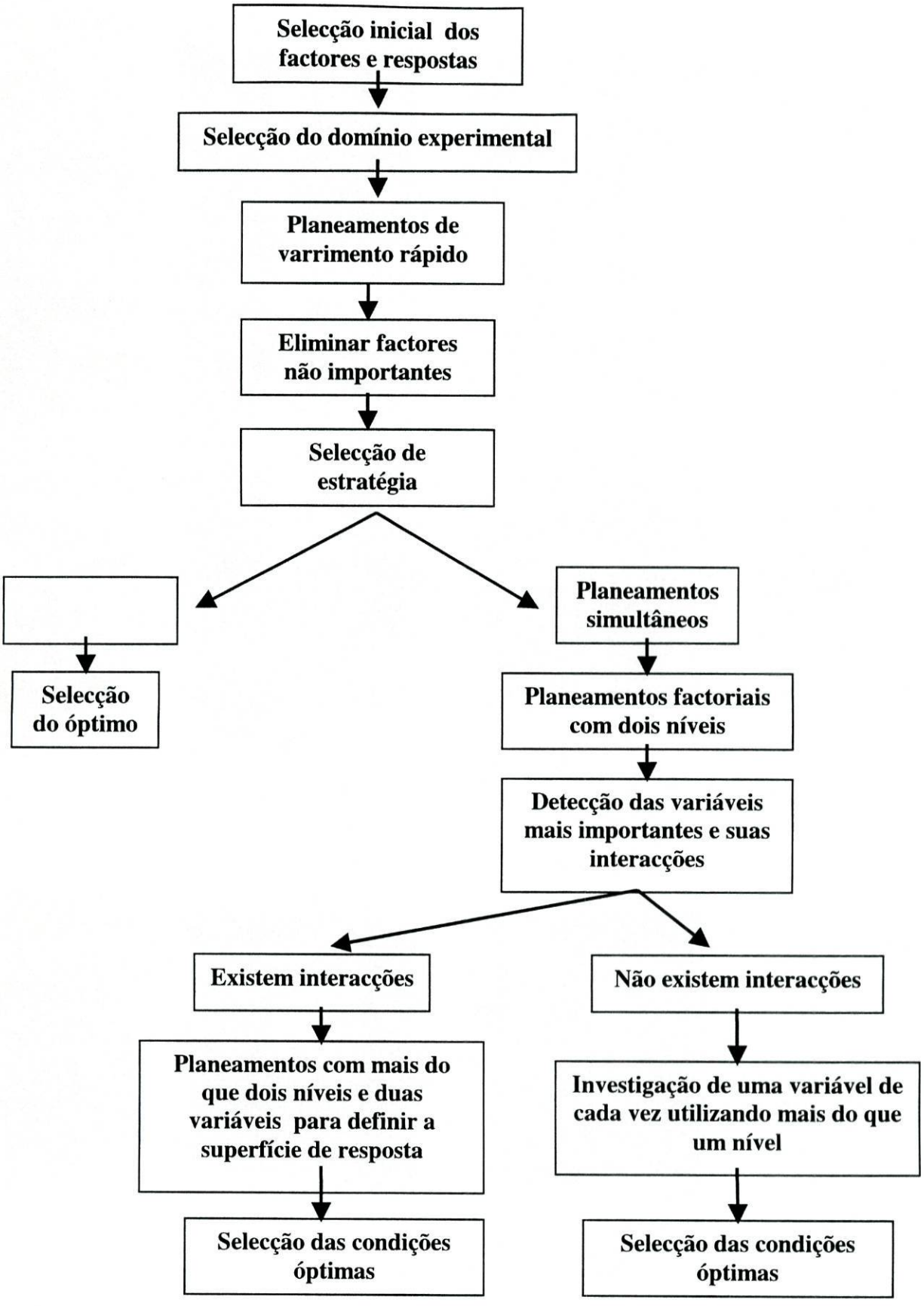


Fig. 3.3 - Representação esquemática dos passos fundamentais num planeamento de experiências [171].

3.2.2 Selecção dos Factores Experimentais e das Respostas

3.2.2.1 – Factores

O primeiro passo de um planeamento experimental normalmente é a selecção dos factores (Fig. 3.3). Por vezes há conhecimento prévio dos factores que mais poderão afectar a resposta, mas, na maior parte dos casos esta informação não está acessível. Neste caso o estudo tem início por se obter uma lista de todos os factores que possam ter um efeito na resposta. De seguida efectua-se um estudo de varrimento rápido ("screening") para seleccionar os factores que têm efeito significativo na resposta.

Uma vez seleccionados os factores, é necessário definir as fronteiras do domínio experimental, ou seja, os níveis extremos para os quais os factores serão estudados. É necessária uma correcta definição das fronteiras e dos níveis: fronteiras muito largas levam à execução de experiências em regiões pouco importantes e a um modelo com pouca precisão na área experimental em investigação; fronteiras muito apertadas podem não conter o óptimo.

3.2.2.2 – Respostas

Um passo muito importante no planeamento experimental é a selecção da(s) resposta(s) a serem investigadas. Normalmente, cada resposta é modelada em separado e procura-se obter os factores que levam à resposta máxima ou mínima. É normalmente difícil, e errado, modelar respostas compostas sendo, sempre que possível, preferível modelar as respostas em separado e combinar num passo seguinte as funções de resposta.

No sentido clássico a optimização procura o máximo ou o mínimo da função de resposta. No entanto, por vezes estas duas hipóteses não são necessariamente a melhor escolha uma vez que é conveniente obter condições em que o desempenho do sistema seja robusto ou seja em que pequenas variações nos níveis dos factores experimentais não induzam grandes variações na resposta do sistema.

3.2.3 – Estratégias de Optimização

As metodologias do planeamento experimental têm uma natureza multivariável. Este tipo de análise está em oposição com uma estratégia clássica de variar um factor de cada vez (estratégica univariável). A estratégia univariável não deve ser usada quando não se conhece os sistemas porque não é sensível à existência de interacções entre os factores em investigação – quando existem interacções deve-se utilizar uma estratégia multivariável.

A existência de interacção entre dois factores experimentais, designados por x_1 e x_2, significa que o efeito de x_1 na resposta do sistema depende do nível de x_2. Em casos reais, os sistemas com interacções são mais vulgares do que os sistemas onde não há interacções pelo que uma estratégia multivariável é normalmente mais eficiente do que uma estratégia univariável.

Existem duas estratégias de optimização multivariável que são denominadas de optimização sequencial e optimização simultânea. Uma estratégia de optimização sequencial consiste na realização de um pequeno conjunto de experiências de cada vez e usar a informação obtida para planear a experiência que será executada a seguir [18]. Quando se efectua mais do que uma medição experimental para a resposta do sistema os métodos sequenciais não são recomendados. Por estes motivos os métodos de optimização simultânea devem ser privilegiados em qualquer estudo de planeamento de experiências.

3.2.4 – O Modelo da Superfície de Resposta

Os planeamentos de experiências são usados para desenvolver modelos empíricos, quando não é possível obter uma função de resposta para o sistema em estudo a partir da teoria. Na prática, esta situação é muito vulgar, a teoria permite prever que haverá uma relação entre um determinado factor e a resposta, até permite derivar o tipo de função, mas raramente dá os coeficientes dessa função.

Funções de resposta típicas para um sistema com uma resposta (y) e dois factores x_1 e x_2 são as seguintes:

$$y = b_0 + b_1 x_2 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \qquad \text{(Eq. 3.9)}$$

$$y = b_0 + b_1 x_2 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \qquad \text{(Eq. 3.10)}$$

Estas funções consistem no seguinte:

- Termos de primeira ordem (Eq. 3.9) e de segunda ordem (Eq. 3.10) para x_1 e x_2. Com frequência são utilizados níveis codificados para a construção dos modelo para amortecer efeitos de escala dos valores reais dos factores experimentais;
- Um termo constante b_0, que é o valor de y quando x_1 e x_2 são zero;
- O último termo das equações 2.3 e 2.4 é o termo da interacção.

Este tipo de modelos é válido para as denominadas variáveis ou factores de processo e os planeamentos de experiências que envolvem factores de processo denominam-se planeamentos factoriais.

O modelo para um sistema com factores de processo é de segunda ordem quando contém termos quadráticos e interacções binárias. Em geral termos de terceira ordem ou de ordem superior não são necessários porque as interacções ternárias raramente são significativas e modelos de terceira ordem ou modelos não lineares ocorrem raramente. Na prática, a natureza pode ser aproximadamente, pelo menos localmente, por modelos do tipo funções de segunda ordem traduzidas por modelos que são lineares ou de primeira ordem nos parâmetros de regressão (b).

3.2.5 – Planeamentos Factoriais

Os planeamentos factoriais incluem um vasto conjunto de métodos que podem ser agrupados em duas classes.

A primeira classe inclui os planeamentos que têm como objectivo detectar quais os factores que mais influenciam a resposta do sistema e obter uma estimativa para essa influência. O planeamento mais elementar desta classe é o planeamento factorial completo com dois níveis. Neste planeamento cada factor é estudado a dois níveis e as experiências são realizadas para cada uma das possíveis combinações dos níveis – para um número de factores igual a nf e o número total de experiências é igual a 2^{nf}. Estes planeamentos permitem estimar o efeito de todos os factores e das suas interacções e obter um modelo de primeira ordem incluindo as interacções binárias (Eq. 3.9).

Quando o número de factores aumenta, o número de experiências também aumenta exponencialmente. Quando o número de experiências no factorial completo é elevado é necessário utilizar apenas uma fracção desse conjunto de experiências, por exemplo 1/2, 1/4 ou 1/8. Estes planeamentos são denominados de planeamentos factoriais fraccionados. Neste tipo de planeamentos, como apenas se realizam algumas experiências do planeamento completo, perde-se alguma informação acerca de algumas ou de todas as interacções entre os factores [17,19-22].

Em alguns estudos não é necessário obter informação acerca das interacções, mas apenas determinar quais são os factores mais importantes para a resposta do sistema. Neste caso é necessário efectuar o "screening" ou varrimento rápido.

A segunda classe de planeamentos factoriais é constituída por planeamentos utilizados na modelação e construção de superfícies de resposta. No caso geral, este tipo de superfícies são curvas (modelos de segunda ordem, Eq. 3.10), e para as descrever são necessários pelo menos três níveis para cada factor. Os planeamentos típicos desta classe são os planeamentos de compósito central e de Box-Behnken, embora possam ser utilizados planeamentos factoriais completos com três (número de experiências = 3^{nf}), ou mais níveis (n) (número de experiências = n^{nf}).

3.2.5.1 - Planeamentos factoriais completos

Formulação dos planeamentos

O planeamento factorial completo mais simples tem dois factores com dois níveis e está representado na Fig. 3.4.a. Na Fig. 3.4.b representa-se um planeamento factorial completo com três factores e dois níveis. Como se viu atrás e pode-se verificar na figura o número de experiências a realizar em cada um destes três exemplos são 4 e 8 ($=2^{nf}$).

Os níveis do factores podem ser representados de várias maneiras. Nesta dissertação e nos planeamentos com dois níveis estes serão representados por +1 (valor mais alto do factor) e –1 (valor mais baixo do factor). Esta representação corresponde a trabalhar com variáveis codificadas ou seja reduzir o seu intervalo de variação experimental ao intervalo de [–1, +1]. Nos planeamentos com três níveis, inclui-se um nível intermédio que corresponde ao nível 0 (zero). Quando os factores são qualitativos, o valor +1 corresponde a um valor maior ou à existência de uma característica e o valor –1 a um valor menor ou à inexistência dessa característica.

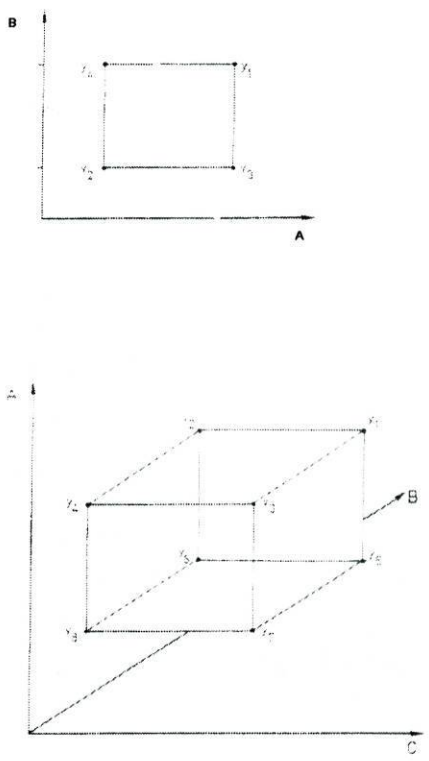


Fig. 3.4 – Esquema de um planeamento factorial completo com dois (a) e três (b) factores com dois níveis.

Para o caso de dois factores e dois níveis a lista das experiências a realizar (matriz do planeamento), que são todas as combinações possíveis dos factores aos níveis considerados, é apresentada nas duas primeiras colunas da tabela 3.1. A terceira coluna (interacção), é obtida por simples multiplicação das duas primeiras, e é apenas útil para calcular o efeito da interacção na resposta dos sistema (como se apresentará na secção seguinte).

De uma maneira geral as experiências devem ser realizadas segundo uma sequência aleatória para evitar artificios nas conclusões. Outro factor importante a ter em conta na realização experimental é a repetição das experiências porque, como se focará mais em baixo, permite obter mais informação sobre o sistema em estudo.

Tabela 3.1 – Planeamento das quatro experiências num planeamento experimental completo com dois factores e dois níveis.

Factor A	Factor B	Interacção AxB	Experiência
+1	+1	+1	1
-1	-1	+1	2
+1	-1	-1	3
-1	+1	-1	4

Estimativa directa dos efeitos

A fase seguinte é a análise das respostas para calcular o efeito dos factores na resposta do sistema. Dois tipos de efeitos têm que ser considerados: efeitos principais (o efeito dos factores); efeitos das interacções entre os factores.

O cálculo dos efeitos principais consiste em calcular a variação provocada por um factor quando os outros estão constantes. De uma maneira geral os efeitos principais são determinados somando todas as respostas correspondentes ao nível +1 e subtrair as correspondentes ao nível –1 (diferença entre as médias das respostas nos níveis alto e baixo). Usando a Tabela 3.1, este cálculo é automático. O calculo dos efeitos de uma interacção binária corresponde à média da diferença do efeito do factor A quando o

factor B está no nível mais elevado pelo efeito do factor A quando o factor B está no nível mais baixo.

Uma análise preliminar dos efeitos permite detectar os factores que mais influenciarão o sistema. No entanto, uma análise pormenorizada do real significado dos efeitos só poderá ser efectuada após a sua análise estatística como se descreve na próxima secção.

Pontos centrais para estimar a significância dos efeitos

Pode-se incluir nos planeamentos factoriais com dois níveis um ponto central (Fig. 3.5), designado por 0 se os outros dois forem designados por (-1) e (1). A inclusão deste ponto central tem dois objectivos: (i) incluir um terceiro ponto experimental permitindo verificar se o modelo é linear ou não linear, apresenta ou não termos quadráticos; (ii) efectuando repetições deste ponto central pode-se estimar um valor para a incerteza da medição experimental. Este valor da incerteza pode ser utilizado para verificar se as variações observadas nos dois níveis dos factores são superiores à incerteza das observações. Se estatisticamente as variações observadas forem superiores à incerteza experimental então o factor tem significado para o modelo de resposta do sistema em estudo.

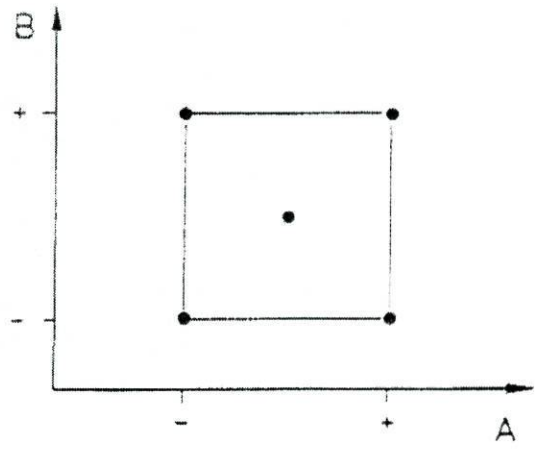


Fig. 3.5 – Esquema de um planeamento factorial completo com dois factores com dois níveis com um ponto central.

Análise da significância (ANOVA) dos efeitos

O melhor método de analisar a significância dos efeitos num planeamento experimental completo com dois níveis é efectuando uma ANOVA com efeitos fixos de múltiplas vias. Na tabela 3.2 mostra-se uma tabela de ANOVA de uma via (um factor) – quando existem vários factores e interacções acrescentam-se mais linhas à tabela e os graus de liberdade dos "Resíduos" e "Total" têm que ser ajustados.

Tabela 3.2 – Tabela da ANOVA de uma via [17].*

Fonte da variação	SS	df	MS	F**
Factor A	SS_A	k-1	MS_A	MS_A/MS_R
Resíduos	SS_R	n-k	MS_R	
Total	SS_T	n-1		

* SS – soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados; F – teste F; k – número de níveis do factor; n – número de experiências (= k x número de repetições).

** $F_{0.05;\ k\text{-}1,\ n\text{-}k}$ = ..., conclusão acerca da significância do factor A (se $F < F_{0.05;\ k\text{-}1,\ n\text{-}k}$ então o factor contribui significativamente para a resposta do sistema).

A análise dos testes F dos factores e das interacções permite concluir se a sua contribuição é significativa ou não para a resposta do sistema em estudo.

3.2.5.2 - Planeamentos factoriais fraccionados

O número de experiências num planeamento factorial completo aumenta de forma exponencial com o número de factores. Por outro lado, em muitos casos verifica-se que o efeito das interacções diminui à medida que aumenta o número de factores

envolvidos e por conseguinte as interacções de ordem mais elevada podem ser consideradas redundantes. Os planeamentos factoriais fraccionados exploram este aspecto e na matriz do planeamento, as colunas de contrastes para alguns factores são idênticas às colunas correspondentes à interacção de outros factores. Neste caso, em que as colunas de contrastes são idênticas, diz-se que o efeito do factor se encontra confundido com a interacção ou que o factor e a interacção são "aliases".

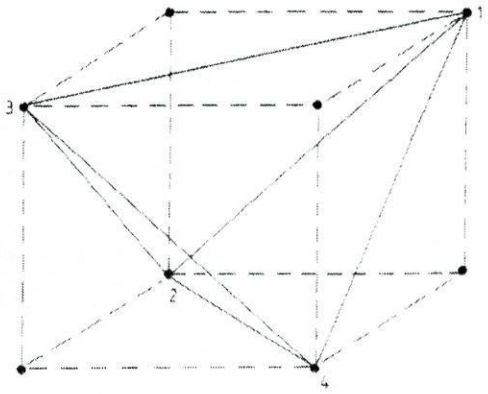


Fig. 3.6 - Esquema de um planeamento fraccionado (1/2) com três factores.

Para construir planeamentos factoriais fraccionados (Fig. 3.6) é necessário definir as equações que traduzem as "aliáses" também designadas por geradores do planeamento. Por exemplo, num planeamento correspondente a meio factorial com dois níveis e três factores (A, B e C), o efeito de um dos factores pode ser confundido com a interacção dos outros dois e neste caso o gerador da matriz do planeamento é traduzido por:

$$AxB = C \qquad \text{(Eq. 3.11)}$$

a partir desta equação, calcula-se a expressão de definição dos contrastes, representada por I, que é obtida multiplicado os dois membros do gerador do planeamento:

$$I = AxBxC \qquad \text{(Eq. 3.12)}$$

As "aliáses" de cada efeito no planeamento podem ser calculadas multiplicando-o por I, seguindo as regras algébricas normais, sendo imposta uma condição adicional:

os efeitos que surgem no produto um número par de vezes desaparecem. No caso anterior, traduzido por eq. 3.11 e 3.12, obtemos,

$$\text{Aliáse de } C = AxBxC^2 = AxB \qquad \text{(Eq. 3.13)}$$

3.2.5.3 - Planeamentos de Plackett-Burman

Os planeamentos de Plackett-Burman propõem (4xn) experiências, nomeadamente 4, 8, 12, 16, 20, etc., para estudar um número de factores igual a (4xn-1), 3, 7, 11, 15, 19,...,etc, respectivamente. Quando n é uma potência de 2 estes planeamentos correspondem a um desenho factorial fraccionado [22].

Os planeamentos de Plackett-Burman têm a particularidade das suas colunas serem construídas através de uma permuta cíclica dos contrastes que se encontram resumidos nas linhas da tabela 3.3, respectivamente para 12, 20 e 24 experiências. A última experiência dos planeamentos apenas tem contrastes (–) para todos os factores.

Tabela 3.3 – Contrastes para a construção de planeamentos de Plackett-Burman com o número de experiências indicado [22].

4xn	Contrastes
12	+ + - + + + - - - + -
20	+ + - - + + - + - + - + - - - - + + -
24	+ + + + + - + - + + - - + + - - + - + - - - -

Os planeamentos de Plackett-Burman podem ser utilizados também para estudar um número de factores igual ou superior a 4x(n-1) e inferior a 4xn-1, mas o número de experiências a efectuar é sempre 4xn.

3.2.5.4 - Planeamentos de Box-Behnken

O esquema do planeamento de Box-Behnken para 3 factores é apresentado na Fig. 3.7. Este desenho consiste na realização de experiências no cento e no centro das arestas. Este tipo de desenho é económico – para 3 factores apenas são necessárias 13 experiências.

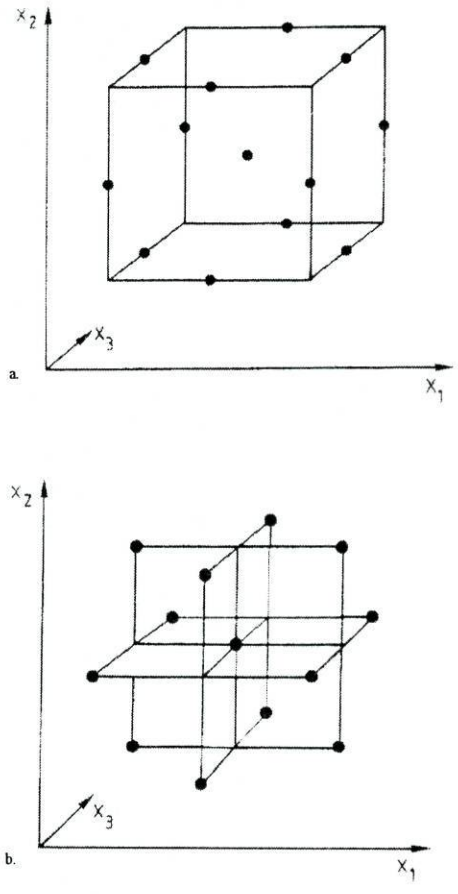


Fig. 3.7 - Esquema de um planeamento de Box-Behnken: (a) representação derivada de um cubo; (b) representação como um cruzamento de três planeamentos factoriais de dois factores com dois níveis.

3.2.6 – Regressão Múltipla

Quando há informação ou suspeitas de que a resposta de sistema depende de diferentes variáveis ou factores (x_1, x_2, ..., x_m) obtém-se um modelo multivariável que é linear nos coeficientes de regressão "b" que pode ser escrito com seguinte forma geral:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + ... + b_m x_m = b_0 + \Sigma_{(i=1,m)} b_i x_i \qquad \text{(Eq. 3.14)}$$

Um caso especial de modelos lineares são os polinómios, que como se referiu em 3.2.5 em geral são adequados para aproximar, pelo menos localmente, por modelos do tipo funções de segunda ordem traduzidas por modelos que são lineares ou de primeira ordem nos parâmetros de regressão (b). Se na equação 3.14, $x_1 = x$, $x_2 = x^2$, ..., $x_m = x^m$, obtém-se um polinómio de grau *m* entre a resposta e o factor, representado pela seguinte equação,

$$y = b_0 + b_1 x + ... + b_m x^m = b_0 + \Sigma_{(i=1,m)} b_i x^i \qquad \text{(Eq. 3.15)}$$

Apenas quando $m = 1$ é que o modelo linear define uma linha recta. Todos os outros modelos lineares correspondem a representações gráficas não lineares. Assim, e para evitar confusões entre a definição de modelos não lineares e modelos lineares que dão origem a representações não lineares, denominam-se estes últimos por modelos lineares curvilíneos.

Um dos métodos mais vulgares para obter estimativas dos coeficientes de regressão é o método dos mínimos quadrados. Para além do cálculo dos coeficientes (b) do modelo é também necessário proceder à sua validação, o que pode ser efectuado com a ANOVA da regressão como se apresenta a seguir.

3.2.6.1 - Validação do modelo

Teste de normalidade

A maior parte dos testes estatísticos são baseados na assunção de que os dados experimentais apresentam uma distribuição normal. Um método gráfico denominado procedimento de "rankit" permite de uma forma expedita verificar se a distribuição é normal [17,23]. Este procedimento consiste em ordenar por ordem crescente os *np* pontos experimentais e atribuir a cada ponto uma frequência de ocorrência cumulativa.

De seguida é necessário converter a frequência cumulativa numa percentagem de frequência cumulativa calculada do seguinte modo,

Frequência cumulativa (%) = (100 x frequência cumulativa) / (np+1) (Eq. 3.16)

A representação gráfica da percentagem de distribuição cumulativa em função das medições y deverá ter uma tendência linear se os dados estiverem normalmente distribuídos.

Por outro lado, a análise destes gráficos permite detectar a presença de pontos experimentais anormais ("outliers"). Por exemplo, um gráfico de "rankit" onde a falta de tendência linear da representação se deve à existência de dois pontos anormais e não a uma distribuição não normal. Após retirar os dois pontos suspeitos o gráfico deverá mostrar que os pontos experimentais estão normalmente distribuídos.

ANOVA da regressão

A análise da variância (ANOVA) da regressão permite verificar se as variáveis independentes previstas no modelo podem explicar uma quantidade significativa da variância na variável dependente (resposta). Também, se foram efectuadas experiências repetidas ou se existe uma estimativa do erro experimental, a validade do modelo proposto pode ser verificada. A ANOVA pode ser utilizada para verificar falta de ajuste numa regressão, de modo a verificar se o modelo escolhido é o correcto.

Tabela 3.4 – Tabela da ANOVA para regressão múltipla [17].*

Fonte da variação	SS	df	MS	F
Regressão	SS_{REG}	p-1	MS_{REG}	MS_{REG}/MS_R
Resíduos	SS_R	n-p	MS_R	
Falta de ajuste	SS_{LOF}	k-p	MS_{LOF}	MS_{LOF}/MS_{PE}
Erro puro	SS_{PE}	n-k	MS_{PE}	
Total	SS_T	n-1		

* SS – soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados; F – teste F; p – número de coeficientes de regressão; n – número de experiências; k – número de combinações diferentes das variáveis x ($m<k<n$).

O teste da falta de ajuste (lack of fit) compara a razão $F = MS_{LOF} / MS_{PE}$ com uma distribuição F com (k-p) e (n-k) graus de liberdade. Se este teste for significativo para o nível de significado escolhido (MS_{LOF} significativamente maior do que MS_{PE}) pode-se concluir que o modelo é inadequado. Se MS_{LOF} e MS_{PE} são comparáveis, o modelo está justificado e ambas as MS são estimativas independentes de σ^2. Consequentemente, a estimativa de σ^2 dada pelo $MS_R = s_e^2$ é usada nos cálculos subsequentes.

3.2.7 – Superfícies de Resposta

Uma superfície de resposta é um gráfico ou uma resposta em função de um ou mais factores. Após um estudo de planeamento experimental de um sistema e da sua conveniente modelação é possível estimar a forma da superfície de resposta para esse sistema na gama de condições experimentais utilizadas. Por sua vez, as superfícies de resposta poderão ser utilizadas para obter informação sobre as condições de funcionamento óptimo do sistema.

De seguida descrevem-se as formas de diferentes superfícies de resposta típicas e os respectivos modelos matemáticos.

3.2.7.1 - Superfícies de resposta planas

Basicamente podem ser observadas dois tipos de superfícies de resposta planas, a que correspondem modelos sem (Fig. 3.5) e com (Fig. 3.6) interacção. Os modelos matemáticos que lhes correspondem sã os seguintes:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 \qquad \text{(Eq. 3.28)}$$

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \qquad \text{(Eq. 3.29)}$$

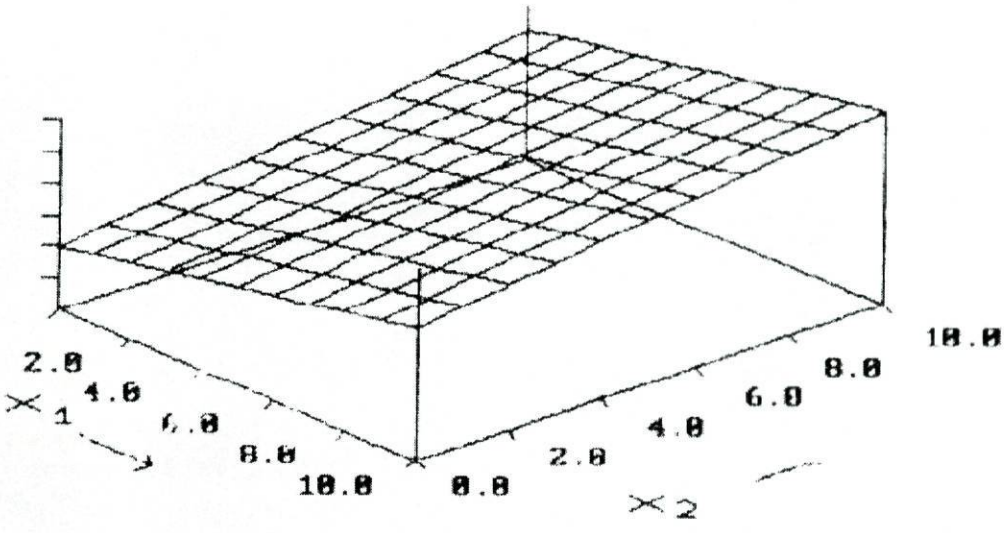


Fig. 3.8 –Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem sem interacção [19].

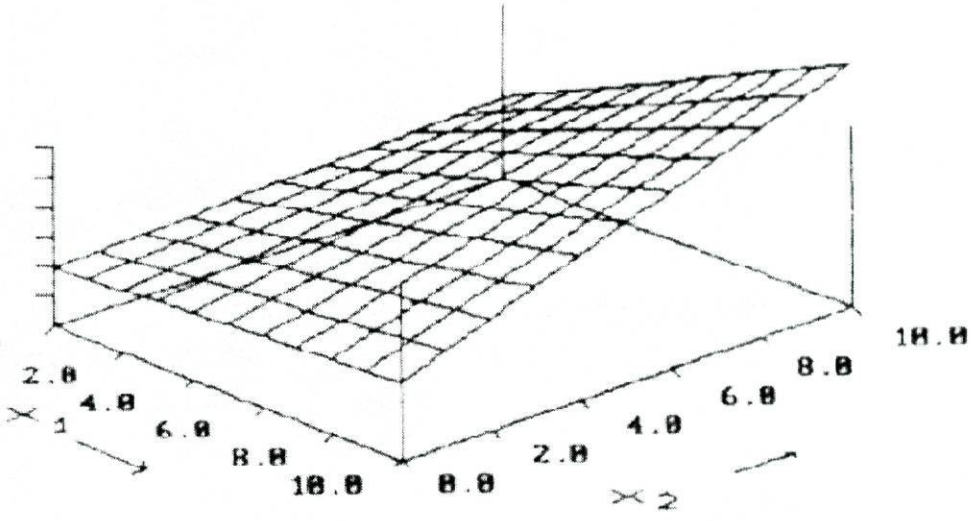


Fig. 3.9 – Superfície de resposta para um modelo de primeira ordem com interacção [19].

3.2.7.2 - Superfícies de resposta curvas

As superfícies de resposta curvas mais vulgares podem ser observadas na Fig. 3.10. O modelo de base, é dado pela seguinte equação [17]:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \qquad \text{(Eq. 3.30)}$$

As diferenças de sinal e grandeza relativa dos coeficientes b_{11} e b_{22} dão origem a superfícies de resposta curvas com diferentes formas. Se ambos os coeficientes forem negativos mas com valores muito diferentes observa-se um cume. Se os coeficientes tiverem sinais opostos e com a mesma ordem de grandeza observa-se uma cela. Se ambos os coeficientes forem negativos e com a mesma grandeza observa-se uma parábola aberta para baixo.

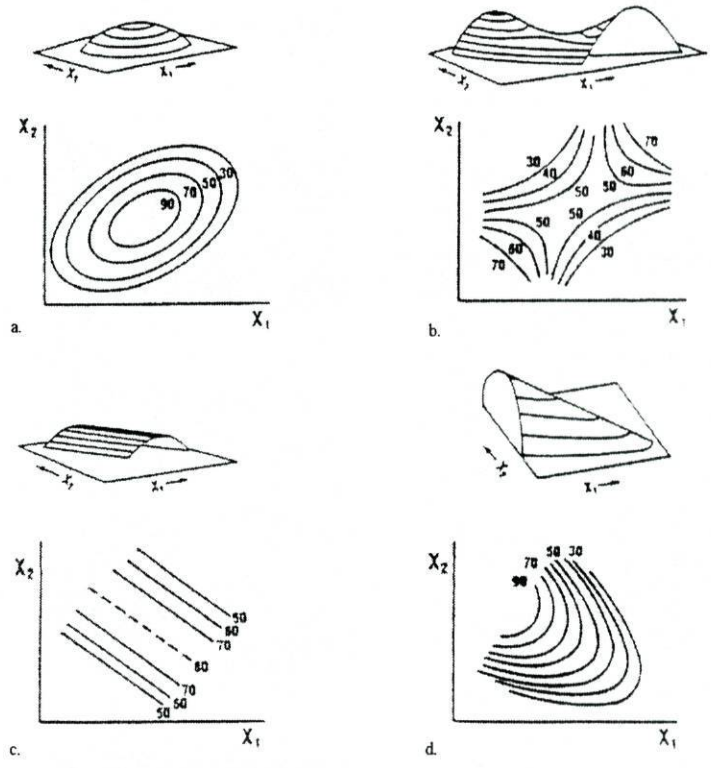


Fig. 3.10 – Superfícies de resposta curvas e respectivos gráficos de contornos: (a) parábola a abrir para baixo; (b) superfície com forma de uma sela; (c) superfície curva com um cume; (d) superfície curva com inclinação ascendente.

3.3 – BIBLIOGRAFIA

1. Ruzicka J. e E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, *78*,145 (1975).

2. K.K. Stewart, *Anal. Chem.*, *55*, 931A.

3. E.H. Hansen, Int. Lab., 18, 14 (1985).

4. J.Ruzicka e E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, Wiley-Interscience, New York, 1987, pág. 122.

5. J. Ruzicka e J.W.B. Stewart, *Anal. Chim. Acta*, *79*, 79 (1979)..

6. J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, *99*, 37 (1978).

7. J. Ruzicka, E.H. Hansen, H. Mosbaek F.J. Krug, *Anal. Chem.*, *49*, 1861 (1977).

8. J.T. Vanderslice, K.K. Stewart e A.G. Rosenfeld, *Talanta*, *28*, 11 (1981).

9. E. Tijssen, *Anal. Chim. Acta*, *114*, 71 (1980).

10. J.M. Reijn, W.E. Van der Linden e H. Poppe, *Anal. Chim. Acta*, *126*, 1 (1981).

11. ref. 4, pág. 94.

12. ref. 4, pág. 95.

13. ref. 4, pág. 44-60.

14. J.M. Reijn, W.E. Van der Linden e H. Poppe, *Anal. Chim. Acta, 123*, 229 (1981).

15. ref. 4, pág. 54.

16. ref. 4, pág. 244.

17. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginsts, L.M.C. Buydens, D. de Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

18. S.L.Morgan e S.N. Deming, *Anal. Chem.*, *46* 1170 (1974).

19. Ed Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, ACOL, Wiley, Chichester, 1991.

20. D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Wiley, New York, 1997.

21. S.N.Deming e S.L.Morgan, *Experimental design: A chemometric approach*, 2 Ed., Elsevier, Amsterdam, 1993.

22. N.A. Armstrong e K.C.James, Understanding experimental design and interpretation in pharmaceutics, Ellis Horwood, New York, 1990.

23. CAMO, The Unscramble design, User manual, Oslo, 2000.

4 – NORMAS DE AMOSTRAGEM E ENSAIOS QUÍMICOS

4.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo são descritas as normas portuguesas, aplicadas nesta dissertação: (i) para a recolha e amostragem das rolhas a norma NP 2922/1996; (ii) para a análise de oxidantes a norma NP 4296/1995; e (iii) para a análise de cloretos a norma NP 3384/1988.

Relativamente à norma NP 2922/1996, descreve-se sucintamente o processo de amostragem bem como os conceitos teóricos relacionados.

Relativamente às outras duas normas, referentes aos métodos de pesquisa de oxidantes, norma NP 4296/1995, e de pesquisa de cloretos, norma NP 3384/1988, apresentam-se os fundamentos teóricos, o procedimento experimental, o tratamento e apresentação de resultados e as respectivas conclusões baseadas na análise dos resultados obtidos.

4.2 - NORMA NP 2922/1996 – REGRAS E TABELAS DE AMOSTRAGEM

4.2.1 - Introdução

O objectivo e campo de aplicação da presente norma, consiste em especificar planos e regras de amostragem para o controlo por atributos de produtos de cortiça, segundo um nível de qualidade aceitável. Estes planos destinam-se, principalmente, ao controlo de séries continuas de lotes suficientemente importantes para permitir a aplicação das regras para alteração do controlo que:

- garantam a protecção do cliente em caso de detecção de uma deterioração da qualidade (pela passagem de um controlo rigoroso ou interrupção do controlo);
- constituem uma incitação na redução dos custos de controlo se a qualidade se mantiver continuamente satisfatória (pela passagem de um controlo reduzido).

4.2.2 – Terminologia e definições

Defeito: Desvio de uma característica, de um produto, ou de um processo conduzindo a uma insatisfação deste produto ou deste processo no uso normal ao qual está destinado.

Não conformidade: Desvio numa característica conduzindo ao não respeito por um produto ou processo da exigência especificada. Segundo o seu grau de importância, as não conformidade são geralmente classificadas em:

Classe A: Tipo de não conformidade com incidência grave sobre o produto. Num controlo de recepção por amostragem, será fixado um valor de NQA (nível de qualidade aceitável) bastante baixo.

Classe B: Tipo de não conformidade com uma incidência menor e pelas quais pode ser fixo um valor do NQA superior às da classe A e inferior às da classe C, caso exista uma 3° classe, e assim sucessivamente.

Nível de qualidade aceitável (NQA): É um valor que determina a percentagem de unidades não conformes (ou o número de não conformidade por 100 unidades), devendo ser aceite, na maioria dos casos, por aplicação do processo de amostragem utilizado.

Plano de amostragem: Plano específico que fixa o número de unidades de produto que devem ser controladas em cada lote (efectivo de amostras ou série de efectivos de amostra), assim como os critérios correspondentes de aceitação do lote (critérios de aceitação ou de rejeição). Os planos de amostragem contidos nesta norma foram estabelecidos de tal modo que, a probabilidade de aceitação para um dado NQA, depende do efectivo da amostra, sendo esta probabilidade geralmente mais elevada, para um dado NQA, para as amostras de efectivo elevado do que para a amostra de efectivo mais reduzido.

Processo de amostragem: Combinação adequada de planos de amostragem e de regras de modificação de controlo.

Sistema de amostragem: Conjunto de planos ou de processos de amostragem.

Efectivo de um lote: Número de unidades de produto de um lote.

Amostra: Uma ou várias unidades de produto retiradas ao acaso de um lote, sem ter em consideração a sua qualidade. O número de unidades de produto que constitui a amostra é o efectivo da amostra.

4.2.3 - Levantamento das amostras

Amostra representativa ou estratificada: O número de unidades de amostra levantadas deve ser proporcional aos efectivos dos sub-lotes ou estratos de lotes, identificados seguindo um critério racional. Quando se utiliza a amostragem estratificada, as unidades devem ser levantadas aleatoriamente em cada um dos estratos do lote.

Momento do levantamento: As amostras podem ser levantadas, seja depois que todas as unidades do lote tenham sido reunidas, ou durante a produção do lote. Nestes dois casos, as amostras devem ser levantadas aleatoriamente.

Amostragem dupla ou múltipla: No caso de uma amostragem dupla ou múltipla, cada amostra deve ser levantada sobre a totalidade do lote.

4.2.4 – Planos de amostragem

4.2.4.1 – Nível de controlo

O nível de controlo é fixado, para cada aplicação considerada, pela autoridade responsável. Esta cláusula permite à autoridade responsável exigir uma discriminação mais forte em certos casos e mais fraca noutros. Os níveis de controlo estabelecidos pela norma podem ser reduzido (nível I), normal (nível II) ou rigoroso (nível III). Salvo prescrição contrária, o nível II deve ser utilizado. O nível I pode ser utilizado quando uma austeridade mínima é suficiente e o nível III quando, ao contrário, a austeridade deve ser maior. A mesma norma específica quatro níveis de controlo especiais complementares: S1, S2, S3 e S4, que podem ser utilizados quando as amostras de efectivos relativamente pequenos são necessárias ou quando os riscos mais elevados podem ser tolerados. O objectivo dos níveis especiais de controlo é reduzir ao máximo os efectivos da amostra.

4.2.4.2 – Letra-código do efectivo da amostra

Os efectivos de amostra são localizados por letra-código do mesmo. A norma estabelece uma tabela deve ser utilizada para encontrar a letra-código do efectivo do lote e do nível de controlo prescrito.

4.2.4.3 – Determinação de um plano de amostragem

O NQA e letra código do efectivo de amostragem são utilizados para encontrar o plano de amostragem nos índices II, III ou IV. Quando nenhum plano de amostragem corresponder a uma dada combinação do NQA e à letra código do efectivo de amostra, os índices remetem o utilizador para uma outra letra código. O efectivo de amostra a utilizar, neste caso, é dado pela primeira letra mas pela nova letra código.

4.2.4.4 – Tipos de planos de amostragem

Os índices II, III e IV dão 3 tipos de planos de amostragem: simples, dupla e múltipla. Quando existem vários tipos de planos para um dado NQA e uma dada letra código, pode-se utilizar um qualquer. A escolha entre os tipos de planos simples, duplo ou múltiplo, quando estes existem para um dado NQA e uma letra código, deve-se efectuar tendo em conta, por um lado as dificuldades administrativas e por outro lado os efectivos médios de amostra destes diversos planos. Nos planos considerados na presente norma, o efectivo médio de amostra dos planos múltiplos é inferior ao dos planos duplos (salvo no caso onde o critério de aceitação do plano simples é correspondente a 1) e o dos planos duplo e múltiplo é habitualmente inferior ao efectivo do plano simples. Geralmente, as dificuldades administrativas e os custos por unidade controlada são menores no caso de amostragem simples que no caso de amostragem dupla ou múltipla. Nas amostras que são objecto de estudo nesta dissertação, foi utilizado um plano de amostragem simples par inspecção normal, de acordo com o estabelecido pela norma NP 2922/96.

4.3 – PESQUISA DE OXIDANTES BASEADA NA NORMA NP 4296/1995

4.3.1 Introdução

A norma NP 4296/1995 destina-se a fixar um método de ensaio para a pesquisa de oxidantes em rolhas de cortiça. O método descrito nesta norma baseia-se no contacto das rolhas com uma solução de iodeto em meio ácido.

O ião iodeto (I^-), é um redutor bastante forte, pelo que reage com um grande número de substâncias oxidantes. A reacção de oxidação/redução é traduzida pela seguinte equação:

$$I^- + \text{Oxidante} \rightleftharpoons I_3^- + \text{Redutor} \qquad \text{(Eq. 4.1)}$$

Como se referiu em 1.1.9 (ver fluxograma da Fig. 1.7) o processo de fabrico das rolhas envolve a "lavação" com peróxido de hidrogénio pelo que podem aparecer nas rolhas vestígios deste composto. Acresce que a reacção entre o H_2O_2 e o I^- é relativamente lenta, embora a sua velocidade aumente com a acidez. Deste modo, deve-se deixar a rolha em contacto com a solução ácida de iodeto o tempo suficiente para a reacção se completar. Por outro lado, tempos de contacto muito elevados também podem permitir que ocorra a oxidação do I^- em excesso, pelo oxigénio atmosférico, oxidação esta que é acelerada pela acção da luz. Para evitar extensão apreciável desta reacção deve-se manter a solução, ao abrigo da luz.

O ião I_3^-, originado pela oxidação do ião I^-, é fixado pelas moléculas de β-amilase (um dos constituintes do amido), com formação de um composto de cor azulada facilmente detectável.

Este método é um método semi–quantitativo, pelo que apenas se podem retirar conclusões acerca da gama de valores entre os quais a concentração de oxidantes da amostra analisada se encontra. Em concreto, a sensibilidade do método corresponde à sensibilidade da reacção corada, de tal forma que, a cor azulada é visível quando a concentração de iodo é 2×10^{-5} M e a concentração de iodeto é maior que 4×10^{-4} M, a 23 °C.

4.3.2 – Parte experimental

As soluções utilizadas na parte experimental, foram preparadas a partir de reagentes de elevado grau de pureza, qualidade p.a ou equivalente, e água desionizada.

4.3.2.1 – Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram: iodeto de potássio; Amido solúvel, ácido acético glacial; água desionizada.

Solução de amido a 0,1 % (m/ V): pesou-se 1 g de amido solúvel, triturou-se com alguns ml de água fria, lançou-se a pasta em 1000 ml de água a ferver, deixou-se ferver a solução durante 2 min, até que a solução ficou transparente e de seguida decantou-se. O acondicionamento foi efectuado em frasco de vidro devidamente rotulado, ou seja, com a indicação que se trata de uma solução de amido, com o valor da concentração desta, a data de preparação e o nome do técnico que a preparou. É de salientar que as soluções de amido são um excelente meio alimentar para os microoganismos e portanto deterioram-se rapidamente. Se a tonalidade obtida no ensaio não for azulada, mas acastanhada, significa que o amido se deteriorou e que já não pode servir de indicador.

4.3.2.2 – Material

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL, uma proveta de 200 mL, provetas de 5 mL ou instrumento de medida equivalente, micropipetas de 1000 µL de marca Gylson, uma balança com resolução 0.1 g e um agitador regulável para 120 rpm.

4.3.2.3 – Técnica de ensaio

Mediu-se 200 ml de água desionizada para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, adicionaram-se cerca de 4 g de iodeto de potássio. À solução anterior adicionaram-se 1 mL de ácido acético glacial e 5 mL de solução de amido, homogeneizou-se e juntaram-se 5 rolhas. Agitou-se durante 30 min a 120 rpm. Imediatamente após a agitação, verificou-se se a solução ficou ou não azulada. Os ensaios foram efectuados em duplicado e em paralelo com o ensaio em branco (sem rolhas).

4.3.3 – Resultados e discussão

Os resultados obtidos por este método são qualitativos e descritos como podendo ser positivos ou negativos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.1, sendo baseados em duas réplicas concordantes, apresentando-se como positivos se aparecer cor azulada ou negativos, na ausência desta. Relativamente ao resultado do branco tem que ser sempre negativo, quando tal não se verificou, procedeu-se às correcções necessárias e tornou-se a repetir o procedimento experimental.

4.3.4 – Conclusão

Todos os resultados obtidos da análise das amostras (ver tabela 4.1) foram negativos. O facto de não se detectarem níveis elevados de oxidantes nas rolhas analisadas, apesar de estas terem sofrido lavação com oxidantes deve-se a que, a etapa seguinte de secagem foi efectuada de forma correcta de modo a elimina-los. Este método é um método qualitativo pelo que apenas se pode concluir acerca da presença ou não de oxidantes acima de um determinado valor (resultado positivo ou negativo) mas não se pode concluir acerca da concentração abaixo desse valor limite. Torna-se interessante implementar outros métodos para detectar e quantificar os oxidantes nas rolhas de cortiça.

4.4 – PESQUISA DE CLORETOS BASEADA NA NORMA NP 3384/88

4.4.1 - Introdução

O método utilizado na norma NP 3384/1988 para detecção de cloretos é baseado no método de Charpentier Volhard, que se trata de uma argentometria de retorno, em que precipita o anião cloreto com solução de catião prata, em excesso segundo a reacção traduzida por:

$$Cl^- + Ag\ (aq) \rightleftharpoons AgCl\ (s) + Ag^+\ (aq) \qquad \text{(Eq. 4.2)}$$

Titulando-se este excesso com solução de SCN^- padrão ocorre a reacção traduzida por:

$$Ag^+\ (aq) + SCN^- \rightleftharpoons AgSCN\ (s) \qquad \text{(Eq. 4.3)}$$

Para indicação do ponto final junta-se ao titulado solução de $Fe(NH_4)(SO_4)_2.12\ H_2O$ 0,2 M. Para obter a solução ácida, exigido pelo processo de indicação do ponto final, utiliza-se HNO_3 6 M, previamente fervido para expulsar os óxidos de azoto.

Existe uma causa importante de erro do método, que é a ocorrência da reacção traduzida por:

$$AgCl + SCN^- \rightleftharpoons Cl^- + AgSCN\ (s) \qquad \text{(Eq. 4.4)}$$

que se dá em extensão apreciável.

Neste caso, o SCN^- adicionado vai não só precipitar o catião Ag^+ em excesso (doseamento de retorno) como também dissolver parte do precipitado de AgCl, convertendo-se em AgSCN. Consome-se excesso de titulante e, como a volumetria é de retorno, os resultados aparecem com um erro por defeito. Esta causa de erro pode ser eliminada, por exemplo, isolando o precipitado de AgCl formado da solução que contém o excesso de Ag^+, a dosear com SCN^-.

O processo resume-se ao contacto da rolha com a solução alcoólica a 12 % durante 24 horas a 40 °C. A precipitação de cloretos efectua-se através da adição ao extracto de solução padrão de nitrato de prata, sendo a titulação do excesso de nitrato de prata realizada com solução de tiocianato de amónio.

4.4.2.1 – Reagentes e soluções

Solução de nitrato de prata 0,1 M: a norma NP 3384/88 descreve a preparação de solução de nitrato de prata a partir do sal. Neste trabalho foi utilizada uma solução padrão de nitrato de prata 0,1 M obtida por diluição em água desionizada de uma ampola de Tritisol refº 109990 da marca Merck.

Solução de nitrato de prata 0,02 M: preparou-se imediatamente antes do ensaio, por diluição da solução anterior.

Solução de tiocianato de amónio 0,02 M: transferiu-se para um balão volumétrico de 500 mL, 0,76 g de tiocianato de amónio e adicionou-se água desionizada até completar o volume do balão.

Solução de ácido nítrico a 10%: num balão volumétrico de 100 mL, dissolveu-se 14,6 mL de ácido nítrico em água desionizada, homogeneizou-se e completou-se o volume.

Solução saturada de sulfato de ferro (III) e amónio: adicionou-se sulfato de ferro (III) e amónio à água, a frio, até saturar. De seguida, adicionou-se ácido nítrico em quantidade suficiente para descorar a solução (cerca de 5 mL para 100 mL).

4.4.2.2 – Material

Foram utilizados balões volumétricos de 100, 500 e 1000 mL, uma proveta de 50 ml, uma micropipeta de marca Gylson de 5000 μL, pipetas de 10 e 50 mL, uma balança com resolução 0,1 g e uma estufa regulada a 40 ± 2°C.

4.4.2.3 – Técnica de ensaio

Extracção: num frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de solução alcoólica a 12% fez-se mergulhar a rolha, de seguida vedou-se o frasco e colocou-se o conjunto na estufa regulada a 40 ± 2°C durante 24 horas; após este período, retirou-se imediatamente a rolha em ensaio e deixou-se arrefecer a solução à temperatura ambiente.

Determinação: mediu-se 50 mL da solução de extracção para um frasco Erlenmeyer de 150 mL, adicionou-se 10 mL da solução de ácido nítrico, cerca de 3 mL da solução de alúmen férrico e 50 mL da solução de nitrato de prata medidos por pipeta volumétrica; titulou-se o excesso de prata com solução de tiocianato até obtenção de coloração rósea persistente.

O ensaio em branco efectuou-se paralelamente e nas mesmas condições operatórias, utilizando a solução alcoólica a 12% sem contacto com qualquer rolha de cortiça.

4.4.3– Resultados e discussão

Os resultados referentes ao teor de cloretos detectado na pesquisa baseada na norma NP 3384/88, são expressos em mg/100mL sendo calculado o resultado segundo a fórmula:

$$C\ (\text{cloretos}) = 2 \times 35{,}5 \times M \times (V_0 - V_1) \qquad \text{(Eq. 4.5)}$$

Em que:

V_0 – é o volume, expresso em mL, da solução de tiocianato gasta no ensaio em branco;

V_1– é o volume, expresso em mL, na solução de tiocianato gasta na determinação;

M – é a molaridade da solução de nitrato de prata.

Os resultados obtidos para as diferentes amostras analisadas estão resumidos na tabela 4.3.

Tabela 4.1 – Resultados obtidos na análise de oxidantes e de cloretos em rolhas de cortiça, efectuadas segundo as normas NP 4296/1995 e NP 3384/88.

		Cloretos (mg/100 mL)				Oxidantes
Amostra	Tipo de rolha	Ensaio: 1	2	3	Média[a)]	
1	Naturais timbradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
2	Colmatadas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
3	Naturais timbradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
4	Naturais coradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
5	Aglomerado	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
6	Aglomerado	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
7	Colmatada	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
8	Natural	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
9	Aglomerado	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
10	Colmatada	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
11	Naturais timbradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
12	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
13	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
14	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
15	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
16	Naturais timbradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.

a) Valor médio de três ensaios acompanhado do respectivo desvio padrão.
(continua)

Tabela 4.1 – Resultados obtidos na análise de oxidantes e de cloretos em rolhas de cortiça, efectuadas segundo as normas NP 4296/1995 e NP 3384/88.

		Cloretos (mg/100 ml)				Oxidantes
Amostra	Tipo de rolha	Ensaio: 1	2	3	Média[a)]	
17	Colmatadas naturais	-0,1	0,0 7	0,07	0,0 ± 0,0	Neg.
18	Timbradas naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
19	Coradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
20	Aglomerado	0,14	0,14	0,14	0,14 ± 0,0	Neg.
21	Aglomerado	0,07	0,07	0,07	0,07 ± 0,0	Neg.
22	Colmatada	-0,01	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
23	Natural	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
24	Aglomerado	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
25	Colmatada	0,0	0,01	0,03	0,02 ± 0,01	Neg.
26	Naturais timbradas	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
27	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
28	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
29	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.
30	Naturais	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0	Neg.

a) Valor médio de três ensaios acompanhado do respectivo desvio padrão.

4.4.4 - Conclusões

Da análise dos resultados da tabela 4.1, pode-se concluir que a concentração de cloretos ou é muito baixa (numa gama de valores que não se detectam por titulação nas condições em que foi efectuada) ou é aproximadamente zero para todas as amostras, o que está de acordo com o resultado que se poderia prever, uma vez que, na etapa de lavação das rolhas que compõem as amostras utiliza-se peróxido. Conclui-se que é desejável desenvolver um processo automatizado e expedito para efectuar esta determinação de modo a simplificar o controlo deste parâmetro de qualidade das rolhas.

5 - DETERMINAÇÃO DE CLORETOS POR PSEUDO-TITULAÇÃO EM FIA

5.1 - INTRODUÇÃO

Como foi referido anteriormente no capítulo 1, a importância do controlo da concentração de cloretos nas rolhas de cortiça deve-se sucintamente, à associação deste ião com a formação do tricloroanosole (TCA), composto este que pode estar relacionado com a formação do denominado "gosto a rolha" [1]. A determinação da concentração de cloretos pode ser efectuada pela norma NP 3384/1988, descrita no capítulo 4, no entanto, torna-se pertinente pesquisar um método alternativo, mais expedito para efectuar esta determinação.

Em estudos anteriores [2], foram implementados e optimizados sistemas para a determinação de cloretos por pseudo-titulação em FIA com detecção potenciométrica cobrindo uma gama de valores de concentração de cloreto entre 0,3 e 2,6 M. Nesses sistemas, as amostras (titulado) são injectadas, sem qualquer tratamento prévio, num fluxo de solução de nitrato de prata (o titulante), que contém nitrato de potássio para aumentar a condutividade da solução e ajustar a força iónica, e ácido nítrico para prevenir a precipitação de óxidos e hidróxidos de prata. A solução de prata e a amostra são misturadas num dispositivo com gradiente exponencial. No sistema de FIA em estudo neste capítulo, o titulante também é uma solução de transportador que contém nitrato de prata e o titulado é a amostra a ser injectada no sistema (solução etanólica de cloreto), ocorrendo uma reacção de precipitação. A diminuição da concentração da prata também é monitorizada pela variação do potencial entre o eléctrodo indicador e o eléctrodo de referência. O eléctrodo indicador utilizado, é um eléctrodo sanduíche [3], sendo a membrana homogénea cristalina constituída por uma pastilha de sulfureto de prata/cloreto de prata, obtida a partir de 0,5 g do sensor. No entanto, no sistema agora desenvolvido pretende-se efectuar a determinação de cloreto numa gama de valores de concentração inferior à descrita em trabalho anterior [2], entre 0,05 e 10,0 mM.

As pseudo-titulações em FIA são determinações efectuadas num sistema de fluxo, no qual ao injectar uma amostra, por exemplo de ácido numa solução de transporte constituída por uma base, a espécie ácida é gradualmente neutralizada ao dispersar-se nesta solução, em ambas as interfaces correspondentes aos extremos da zona da amostra [4]. Em cada uma destas interfaces, existe um elemento de fluido, no qual o ácido da amostra, e a base da solução de transportador, estão em proporção estequiométrica. A distância a que se encontram esses elementos de fluído (Δt), nas duas interfaces aumenta com a concentração de base na solução de transportador (titulante). A relação entre a concentração de ácido na amostra, e a distância a que se encontram os dois pontos, depende do perfil de concentrações formado pela dispersão da amostra na solução de transportador.

Relativamente à resposta do sistema, esta tem a forma de um pico, cuja largura está relacionada com a variação do tempo entre dois elementos de fluido, com coeficiente de dispersão idêntico. Por injecção de amostras padrão de diferentes concentrações, podem ser obtidos vários picos, e a respectiva curva de calibração é construída dependendo da selectividade da resposta do detector. O Δt é uma função da concentração da amostra e pode ser representado, da seguinte forma [5]:

$$\Delta t = (Vm/Q) \ln 10 \log[C^{o}_{S}/(C^{o}_{R}n)] + const. \qquad \text{(Eq. 5.1)}$$

Em que n é o coeficiente molar dos componentes que reagem, Vm é o volume do reactor, Q é o caudal, C^{o}_{S} é a concentração de amostra, e C^{o}_{R} é a concentração de titulante na solução de transportador e const. é uma constante. A zona de dispersão da amostra é traduzida por uma matriz de concentração *vs* tempo, deste modo, em todas as pseudo-titulações de FIA existe um par de elementos de fluído que podem ser identificados por utilização de um indicador da reacção química que ocorre, a uma distância entre o par de pontos de Δt.

O processo de mistura originalmente era realizado numa câmara de mistura, cujo volume determinava o desenho do fluxo. Para cada experiência, surge uma constante que pode ser definida da seguinte forma [6]:

$$const_{I} = (V_m/Q) \ln 10 \log (S_v/V_m) \qquad \text{(Eq. 5.2)}$$

Na qual S_v representa o volume da amostra e V_m o volume da câmara de mistura, como já referido, que constituem os parâmetros físicos identificáveis. Por utilização do coeficiente de dispersão (D), a $const_1$ pode ser rescrita da seguinte forma:

$$const_1 = (V_m/Q) \ln 10 \log[D/(D-1)] \qquad \text{(Eq. 5.3)}$$

No entanto, em estudos anteriores, demonstrou-se que os processos com um modelo de um único estádio de mistura, permitia a miniaturização e simplificação do sistema de FIA, resultando na eliminação da câmara de mistura na implementação de pseudo-titulações de alta velocidade. Estas psedo-titulações são realizadas a uma dispersão média ou mesmo limitada. O tratamento da dispersão num sistema para valores de D pequenos, desenvolvido por Tyson [7], requer a modificação da $const_1$ para valores de D pequenos de modo que Δ t apresenta a seguinte forma:

$$\Delta t = (Vm/Q) \ln 10 \log[C^o_S/(C^o_R n)] + (Vm/Q) \ln 10 \log(D-1) \qquad \text{(Eq. 5.4)}$$

Em que se estabelece a seguinte condição de equivalência:

$$C^o_S/(C^o_R n) = D-1 \qquad \text{(Eq. 5.5)}$$

Deste modo, pode-se fazer diminuir o limite de detecção por diminuição do coeficiente de dispersão D, o qual se pode realizar pelo aumento do volume de amostra injectado (D diminui com Sv), mas perde-se em gasto de amostra e em tempo da determinação. A utilização de uma câmara de mistura em pseudo-titulações de FIA resulta num valor elevado de dispersão e numa alta precisão, tendo no entanto algumas desvantagens, designadamente, um baixo valor do ritmo de amostragem e um limite de detecção baixo. Por outro lado as pseudo-titulações realizadas sem câmara de mistura, com tubo de gradiente, a dispersão é mais baixa, o limite de detecção também é inferior e o ritmo de amostragem é muito superior ao dos sistemas com câmara de mistura.

Um tratamento rigoroso dos processos cinéticos que influenciam a largura do pico, e portanto, foi decisivo para o desenvolvimento de pseudo-titulações com base no gradiente, os estudos efectuados por Pardue *et.al.* [8], que utilizaram um modelo cinético da variável tempo, para prever a dependência entre Δt e os parâmetros físico-químicos do

sistema. Estes cientistas, submeteram os seus modelos a uma avaliação experimental exacta, incluindo um método cinético de previsão da resposta dos sistemas. No entanto, na pratica, na maioria dos sistemas de pseudo-titulação baseados em medições de largura de pico, é utilizada uma abordagem empírica, e não uma aproximação com base em modelos teóricos, os quais apesar da sua crescente sofisticação não conseguem descrever peculiaridades das experiências com uma precisão suficiente para evitar a necessidade de calibração.

Por este motivo, no presente trabalho, a aproximação ao estudo do sistema de pseudo-titulação, é efectuada empiricamente, de modo a optimizar as condições operacionais sendo depois efectuada a calibração do sistema e as determinações de anião cloreto em extractos de rolhas de cortiça.

5.2 – OPTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO SISTEMA

5.2.1 – Estudo da resposta limite de detecção

Com base nos modelos traduzidos pelas equações 5.1 a 5.5 os factores considerados mais significativos para o sistema em estudo, que se encontra esquematizado na Fig.2.1, são a concentração de prata na solução de transportador, o comprimento do reactor e o caudal total. Na tabela 5.1 encontra-se a lista desses factores e as respectivas abreviaturas utilizadas para os referir ao longo do texto.

O número de factores apresentado não é elevado e como tal, recorreu-se a um planeamento factorial completo, cuja matriz dos contrastes do planeamento para três factores a dois níveis, representados pelos algarismos (-1) e (1), mais três repetições no centro (0) se encontra na tabela 5.2. Os valores experimentais a que correspondem os níveis da tabela 5.2, encontram-se resumidos na tabela 5.3.

Tabela 5.1 – Factores estudados e suas abreviaturas.

Factor	Abreviatura
Concentração de prata	C_{Ag}
Comprimento do reactor de mistura	L_{mix}
Caudal total	Q_t

Tabela 5.2 – Matriz do planeamento de experiências de um planeamento factorial fraccionado com três factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0).

Experiências	Factores		
	C_{Ag}	L_{mix}	Q_t
1	-1	-1	-1
2	-1	1	-1
3	-1	-1	1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	1	-1
7	1	-1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Tabela 5.3 – Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da tabela 5.2.

Factores	Unidades	Níveis		
		-1	0	1
C_{Ag}	M	$5x10^{-5}$	10^{-4}	$5x10^{-4}$
L_{mix}	m	1	2	3
Q_t	mL/min	1,5	3,3	5,0

A primeira resposta do sistema estudada foi o limite de detecção, uma vez que o processo descrito na norma NP 3384/1988 permite a determinação de valores de concentração de cloreto nos extractos até cerca de $5x10^{-5}$ M, pretendeu-se garantir que o sistema permitisse a determinação de cloretos com um limite de detecção desta ordem de grandeza. Os resultados obtidos neste primeiro conjunto de experiências encontram-se resumidos na tabela 5.4, na qual se apresenta simultaneamente os valores obtidos e a matriz do planeamento factorial de experiências.

Tabela 5.4 - Matriz do planeamento factorial de experiências, com três factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0) e o respectivo valor do limite de detecção.

Experiências	Factores			Limite de detecção
	C_{Ag}	L_{mix}	Q_t	
1	-1	- 1	-1	$1x10^{-4}$
2	- 1	1	-1	$5x10^{-4}$
3	- 1	-1	1	$1x10^{-4}$
4	-1	1	1	$5x10^{-4}$
5	1	-1	- 1	$5x10^{-5}$
6	1	1	- 1	$5x10^{-4}$
7	1	- 1	1	$5x10^{-5}$
8	1	1	1	$1x10^{-4}$
9	0	0	0	$1x10^{-4}$
10	0	0	0	$1x10^{-4}$
11	0	0	0	$1x10^{-4}$

Para identificar os factores mais significativos foi utilizado um o método HOIE [9] e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.5. Na tabela 5.6 encontra-se a ANOVA dos mesmos resultados e os valores dos coeficientes *b* do modelo linear.

Tabela 5.5 – Resultados do estudo do efeito dos factores pelo método HOIE [9].

Factor	Significado
L_{mix}	Muito significativo
Q_t	Não significativo
C_{Ag}	Não significativo

Tabela 5.6 - ANOVA dos resultados da tabela 5.4 para identificar os efeitos mais significativos na resposta do sistema.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	*b*
Sumário						
Modelo	$2{,}625\times10^{-7}$	3	$8{,}750\times10^{-8}$		1,0000	
Erro	$7{,}125\times10^{-8}$	4	$1{,}781\times10^{-8}$			
Total ajustado	$3{,}338\times10^{-7}$	7	$4{,}768\times10^{-8}$			
Variáveis						
L_{mix}	$2{,}112\times10^{-7}$	1	$2{,}112\times10^{-7}$		0,0000	$1{,}625\times10^{-4}$
C_{Ag}	$3{,}125\times10^{-8}$	1	$3{,}125\times10^{-8}$		1,0000	$-6{,}250\times10^{-5}$
Q_t	$2{,}000\times10^{-8}$	1	$2{,}000\times10^{-8}$		1,0000	$-5{,}000\times10^{3}$

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; *F* – razão de Fisher; valor *p* – probabilidade; *b* – coeficientes de regressão.

Da análise das tabelas 5.5 e 5.6, conclui-se que o factor mais significativo para o limite de detecção do sistema é o comprimento do reactor de mistura (L_{mix}) e que o valor

deste limite aumenta com este factor, o que está de acordo com a Eq. 5.4 apresentada na introdução deste capítulo. Por este motivo, o valor de L_{mix} foi fixado em 1m e no estudo seguinte da largura de pico apenas se considerou os factores C_{Ag} e Q_t .

5.2.2 – Estudo da resposta largura de pico

A etapa seguinte consistiu no estudo do efeito dos factores C_{Ag} e Q_t na largura de pico tendo sido variados os seus níveis segundo um planeamento factorial completo com dois factores e dois níveis, ao qual se adicionaram três experiências no centro do planeamento. Na tabela 5.7 encontra-se a matriz de contrastes para este planeamento e as respostas obtidas nestas experiências em que foi injectada no sistema uma solução de NaCl $5x10^{-4}$ M em solução etanólica a 12 %. Os valores experimentais a que correspondem os níveis codificados dos factores da tabela 5.7 encontram-se na tabela 5.3.

Na tabela 5.8 encontram-se os resultados da ANOVA dos dados da tabela 5.7 e os valores dos coeficientes *b* do modelo linear. Os resultados da tabela 5.8 mostram que o factor mais significativo é a velocidade de fluxo Q_t, a que corresponde um valor de *F* de 175,679, e que a largura de pico diminui com este factor (coeficiente *b* negativo e igual a – *12,129*). O outro factor estudado, a concentração de prata na solução de transportador C_{Ag} não tem um efeito significativo, o valor de *F* e P(*F*) são respectivamente de 3,067 e 0,1180. O valor do coeficiente *b* do modelo linear para este factor é de 1,602, ou seja a largura de pico aumenta com C_{Ag}.

No que se refere à optimização da velocidade de fluxo é importante salientar que o aumento da largura do pico à medida que aumenta o velocidade de fluxo (Q_t) se encontra relacionado em grande parte com o tempo de passagem do segmento de amostra no detector e por conseguinte a diminuição da largura de pico com Q_t não pode ser atribuída apenas a uma menor dispersão da amostra no transportador, o que tal como se referiu na introdução deste capítulo não é essencial uma elevada dispersão para se efectuarem pseudo-titulações em sistemas de FIA. A optimização da resposta largura de pico baseou-se na repetibilidade da resposta do sistema avaliada através dos valores do desvio padrão dos valores obtidos nas três réplicas de cada ponto do planeamento. Na tabela 5.9 encontram-se os valores médios da largura de pico obtidos nas três experiências efectuadas para cada combinação de níveis dos factores experimentais acompanhados do respectivo desvio padrão absoluto e em percentagem. Na tabela 5.10 encontram-se resumidos os resultados da ANOVA dos valores absolutos do desvio padrão e mostram que, também neste caso, o único factor significativo é a velocidade de fluxo, valor *p de 0,0409*. O valor do coeficiente *b* do modelo linear para este factor é de –2,236, ou seja a largura de pico diminui com a velocidade de fluxo.

Os resultados da Tabela 5.10 mostram também que a repetibilidade da resposta e a largura de pico aumenta com a concentração de prata no transportador, valor de b de 0,141. Em face destes resultados, o valor da concentração de prata foi fixado em $5x10^{-4}$ M, e o valor caudal total Q_t em 5,00 ml/minuto.

Tabela 5.7 - Matriz do planeamento factorial de experiências, com dois factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) com três réplicas de cada ensaio ao qual foram adicionados três pontos no centro e os respectivos valores médios da largura de pico obtidos nas três experiências, acompanhados do valor do desvio padrão.

Experiências	Factores		
	C_{Ag}	Q_t	Largura de pico (s)
1	-1	-1	38,44
2	-1	-1	30,21
3	-1	-1	35,70
4	1	-1	43,94
5	1	-1	43,94
6	1	-1	52,18
7	-1	1	19,22
8	-1	1	19,23
9	-1	1	19,22
10	1	1	13,73
11	1	1	13,73
12	1	1	13,73
13	0	0	32.95
14	0	0	33.23
15	0	0	35,71

Tabela 5.8 - ANOVA dos significado dos efeitos dos valores da largura de pico obtidos nas experiências descritas na Tabela 5.7.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	*b*
Sumário						
Modelo	$2{,}023 \times 10^3$	3	674,400	67,111	0,0000	
Erro	80,392	8	10,049			
Total ajustado	$2{,}104 \times 10^3$	11	191,236			
Variáveis						
Q_t (A)	$1{,}765 \times 10^3$	1	$1{,}765 \times 10^3$	175,679	0,0000	-12,129
Cag (B)	30,816	1	30,816	3,067	0,1180	1,602
AB	226,983	1	226,983	22,588	0,0014	-4,349

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; *F* – razão de Fisher; valor *p* – probabilidade; *b* – coeficientes de regressão.

Tabela 5.9 - Matriz do planeamento factorial de experiências, com dois factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) ao qual foi adicionado um ponto no centro e os respectivos valores médios da largura de pico obtidos nas três experiências, acompanhadas do valor do desvio padrão.

Factores			
C_{Ag}	Q_t	Largura de pico (s)	Desvio padrão
-1	-1	34,78	4,19
-1	1	19,22	0,01
1	-1	46,69	4,76
1	1	13,73	0,00
0	0	33,96	1,52

Tabela 5.10 - ANOVA dos significado dos efeitos dos valores da largura de pico obtidos nas experiências descritas na Tabela 5.7.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	*b*
Sumário						
Modelo	20,078	2	10,039	121,035	0,0641	
Erro	$8,294x10^{-2}$	1	$8,294x10^{-2}$			
Total ajustado	20,191	3	6,720			
Variáveis						
Q_t (A)	19,999	1	19,999		0,0409	-2,236
Cag (B)	$7,952x10^{-2}$	1	$7,952x10^{-2}$		0,959	0,141

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; *F* – razão de Fisher; valor *p* – probabilidade; *b* – coeficientes de regressão.

5.3 – CARACTERÍSTICAS DE RESPOSTA DO SISTEMA OPTIMIZADO

Na figura 5.1 encontra-se representada uma curva de calibração obtida para o sistema optimizado e que mostra que o valor da largura de pico aumenta com o logaritmo da concentração de cloreto nas amostras. A curva da figura mostra também que a resposta é linear numa gama bastante ampla de valores de concentração de cloreto, entre cerca de $5x10^{-5}$ e 10^{-2} M. Na figura 5.2 encontram-se representados alguns dos fiagramas obtidos no traçado das curvas de calibração mostram a variação da largura de pico para diferentes valores de concentração de cloreto na amostra.

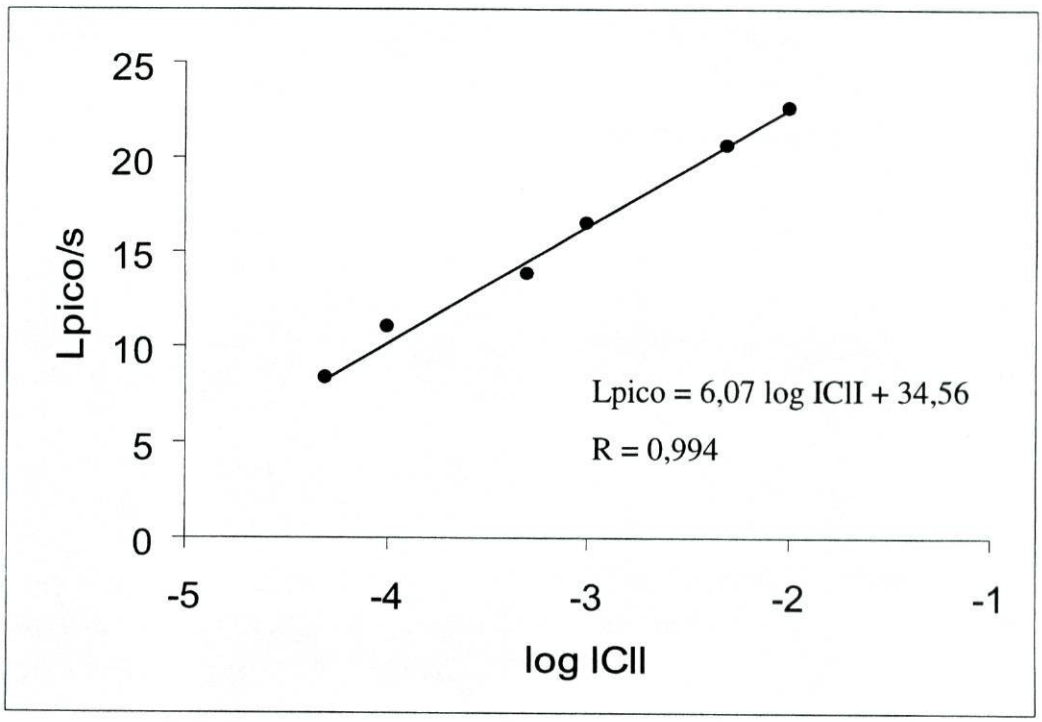
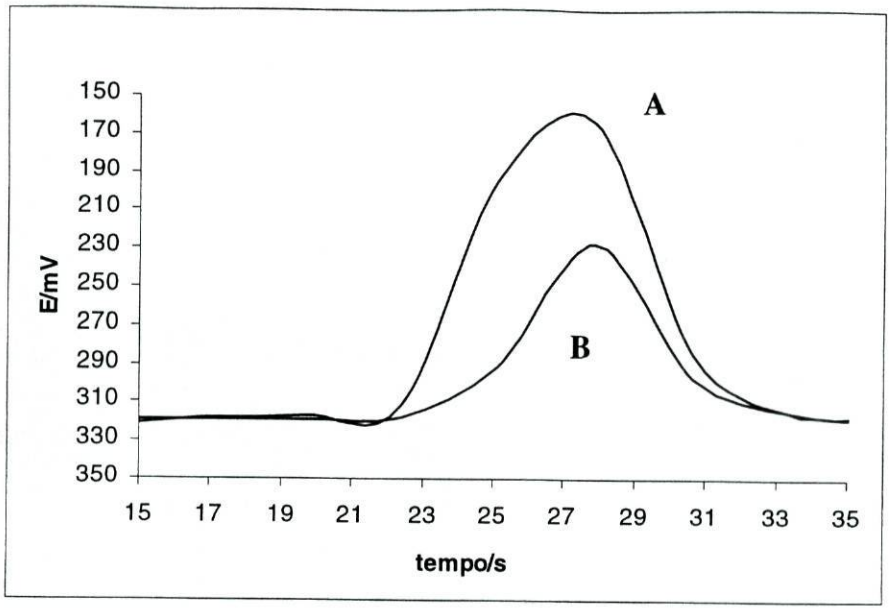


Figura 5.1 – Curva de calibração (largura de pico em função do logaritmo da concentração de cloreto) obtida para o sistema de pseudo-titulação optimizado (Q_t = 5,00 ml/min, L_{mix} = 1m, $C_{Ag} = 5x10^{-4}$ M).



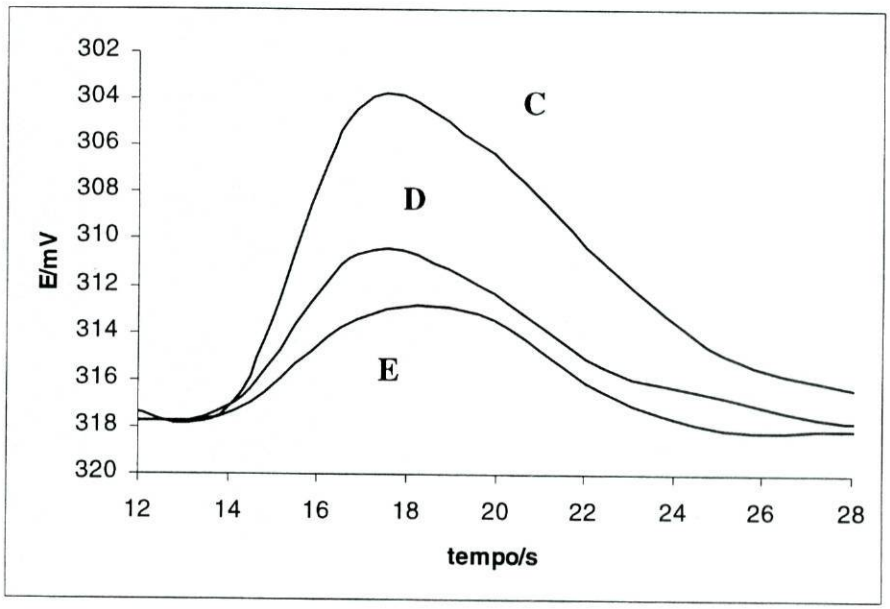


Figura 5.2 – Fiagramas de resposta do sistema optimizado a soluções com os seguintes valores de concentração de cloreto: **A** - 10^{-2} M; **B** - $5x10^{-3}$ M, **C** - 10^{-3} M; **D** - $5x10^{-4}$ M; e **E** - $5x10^{-5}$ M.

Verificou-se também que a resposta do sistema tem uma boa repetibilidade (ver figura 5.3) e que o coeficiente de variação para 8 ensaios consecutivos é de 6 % para uma solução de cloreto $5x10^{-3}$ M e de 7,5 % para uma solução $5x10^{-5}$ M. Os fiagramas da figuras mostram também que o sistema desenvolvido permite obter elevados ritmos de amostragem, da ordem de 120 amostras/hora, dependendo da concentração de cloreto nas amostras.

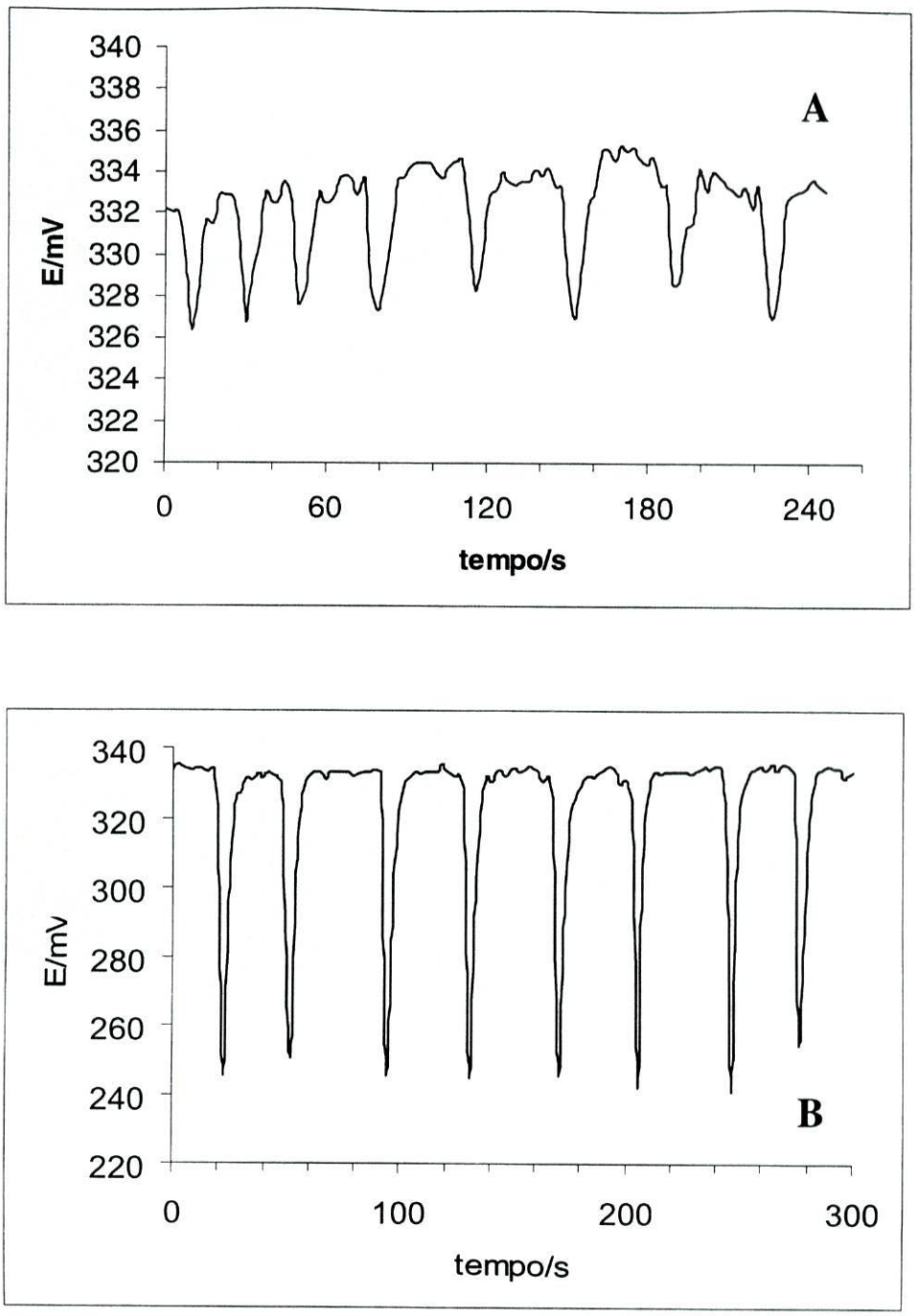


Figura 5.3 – Fiagramas de resposta do sistema optimizado a soluções com os valores de concentração de cloreto: **A** - $5x10^{-5}$ M; e **B** - 10^{-2} M.

5.4 – ANÁLISE DE EXTRACTOS

A análise dos extractos foi efectuada em paralelo pela norma NP 3384/1988 e com o sistema de FIA de pseudo-titulação desenvolvido neste trabalho. Na tabela 5.11 encontra-se indicado o conjunto de amostras analisadas, não se tendo detectado a presença de cloretos em nenhum dos extractos das amostras para ambos os métodos de determinação.

Tabela 5.11 – Amostras de rolhas analisadas em paralelo pela NP 3384/1988 e com o sistema de pseudo-titulação .

Amostra	Tipo de rolhas [a)]
1	Naturais tibradas
2	Colmatadas
3	Aglomeradas
4	Aglomeradas
5	Colmatadas
6	Naturais
7	Aglomeradas
8	Colmatadas
9	Naturais coradas
10	Naturais
11	Naturais coradas

a) definição de acordo com a tabela 2.1.

5.5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a determinação de cloretos em extractos de rolhas de cortiça pode ser efectuada por um sistema de pseudo-titulação em FIA de forma expedita, atingindo ritmos de amostragem da ordem das 120 amostras/hora e cobrindo uma gama de valores de concentração de cloreto entre $5x10^{-5}$ e 10^{-2} M.

5.6 – BIBLIOGRAFIA

1. Centro Tecnológico da Cortiça : *CTCOR magazine,* Julho (1997).

2. M.B.Etxebarria, J.L.F.C.Lima, M.C.B.S.M.Montenegro, R.P.Olmos, *Analytical Sciences, 13,* 89 (1997).

3. S. Alegret, J. Alonso, J.L.F.C. Lima e A.A.S.C. Machado, *Anal. Lett., 18,* 2291 (1985).

4. J.Ruzicka e E.H.Hansen, *Flow Injection Analysis*, Wiley-Interscience, New York, 1987, pág.54.

5. Ref. 4, pág.57.

6. Ref. 4, pág.58.

7. J.F. Tyson, *Anal. Chim. Acta, 179,* 131 (1986).

8. H.L Pardue e P.Jager, *Anal. Chim. Acta, 179,* 169 (1986).

9. CAMO, *The Unscramble design, User manual*, Oslo, 2000.

6. PESQUISA DE OXALATO

6.1 – INTRODUÇÂO

A pertinência da análise do oxalato surgiu desde à alguns anos, devido ao estudo de patologias clínicas, principalmente da hiperoxaluria, uma doença metabólica genética que conduz com frequência à morte. O mecanismo da doença processa-se na conversão do glioxalato em glicina, resultando uma excessiva produção e excreção de oxalato na urina [1]. O oxalato é responsável pela formação de sais de oxalato de cálcio, que por precipitação originam cálculos renais e urinários [2], pelo que se torna fundamental o seu controlo principalmente nos alimentos, ou em elementos em contacto com estes, como é o caso da rolha de cortiça. Apesar da importância do controlo deste parâmetro nas rolhas de cortiça, não existe normalização nem legislação que permita orientar os procedimentos técnicos necessários à sua análise. Deste modo, os ensaios de oxalato são de grande interesse tanto no diagnostico clinico como na tecnologia alimentar, tendo havido consideráveis progressos nos procedimentos analíticos que permitem a sua detecção e quantificação [3]. Neste capítulo apresenta-se um método baseado numa reacção de quimioluminescência para a determinação de oxalato em extractos de rolhas de cortiça. Este método de determinação foi implementado num sistema de FIA, cuja resposta foi optimizada e avaliada para efectuar a determinação. Paralelamente foi utilizado um método enzimático para efectuar a mesma determinação.

6.1.1 - Método de determinação enzimático

Em estudos efectuados anteriormente, a determinação de oxalatos foi efectuada enzimáticamente em amostras de urina. De entre os numerosos métodos de detecção de oxalato em urina, nomeadamente: diluição isotópica, cromatografia gasosa, cromatografia de permuta iónica e reacções enzimáticas, foi escolhido este último para analisar o oxalato em extractos de rolhas de cortiça, porque todos os outros apresentavam-se morosos e

requerendo material que não estava disponível em laboratório. Neste sentido, a Sigma introduziu um kit de reagentes para medida de oxalato em urina o qual foi utilizado nesta dissertação, para medir oxalato em extractos de rolhas de cortiça. Este método enzimático baseia-se na utilização da enzima oxalato-oxidase, que ao reagir com o oxalato dá origem a dióxido de carbono e peróxido de hidrogénio [4,5]. O peróxido de hidrogénio formado é determinado pela reacção oxidativa do 3–metil-2– benzotiazolinona hidrazona com N,N–dimetilanilina catalisada por uma peroxidase. A indamina resultante desta reacção pode ser determinada espectrofotométricamente a 590 nm [4,5].

Este método é rápido e especifico para a determinação do oxalato, e é facilmente adaptável a qualquer laboratório [1].

6.1.2 - Método de determinação FIA+quimioluminescência

Em estudos efectuados anteriormente [6], foi desenvolvido um método para a determinação de oxalato na urina baseado numa reacção de quimioluminescência que envolve o sistema oxalato-carbodiimida-peróxido e que permite a determinação directa do oxalato. Resumidamente, o método apresentado nesse trabalho [6] consiste em medir para um tubo de ensaio sucessivamente, 300 µL de solução de peróxido a 0,3 %, 300 µL de uma solução de biscicloexilcarboddimida (25 g/L) e de difenilantraceno (50 mg/L) dissolvidos em etanol absoluto e 100 µL de amostra a analisar com o pH previamente ajustado a 1 por adição de ácido clorídrico. No presente trabalho, este método de determinação foi implementado num sistema de FIA cuja resposta foi optimizada e avaliada. Por último, foram analisados alguns extractos de rolhas de cortiça e os resultados obtidos pelo método enzimático e com o sistema de FIA são comparados.

6.2 - MÉTODO DE DETERMINAÇÃO ENZIMÁTICO

Na figura 6.1 encontra-se representada uma curva de calibração típica do método enzimático para a determinação de oxalato e mostra que o método enzimático cobrindo uma gama de concentração de oxalato até 0,20 mM.

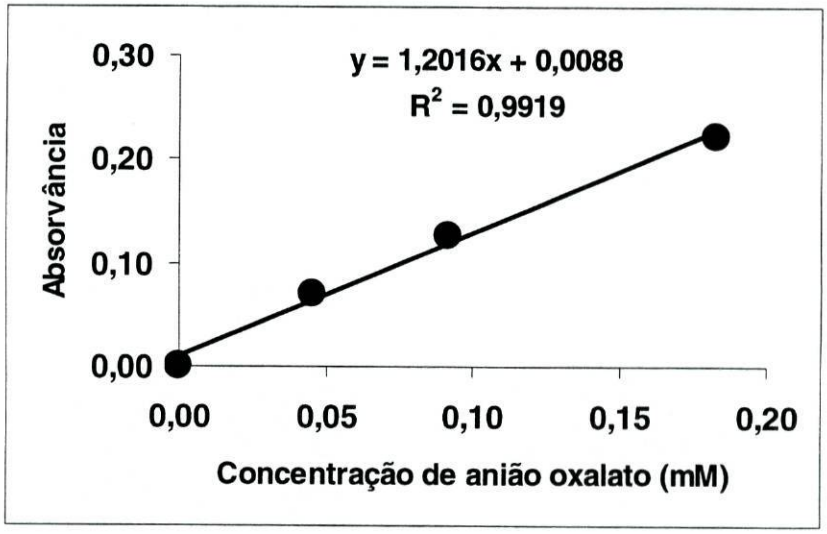


Fig. 6.1 – Curva de calibração típica do método enzimático para determinação de anião oxalato.

Na tabela 6.1 encontram-se resumidos os resultados obtidos na determinação de oxalato em extractos de rolhas de cortiça do tipo indicado na tabela. Para cada tipo de rolhas, designado na tabela 6.1 por um numero de 1 a 6, foram preparados e analisados dois extractos designados por a e b. Os resultados da tabela mostram que os resultados obtidos para diferentes extractos de um mesmo tipo de rolhas em geral apresentam valores ligeiramente diferentes e que o valor da concentração de oxalato determinado nestes ensaios depende do tipo de rolha sendo mais elevado para as rolhas naturais coradas (amostras 1(a) e 1(b)) e naturais com carimbo (amostras 4(a) e 4(b)).

Tabela 6.1 – Concentração de anião oxalato nas amostras de rolhas.

N. amostra	Tipo de rolhas	[anião oxalato]/mM	[anião oxalato]/ppm
1(a)	Natural corada	0,197	17,3
1(b)	Natural corada	0,152	13,4
2(a)	Colmatada	0,120	10,6
2(b)	Colmatada	0,0652	5,74
3(a)	Naturais	0,0436	3,84
3(b)	Naturais	0,0320	2,81
4(a)	Naturais com carimbo	0,114	9.99
4(b)	Naturais com carimbo	0,110	9,70
5(a)	Aglomerada	0,0336	2,96
5(b)	Aglomerada	0,0186	1,64
6(a)	Colmatada corada	0,0652	5,74
6(b)	Colmatada corada	0,0686	6,03

6.3 - MÉTODO DE DETERMINAÇÃO POR FIA+QUIMIOLUMINESCÊNCIA

6.3.1 - Optimização da resposta do sistema

6.3.1.1 Estudo prévio dos factores que podem influenciar o sistema

O número de factores potencialmente importantes para o sistema estudado, que se encontra esquematizado na Fig. 2.2, é seis. Na tabela 6.2 encontra-se a lista desses factores e as respectivas abreviaturas utilizadas para os referir ao longo do texto.

Tabela 6.2 - Factores estudados e suas abreviaturas.

Factor	Abreviatura
Concentração de ácido clorídrico	C_A
Concentração de peróxido de hidrogénio	C_O
Concentração de carbodiimida	C_B
Volume de injecção	V_i
Volume do reactor	V_R
Caudal do fluxo total	Q_T

Devido ao numero relativamente elevado de factores apresentado recorreu-se a um planeamento factorial fraccionado com seis factores a dois níveis, correspondente a um quarto do factorial completo, que permite o estudo das seis variáveis em 16 experiências. A este planeamento foram adicionadas quatro repetições cujos níveis dos factores correspondem ao centro do planeamento factorial. Nas tabelas 6.3 e 6.4 encontram-se respectivamente a matriz do planeamento de factorial utilizado e os valores a que correspondem os níveis dos factores experimentais da tabela 6.2.

A sequência de experiências foi efectuada injectando no sistema uma solução com 10 ppm de oxalato e a resposta estudada foi a altura de pico.

Tabela 6.3 – Matriz do planeamento de experiências de um planeamento factorial fraccionado com seis factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais quatro repetições no centro (0).

Experiência	Factores					
	C_A	C_O	C_B	V_i	V_R	Q_T
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	1	-1	1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	-1	1
16	1	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Tabela 6.4 - Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da tabela 6.3.

Factores	Unidades	Níveis		
		-1	0	1
C_A	M	0,01	0,05	0,1
C_O	%	1	2	3
C_B	g L^{-1}	10	20	30
V_i	µL	133	168	203
V_R	µL	200	282	365
Q_T	mL/min	0,92	1,85	2,80

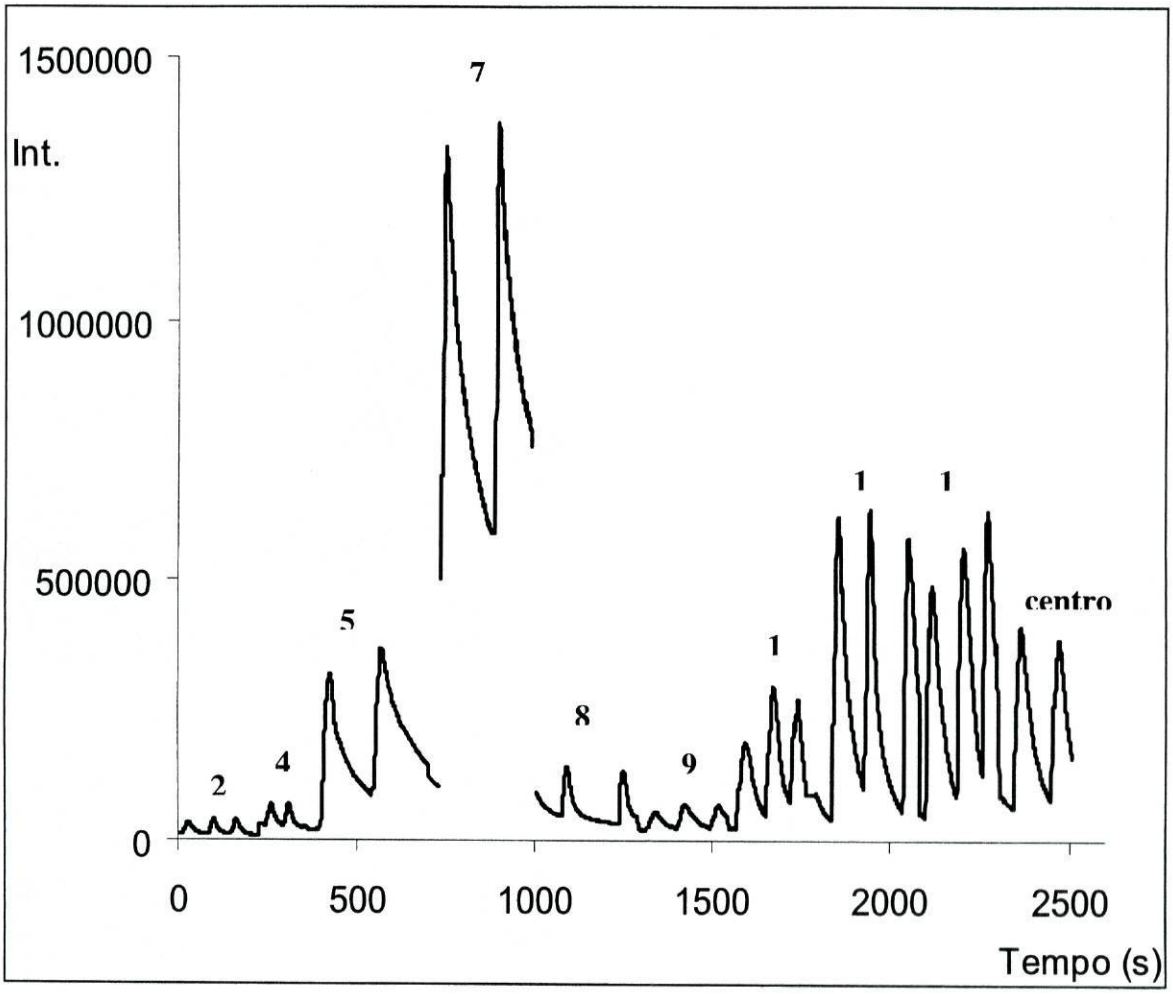


Fig. 6.2 - Resposta do sistema a algumas experiências do planeamento da tabela 6.3.

Na Figura 6.1. encontram-se alguns fiagramas obtidos na realização destas experiências. Na tabela 6.5 encontram-se os resultados da ANOVA dos valores da altura de pico obtidos nas experiências do planeamento da tabela 6.3 e a sua análise mostra que os factores que possuem maior valor da razão *F* são C_A (*F* = 5,927), Q_T (*F* = 3,527) e C_O (*F* = 2,414). Os resultados da tabela 6.5 mostram que os valores de p (probabilidade dos factores não serem significativos), mais baixos são C_A (p = 0,1353), C_O (p = 0,2605), Q_T (p = 0,2012), AB = CE (p = 0,2571) e AF = DE (p = 0,1898), o que significa que estes factores e interacções são os que têm maior probabilidade de serem significativos. Na Fig.6.3 encontram-se representados os valores *F* para os factores em estudo, verificando-se que os valores mais elevados, indicados na figura pelas setas, são C_A, C_O, Q_T e as interacções AB = CE e AF = CE que confirmam os resulatdos da Tabela 6.5. Na Fig.6.4 representa-se a intensidade dos efeitos para os factores estudados e mostra que, também neste caso, os efeitos mais intensos, indicados pelas setas, correspondem aos factores mais significativos já referidos anteriormente bem como às suas interacções. A Tabela 6.5 mostra também que os valores dos coeficientes b para os factores C_B, V_I e V_R são todos negativos, e como tal, no planeamento de experiências seguinte não foram estudados e os seus valores experimentais foram fixados nos valores correspondentes ao nível –1 da tabela 6.4.

Tabela 6.5 - ANOVA dos significado dos efeitos dos valores da altura de pico obtidos nas experiências descritas na Tabela 6.3.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	*b*
Sumário						
Modelo	$6{,}641 \times 10^{10}$	13	$5{,}109 \times 10^{9}$	1,687	0,4330	
Erro	$6{,}058 \times 10^{9}$	2	$3{,}029 \times 10^{9}$			
Total ajustado	$7{,}247 \times 10^{10}$	15	$4{,}832 \times 10^{9}$			
Variáveis						
C_A (A)	$1{,}795 \times 10^{10}$	1	$1{,}795 \times 10^{10}$	5,927	0,1353	$3{,}350 \times 10^{4}$
C_O (B)	$7{,}312 \times 10^{9}$	1	$7{,}312 \times 10^{9}$	2,414	0,2605	$2{,}138 \times 10^{4}$
C_B (C)	$2{,}193 \times 10^{9}$	1	$2{,}193 \times 10^{9}$	0,724	0,4844	$-1{,}171 \times 10^{4}$
V_I (D)	$4{,}123 \times 10^{8}$	1	$4{,}123 \times 10^{8}$	0,136	0,7476	$-5{,}076 \times 10^{3}$
V_R (E)	$5{,}683 \times 10^{8}$	1	$5{,}683 \times 10^{8}$	0,188	0,7072	$-5{,}960 \times 10^{3}$
Q_T (F)	$1{,}068 \times 10^{10}$	1	$1{,}068 \times 10^{10}$	3,527	0,2012	$2{,}584 \times 10^{4}$
AB=CE	$7{,}461 \times 10^{9}$	1	$7{,}461 \times 10^{9}$	2,463	0,2571	$2{,}159 \times 10^{4}$
AC=BE	$1{,}959 \times 10^{9}$	1	$1{,}954 \times 10^{9}$	0,645	0,5061	$-1{,}105 \times 10^{4}$
AD=EF	$3{,}856 \times 10^{8}$	1	$3{,}856 \times 10^{8}$	0,127	0,7554	$-4{,}909 \times 10^{3}$
AE=BC=DF	$3{,}559 \times 10^{8}$	1	$3{,}559 \times 10^{8}$	0,118	0,7644	$-4{,}717 \times 10^{3}$
AF=DE	$1{,}158 \times 10^{10}$	1	$1{,}158 \times 10^{10}$	3,822	0,1898	$2{,}690 \times 10^{4}$
BD=CF	$2{,}051 \times 10^{9}$	1	$2{,}051 \times 10^{9}$	0,677	0,4971	$-1{,}132 \times 10^{4}$
BF=CD	$3{,}507 \times 10^{9}$	1	$3{,}507 \times 10^{9}$	1,158	0,3945	$1{,}480 \times 10^{4}$

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; *F* – razão de Fisher; valor *p* – probabilidade; *b* – coeficientes de regressão.

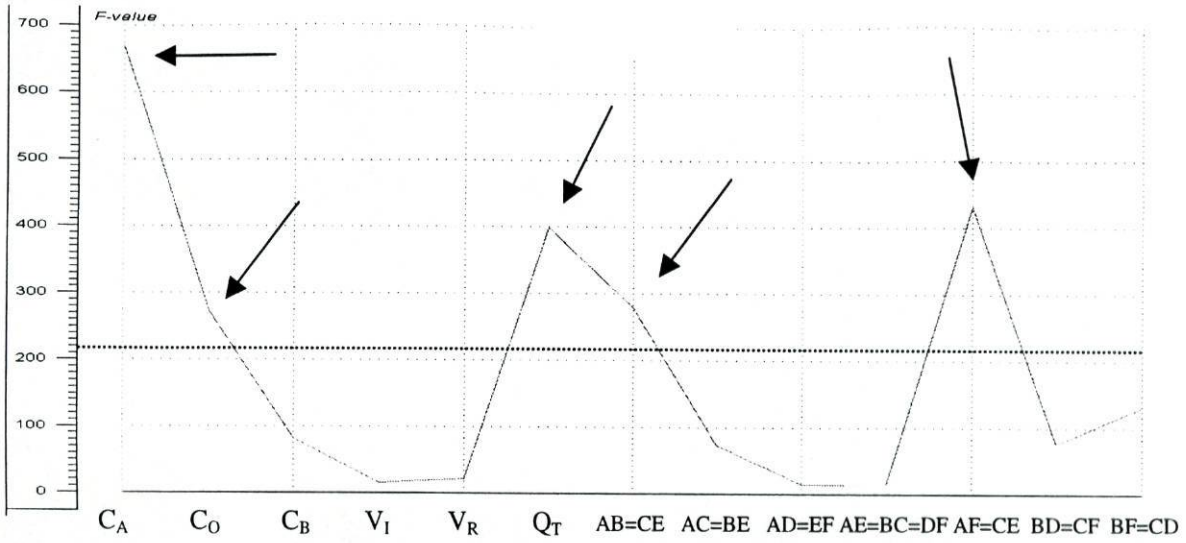


Fig. 6.3 – Valor *F* para os factores estudados (as setas indicam os mais significativos).

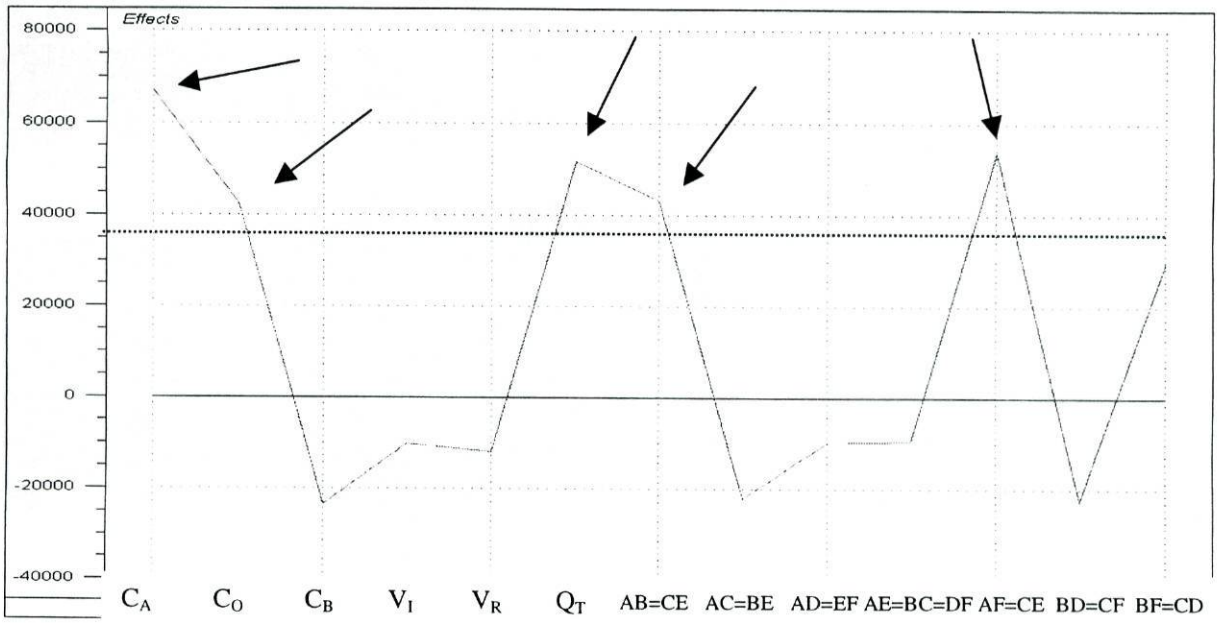


Fig. 6.4 – Intensidade dos efeitos para os factores estudados (as setas indicam os mais significativos).

6.3.1.2 – Estudo dos factores mais significativos

Estudo com Vi = 133 μL

Para se obter mais informação sobre o feito dos factores C_A, C_O, Q_T na resposta do sistema foi utilizado um planeamento de Box-Benhken, cuja matriz do planeamento se encontra na Tabela 6.6, e em que cada experiência foi efectuada em triplicado. O intervalo dos valores experimentais dos três factores encontra-se na tabela 6.7. A análise comparativa das Tabelas 6.4 e 6.7 mostra que neste planeamento a gama dos valores experimentais a que correspondem os níveis dos três factores com maior efeito na resposta, (C_A, C_O e Q_T) foram deslocadas para valores mais elevados por se ter verificado que são positivos os valores dos coeficientes b na Tabela 6.5 para estes factores. Tal como no planeamento anterior, foi estudada a altura de pico e foi injectada no sistema uma solução com 10 ppm de oxalato.

Na Tabela 6.8 encontram-se os resultados da ANOVA dos resultados obtidos nas experiências do planeamento da Tabela 6.6 e a sua análise mostra que os factores que possuem maior valor da razão *F* são C_A (*F* = 272,768), C_O (*F* = 178,813), a interacção C_AC_O (AB) (*F* = 45,729) e o termo quadrático da concentração de ácido (F = 249,710). No entanto os valores de p(*F*) na mesma Tabela mostram que apenas o efeito das interacções AC e BC têm uma probalidade superior a 90 % de serem zero. A análise da mesma Tabela mostra também que a falta de ajuste dos dados ao modelo não é significativa uma vez que o valor de P(*F*) é 0,0032 o que significa que existe uma probabilidade superior a 99 % de que o erro corresponda a erro experimental e não a falta de ajuste do modelo aos dados. Por outro lado, o gráfico de distribuição normal dos resíduos que se encontra na fig. 6.5 também não permite identificar pontos anormalmente desviados (outliers) neste conjunto de dados.

As Figs. 6.6, 6.7 e 6.8 mostram as superfícies de resposta para este sistema e permitem verificar que a altura de pico tem uma dependência quadrática em relação aos três factores e que o máximo de resposta correspondente ao sistema optimizado se encontra na gama experimental ensaiada. Na Tabela 6.8 encontram-se os valores dos níveis correspondentes ao máximo e na Tabela 6.9 estão resumidas as condições óptimas para o sistema investigado.

Tabela 6.6- Matriz do planeamento de experiências do tipo Box-Behnken (os três níveis são representados pelos algarismos -1, 0 e 1) – cada experiência foi realizada em triplicado.

Experiência	Factores		
	C_A	C_O	Q_T
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	-1
12	0	1	-1
13	0	0	0

Tabela 6.7 - Factores experimentais e valores a que correspondem os factores fixos e os níveis no planeamento da Tabela 6.6.

Factores	Unidades	Níveis		
		-1	0	1
C_A	M	0,1	0,6	1,2
C_O	%	3	6	9
Q_T	mL/min	2,80	3,70	4,55
			Factores fixos	
C_B	$g\ L^{-1}$		10	
V_i	µL		133	
V_R	µL		200	

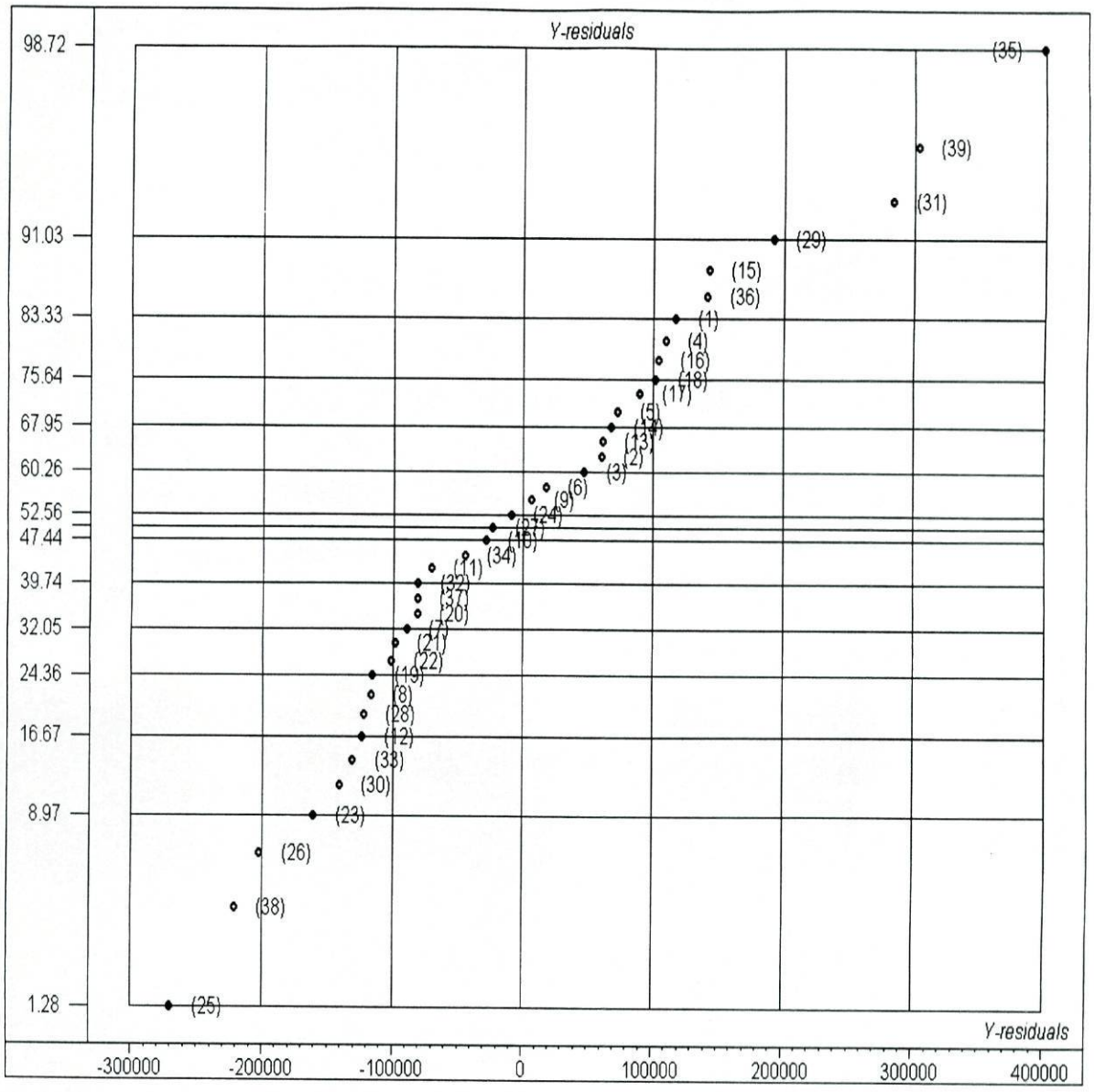


Fig. 6.5 – Gráfico de distribuição normal dos resíduos do planeamento experimental de Box-Benhken apresentado na tabela 6.6.

Tabela 6.8 – ANOVA do significado dos efeitos dos valores da altura de pico obtidos nas experiências descritas na Tabela 7.6.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	b	DP_b	Máximos
Sumário								
Modelo	$2{,}17\times10^{13}$	9	$2{,}41\times10^{12}$	85,092	0,0000			
Erro	$8{,}22\times10^{11}$	29	$2{,}84\times10^{10}$					
Total ajustado	$2{,}25\times10^{13}$	38	$5{,}93\times10^{11}$					
Variáveis								
Intercepção	$1{,}26\times10^{13}$	1	$1{,}26\times10^{13}$	445,231	0,0000	$2{,}05\times10^{6}$	$9{,}72\times10^{4}$	
C_A (A)	$7{,}74\times10^{12}$	1	$7{,}74\times10^{12}$	272,768	0,0000	$-1{,}14\times10^{6}$	$6{,}88\times10^{4}$	1,270
C_O (B)	$5{,}07\times10^{12}$	1	$5{,}07\times10^{12}$	178,813	0,0000	$9{,}19\times10^{5}$	$6{,}88\times10^{4}$	2,048
Q_T (C)	$9{,}35\times10^{10}$	1	$9{,}35\times10^{10}$	3,298	0,0797	$1{,}25\times10^{5}$	$6{,}88\times10^{4}$	1,454
AB	$1{,}30\times10^{12}$	1	$1{,}30\times10^{12}$	45,729	0,0000	$-2{,}07\times10^{5}$	$3{,}07\times10^{4}$	
AC	$7{,}63\times10^{10}$	1	$7{,}63\times10^{10}$	2,690	0,1118	$5{,}04\times10^{4}$	$3{,}07\times10^{4}$	
BC	$6{,}12\times10^{10}$	1	$6{,}12\times10^{10}$	2,159	0,1525	$-4{,}51\times10^{4}$	$3{,}07\times10^{4}$	
AA	$7{,}08\times10^{12}$	1	$7{,}08\times10^{12}$	249,710	0,0000	$-6{,}42\times10^{5}$	$4{,}06\times10^{4}$	
BB	$5{,}44\times10^{11}$	1	$5{,}44\times10^{11}$	19,198	0,0001	$-1{,}79\times10^{5}$	$4{,}06\times10^{4}$	
CC	$5{,}50\times10^{11}$	1	$5{,}50\times10^{11}$	19,407	0,0001	$-1{,}79\times10^{5}$	$4{,}06\times10^{4}$	
Verificação do modelo								
Efeitos principais	$1{,}29\times10^{13}$	3	$4{,}30\times10^{12}$					
Interacções (Int)	$1{,}43\times10^{12}$	3	$4{,}78\times10^{11}$	16,859	0,0000		0,0734	
Int+Termos quadráticos	$7{,}38\times10^{12}$	3	$2{,}46\times10^{12}$	86,792	0,0000			
Termos quadráticos	$7{,}38\times10^{12}$	3	$2{,}46\times10^{12}$	86,792	0,0032			
Erro	$8{,}22\times10^{11}$	29	$2{,}84\times10^{10}$					
Falta de ajuste (LOF)								
LOF	$3{,}34\times10^{11}$	3	$1{,}12\times10^{11}$	5,937	0,0032			
Erro puro	$4{,}88\times10^{11}$	26	$1{,}88\times10^{10}$					
Erro total	$8{,}22\times10^{11}$	29	$2{,}83\times10^{10}$					

* Ver rodapé da Tabela 6.5. DP_b – estimativa do desvio padrão dos coeficientes de regressão;

Máximos – valores das três variáveis para os quais a superfície de resposta têm valores máximos.

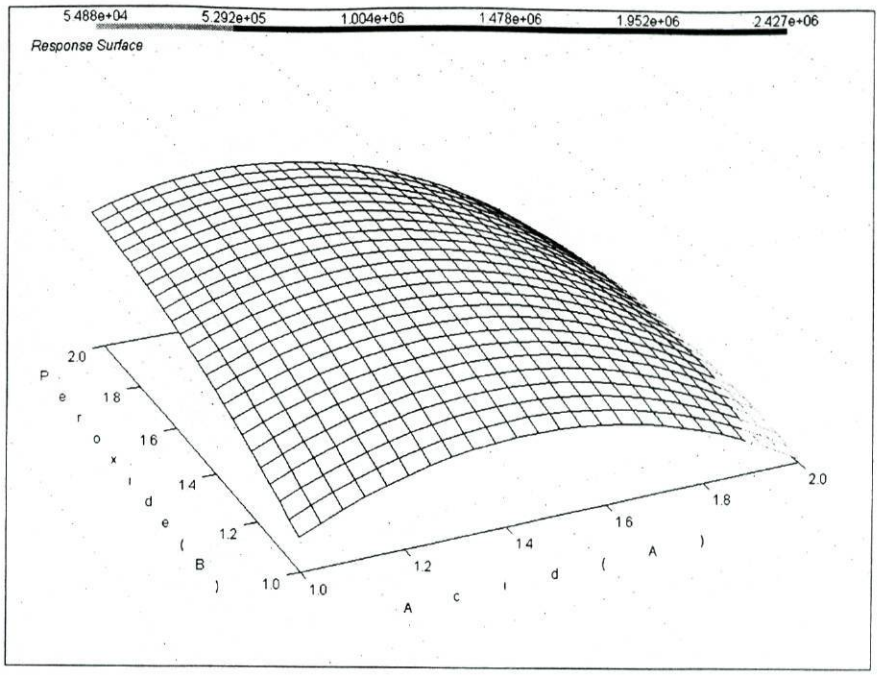


Fig. 6.6 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de ácido clorídrico e concentração de peróxido de hidrogénio.

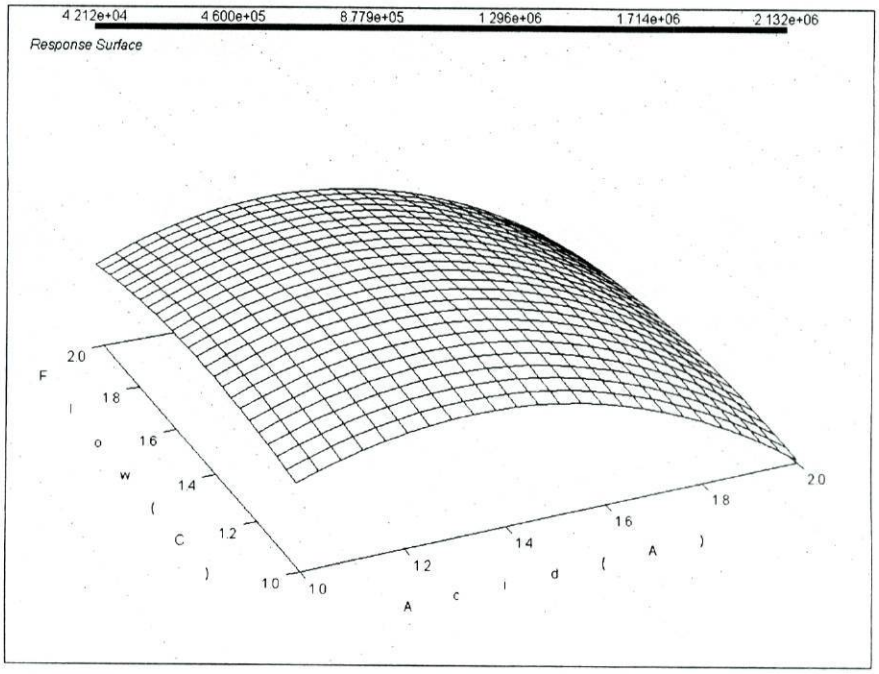


Fig. 6.7 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de ácido clorídrico e caudal total.

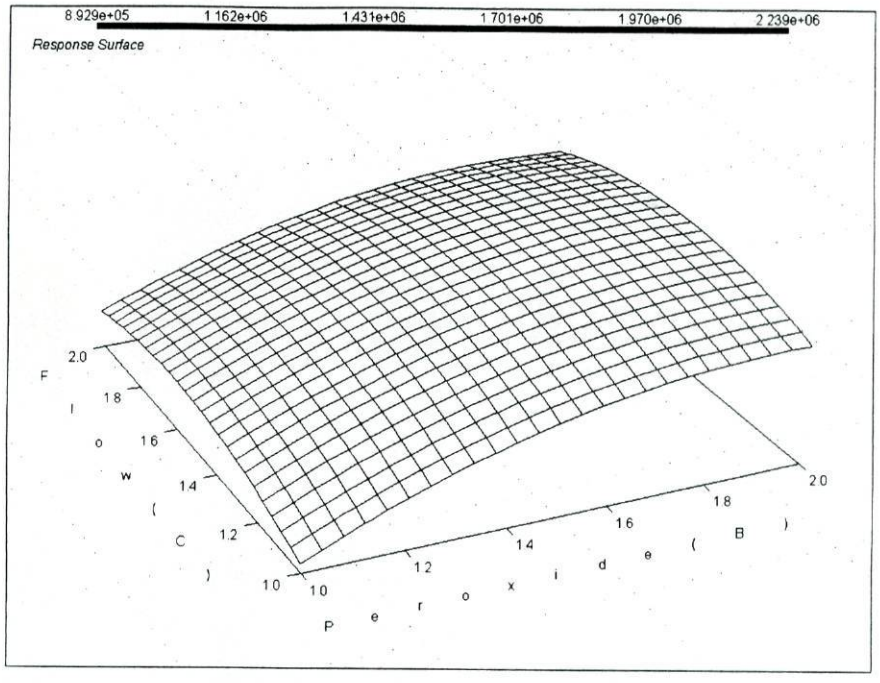


Fig. 6.8 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de peróxido de hidrogénio e caudal total .

Tabela 6.9- Factores e respectivos níveis optimizados para o sistema.

Factores	Unidades	Valores óptimos
C_A	M	0,37
C_O	%	9,3
C_B	$g\ L^{-1}$	10
V_i	µL	133
V_R	µL	200
Q_T	mL/min	3,58

Estudo com Vi = 75 μL

Com o objectivo de aumentar o ritmo de amostragem foi efectuado um conjunto de experiências seguindo um planeamento de Box-Behnken idêntico ao representado na Tabela 6.6, mas utilizando um volume de injecção de 75 μL.

Na Tabela 6.10 encontram-se os resultados da ANOVA dos resultados obtidos nestas experiências e a sua análise mostra que, os factores que possuem maior valor da razão *F* são C_O (*F* = 2687), Q_T (*F* = 1,818), a interacção C_OQ_T (BC) (*F* = 6,097) e o termo quadrático da concentração de ácido (F = 13,040). Os efeitos com menor valor da razão *F* são as interacções AB (*F* = 0,028) e AC (*F* = 0,251) e o termo quadrático da concentração de peróxido (*F* = 0,054). A análise da mesma Tabela mostra também que o valor de P(*F*) associado á falta de ajuste (LOF) é de 0,2555 o que significa que, neste caso, a falta de ajuste dos dados ao modelo apenas tem cerca de 25 % de probabilidade de ser devida ao erro experimental. A análise da Fig. 6.9 em que se encontra o gráfico de distribuição normal dos resíduos para este conjunto e dados não permite detectar claramente pontos anormalmente desviados (outliers). É importante salientar que apenas foi efectuada uma experiência por cada ponto do planeamento da Tabela 6.6 excepto para o centro em que as experiências foram efectuadas em triplicado. Os resultados obtidos para o centro do planeamento foram utilizados para estimar o erro experimental o que embora permita economizar um grande número de experiências pode não ser uma boa estimativa do erro experimental.

As Figs. 6.10, 6.11 e 6.12 mostram as superfícies de resposta para este sistema e permitem verificar que neste caso a altura de pico tem uma dependência quadrática em relação aos factores CA e QT e que o máximo de resposta correspondente ao sistema optimizado se encontra na gama experimental ensaiada.

As condições experimentais utilizadas para efectuar as determinações são as indicadas na Tabela 6.9 mas o volume de injecção utilizado foi de 75 μL. A pesar das condições óptimas para o sistema para um volume de injecção de 75 μL serem ligeiramente diferentes das indicadas na Tabela 6.9, optou-se por utilizar estas condições porque: (i) os resultados da Tabela 6.5 mostram que este factor (V_I) tem um efeito pouco intenso na resposta do sistema; (ii) o modelo da Tabela 6.8 é uma descrição mais adequada da resposta do sistema em função dos níveis dos factores estudados porque o valor de P(*F*) para o modelo é superior a 99,99 % e a falta de ajuste não é significativa.

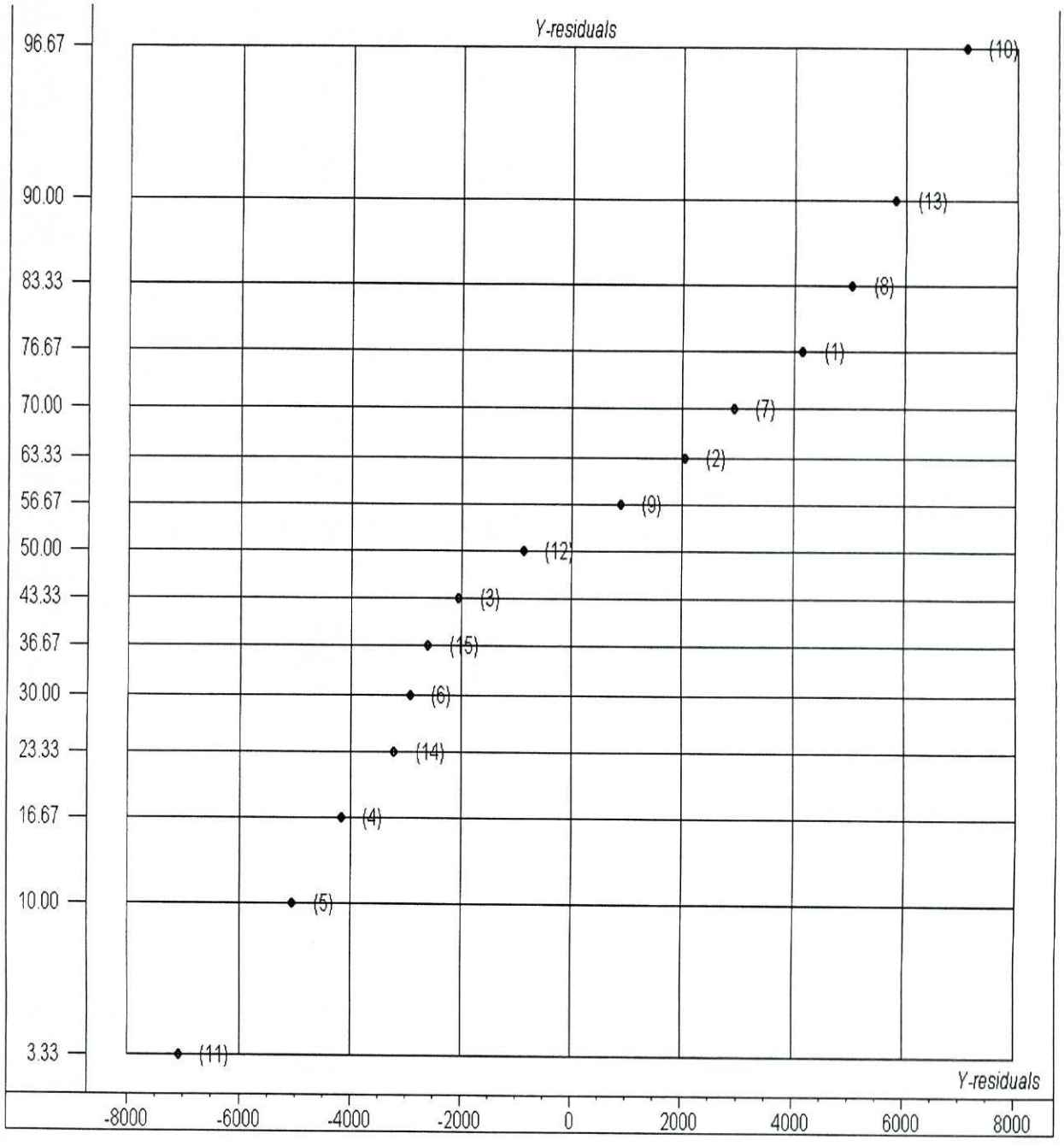


Fig. 6.9 – Gráfico de distribuição normal dos resultados do planeamento experimental de Box-Benhken para V_i = 75 µL.

Tabela 6.10 – ANOVA dos significado dos efeitos dos valores da altura de pico obtidos no planeamento de experiências do tipo Box-Behnken sem repetições (apenas três repetições para o ponto de centro). *

	SS	df	MS	***F***	valor *p*	b	DP_b	Máximos
Sumário								
Modelo	$1{,}39\times10^{9}$	9	$1{,}54\times10^{8}$	2,919	0,1254			
Erro	$2{,}64\times10^{8}$	5	$5{,}28\times10^{7}$					
Total ajustado	$1{,}65\times10^{9}$	14	$1{,}18\times10^{8}$					
Variáveis								
Intercepção	$9{,}04\times10^{8}$	1	$9{,}04\times10^{8}$	17,123	0,0090	$1{,}74\times10^{4}$	$4{,}20\times10^{3}$	
C_A (A)	$3{,}76\times10^{7}$	1	$3{,}76\times10^{7}$	0,713	0,4371	$4{,}34\times10^{3}$	$5{,}14\times10^{3}$	1,555
C_O (B)	$1{,}42\times10^{8}$	1	$1{,}42\times10^{8}$	2,687	0,1621	$8{,}42\times10^{3}$	$5{,}14\times10^{3}$	1,510
Q_T (C)	$9{,}60\times10^{7}$	1	$9{,}60\times10^{7}$	1,818	0,2354	$-6{,}93\times10^{3}$	$5{,}14\times10^{3}$	1,729
AB	$1{,}48\times10^{6}$	1	$1{,}48\times10^{6}$	0,028	0,8735	$-3{,}48\times10^{2}$	$2{,}08\times10^{3}$	
AC	$1{,}33\times10^{7}$	1	$1{,}33\times10^{7}$	0,251	0,6375	$1{,}04\times10^{3}$	$2{,}08\times10^{3}$	
BC	$3{,}22\times10^{8}$	1	$3{,}22\times10^{8}$	6,097	0,0566	$-5{,}13\times10^{3}$	$2{,}08\times10^{3}$	
AA	$6{,}87\times10^{8}$	1	$6{,}89\times10^{8}$	13,040	0,0154	$-7{,}80\times10^{3}$	$2{,}16\times10^{3}$	
BB	$2{,}84\times10^{6}$	1	$2{,}84\times10^{6}$	0,054	0,8257	$-5{,}02\times10^{2}$	$2{,}16\times10^{3}$	
CC	$5{,}24\times10^{7}$	1	$5{,}24\times10^{7}$	0,993	0,3648	$2{,}15\times10^{3}$	$2{,}16\times10^{3}$	
Verificação do modelo								
Efeitos principais	$2{,}76\times10^{8}$	3	$9{,}19\times10^{7}$					
Interacções (Int)	$3{,}37\times10^{8}$	3	$1{,}12\times10^{8}$	2,125	0,2156		0,0734	
Int+Termos quadráticos	$7{,}75\times10^{8}$	3	$2{,}58\times10^{8}$	4,892	0,0600			
Termos quadráticos	$7{,}75\times10^{8}$	3	$2{,}58\times10^{8}$	4,892	0,0600			
Erro	$2{,}64\times10^{8}$	5	$5{,}28\times10^{7}$					
Falta de ajuste (LOF)								
LOF	$2{,}13\times10^{8}$	3	$7{,}10\times10^{7}$	2,782	0,2555			
Erro puro	$5{,}10\times10^{7}$	2	$2{,}55\times10^{7}$					
Erro total	$2{,}64\times10^{8}$	5	$5{,}28\times10^{7}$					

* Ver rodapé da Tabela 7.5. DP_b – estimativa do desvio padrão dos coeficientes de regressão;

Máximos – valores das três variáveis para os quais a superfície de resposta têm valores máximos.

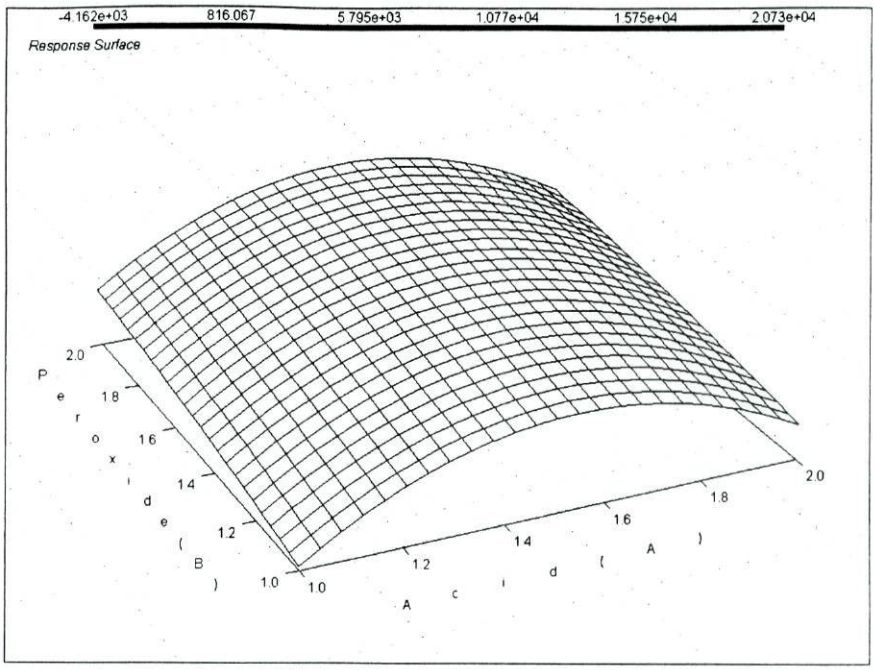


Fig. 6.10 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de ácido clorídrico e concentração de peróxido de hidrogénio.

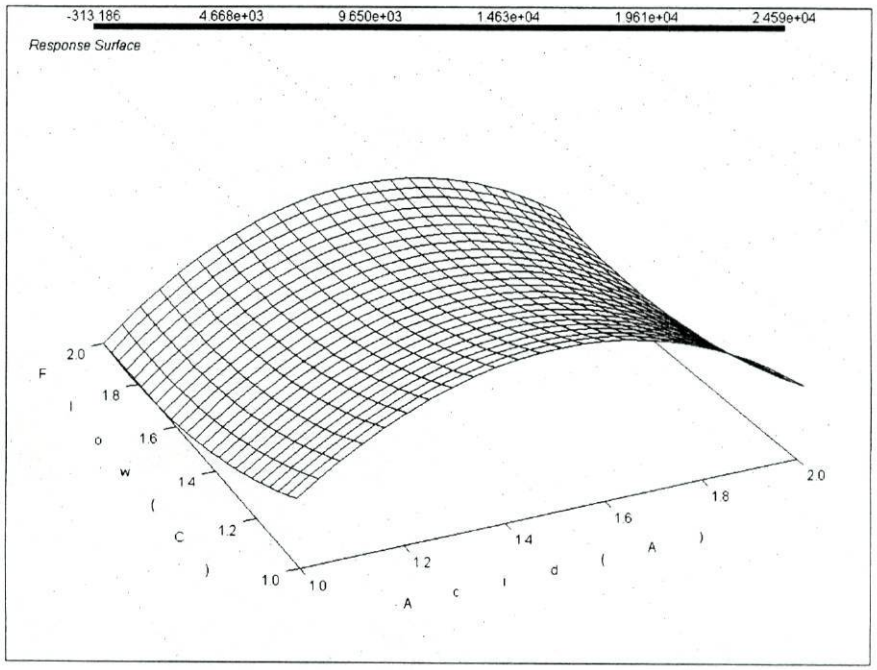


Fig. 6.11 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de ácido clorídrico e caudal total.

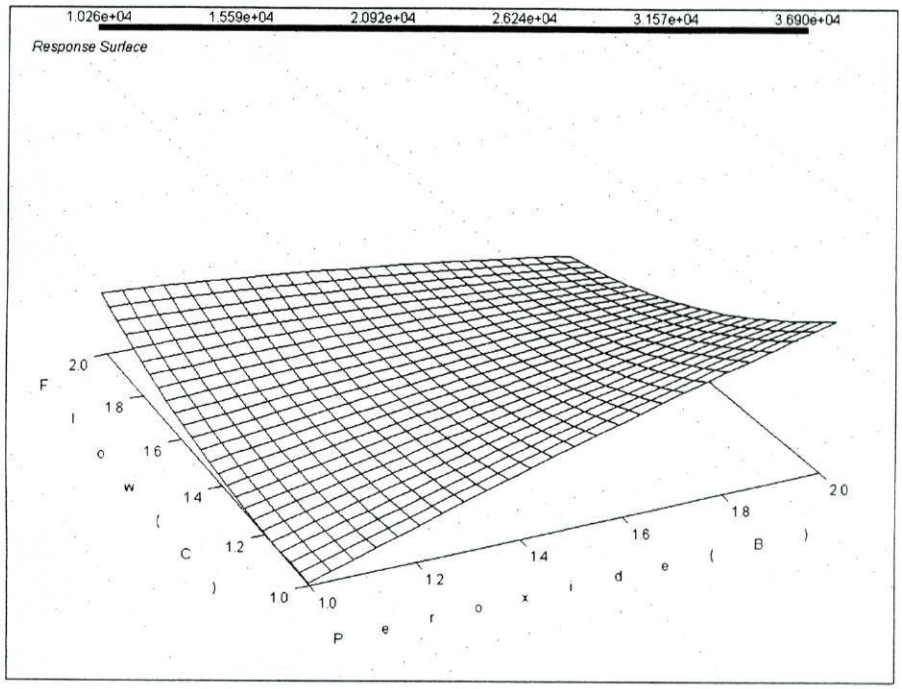


Fig. 6.12 – Superfície de resposta do sistema em função da concentração de peróxido de hidrogénio e caudal total.

6.3.2 – Características de resposta do sistema optimizado

Na Fig. 6.13 está representada uma resposta típica de uma série de injecções no sistema para uma solução com 10 ppm de oxalato . A análise da precisão para o máximo de sinal dos picos, mostra que o coeficiente de variação do sinal quimioluminescente é de cerca de 6,2 %. Estes resultados mostram que o sistema optimizado possui um precisão aceitável resposta ao anião oxalato. A análise da resposta do sistema quimioluminescente permite verificar que esta permite obter ritmos de amostragem de cerca de 20 amostras/hora.

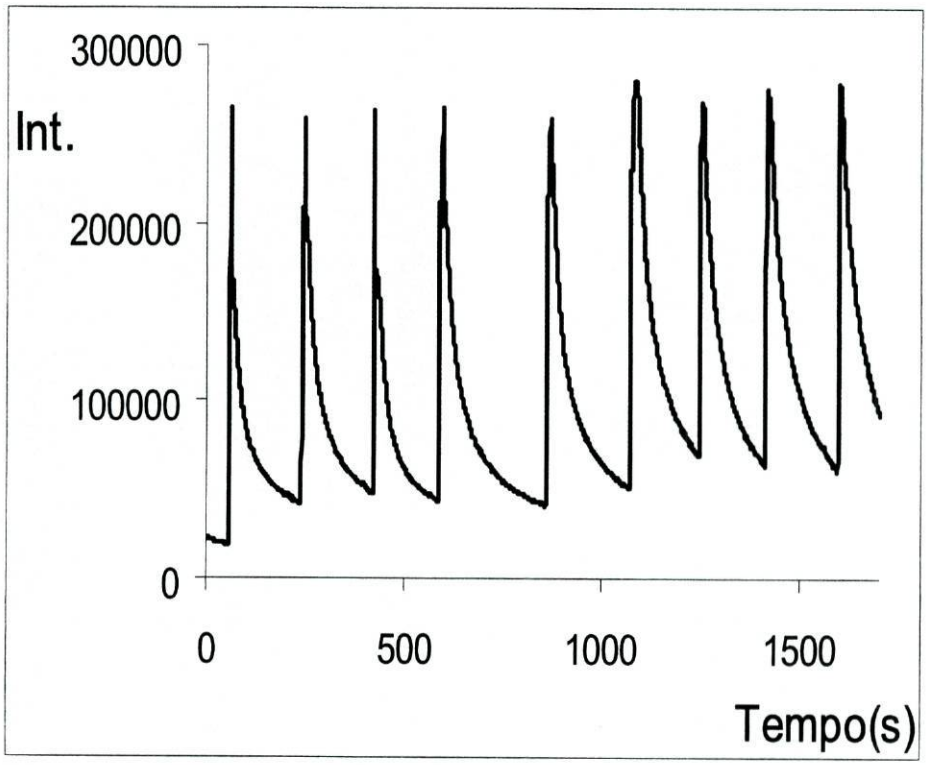


Fig. 6.13 - Representação de uma resposta típica de uma série de injecções do padrão de 10 ppm de oxalato no sistema.

Na Fig. 6.14 está representada uma sequência de calibração típica do sistema para concentrações de oxalato num intervalo de 1 a 20 ppm e na Fig. 6.15 está representada uma curva do logaritmo do sinal quimioluminescente em função do logaritmo da concentração de oxalato. A observação desta curva de calibração mostra uma resposta linear em todo o intervalo de concentrações estudado, com um declive de 0,868, intercepção de 4,714 e um coeficiente de correlação ao quadrado de 0,962.

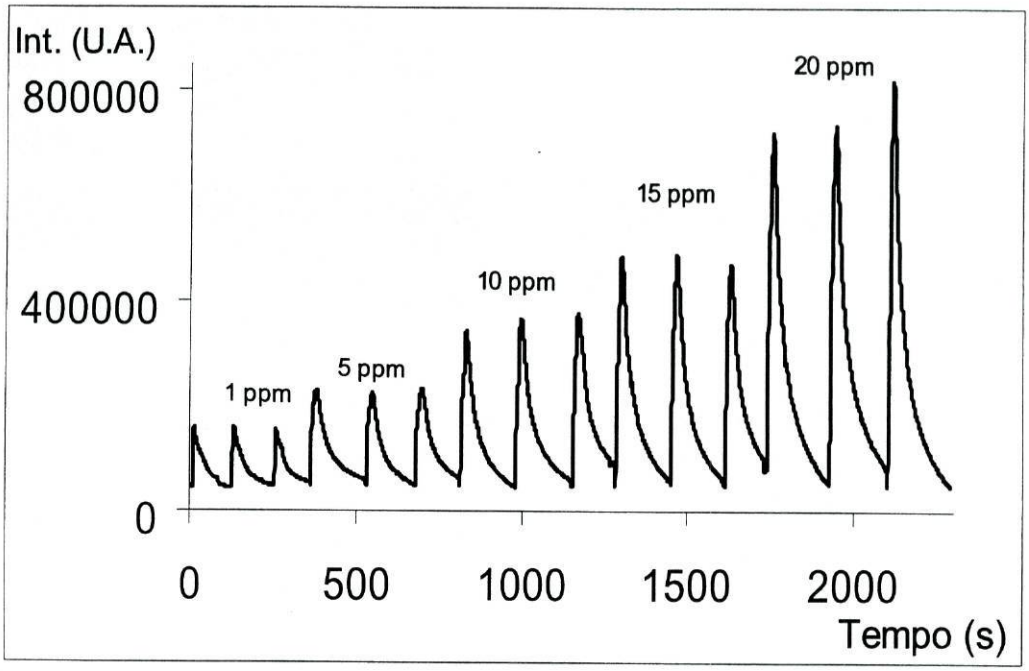


Fig. 6.14 - Representação de uma sequência de calibração típica.

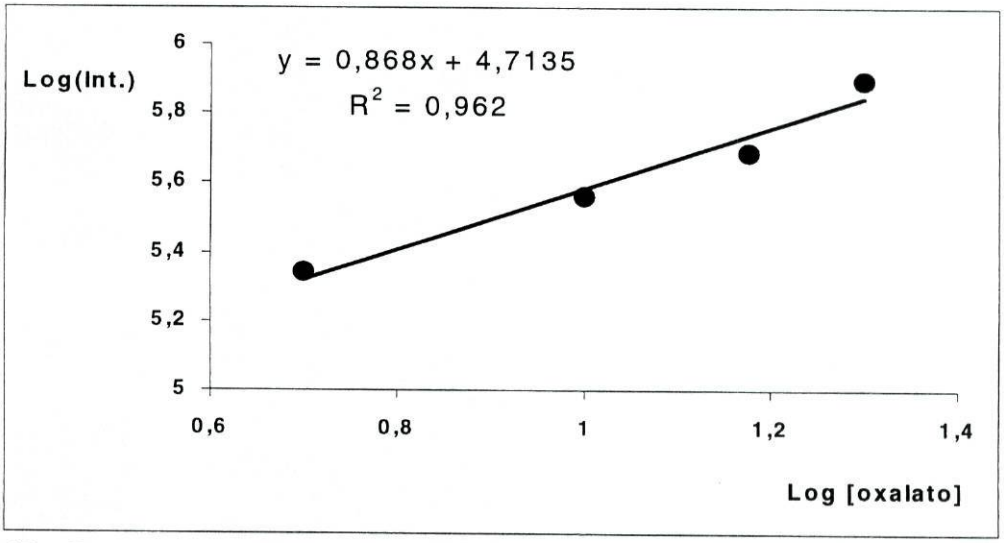


Fig. 6.15 – Representação da curva do logaritmo do sinal quimioluminescente como função do logaritmo da concentração de oxalato.

6.3.3 – Análise das amostras

Nas Figs 6.16 a 6.18 encontram-se os picos obtidos na análise com o sistema de FIA de três dos extractos de rolhas de cortiça previamente analisados pelo método enzimático (Tabela 6.1). Em cada uma das figuras encontram-se representados os picos obtidos na análise do mesmo extracto sem qualquer tratamento prévio (picos assinalados nas figuras com **a**) e após tratamento com carvão activado por um processo semelhante ao utilizado no método enzimático (assinalados nas figuras com **b**). A análise das figuras mostra que é necessário efectuar o tratamento dos extractos para se poder efectuar a determinação do oxalato uma vez que a intensidade do sinal para um mesmo extracto antes e após o tratamento varia entre 10 e 36 vezes, como se pode observar nas figuras. Deste modo, os extractos das rolhas contêm substâncias interferentes que deverão ser previamente eliminadas.

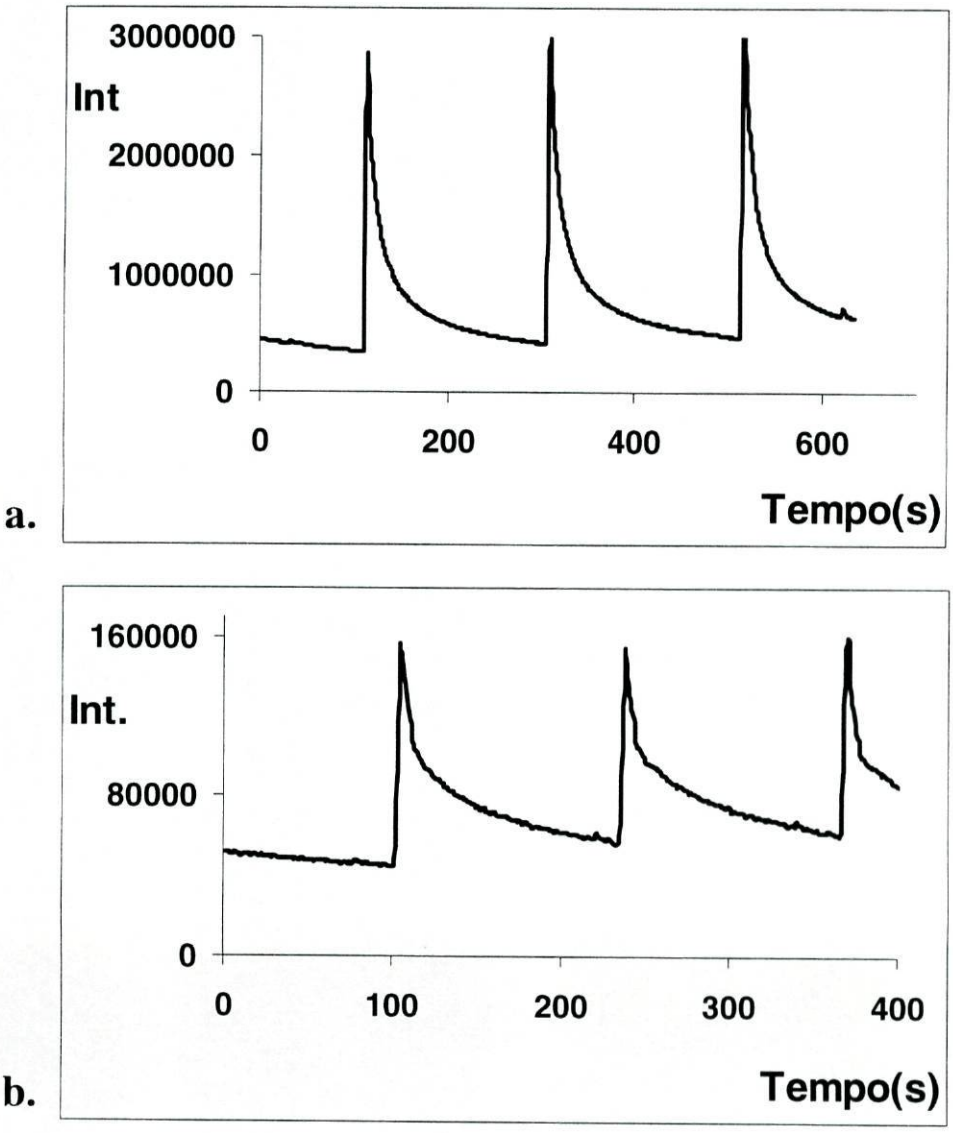


Fig. 6.16 – Resposta do sistema à amostra 3(a) : (a) extracto sem tratamento; (b) extracto após tratamento com carvão activado.

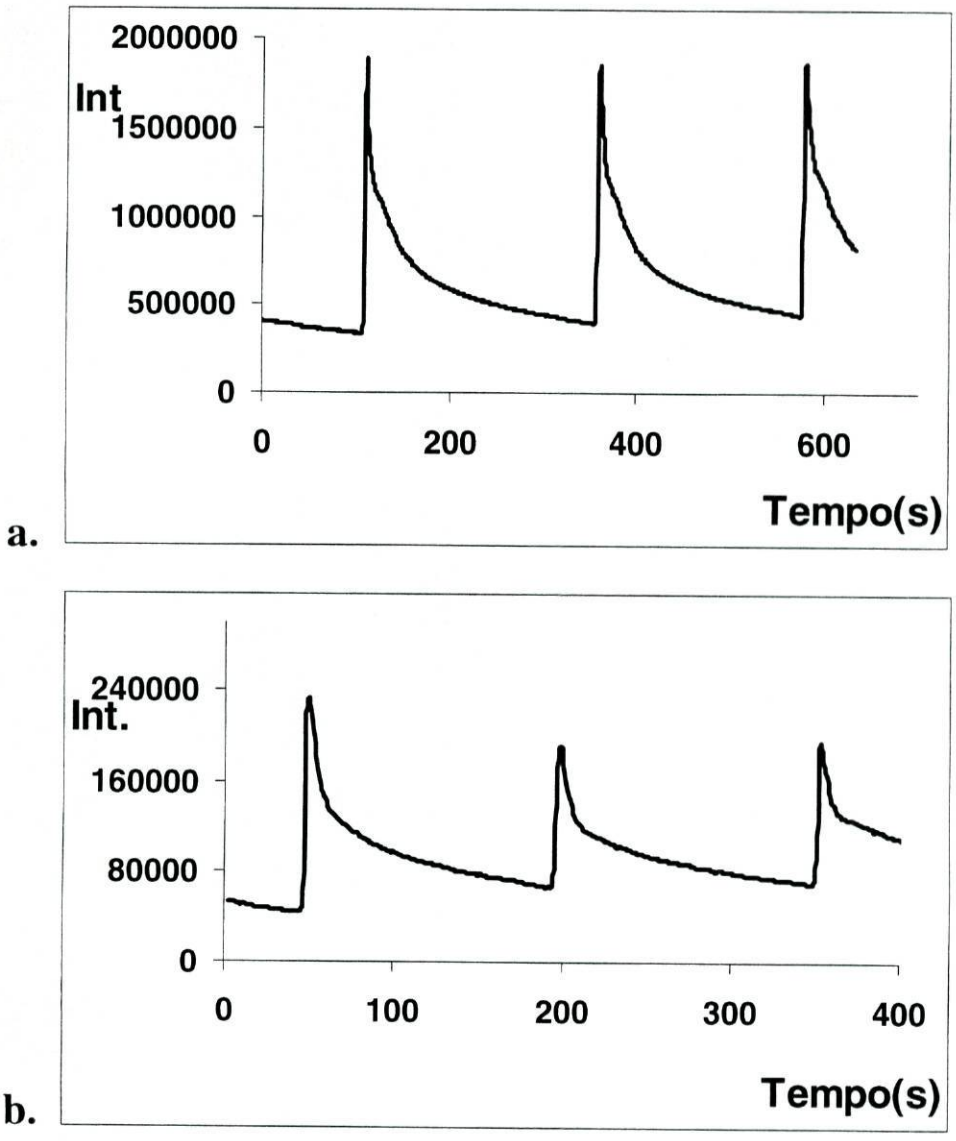
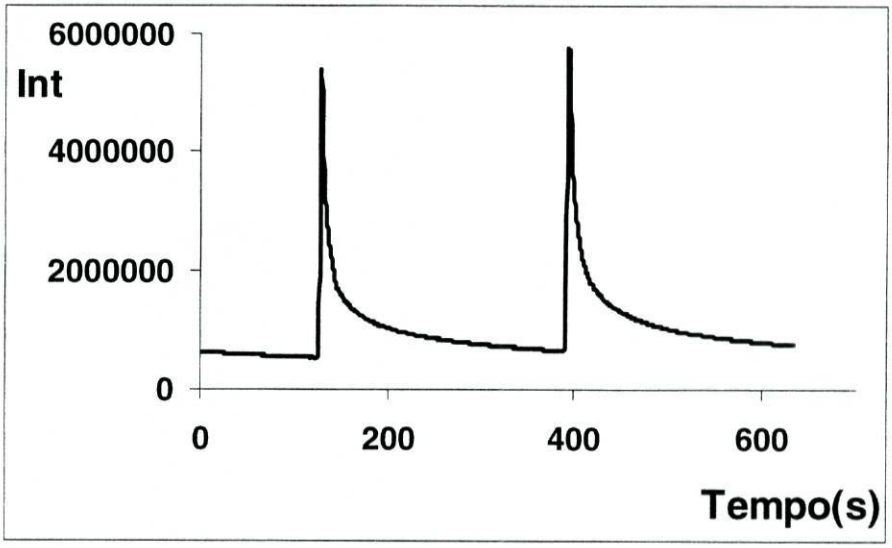


Fig. 6.17 – Resposta do sistema à amostra 5(a): (a) extracto sem tratamento; (b) extracto após tratamento com carvão activado.

a.



b.

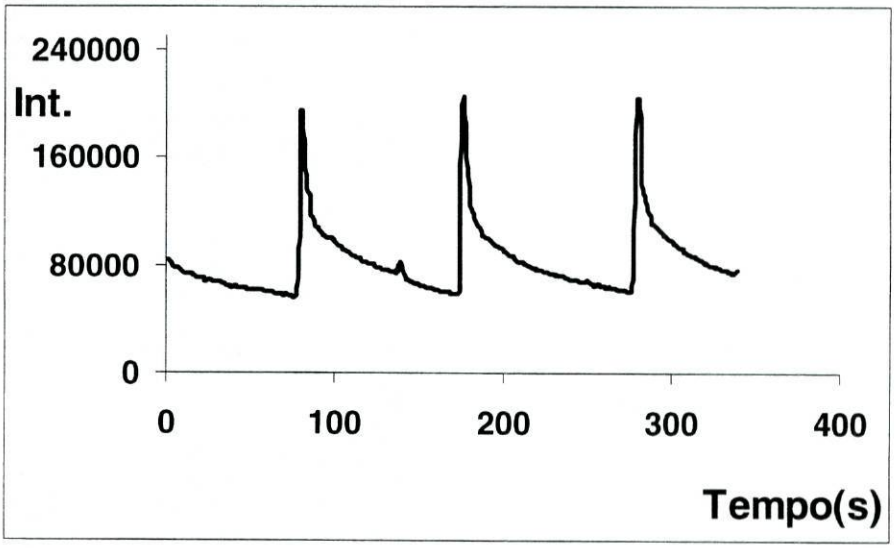


Fig. 6.18 – Resposta do sistema à amostra 6(b): (a) extracto sem tratamento; (b) extracto após tratamento com carvão activado.

6.4 – COMPARAÇÂO DOS MÈTODOS DE PESQUISA DE OXALATO

Os valores de concentração de oxalato nos extractos foram determinados no sistema de FIA por interpolação dos valores da altura de pico numa curva de calibração previamente traçada. Os resultados obtidos nesta determinação, bem como os valores determinados pelo método enzimático encontram-se resumidos na Tabela 6.11. A análise desta Tabela mostra que os valores das concentrações determinadas por quimioluminescência está na mesma ordem de grandeza da obtida pelo método enzimático.

Tabela 6.11 – Resultados obtidos na determinação de oxalatos em extractos de rolhas de cortiça com o sistema de FIA e pelo método enzimático.

Extracto	Sistema de FIA(ppm)	Método enzimático(ppm)
3(a)	2,20	3,84
5(a)	3,27	2,96
6(b)	3,23	6,03

6.5 – CONCLUSÕES

O sistema quimioluminescente para quantificação de oxalato em amostras sintéticas foi implementado com sucesso. A sua simplicidade de implementação e as suas características de resposta atribuem-lhe o potencial para a sua incorporação em procedimentos de detecção rápida de oxalato.

No entanto, na pesquisa de oxalato em rolhas de cortiça é necessário proceder ao pré-tratamento dos extractos para eliminar interferentes. Este aspecto do pré-processamento dos extractos de rolhas de cortiça não foi devidamente explorado neste trabalho. Contudo, a versatilidade dos sistemas de FIA permitirá incluir, em futuros desenvolvimentos do sistema aqui implementado, sistemas de pré-processamento de amostras que permitam a pesquisa directa de oxalatos em extractos de rolhas de cortiça.

6.6 – BIBLIOGRAFIA

1. Luis E. Leon, Angel Rios, M.D.Luque de Castro, Miguel Valcárcel, *Analyst*, *115*, 1549 (1990).

2. E.Kooster, in H. Bruscckke(Ed.), *Handbuch der Inneren Erkrenkungen*, vol.2, Fisher, Jena, pp.250-262 (1991).

3. José A Rodrigues, Aquiles Barros, *Analytica Chimica Acta*, *273*, 531 (1993).

4. M.F. Laker, A.F. Hofmann, B.J.D. Meeuse, *Clin. Chem.*, *26*, 827 (1980).

5. Minguen G., Mathew M. Madappally, *Clin. Chem.*, *35*, 2330 (1989).

6. S. Albrecht, H. Brandl, Wolf-Dieter Böhm, R. Becket, H. Kroschwitz, V. Neumeister, , *Anal. Chim. Acta*, *255*, 413 (1991).

7. CONCLUSÕES

Nesta dissertação implementaram-se métodos de pesquisa de substâncias químicas, cloretos, oxalatos e oxidantes, contaminantes de rolhas de cortiça. A pesquisa destas substâncias químicas é um passo fundamental no controlo de qualidade do produto final do processo de produção de rolhas de cortiça porque o sucesso da sua comercialização depende da negatividade desses testes.

Foram implementadas metodologias de pesquisa de extractos de rolhas descritas em normas. Paralelamente foram avaliadas novas metodologias, eventualmente de implementação e operação mais eficiente do que as descritas nas normas, e baseadas em técnicas potenciométricas (pesquisa de cloreto) e técnicas de quimioluminescência (pesquisa de oxalatos e oxidantes).

Os resultados obtidos com as novas metodologias parecem ser promissores para o desenvolvimento de técnicas de pesquisa facilmente automatizáveis (sistemas de análise por injecção em fluxo) e que envolvam o menor tempo de pessoal técnico na sua operação e manutenção.

Devido a limitações de tempo do Curso de Mestrado em Química, a implementação das novas técnicas de pesquisa num laboratório de controlo de qualidade numa indústria de rolhas de cortiça não foi realizado. Esta limitação impediu um maior desenvolvimento e optimização das três novas técnicas estudadas. Espera-se, havendo oportunidade, concluir esta fase de trabalho futuramente.

APÊNDICE

DETERMINAÇÃO DE OXIDANTES POR FIA COM DETECÇÃO DE QUIMIOLUMINÊSCENCIA

A.1 – INTRODUÇÃO

Como já foi referido anteriormente na secção 1.1.10, a importância do controlo da concentração de oxidantes, no produto acabado, a rolha de cortiça, advém do facto de os oxidantes poderem interferir no equilíbrio dos sistemas oxi-redutores do vinho, influenciando a relação entre formas oxidadas e reduzidas, afectando as suas características redutoras, contribuindo para a sua oxidação e deterioração precoces [1]. A detecção de peróxidos pode ser efectuada pela norma NP 4296/1995 (descrita no capítulo 4), no entanto os resultados obtidos por este processo não permitem a determinação quantitativa da concentração de oxidantes. Por outro lado, a concentração de oxidantes em geral, encontra-se dentro de níveis vestigiais, verificado à posteriori com os dados, tornando-se pertinente pesquisar outro método que permita detectar e determinar de forma eficiente, níveis tão baixos de concentração.

A determinação de gamas resíduais de peróxido de hidrogénio, através de um novo método de FIA com detecção de quimioluminescência, tem sido objecto de estudo, desde à alguns anos, por parte de alguns investigadores. Assim, em estudos efectuados anteriormente [2,3], foi realizada a determinação de peróxido de hidrogénio em águas do mar Mediterrâneo, através da implementação e optimização, de um sistema de FIA com detecção de quimioluminescência. Nestes trabalhos a pertinência da análise de H_2O_2 surge devido ao facto, de se ter constatado que o peróxido desempenha um papel fundamental em reacções redox que ocorrem em ambientes marítimos, sendo responsável pelo controlo da especiação redox de vários metais e pela participação em reacções de oxidação envolvendo compostos orgânicos lábeis e residuais [2,3]. A formação de H_2O_2 ocorre por geração fotoquímica (fotogeração), através de radicais livres intermediários e cromóforos orgânicos dissolvidos. Deste modo, os investigadores desde à alguns anos que se dedicam

a pesquisar métodos expeditos de detecção de peróxido dentro de gamas residuais, debruçando-se especialmente sobre métodos de análise de fluxo [2,3].

No sistema de FIA que foi implementado e optimizado em estudos anteriores [2,3], são introduzidos no sistema dois fluxos, um de cobalto (II), e outro de luminol. No fluxo de luminol, é injectada a amostra contendo H_2O_2 [1]. O Co(II), assim como outros metais, tem a função de catalisar a decomposição de H_2O_2 produzindo o radical $HO^{\cdot}$, que oxida o luminol em presença de O_2 produzindo um cromóforo com emissão fluorescente [4]. A emissão quimioluminescente resultante da oxidação do luminol é directamente proporcional à concentração de H_2O_2 e foi registada e analisada [2,3]. O método revelou-se de baixo custo, com sensibilidade elevada e com perspectivas de poder ser incorporado num sistema portátil de detecção de peróxidos [2].

Neste capítulo, são apresentados o estudo preliminar e a discussão do método de FIA com detecção de quimioluminescência para detecção de oxidantes em extractos de rolhas de cortiça, referido anteriormente. A preparação dos extractos de rolhas foi efectuada em solução etanólica a 12 % o que influencia a resposta do sistema e surge portanto a necessidade de proceder a uma optimização para este tipo de análise.

A.2 – Estudo dos factores que podem influenciar o sistema

Os factores considerados mais significativos para o sistema em estudo, que se encontra esquematizado na Fig.2.3, é cinco. Na tabela A.1 encontra-se a lista desses factores e as respectivas abreviaturas utilizadas.

Tabela A.1 – Factores estudados e suas abreviaturas.

Factor	Abreviatura
Concentração de cobalto	Cco
Concentração de luminol	Clu
Volume de injecção	Vi
Caudal total	Qt
pH de nitrato de prata (tampão)	pH

O número de factores apresentado é elevado e como tal, recorreu-se a um planeamento experimental de Plackett-Burman, apresentado na tabela A.2 na qual se apresenta a matriz do planeamento factorial fraccionado de experiências com cinco factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0).

Tabela A.2 – Matriz do planeamento factorial fraccionado de experiências, com cinco factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0).

	Factores				
Experiência	Cco	Clu	Vi	Qt	pH
1	1	1	-1	1	1
2	1	-1	1	-1	1
3	-1	-1	1	1	1
4	-1	1	1	1	- 1
5	1	- 1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	-1	1
7	1	1	1	- 1	-1
8	-1	-1	-1	-1	- 1
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0

Os valores experimentais a que correspondem os níveis da tabela A.2, encontram-se descritos na tabela A.3.

Tabela A.3 – Factores experimentais e valores a que correspondem os níveis no planeamento da tabela A.2.

Factores	Unidades	Níveis		
		- 1	0	1
Cco	M	10^{-6}		10^{-4}
Clu	M	$3x10^{-6}$		$3x10^{-4}$
Vi	µl	75		325
Qt	mL/min	2,5		5,00
pH		9		12

A resposta experimental do sistema correspondente ao planeamento efectuado e apresentado na Tabela A.2, encontra-se na Tabela A.4, na qual se apresenta simultaneamente a matriz do planeamento factorial de experiências, com cinco factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0) e respectiva resposta.

Tabela A.4 - Matriz do planeamento factorial fraccionado de experiências, com cinco factores a dois níveis representados pelos algarismos (-1) e (1) mais três repetições no centro (0) e a respectiva resposta experimental.

	Factores					Resposta
Experiência	Cco	Clu	Vi	Qt	pH	
1	1	1	-1	1	1	1.182×10^4
2	1	-1	1	-1	1	7.900×10^3
3	-1	-1	1	1	1	3.532×10^3
4	-1	1	1	1	- 1	0.208×10^3
5	1	- 1	-1	1	-1	1.000×10^3
6	-1	1	-1	-1	1	9.312×10^3
7	1	1	1	- 1	-1	0.750×10^3
8	-1	-1	-1	-1	- 1	0.388×10^3
9	0	0	0	0	0	8.512×10^3
10	0	0	0	0	0	8.512×10^3
11	0	0	0	0	0	8.512×10^3

O estudo dos factores com o objectivo de identificar os factores mais significativos foi efectuado utilizando o método de teste HOIE e os resultados são apresentados na Tabela A.5.

Tabela A.5 - Estudo da significância do efeito dos factores pelo método de HOIE.

Factor	Significado
C_{co}	Significativo
C_{lu}	Significativo
V_i	Não significativo
Qt	Não significativo
PH	Muito significativo

Da análise desta tabela, conclui-se os factores mais significativos para o sistema são a concentração de cobalto, concentração de luminol e o pH da solução transporte.

Tal como se referiu no capítulo 3, a ANOVA permite fazer uma análise mais pormenorizada do efeito dos factores experimentais na resposta. Na tabela A.6 encontram-se os resultados da ANOVA.

Tabela A.6 - ANOVA dos significado dos efeitos dos valores da altura de pico obtidos nas experiências descritas na Tabela A.4.

	SS	df	MS	*F*	valor *p*	*b*
Sumário						
Modelo	$1{,}462 \times 10^{8}$	5	$2{,}923 \times 10^{7}$	12,827	0,0739	
Erro	$4{,}558 \times 10^{6}$	2	$2{,}279 \times 10^{6}$			
Total ajustado	$1{,}507 \times 10^{8}$	7	$2{,}153 \times 10^{7}$			
Variáveis						
Cco	$8{,}060 \times 10^{6}$	1	$8{,}060 \times 10^{6}$	3,536	0,2008	$1{,}004 \times 10^{3}$
Clu	$1{,}074 \times 10^{7}$	1	$1{,}074 \times 10^{7}$	4,713	0,1621	$1{,}159 \times 10^{3}$
Vi	$1{,}283 \times 10^{7}$	1	$1{,}283 \times 10^{7}$	5,628	0,1410	$-1{,}266 \times 10^{3}$
Qt	$4{,}005 \times 10^{5}$	1	$4{,}005 \times 10^{5}$	0,176	0,7158	-223,750
PH	$1{,}141 \times 10^{8}$	1	$1{,}141 \times 10^{8}$	50,081	0,0194	$3{,}777 \times 10^{3}$

* SS – Soma dos quadrados; df – graus de liberdade; MS – média dos quadrados ; *F* – razão de Fisher; valor *p* – probabilidade; *b* – coeficientes de regressão.

A.3 – Bibliografía

1. Centro Tecnolológico da cortiça: *Estudo comparativo de rolhas de cortiça vs vedantes Sintéticos*, relatório final (1997).

2. D. Price, R.Fauzi C. Mantoura, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, *337*, 145, (1998).

3. D. Price, P.J. Worsfold, R.Fauzi, *Anal. Chim. Acta*, *298*, 121, (1994).

4. K. Okamura, T. Gamo, H. Obata, E. Nakayama, H. Karatani, Y. Nozaki, *Anal. Chim. Acta*, *377*, 125, (1998).

UNIVERSIDADE DO PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIBLIOTECA