

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Novos desenvolvimentos na deteção individual de 2,4,6- Tricloroanisol em rolhas de cortiça

Tese de Mestrado

de

Ana Raquel Nogueira Dias da Silva

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim & Irmãos S.A.- Investigação & Desenvolvimento



Orientador na FEUP: Prof. Doutora Margarida Bastos

Orientador na empresa: Prof. Doutor Miguel Cabral



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

Julho de 2014

“ A persistência é o caminho do êxito.”

Charlie Chaplin

Agradecimentos

Não podia deixar de agradecer a todos aqueles que contribuíram para que esta experiência tenha valido a pena desde o primeiro minuto.

Dirijo as minhas primeiras palavras aos meus pais, irmão e ao Pedro que sempre me apoiaram nesta caminhada que agora culmina. Obrigado pelo vosso incentivo, interesse e apoio incondicional.

Ao Pedro, um sincero obrigado pelo apoio incondicional, pela extrema dedicação e por toda a confiança depositada na minha pessoa durante esta etapa e todo o percurso académico.

À minha restante família e amigos, obrigado por estarem sempre do meu lado.

À Alexandra Antunes por esta grande amizade. Obrigado pela força e apoio incondicional demonstrado durante toda esta nossa caminhada.

Agradeço a oportunidade de realizar esta dissertação de mestrado no Departamento de Investigação e Desenvolvimento da empresa Amorim & Irmãos S.A.

Aos meus orientadores. Ao Prof. Doutor Miguel Cabral pela oportunidade, condições de trabalho, pela dedicação demonstrada e o acompanhamento prestado ao longo de todo o projeto. À Prof. Doutora Margarida Bastos por todo o acompanhamento e dedicação demonstrada ao longo deste projeto.

Ao Doutor Paulo Lopes, pelo interesse e dedicação demonstrados ao longo de todo o projeto. À Dra. Isabel Roseira, pela simpatia demonstrada ao longo destes 5 meses.

Ao Carlos Costa, por todos os ensinamentos e pelo apoio incondicional que me deu durante todo o estágio.

Aos colaboradores do I&D, Ana Malheiro, Eliana Reis, Patrícia Oliveira e Salomé Reis pela simpatia, ajuda, ensinamentos e auxílio laboratorial prestado. À minha colega de estágio, Magda Sá com quem partilhei esta etapa. Aos colaboradores do LabCork pela simpatia e companheirismo demonstrado.

Aos Colaboradores da PortoCork por toda a simpatia e ajuda.

Resumo

O 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é responsável pelo aroma a mofo/báfio detetado nos vinhos. Este composto é apontado como sendo responsável por um elevado número de contaminações dos vinhos, que utilizam como vedantes as rolhas de cortiça naturais. A indústria corticeira, nos últimos anos tem realizado várias tentativas para erradicar esta problemática, surgindo em 2011 na A&I a ideia da criação de uma máquina de deteção individual de TCA, designada por MDI.

O presente projeto tem como objetivo a otimização da segunda geração desse equipamento de deteção individual designado por *MDI Evolution*, que tem como finalidade a redução do tempo de análise e do limite mínimo de deteção conseguido com a MDI de primeira geração. Com a otimização deste equipamento, obteve-se um método cromatográfico que permite um tempo de análise de 12 segundos e um limite mínimo de deteção do equipamento de 2 ng/L.

A validação da *MDI Evolution* foi realizada em duas fases. A primeira fase consistiu na análise de rolhas de cortiça natural com concentração conhecida de TCA obtendo-se uma eficácia de deteção de 95,5 % para rolhas com concentração superior a 2 ng/L. Na segunda fase foram analisadas diretamente na *MDI Evolution* rolhas provenientes de um lote com elevada incidência em TCA, que foram posteriormente analisadas pelo método de rotina, SPME-GC-ECD, de forma avaliar a eficácia do método implementado. Dos resultados desta segunda fase da validação, obteve-se uma eficácia de deteção de 79 % para rolhas com concentração igual ou superior a 2 ng/L.

Palavras- Chave: Rolha de cortiça natural; 2,4,6-TCA; Deteção individual TCA; *MDI Evolution*

Abstract

The 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is responsible for the so-called "cork taint" detected in wines. This compound is identified as being responsible for a large number of contaminations of wines, when cork stoppers are used as sealants. In recent years, cork industry has been making several attempts to eradicate this problem, emerging in 2011 in A&I the idea of creating a machine individual detection of TCA, called MDI.

The objective of this project is the optimization of the second generation of this individual detection equipment called MDI Evolution, which aims to reduce the analysis time and the minimum detection limit. This equipment optimization uses a chromatographic method which allows analysis time of 12 seconds and a minimum limit of detection of 2 ng/L.

The Validation of MDI Evolution was conducted in two phases. The first stage consists of an analysis of natural cork stoppers with a known TCA concentration. It was obtained a detection efficiency of 95,5% for stoppers with TCA concentration higher than 2 ng/L.

At the second stage, the stoppers coming from a sample with a high incidence in TCA were analyzed directly in the MDI Evolution. Then, these stoppers were analysed by the SPME-GC-ECD routine method which served to evaluate the implemented method effectiveness.

The results of this second phase validation, showed a detection efficiency of 79% for stoppers over 2 ng/L concentration.

Keywords: Natural cork stoppers; 2,4,6-TCA; Individual detection of TCA; MDI *Evolution*

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

(Ana Raquel Nogueira Dias da Silva)

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	2,4,6-Tricloroanisol (TCA).....	2
1.1.1	Processos de prevenção e eliminação do TCA	2
1.2	Contributos do Trabalho.....	6
1.3	Organização da Tese	6
2	Contexto e Estado da Arte	7
3	Descrição técnica	10
3.1	Descrição do equipamento	10
3.1.1	Descrição da máquina de deteção individual de TCA (MDI)	10
3.1.2	Descrição da MDI <i>Evolution</i> - nova máquina de deteção individual de TCA	12
3.2	Método obtido para tempos de análise de 12 segundos	23
4	Validação/Resultados obtidos.....	27
5	Conclusões	31
6	Melhorias e trabalhos futuros	32
Anexo 1	Especificações das colunas cromatográficas	35
Anexo 2	Testes de fluxo de gás auxiliar (Make-up).....	36
Anexo 3	Resultados da Validação obtidos pela MDI <i>Evolution</i>	38
Anexo 4	Resultados obtidos pela MDI <i>Evolution</i> da análise de rolhas de um lote com elevada incidência em TCA	41

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Máquina de deteção individual (MDI). a) Alimentação; b) Incubação; c) Análise cromatográfica.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2 - Projeto do protótipo MDI Evolution: a) Esboço da MDI Evolution; b) protótipo do equipamento em 3D; c) Ampliação das câmaras de incubação.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3 - Protótipo do Módulo de alimentação da MDI Evolution: a) Projeto em 3D do módulo de alimentação e incubação; b) Ampliação do auto-sampler e das câmaras de incubação.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4 - Módulo de incubação/extração de TCA: a) tubo metálico que transporta o azoto para o interior da câmara; b) aquecimento elétrico das câmaras de incubação</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5 - Representação dos elementos constituintes das câmaras de incubação: a) vedante de teflon com mola no interior; b) localização do vedante na câmara; c) mola existente na parte móvel da câmara e revestimento de fibra de vidro</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6 - Interior do forno cromatográfico: a) válvula de diafragma; b) e c) válvulas de rotação; d) colunas cromatográficas</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7 - Diagrama processual da MDI Evolution</i>	<i>16</i>
<i>Figura 8 - Representação dos cromatogramas obtidos para os diferentes valores de temperaturas das colunas.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 9- Cromatogramas da experiência à temperatura de 106 °C para diferentes fluxos de gás auxiliar (make-up).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 10- Representação do conjunto de cromatogramas para diferentes valores de corrente elétrica no ECD</i>	<i>22</i>
<i>Figura 11 - Representação do cromatograma obtido no software AmorimCleanCork™ para um tempo de análise de 12 segundos</i>	<i>23</i>
<i>Figura 12 - Valores dos parâmetros definidos para método de deteção com um tempo de análise de 12 segundos.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 13 - Cromatogramas obtidos em 2 colunas para a mesma amostra</i>	<i>25</i>
<i>Figura 15 - Representação da regressão linear para uma dada gama de valores de fluxo de gás auxiliar (Make-up)</i>	<i>36</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Valores dos fluxos das colunas cromatográficas da MDI Evolution.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 2 - Valores dos parâmetros para método com tempo de análise de 12 segundos na MDI Evolution</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 3 - Comparação de parâmetros da MDI e MDI Evolution</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 4 - Comparação entre os resultados obtidos para rolhas com concentração conhecida (quantificadas pelo método de SPME-GC-ECD) e o método de detecção da MDI Evolution</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 5 - Distribuição das rolhas analisadas por SPME-GC-ECD por diferentes valores de concentração</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 6 - Comparação entre os resultados obtidos por SPME-GC-ECD e MDI Evolution</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 7 - Resultados da detecção de rolhas com concentração conhecida na MDI Evolution</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 8 - Resultados obtidos da detecção de 1071 rolhas provenientes de um lote com elevada incidência em TCA na MDI Evolution</i>	<i>41</i>

Notação e Glossário

- TCA - 2,3,6-tricloroanisol
- TCP - 2,4,6-triclorofenol
- PCP - Pentaclorofenol
- TeCP - 2,3,4,6-tetraclorofenol
- TBA - 2,4,6-tribromoanisol
- SPME - Micro-extração em fase sólida
- GC - Cromatografia em fase gasosa
- MS - Espectrometria de massa
- ECD - Detetor de captura electrónica de electrões
- A&I - Amorim e Irmãos, S.A.
- I&D - Investigação e Desenvolvimento
- APCOR - Associação Portuguesa da Cortiça
- CQC - Cork Quality Council
- CIPR - Código Internacional das Boas Práticas Rolheiras
- PSA - Pressure Swing Adsorption (adsorção por variação de pressão)
- MDI - Máquina de deteção individual
- MDI Evolution - Nova máquina de deteção individual
- PCA -Pentacloroanisol
- CTCOR - Centro Tecnológico da Cortiça

1 Introdução

A Corticeira Amorim é a maior empresa mundial de produtos de cortiça contribuindo como nenhuma outra para a economia e a inovação da fileira da cortiça. O grupo Amorim é constituído por cinco principais unidades de negócio: matérias-primas, rolhas (Amorim & Irmãos, S.A), revestimentos, aglomerados compósitos e isolamentos. Das unidades de negócio referenciadas anteriormente a de maior relevância é a unidade de negócio das Rolhas, sendo esta responsável por cerca de 60,7% das vendas globais do grupo. Em 2013, as vendas da Corticeira Amorim atingiram 542,5 milhões de euros, tendo como principal país de exportação os Estados Unidos da América (Amorim, 2013). A empresa disponibiliza uma ampla gama de produtos de cortiça, com aplicação na indústria vinícola, construção, têxtil até à indústria aeronáutica (Amorim, 2014). A rolha de cortiça Amorim é considerada o vedante de cortiça com a melhor relação qualidade/preço (Amorim, 2013).

A cortiça é um tecido vegetal que reveste o tronco do sobreiro, *Quercus suber L.* É considerado um material 100% natural, formado por células microscópicas revestidas predominantemente por suberina, lenhina e polissacarídeos (Fortes, 2004) que lhe conferem propriedades únicas como a impermeabilidade, compressibilidade, leveza, sustentabilidade e elevada resistência ao atrito, tornando as rolhas de cortiça um excelente vedante das garrafas de vinho (AmorimCork, 2014).

O montado de sobreiro é um dos mais ricos ecossistemas existentes no mundo, onde sobrevivem muitas espécies animais raras e em vias de extinção e constitui uma importante barreira ao avanço da desertificação (Liège,2006). O tecido do sobreiro é regenerado naturalmente, permitindo a extração de cortiça a cada 9 anos. Este facto permite manter um desenvolvimento sustentável, considerado um fator de peso na escolha da cortiça por parte dos consumidores. (APCOR, 2014). Portugal concentra cerca de 34% da área mundial de montado de sobreiro, que é o correspondente a cerca de 736 mil hectares. Em termos económicos, Portugal é também o líder mundial do setor da cortiça relativamente à sua produção e exportação, produzindo quase 50% da produção mundial e exportando cerca de 64,7% dos produtos de cortiça correspondentes a 845,370 Milhões de euros (APCOR, 2013).

A cortiça, desde a sua formação até ao engarrafamento, está exposta a diversos fatores ambientais capazes de alterar a sua qualidade. A atividade microbiológica é um processo que ocorre naturalmente na cortiça conduzindo à formação de compostos indesejáveis. Estes compostos, quando migram para o vinho, causam alterações organoléticas suscetíveis de adulterar a sua qualidade. Como consequência, o vinho afetado por estes compostos adquire o chamado “gosto a rolha”. A ocorrência desta alteração nos vinhos

resulta da ação cumulativa de vários compostos, nomeadamente: TCA (2,4,6-Tricloroanisol), TeCA (2,3,4,6-Tetracloroanisol), PCA (Pentacloroanisol) e TBA (2,4,6-Tribromoanisol). Estes compostos apresentam um limite de perceção sensorial em solução alcoólica entre 1,5 até 15 ng/L. Dos compostos anteriormente referidos o 2,4,6-Tricloroanisol (TCA) é o de maior importância, sendo o responsável por 80% dos casos das alterações organoléticas em vinhos (Sefton *et al*, 2005).

1.1 2,4,6-Tricloroanisol (TCA)

O TCA é um composto muito volátil que passa facilmente para a fase gasosa durante o processo de tratamento da cortiça, podendo ser absorvido por cortiça não contaminada. Tal como foi citado anteriormente, este é o composto responsável por cerca de 80% dos desvios organoléticos verificados em vinhos (Hervé *et al*, 2004). A sua facilidade de absorção permite a ocorrência de gradientes de concentração de TCA nos vinhos após o engarrafamento, devido à existência de fenómenos de adsorção e dessorção de TCA por parte do vedante. Este cloroanisol é um composto quimicamente estável, não sofrendo degradação natural ao longo do tempo, podendo assim alterar sensorialmente os vinhos mesmo em concentrações inferiores a 2 ng/L (Coque *et al*, 2006).

Durante décadas os clorofenóis (2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) e o pentaclorofenol (PCP)) foram usados como conservantes da madeira, devido às suas propriedades antimicrobianas (biocidas, inseticidas e fungicidas) (Sefton *et al*, 2007). Um estudo realizado por Rigaud, em 1984, demonstrou que a cortiça retirada dos sobreiros tratados com estes clorofenóis apresentava os respetivos cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) e que estes apareciam com maior incidência nos anéis exteriores da cortiça. Apesar do uso destes clorofenóis já ter sido proibido na União Europeia, estes compostos foram-se acumulando nos ecossistemas e alguns microorganismos desenvolveram mecanismos de defesa à sua toxicidade. O mecanismo mais plausível para explicar a formação dos cloroanisóis é a *O*-metilação dos clorofenóis, corresponde à biometilação do TCP que é realizada por bactérias dos solos ou por fungos filamentosos, formando TCA (Coque *et al*, 2006).

1.1.1 Processos de prevenção e eliminação do TCA

Durante as últimas duas décadas, o foco das indústrias cortiçeiças tem sido a eliminação do TCA, visto ser este o principal composto identificado como contaminante de vinhos a partir de rolhas de cortiça. A erradicação deste composto fez com que ao longo dos últimos anos fossem desenvolvidos diversos processos/técnicas para a sua remoção. As ações

implementadas para a erradicação desta problemática assentam em 3 pilares: prevenção, descontaminação e controlo de qualidade.

A prevenção engloba várias práticas implementadas pela indústria que previnem a formação de TCA desde a plantação do sobreiro até ao processo de produção das rolhas. Destacam-se o aumento da rastreabilidade e rigor na escolha da matéria-prima, um melhor arejamento e escoamento de água durante a armazenagem da cortiça, a substituição de paletes de madeira por paletes de metal (a madeira acumula TCA), o corte dos calços antes da primeira etapa do processo produtivo (zona de grande incidência de TCA), a monitorização ao longo de todo o processo de produção das rolhas e a substituição de hipoclorito de sódio por peróxido de hidrogénio durante a lavagem das rolhas (CELIEGE, 2011) .

A descontaminação consiste na extração de TCA e de outros compostos voláteis da matriz da cortiça. Em 1998 foi desenvolvido o INOS II, processo de lavagem hidrodinâmica de discos para rolhas técnicas. Este processo patenteado (Patente nº EP1108507) realiza-se num autoclave a uma temperatura elevada onde são promovidos ciclos de pressurização e despressurização, provocando uma expansão/contracção das lenticelas da cortiça resultando numa redução de TCA de 40 % (Cabral et al, 2012). A A&I desenvolveu também a tecnologia ROSA (Rate of Optimal Steam Application), processo patenteado em 2006 (Patente nºDE60306404T) que se baseia numa tecnologia de destilação por corrente de vapor controlada para a remoção de compostos voláteis do interior das células da cortiça. Este processo reduz em cerca de 80% a incidência de TCA (Cefage-UE, 2012/12). As condições operatórias deste processo, não podem ser aplicadas às rolhas de cortiça natural pois alteram as suas propriedades físico-mecânicas. Para ultrapassar esta limitação a empresa desenvolveu o processo ROSA Evolution, onde foram otimizadas as condições operatórias em termos de temperatura e humidade (Cefage-UE, 2012/12). Este processo apresenta uma taxa de remoção média de cerca de 82% para discos e de 77% para rolhas de cortiça natural, podendo estes valores variar com a quantidade de TCA existente inicialmente. Os processos ROSA e ROSA Evolution diminuem o risco de aparecimento de defeitos organoléticos no vinho, devido à presença de TCA, em 80% a 100%, respetivamente (Chatonnet, P., 2004). A par destes desenvolvimentos, outras indústrias corticeiras desenvolveram outras tecnologias. Em 2004 surgiu o sistema Symbios desenvolvido pelo CTCOR. Trata-se de um processo biológico preventivo que aborda o problema durante todas as etapas da transformação da cortiça. Numa primeira fase, na cozedura das pranchas, são extraídos os materiais solúveis existentes na cortiça através de água, como por exemplo os polifénóis. Na segunda fase é inibido o desenvolvimento de microorganismos indesejados, impedindo assim a formação de TCA. O CTCOR reportou que com a utilização deste processo foi obtida uma redução na incidência de rolhas contaminadas de 1,2% para 0,8%. A maior limitação deste processo, é o facto de não

agir sobre o TCA já existente nas pranchas de cortiça que são usadas como matéria-prima para a produção das rolhas. A Corksupply desenvolveu o INNOCORK (Cork Supply, US 79025882, 2007) que utiliza uma mistura de vapor de água, etanol e temperatura controlada para quebrar as interações entre o TCA e a matriz da cortiça. Essas interações são quebradas pela ação de uma corrente de ar comprimido e os contaminantes da cortiça são transportados pela corrente, evitando assim a sua reabsorção. A utilização do etanol neste processo beneficia a remoção de TCA por ajuste da polaridade e tem uma eficácia de remoção de 63% (APCOR, 2007). O processo DIAM patenteado pela OENEO (Patente nº EP1216123B1) baseia-se na utilização de dióxido de carbono em estado supercrítico para a remoção de TCA em granulados de cortiça, com uma taxa de remoção de TCA de 99% (Hibberd, J, 2005). Este não pode ser aplicado a rolhas de cortiça natural devido às alterações físico-mecânicas que provoca.

Existem ainda processos baseados na utilização de radiação γ , que são usados para eliminar parcialmente o TCA, dependendo da dosagem de radiação γ utilizada (15-100 kGy). Estes processos têm uma eficácia de remoção de cerca de 89,5% (Pereira, C. et al, 2007).

Por último, o pilar do controlo da qualidade que passa especificamente por análises cromatográficas de TCA e análises sensoriais, em várias etapas do processo produtivo. (Cefage-UE, 2012/12).

Para atender a resolução deste problema, na A&I, foram desenvolvidos e patenteados vários processos com vista a extração de TCA dos produtos de cortiça. De seguida serão apresentados alguns dos processos desenvolvidos.

O processo de rotina utilizado no departamento de investigação e desenvolvimento da A&I, para a extração de TCA baseia-se na microextração em fase sólida de TCA por exposição no *headspace*. Este método consiste na maceração de 10 ou mais rolhas de cortiça natural, retiradas de lotes contendo cerca de 10000 rolhas. Estas são colocadas numa solução hidroalcoólica ou em vinho (12% de álcool) durante 24 horas à temperatura ambiente, de maneira a promover a extração do TCA para a solução. De seguida, são pipetados 10ml desta solução para um *vial* contendo sal (NaCl). A passagem dos compostos voláteis presentes na solução para o *headspace*, favorecida pelo NaCl, os quais são posteriormente adsorvidos na fibra de SPME. A quantificação é feita por cromatografia em fase gasosa acoplada a deteção por ECD ou MS. O método referido anteriormente trata-se de um método simples e eficaz para a quantificação de TCA; no entanto, apresenta um fator de risco considerável quando usado no controlo de lotes de rolhas da produção industrial, pois para além de ser extremamente aleatória a contaminação de TCA nas rolhas de cortiça natural, a amostragem diária realizada comparada ao número de rolhas produzidas, é ínfima (Costa, 2012).

Apesar de todos estes processos supracitados terem contribuído para um enorme avanço no combate à erradicação do TCA, os resultados estão longe de corresponder às expectativas da indústria vitivinícola. A A&I sentiu necessidade de criar uma nova tecnologia que permitisse ultrapassar algumas das limitações dos processos já existentes. É então que surge o conceito de análise de deteção individual de TCA das rolhas de cortiça natural. A A&I pretende com este projeto criar uma tecnologia que seja capaz de analisar cada rolha de cortiça individualmente num equipamento capaz de operar autonomamente. Este conceito tem como base um equipamento industrial dotado de um sistema de deteção por cromatografia em fase gasosa (GC-ECD), capaz de analisar e segregar as rolhas contaminadas com TCA do processo, garantindo ao cliente que as rolhas aprovadas não alterem sensorialmente o vinho. Após uma primeira fase de estudos com um protótipo laboratorial, a A&I lançou um piloto industrial (máquina de deteção individual, MDI) desenvolvido para o efeito. Este equipamento já opera de modo totalmente automático, tendo um tempo de análise de 20 segundos e um limite mínimo de deteção de TCA de 5 ng/L. O mesmo revelou-se muito promissor tendo uma eficácia de deteção de cerca de 100% para rolhas com concentração de TCA superior a 5 ng/L.

O projeto no qual se insere o tema desta dissertação contempla a otimização de um novo piloto industrial (*MDI Evolution*) com o objetivo de analisar rolhas de cortiça natural individualmente com um menor limite de deteção de TCA e com um menor tempo de análise.

1.2 Contributos do Trabalho

O autor desta dissertação realizou a otimização e a validação de um novo equipamento de deteção individual de TCA. O grande objetivo foi o de aumentar a capacidade produtiva destes equipamentos permitindo a sua utilização de forma economicamente viável na produção de rolhas naturais na Amorim & Irmãos, S.A. A otimização da solução proposta é um passo indispensável para a sua industrialização.

1.3 Organização da Tese

A presente tese encontra-se organizada em 6 capítulos.

No capítulo 1 é feita uma breve introdução à empresa Amorim & Irmãos S.A, evidência-se a importância da indústria corticeira em Portugal e enquadra-se o autor na problemática da eliminação do TCA. Neste capítulo são também referidas as técnicas e os projetos desenvolvidos ao longo dos anos para a deteção, prevenção, eliminação e controlo do TCA nas rolhas de cortiça natural.

No capítulo 2, contexto e estado de arte, refere-se a importância da rolha de cortiça natural como um vedante e alguns dos processos e procedimentos utilizados para a eliminação de TCA em rolhas de cortiça natural.

No capítulo 3, descreve-se os equipamentos de deteção individual existentes, quais as suas principais semelhanças e diferenças, os parâmetros definidos e otimizados para a MDI *Evolution* para um tempo de análise de 12 segundos.

No capítulo 4, validação e discussão de resultados é apresentado o plano de validação definido para a MDI *Evolution* e apresentam-se os respetivos resultados.

No capítulo 5, expõem-se as conclusões deste projeto.

No capítulo 6, apresenta-se a proposta de trabalhos futuros.

2 Contexto e Estado da Arte

A rolha é o mais famoso produto da indústria corticeira, sendo a sua principal função a vedação de garrafas de vinho. Para tal, ao longo dos anos, tem-se verificado um enorme investimento em investigação e desenvolvimento, de modo a responder às exigências dos consumidores e fabricantes, permitindo disponibilizar com maior fiabilidade, uma ampla gama destes produtos, de inúmeros calibres e formatos aos mercados nacionais e internacionais (APCOR, 2013).

As rolhas dividem-se em sete categorias: rolhas naturais multipeça, rolhas naturais colmatadas, rolhas de champanhe, rolhas aglomeradas, rolhas microaglomeradas, rolhas 1+1 (corpo aglomerado e um disco natural em cada topo) e rolhas capsuladas (APCOR, 2013). Convém referir que para a A&I as rolhas naturais são as mais importantes das sete categorias supracitadas. Para além de ser o produto com mais prestígio, a rolha de cortiça natural é o produto de sustentabilidade da empresa, pois para além de ser o produto com maior valor comercial, os desperdícios resultantes da sua produção formam matéria-prima para produzir a restante gama de produtos. A venda da rolha de cortiça natural é crucial para a sustentabilidade da empresa.

As rolhas de cortiça naturais são um vedante de excelência com características incomparáveis (flexibilidade, estanquicidade, impermeabilidade, leveza e imprustecibilidade) (APCOR, 2011) que asseguram uma vedação ideal e, ao mesmo tempo, desempenham um papel determinante na correta evolução do vinho (AmorimCork, 2014).

Durante as últimas duas décadas, o aumento de exigência por parte do consumidor e o aparecimento de vedantes alternativos ameaçaram a posição da indústria corticeira no sector de vedantes de vinho. Esta evolução do mercado obrigou a industria corticeira a focar-se, definitivamente, na erradicação total do TCA. Muitos processos foram desenvolvidos, mas nenhum deles conseguiu eliminar a 100% o TCA contido nas rolhas de cortiça natural. Este facto, obrigou a A&I a investir num melhor controlo da qualidade dos seus produtos.

Durante vários anos o controlo da qualidade fazia-se através da análise sensorial de macerações hidroalcoólicas, aquosas e vinícas de rolhas de cortiça. Este tipo de análises é realizada por pessoas especializadas, mas os seus resultados podem ser variáveis consoante a sua sensibilidade, o tipo de vinho em análise, a ocasião do consumo entre outras. Os fatores descritos anteriormente podem influenciar a reprodutibilidade dos resultados não podendo ser comparados com resultados obtidos por análises químicas, nomeadamente por cromatografia em fase gasosa (Sefton et al, 2005).

Fruto destas limitações, o Departamento de Investigação e Desenvolvimento adotou um método de análise de TCA de rotina. Este método, baseia-se na microextração de TCA em fase sólida por exposição no *headspace* (SPME).

O método de microextração baseia-se na maceração de 10 ou mais rolhas de cortiça natural, retiradas de lotes contendo cerca de 10000 rolhas. Estas são colocadas numa solução hidroalcoólica ou em vinho (12% de álcool) durante 24 horas à temperatura ambiente, podendo ser colocadas individualmente ou em conjunto, caso se trate de uma maceração individual ou conjunta. Este processo químico recorre à combinação de um processo de SPME-GC-ECD/MS. Embora a maceração composta constitua uma ferramenta eficaz para a avaliação do risco de contaminação das rolhas com TCA, ocorre um enviesamento dos resultados porque há absorção de TCA por parte de rolhas não contaminadas, causando uma diminuição da concentração média de TCA na solução. O recurso a macerações individuais não apresenta esse problema, mas o número diário de rolhas analisadas por este método é muito pequeno comparado com a quantidade de rolhas que são produzidas (Sefton, et al. 2005).

Numa tentativa de ultrapassar as limitações mencionadas anteriormente, surgiu um sistema capaz de analisar individualmente rolhas de cortiça natural e que assegure a segregação das rolhas contaminadas com TCA durante o processo. Este sistema permite garantir ao cliente que as rolhas não irão alterar sensorialmente o vinho. O sistema cromatográfico que está na base deste novo projeto é um sistema de deteção de GC-ECD. Este tipo de detector (ECD) é ideal para a deteção de compostos com elementos eletronegativos, como é o caso do TCA. Utiliza um emissor radioativo de partículas que, ao colidirem com o composto, transformam as moléculas nos respetivos iões, formando uma corrente elétrica. As diferenças de corrente resultantes da formação dos iões, são representadas em função do tempo sob a forma de picos no cromatograma e, através da área desses picos (mV/s), é possível a quantificação dos compostos. A amostra é preparada incubando cada rolha numa câmara cilíndrica individual, cuja temperatura no interior é suficiente para volatilizar o TCA. A amostra é injetada no cromatógrafo através de um gás de arraste de elevada pureza, que neste caso é o azoto. Todo este processo demora cerca de 20 segundos por rolha.

Numa primeira fase do projeto foi criado um protótipo laboratorial onde foram analisadas 56 rolhas. Estas rolhas foram analisadas por SPME-GC-ECD e posteriormente analisadas neste protótipo, permitindo a deteção de 98% das rolhas com valores de TCA superiores a 5 ng/L (Pereira, 2011).

Numa segunda fase, fez-se o *scale-up* deste protótipo laboratorial para um protótipo industrial, apelidado de Máquina de Deteção Individual (MDI). O desenvolvimento e otimização deste equipamento foi alvo de um projeto de dissertação (Costa, 2012) e após

validação, demonstrou ser capaz de detetar 100% das rolhas com concentração de TCA superior a 5 ng/L com um tempo de análise de 20 s.

No entanto, com o decorrer do tempo foram identificadas algumas limitações na MDI. Estas limitações estavam relacionadas principalmente com a estanquicidade das câmaras de incubação e o facto de requerer elevada manutenção, fruto da sua complexidade mecânica. A falta de estanquicidade das câmaras origina uma maior quantidade de oxigénio na amostra, diminuindo a sensibilidade do detetor para o TCA. Outro aspeto passível de melhoria na MDI seria a criação de um sistema de amostragem fixo. Nesta máquina, sempre que uma amostra é analisada, há rotação do prato para a injeção da amostra seguinte e, movimento de recolha do amostrador do cromatógrafo. A cada movimento do amostrador, verifica-se entrada de ar no cromatógrafo e, conseqüentemente, aumento dos níveis de oxigénio na amostra. Todas as limitações referidas anteriormente levaram a que A&I desenvolvesse a segunda geração deste equipamento - *MDI Evolution*: uma nova máquina de deteção individual mais robusta e mecanicamente menos complexa, que permita uma amostragem mais estanque em termos de oxigénio e, conseqüentemente, reduza o tempo de análise e o limite mínimo de deteção deste novo equipamento. O tema desta dissertação contempla a otimização da *MDI Evolution*, com o objetivo de criar um equipamento capaz de analisar individualmente rolhas de cortiça com um menor tempo de análise e um limite de deteção mais baixo, em relação à MDI.

3 Descrição técnica

Neste capítulo serão apresentados os dois equipamentos de deteção individual de TCA existentes, a MDI (protótipo já existente) e a MDI *Evolution* (novo equipamento a otimizar). Serão descritas quais as limitações do primeiro equipamento que estiveram na base da evolução para a segunda geração de equipamentos assim como as otimizações a nível cromatográfico que permitiram a redução do tempo de análise e do limite de deteção da MDI *Evolution*.

3.1 Descrição do equipamento

Neste subcapítulo serão abordadas as características mecânicas e o modo operativo de cada um dos equipamentos.

3.1.1 Descrição da máquina de deteção individual de TCA (MDI)

O equipamento é composto por 4 partes distintas: alimentação, incubação, análise e segregação, como é possível visualizar na Figura 1.

A alimentação de rolhas no sistema é realizada por intermédio de um elevador que assegura o transporte das rolhas até ao canal da alimentação. Este canal está equipado com sensores que detetam a presença/ausência de rolhas, regulando a ação do elevador de modo a controlar a entrada de cada rolha no incubador. O incubador consiste num prato rotativo constituído por 48 câmaras de incubação com dimensões de 54x28 mm, nas quais cada rolha é incubada à temperatura de 100 °C durante 10 minutos, até se proceder à sua análise. Este valor foi otimizado em estudos anteriores (Pereira, 2011) e é definido como o tempo mínimo necessário para volatilizar o TCA em rolhas de cortiça natural, sendo que a utilização de um tempo de incubação superior não provoca qualquer alteração na quantidade de TCA extraída.

O aquecimento das câmaras de incubação é assegurado pela circulação de um fluído de aquecimento (óleo térmico) que se ramifica a partir do centro do prato e garante homogeneidade de temperaturas entre as 48 câmaras e um gradiente de temperatura constante no interior de cada uma, permitindo assim que o TCA volatilize uniformemente por toda a superfície da rolha. Em cada uma das câmaras é injetado gás de arraste, azoto, que é fornecido por um gerador que separa o azoto de uma corrente de ar comprimido, por um processo de adsorção por variação de pressão (PSA). O azoto é o elemento responsável pelo arraste do TCA do interior das câmaras para o injetor do cromatógrafo e funciona também como agente de mistura e homogeneização da amostra.

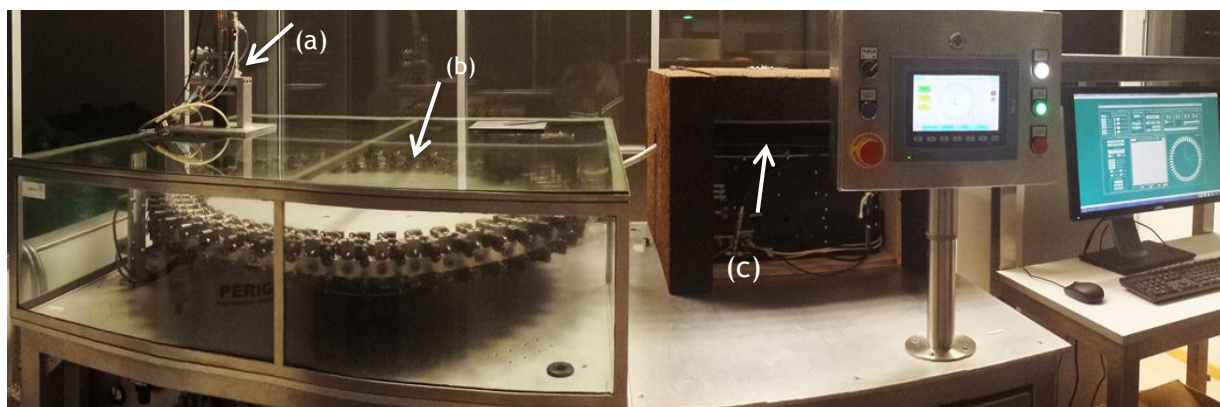


Figura 1 - Máquina de deteção individual (MDI). a) Alimentação; b) Incubação; c) Análise cromatográfica

A ligação entre o cromatógrafo e as câmaras é feita através de um amostrador que contempla duas posições: a posição de recolha da amostra, na qual entra em contacto com a câmara e a posição de espera na qual recolhe e permite a rotação do prato para a câmara seguinte. Depois da recolha da amostra pelo amostrador esta flui através de um tubo de cobre revestido, denominado de “*transfer-liner*”. O aquecimento deste tubo garante que nenhum dos compostos constituintes da amostra condense durante o seu trajeto até ao injetor do cromatógrafo.

O cromatógrafo é constituído por 8 colunas cromatográficas, e o comprimento destas está definido para que a análise de cada amostra se realize em apenas 20 segundos. Através de uma válvula de rotação “switching-valve”, é possível controlar em que coluna a amostra está a ser injetada enquanto às restantes colunas é alimentado continuamente azoto como gás de limpeza deste modo assegura-se a limpeza das colunas antes da injeção de uma nova amostra nessas colunas. Após a passagem da amostra pela coluna cromatográfica, esta segue para outra válvula de rotação que é responsável pela passagem da mesma para o detetor. A análise cromatográfica é automática e a integração dos resultados é processada pelo *software AmorimCleanCork™*. Após análise e de acordo com o resultado, as rolhas são segregadas para um corredor de saída, onde são separadas em gamas de concentração definidas pelo utilizador. Da otimização deste equipamento (Costa, 2012) resultou um tempo de análise de 20 segundos com um limite de deteção de 5 ng/L.

3.1.2 Descrição da MDI *Evolution* - nova máquina de deteção individual de TCA

O fator preponderante para a redução do tempo de análise e do limite de deteção do cromatógrafo é a diminuição do teor de oxigénio na amostra injetada. Uma parte deste oxigénio provém da própria rolha, pois sendo a cortiça um material poroso, durante o seu aquecimento há uma constante libertação de ar. A outra parte do oxigénio da amostra resulta de uma deficiente evacuação do ar do interior das câmaras. Esta falta de estanquicidade da MDI, é devida ao mecanismo de abertura/fecho das câmaras que se realiza por intermédio de molas. A elasticidade das molas é uma variável dinâmica que vai alterando a força exercida no fecho das câmaras ao longo do tempo. Por outro lado, a geometria das câmaras da MDI e a disposição das entradas e saídas de azoto não distribui o gás de igual forma por toda a superfície da rolha, criando zonas de volume morto no interior das câmaras. O mecanismo de selagem das câmaras e a orientação das rolhas durante a incubação foram dos aspetos de maior foco na projeção da MDI *Evolution*.

Outro aspeto passível de melhoria na MDI consistia na criação de um sistema de amostragem fixo. Nesta máquina, sempre que uma amostra é analisada, ocorre a rotação do prato para a injeção da amostra seguinte e o movimento de recolha do amostrador do cromatógrafo. A cada movimento do amostrador, ocorre entrada de ar no cromatógrafo e, conseqüentemente, aumento dos níveis de oxigénio na amostra. Todas estas limitações foram identificadas e tidas em consideração na projeção da MDI *Evolution*.

Essencialmente, procurou-se criar um equipamento mais robusto e com um sistema de amostragem o mais fixo possível de forma a reduzir ao máximo os possíveis pontos de fuga e entradas de ar, tendo em vista a redução do tempo de análise e do limite de deteção. O projeto do protótipo da MDI *Evolution* em diferentes perspetivas é apresentado na Figura 2 (a), (b) e (c) os protótipos da MDI.

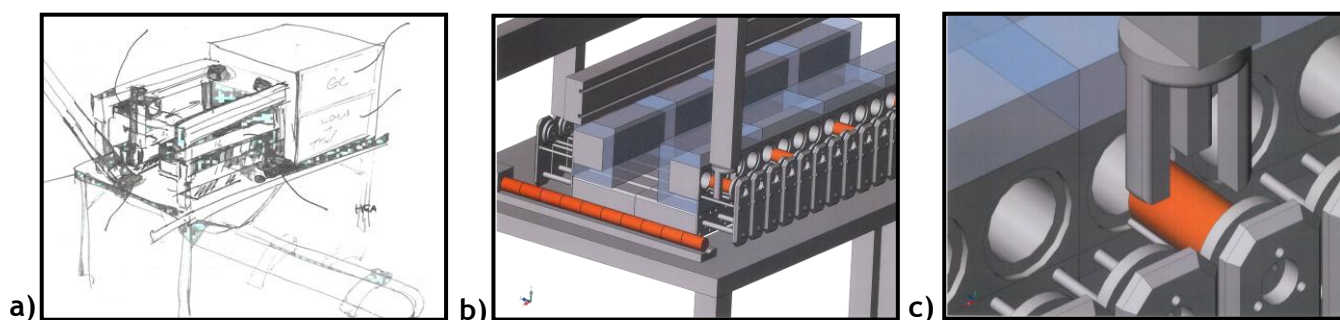


Figura 2 - Projeto do protótipo MDI *Evolution*: a) Esboço da MDI *Evolution*; b) protótipo do equipamento em 3D; c) Ampliação das câmaras de incubação

O objetivo era promover a alimentação móvel das câmaras mantendo as próprias câmaras fixas. Com um sistema de câmaras fixas, seria mais fácil implementar um sistema de fecho capaz de exercer maior pressão sobre a selagem da câmara, o que possibilitaria também optar por um sistema de amostragem fixa.

Descreve-se, de seguida, cada um dos módulos constituintes da *MDI Evolution*.

3.1.2.1 Módulo de alimentação do TCA

Projetou-se a *MDI Evolution* equipada com um *auto-sampler* que permite automaticamente colocar/retirar a rolha da câmara de incubação. Nesta fase inicial do projeto a alimentação é realizada manualmente. A Figura 3 (a) e (b) representa o protótipo do módulo de alimentação da *MDI Evolution*.

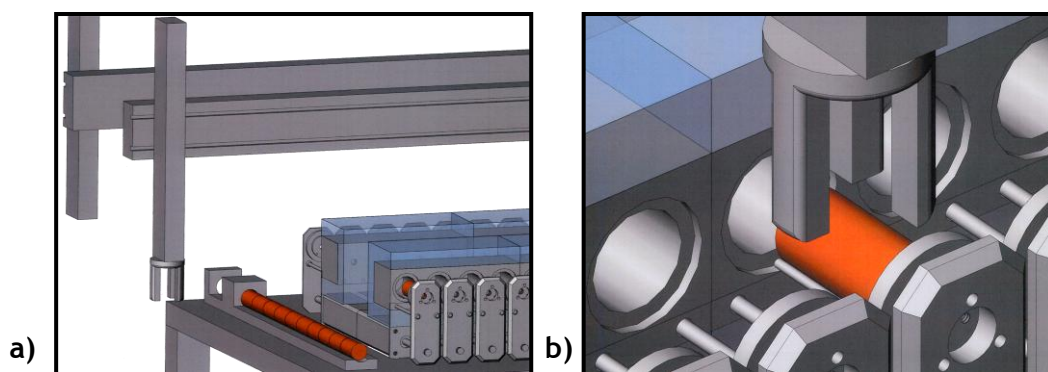


Figura 3 - Protótipo do Módulo de alimentação da *MDI Evolution*: a) Projeto em 3D do módulo de alimentação e incubação; b) Ampliação do auto-sampler e das câmaras de incubação

3.1.2.2 Módulo de incubação/extração do TCA

O módulo de incubação/extração é constituído por um conjunto de 4 câmaras de incubação com dimensão de 54x28 mm. Esta foi definida tendo em conta o tamanho máximo da rolha alvo 52x26 mm, de forma a permitir alguma dilatação da rolha e o escoamento dos gases. Estas câmaras estão colocadas na posição horizontal, porque é necessário que toda a rolha fique exposta ao gás de arraste, azoto, tornando assim mais eficaz a extração do TCA por toda a superfície da rolha. Este gás é introduzido no interior das câmaras de incubação através de um tubo metálico (Fig.4(a)). Estas câmaras são aquecidas eletricamente (Fig.4 (b)), existindo neste sistema um conjunto de termopares que permitem o controlo da temperatura através de um algoritmo de PID (controlador proporcional integral e derivativo). Neste módulo de incubação foi introduzido um sistema de controladores de fluxo, que

permite ajustar diferentes fluxos de azoto em cada uma das câmaras. Ao contrário da MDI que possui um sistema de alimentação de azoto a um fluxo constante, a introdução de controladores de fluxo na MDI *Evolution* permite variar automaticamente o fluxo de azoto no decorrer da incubação. Desta forma, é possível aumentar o fluxo de azoto na câmara de incubação de modo a evacuar rapidamente o oxigénio introduzido durante a alimentação da rolha, permitindo reduzir o tempo de limpeza da câmara. Após a remoção do oxigénio, torna-se possível o decréscimo gradual de fluxo de azoto durante a incubação da rolha, de maneira a concentrar a amostra com fluxos de azoto inferiores aos praticados na MDI. A conciliação destes dois fatores permite a redução do tempo de incubação de 10 para 5 minutos.

A passagem para um sistema de câmaras fixas permitiu construir um tipo de câmara mais robusta e diminuir consideravelmente a complexidade mecânica das câmaras na MDI.

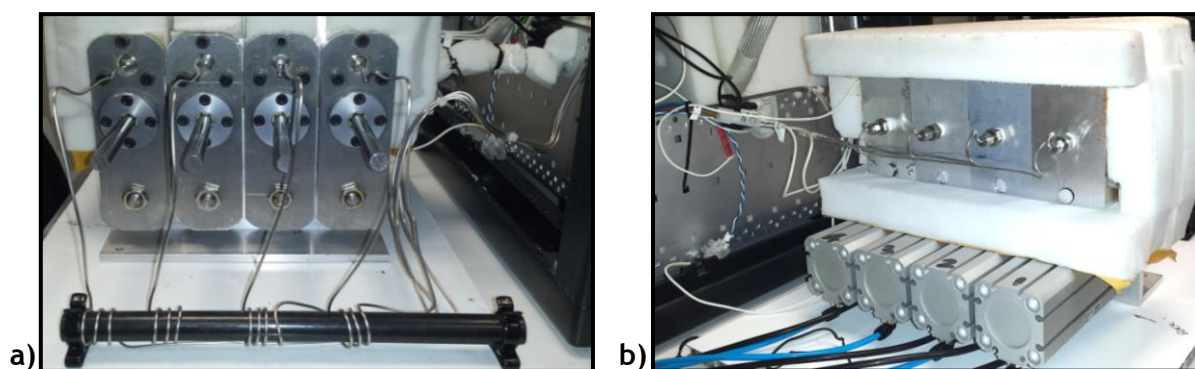


Figura 4 - Módulo de incubação/extração de TCA: a) tubo metálico que transporta o azoto para o interior da câmara; b) aquecimento elétrico das câmaras de incubação

Na Figura 4, está representado o conjunto das 4 câmaras que constituem o módulo de incubação/extração de TCA.

Esta melhoria na vedação/estanquicidade das câmaras é conseguida não só pelo fecho pneumático, mas também pela existência de um vedante de teflon (Fig.5 (a)). No interior do vedante existe uma mola que permite a adaptação do vedante a possíveis imperfeições nas paredes das câmaras, diminuindo a passagem de oxigénio do exterior para o interior da câmara de incubação. Em cada uma destas câmaras existe também um conjunto de molas na sua parte móvel (Fig.5 (b) e (c)) que permitem conter a contrapressão exercida pelo escoamento dos gases no interior da câmara.

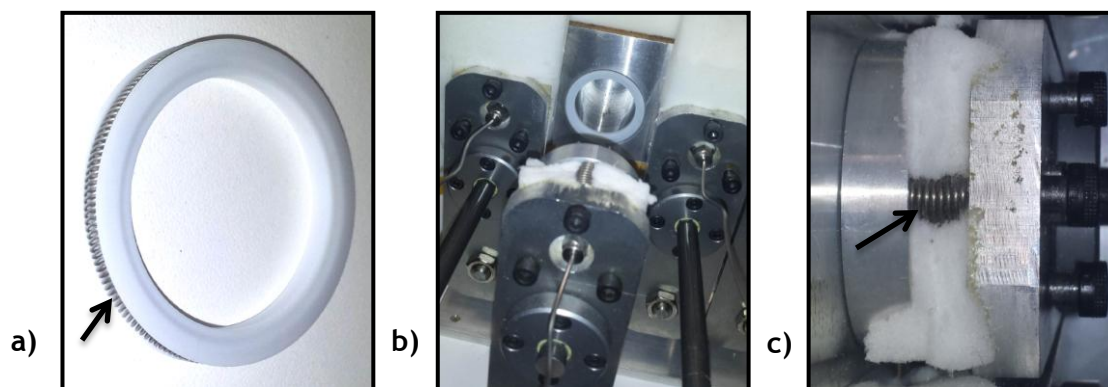


Figura 5 - Representação dos elementos constituintes das câmaras de incubação: a) vedante de teflon com mola no interior; b) localização do vedante na câmara; c) mola existente na parte móvel da câmara e revestimento de fibra de vidro

Este conjunto de alterações no sistema de selagem das câmaras contribuiu também de forma decisiva para a redução do tempo de incubação da rolha e para a redução da quantidade de oxigénio injetada ao cromatógrafo.

3.1.2.3 Módulo de deteção de TCA- GC-ECD

O cromatógrafo da MDI *Evolution* não sofreu alterações em relação ao da MDI. Trata-se de um cromatógrafo constituído por 8 colunas cromatográficas capaz de analisar amostras em fase gasosa com deteção por captura eletrónica de eletrões (ECD). O forno cromatográfico, apresentado na Figura 6, tem no seu interior uma válvula de diafragma (Fig.6 (a)) para injeção da amostra, o *loop* cromatográfico para concentração da amostra, duas válvulas de rotação (Fig.6 (b) e (c)), para seleção da coluna em análise e as colunas cromatográficas (Fig.6 (d)). Está equipado com uma ventoinha para promover a dispersão do calor e, isolado termicamente de forma a manter a temperatura interior independente da temperatura exterior.

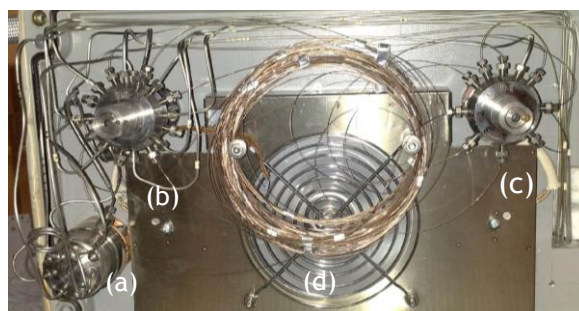


Figura 6 - Interior do forno cromatográfico: a) válvula de diafragma; b) e c) válvulas de rotação; d) colunas cromatográficas

3.1.2.4 Modo operatório da MDI Evolution

Na Figura 7 apresenta-se o diagrama de todo o processo analítico da MDI Evolution, desde a entrada das rolhas nas câmaras de incubação até à saída da amostra no detetor.

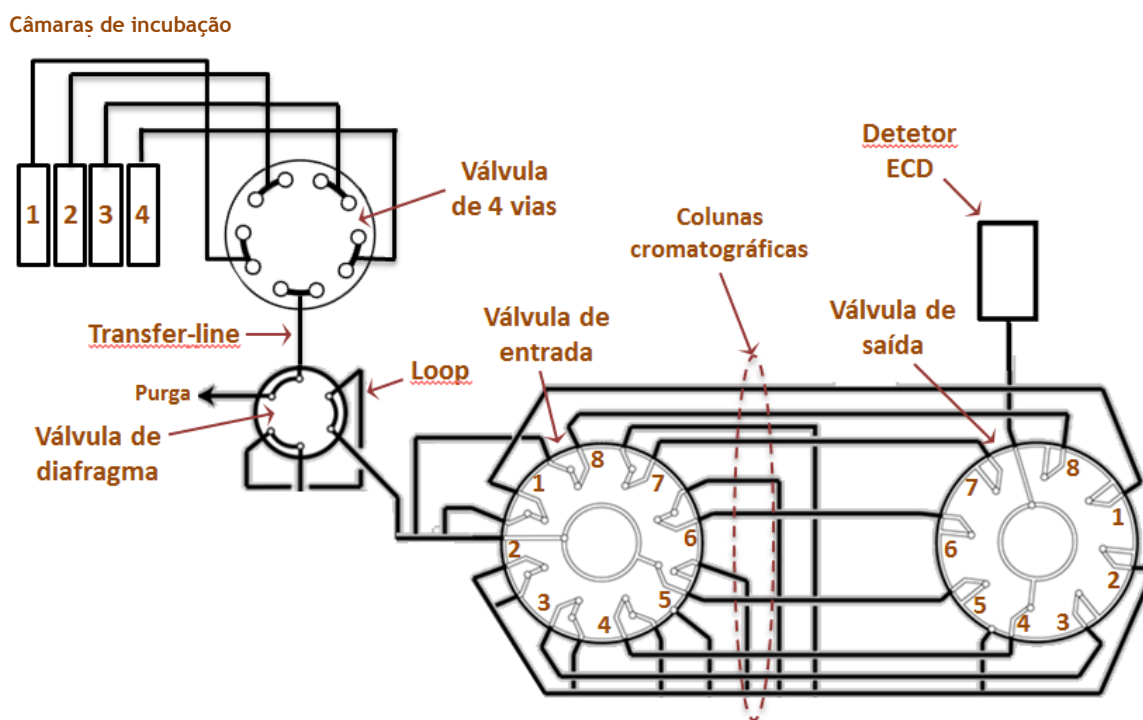


Figura 7 - Diagrama processual da MDI Evolution

As rolhas são incubadas durante 5 minutos nas câmaras de incubação a 110 °C. Durante os primeiros 2 minutos de incubação os controladores automáticos de fluxo debitam o caudal máximo de azoto (200 mL/min) para uma melhor evacuação do ar que entra após abertura da câmara. Gradualmente, é diminuído este fluxo de azoto, até um mínimo de 10 mL/min.

À medida que o TCA volatiliza da superfície da rolha, a passagem do azoto arrasta-o e dispersa-o por todo o volume da câmara. Um fluxo baixo de azoto concentra mais a amostra. Na MDI Evolution, o fluxo de incubação é três vezes inferior ao da MDI, apresentando um fator de diluição, teoricamente, três vezes menor. Findo este período de incubação a amostra flui por um canal aquecido até à válvula de 4 vias. As quatro câmaras de incubação estão ligadas a esta válvula. A sua função é selecionar de qual das câmaras será injetada a amostra no cromatógrafo, enquanto as restantes três estão a ser purgadas. Com a introdução desta válvula, eliminou-se um ponto de fuga em relação à MDI. A abertura e fecho do injetor na MDI provocava contaminação da amostra seguinte por entrada de ar, enquanto que na MDI Evolution o processo é contínuo, isto é, as amostras oriundas das 4 câmaras estão sempre em circuito fechado, não havendo entrada de ar na amostra após a incubação da rolha.

Da válvula de 4 vias, a amostra flui através do injetor do cromatógrafo até à válvula de diafragma. Esta válvula contempla 2 posições: *load* e *inject*. Quando em posição de *load*, a válvula pressuriza o diafragma e impede a amostra de passar. Assim, a amostra fica retida no *loop* cromatográfico, concentrando-a. Quando em posição de *inject*, a válvula relaxa o diafragma e permite a passagem da amostra para as colunas cromatográficas. A amostra passa então para a primeira válvula de rotação que seleciona em qual das colunas vai ser injetada, fluindo através da coluna até chegar ao detetor.

De forma a tornar o processo analítico contínuo, enquanto uma das colunas está a analisar, as restantes estão a ser limpas com a passagem de azoto. Como o GC dispõe de 8 colunas cromatográficas, garante-se um tempo de limpeza de cerca de 2 minutos até uma nova amostra chegar a determinada coluna.

O processo de otimização do método cromatográfico dos dois equipamentos é idêntico, isto é, tanto na MDI como na MDI *Evolution* são otimizados os seguintes parâmetros: temperatura das colunas, temperatura do injetor, temperatura do detetor, fluxo de azoto em cada coluna, fluxo de gás de arraste (*carrier* gás), fluxo de gás auxiliar (*make-up*), corrente elétrica do ECD, tempo de estabilização e a sensibilidade.

Todos os parâmetros referidos, foram otimizados de forma a obter-se um método fiável para cada um dos equipamentos. No caso do MDI foi definido um método com um tempo de análise de cada rolha de 20 segundos e um limite de deteção de 5 ng/L enquanto que na MDI *Evolution* pretende-se implementar um método que garanta um tempo de análise de 12 segundos e um limite mínimo de deteção de 2 ng/L. Para isso foi necessário encontrar uma temperatura ideal, definir com rigor os fluxos que passam pelas colunas tendo em conta o intervalo de tempo definido para a análise, fluxos de gás auxiliar (*make-up*) que permitem aumentar a intensidade do pico e fluxos de gás de arraste (*carrier* gás) que reduzam também a largura do pico.

Cada um dos pontos referidos anteriormente será de seguida descrito em detalhe.

3.1.2.5 Temperatura das colunas

A temperatura das colunas é o parâmetro mais influente do cromatógrafo. Com a variação deste parâmetro é possível controlar o tempo de retenção e a geometria dos picos do TCA. O tipo de coluna utilizado na MDI *Evolution* é uma coluna ZB-5HT, consistindo numa coluna com baixa polaridade, elevada estabilidade e ampla gama de limites de temperatura, até uma temperatura máxima de 430°C. A fase estacionária é constituída por uma resina de poliamida que possui uma degradação térmica mínima, permitindo assim um maior tempo de

vida útil da coluna. O resumo das características deste tipo de coluna encontra-se no Anexo 1.

Por se tratar de uma coluna com baixa polaridade e sendo o TCA um composto do tipo apolar, ocorre interação entre esta molécula e as moléculas da fase estacionária da coluna. Estas moléculas atraem e retém parcialmente TCA, fazendo com que este demore mais tempo a percorrer a coluna, promovendo assim uma melhor separação do TCA dos outros compostos. Temperaturas de coluna mais elevadas reduzem as interações entre a molécula de TCA e a fase estacionária das colunas, permitindo a sua passagem mais rápida pelas colunas e, conseqüentemente, a existência de menores tempos de retenção. Por outro lado, temperaturas de coluna mais elevadas favorecem a formação de picos mais altos e menos largos. É de todo o interesse garantir que este parâmetro seja o mais elevado possível sem comprometer a separação dos picos.

Testaram-se diferentes temperaturas das colunas num intervalo entre os 100 °C (temperatura mínima para o TCA aparecer num tempo de retenção inferior a 20 s) e os 110 °C (temperatura a que ocorre a fusão entre o pico de TCA e o de oxigénio). A Figura 8 representa os cromatogramas obtidos a diferentes valores de temperatura.

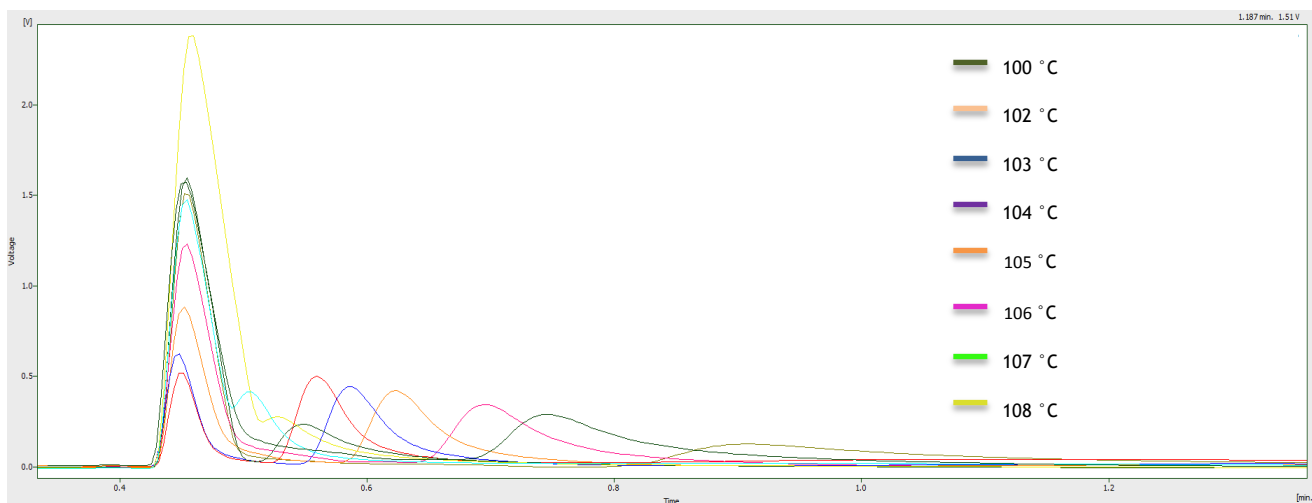


Figura 8 - Representação dos cromatogramas obtidos para os diferentes valores de temperaturas das colunas

Definiu-se 106 °C como sendo a temperatura que apresentava o melhor compromisso entre a separação dos picos de oxigénio e de TCA e uma área do pico de TCA considerável.

3.1.2.6 Temperatura do injetor

A temperatura do injetor não tem influência na sensibilidade ou no tempo de retenção do TCA. É aconselhável, porém, que a temperatura do injetor seja superior à temperatura das câmaras de incubação para não ocorrer condensação da amostra no seu trajeto pelo injetor e consequente efeito de acumulação de TCA no sistema. A temperatura definida para o injetor foi de 115°C.

3.1.2.7 Temperatura do detetor

A temperatura do detetor (ECD) deve ser sempre superior à temperatura do injetor e das colunas cromatográficas, de modo que à entrada do detetor não ocorra condensação da amostra. Para os tempos de retenção pretendidos, as temperaturas do detetor válidas variam entre os 200 e os 220 °C. A temperatura do detetor definida para este método foi de 200 °C uma vez que, para temperaturas superiores, favorece-se o aparecimento de ruído no sinal do detetor, consequência do aumento da corrente elétrica com a temperatura.

3.1.2.8 Fluxos de gás de arraste nas colunas

Tal como a temperatura, o controlo do fluxo que passa em cada coluna é também um parâmetro muito importante. O aumento do fluxo de gás de arraste nas colunas permite uma passagem mais rápida da amostra, deslocando assim o pico de TCA para menores tempos de retenção. É de referir que o fluxo das colunas varia entre 0 e 4000 em unidades do *software*, correspondendo este intervalo a 0 e 20 mL/min de fluxo de azoto. O limite superior deste intervalo de fluxo não deve ser ultrapassado de forma a não criar danos nas colunas cromatográficas. A afinação deste parâmetro permite criar uma maior homogeneidade entre as colunas pois a alteração da velocidade de deslocação da amostra no interior das colunas, compensa possíveis diferenças físicas existentes entre as 8 colunas cromatográficas (essencialmente os desvios no comprimento das colunas).

Na Tabela 1 estão representados os fluxos correspondentes a cada uma das colunas cromatográficas da MDI Evolution.

Tabela 1¹ - Valores dos fluxos das colunas cromatográficas da MDI Evolution

Coluna	Fluxo na MDI Evolution (unid.software)
Coluna 1	2340
Coluna 2	2300
Coluna 3	2375
Coluna 4	2380
Coluna 5	2450
Coluna 6	2400
Coluna 7	2355
Coluna 8	2400

3.1.2.9 Fluxo de gás auxiliar - *Make-up*

O fluxo de gás auxiliar (*make-up*) permite otimizar a geometria do pico, isto é, torna o pico mais estreito e mais alto, apresentando o mesmo valor de área. O fluxo de gás auxiliar (*make-up*) permite afinar a resolução entre os picos de oxigénio e de TCA. A otimização deste parâmetro é fulcral no aumento da sensibilidade do detetor. Testaram-se diferentes fluxos de *make-up* entre 750 e 810 em intervalos de 5, mantendo todos os parâmetros anteriormente descritos constantes. O valor que garantiu um melhor compromisso entre resolução e área dos picos foi de 788.

Os valores de fluxos obtidos foram representados graficamente, *make-up* versus fluxo e foi definida uma zona linear, onde o escoamento do azoto é laminar. Os valores de fluxo *make-up* escolhidos encontram-se naquela gama de valores. Acima dessa gama o fluxo é turbulento e dispersa o TCA impedindo a sua chegada ao detetor.

Na Figura 9, está representado o conjunto de cromatogramas obtidos na experiência descrita anteriormente. No Anexo 2 encontra-se o gráfico 1 de regressão linear que permite identificar a gama de valores de fluxo de *make-up* que deve ser utilizada.

¹ As unidades de *software* correspondem a um intervalo de fluxo de azoto entre 0 e 20 mL/min.

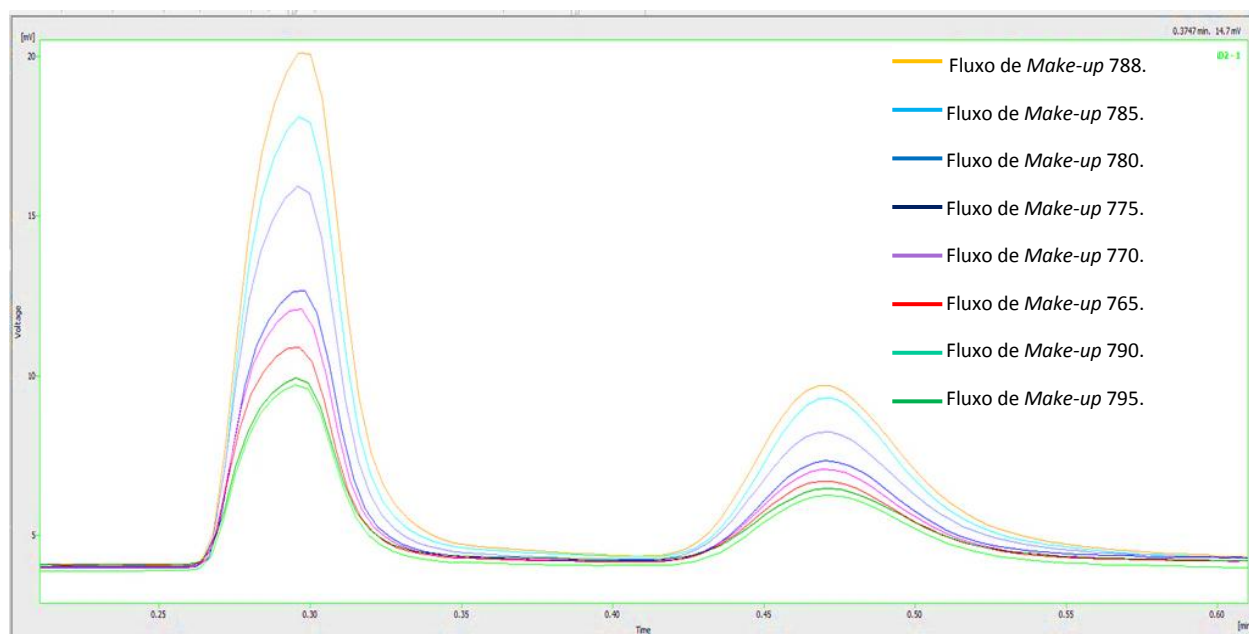


Figura 9- Cromatogramas da experiência à temperatura de 106 °C para diferentes fluxos de gás auxiliar (make-up)

3.1.2.10 Corrente elétrica do ECD

A escolha do valor mais apropriado da intensidade da corrente elétrica do ECD, depende da área que o pico apresenta para um determinado valor de temperatura e de fluxo de gás auxiliar (*make-up*).

No presente projeto foram realizados testes mantendo a temperatura e o fluxo de gás auxiliar (*make-up*) constantes, variando apenas a corrente de 5 em 5 mV. Como resultado desses testes obtiveram-se diferentes áreas correspondentes a cada uma dessas variações, escolhendo-se assim o valor de corrente que resultava numa melhor área do pico de TCA. No caso da *MDI Evolution* a corrente de ECD utilizada é de 40 mV, enquanto que na *MDI* é de 10 mV.

Na Figura 10 encontra-se um cromatograma que exemplifica os testes para diferentes valores de corrente elétrica do ECD que foram realizados neste projeto na *MDI Evolution*.

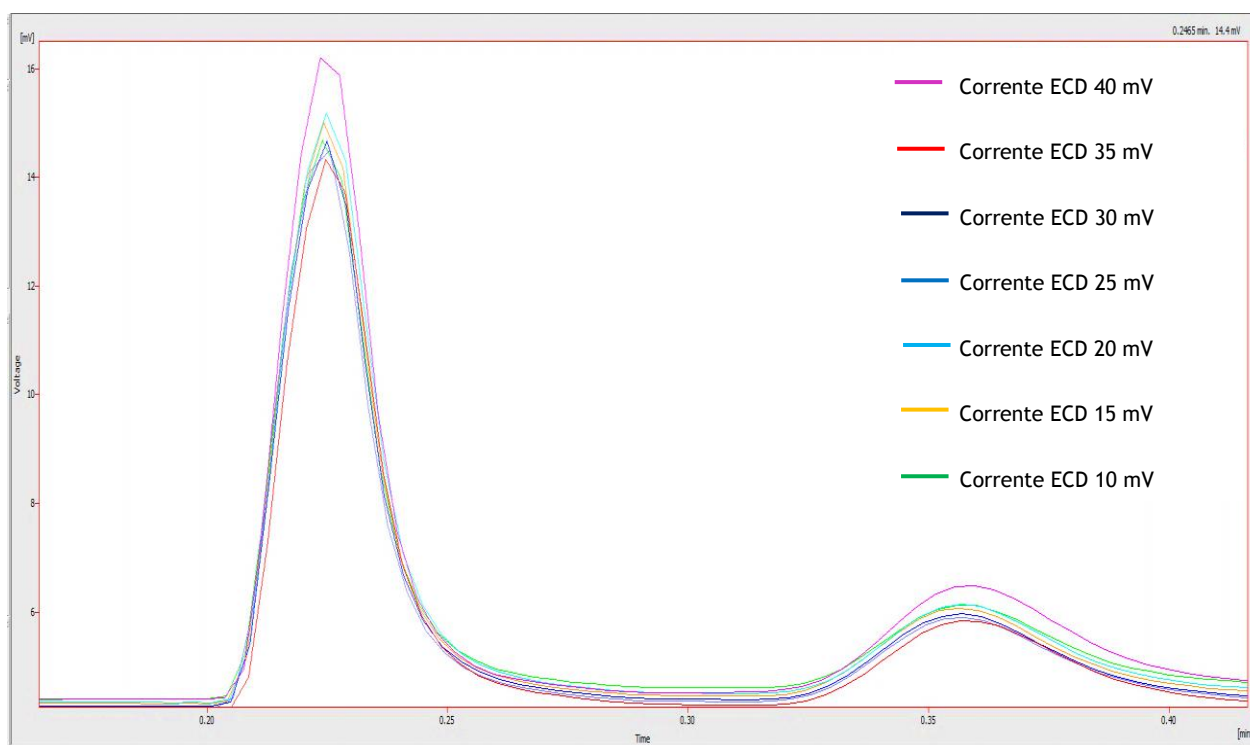


Figura 10- Representação do conjunto de cromatogramas para diferentes valores de corrente elétrica no ECD

3.1.2.11 Sensibilidade

A afinação da sensibilidade do equipamento permite que o ruído inerente à análise não seja integrado. Para isso é necessário escolher um valor ótimo de modo a que tanto para altas como baixas concentrações o ruído não influencie a análise.

Para a *MDI Evolution* o valor de sensibilidade utilizado é de 0,15 e para a *MDI* é de 1,0.

3.1.2.12 Tempo de limpeza das câmaras de incubação

Para determinar este tempo de limpeza, seguiu-se o seguinte procedimento: colocou-se uma rolha com concentração elevada de TCA (300 ng/L), mantendo o fluxo de azoto a 10 mL/min deixando incubar essa rolha durante 5 minutos. Após este tempo, o fluxo foi aumentado para 200 mL/min e a rolha retirada da câmara de incubação, fechou-se a câmara e tornou-se a abri-la passados 10 segundos. Realizou-se a injeção da amostra e verificou-se que a mesma se encontrava limpa.

Todos os parâmetros descritos anteriormente estão relacionados entre si; a relação entre as diferentes temperaturas e fluxos permite uma adequada otimização do equipamento tanto ao nível do tempo de análise como do limite de concentração que se pretende detetar.

3.2 Método obtido para tempos de análise de 12 segundos

Após a otimização de todos os parâmetros referenciados anteriormente, foi obtido o método cromatográfico representado na Figura 11, que permite detetar concentrações de TCA na ordem de 2 ng/L com um tempo de análise de 12 segundos.

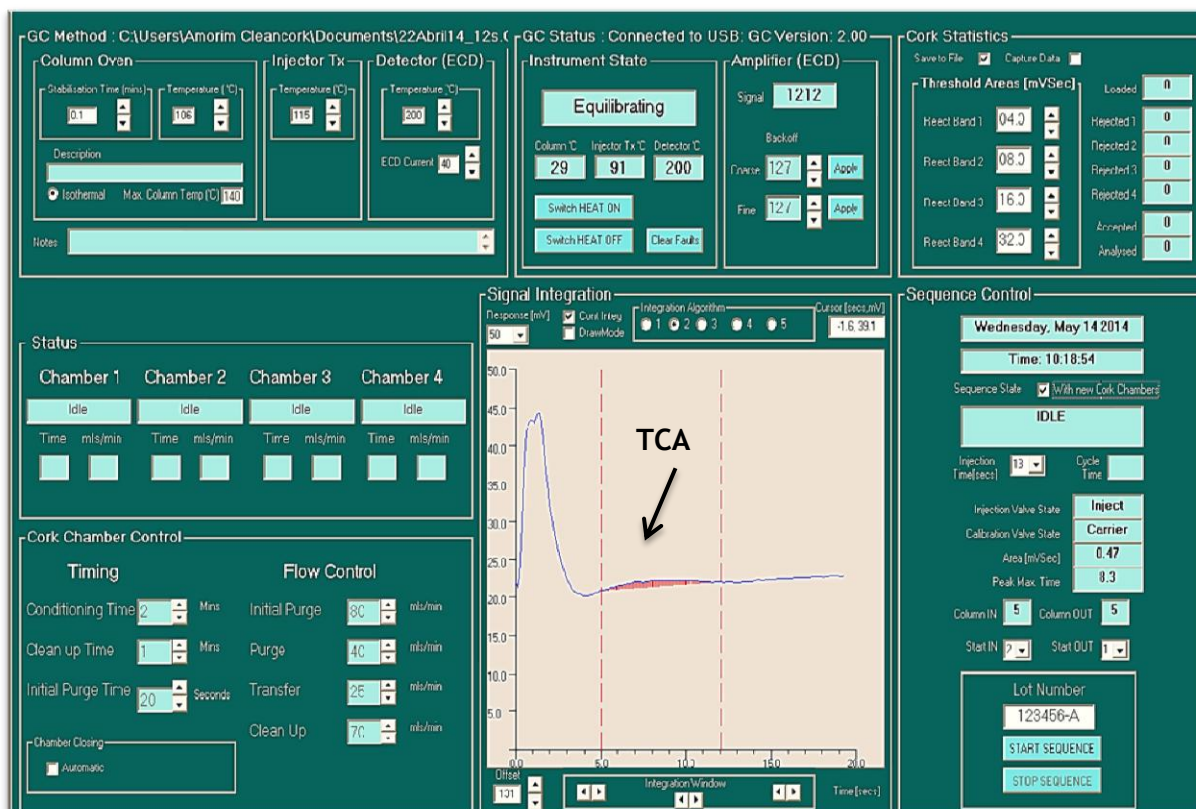


Figura 11 - Representação do cromatograma obtido no software AmorimCleanCork™ para um tempo de análise de 12 segundos

Como é possível observar no cromatograma (Fig.11) o pico correspondente ao TCA é o pico que se encontra integrado dentro do intervalo de tempo (5 -12 s). Os picos antecedentes ao pico de TCA correspondem ao pico do movimento de rotação da válvula e ao pico do oxigénio. Estes dois podem aparecer juntos ou separados, consoante as temperaturas e fluxos utilizados. Quando surgem juntos num só pico significa que o tempo de retenção do TCA é menor, isto é, a amostra flui mais rapidamente permitindo uma análise mais rápida. Quando os mesmos aparecem separados, significa que existe uma elevada quantidade de ar no interior das câmaras de incubação, provocando o afastamento do pico de TCA para tempos de retenção superiores.

Na Figura 11, é possível identificar as temperaturas definidas para as colunas, injetor e detetor nomeadamente 106 °C, 115 °C, 200 °C bem como o tempo de estabilização de 0,1 minutos.

Para se proceder à otimização dos outros parâmetros já referidos, tais como os fluxos das colunas, gás auxiliar (*make-up*), gás de arraste (*carrier gás*) e a sensibilidade, o *software AmorimCleanCork™* possui uma interface, “*Tuning and Direct Control*” que permite ajustar manualmente os valores desses parâmetros, para os tempos de análise pretendidos.

Esta interface permite abrir e fechar as câmaras de incubação, seleccionar qual a amostra que se pretende analisar, definir qual o fluxo de cada controlo de fluxo de massa (*mass flow control*), fluxo do gás de arraste (*carrier gás*), fluxo de gás auxiliar (*make-up*) e qual a sequência nas colunas de entrada e de saída da amostra.

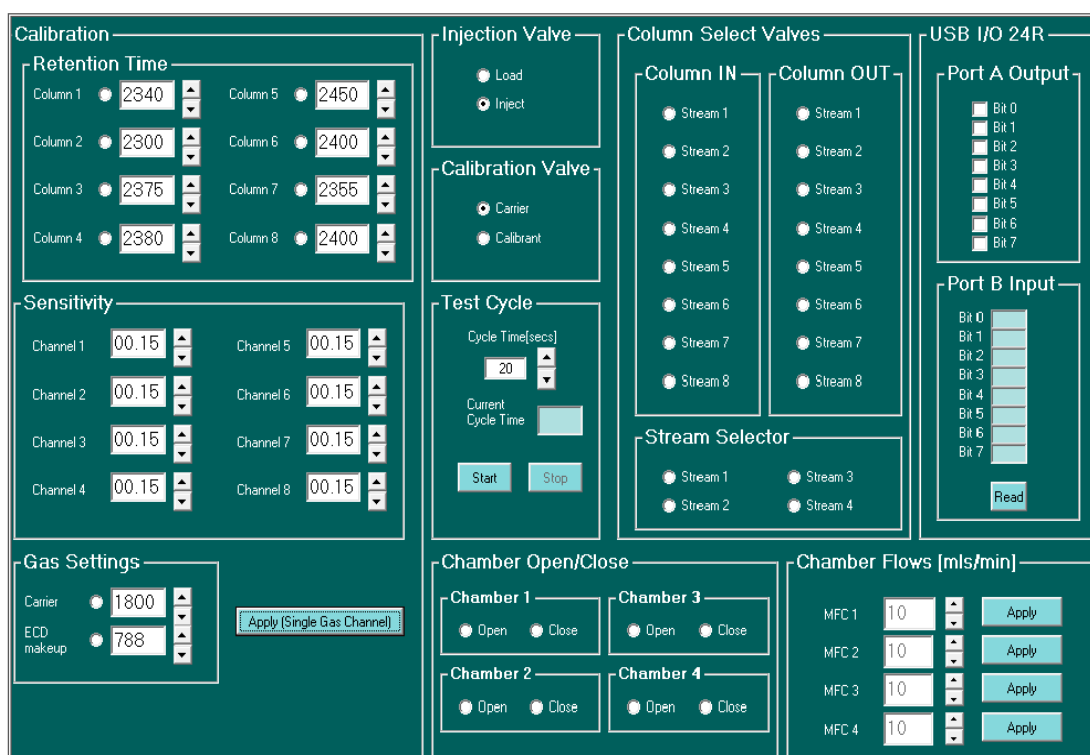


Figura 12 - Valores dos parâmetros definidos para método de deteção com um tempo de análise de 12 segundos

A operação desta interface pode ser realizada de forma manual ou automática. Em modo de operação manual, a interface permite escolher qual a posição da válvula (*load* ou *inject*) e a coluna onde a amostra será injetada. Neste modo de funcionamento, a obtenção do cromatograma da amostra e do respetivo pico de TCA é possível através da seleção da mesma coluna cromatográfica para a entrada e saída da amostra. Em modo automático, é analisada uma amostra de forma distinta em cada uma das colunas. O cromatograma obtido através da interface, corresponde à amostra que atingiu o detetor. Simultaneamente outra amostra está a ser injetada noutra coluna.

Para permitir a observação das injeções manuais é usado um *software* de apoio o “Clarity”, onde são representados os picos da amostra em cada uma das colunas (em cada cromatograma temos representados 8 picos correspondentes às 8 colunas cromatográficas). Este *software* está continuamente ligado em parceria com o *AmorimCleanCork™* e regista ao longo do tempo os picos obtidos da amostra nas diferentes colunas, estando em modo manual ou em modo automático. Aqui é possível identificar com maior precisão as variações de fluxo das colunas para a mesma amostra, permitindo o ajuste do seu fluxo de modo a que todos os picos obtidos de uma determinada amostra sejam similares tanto ao nível da largura do pico, da área e do tempo de retenção. A Figura 13 exemplifica os cromatogramas obtidos em 2 colunas para a mesma amostra.

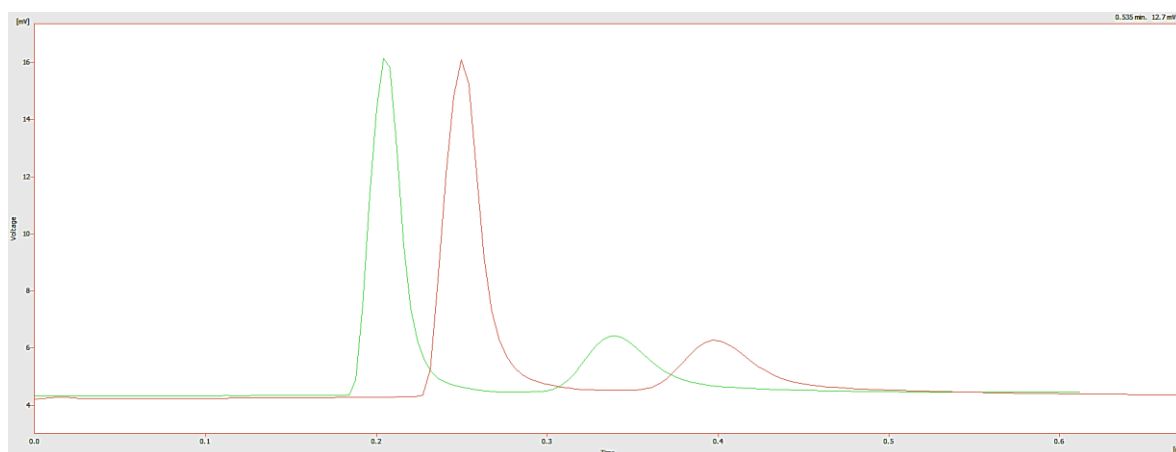


Figura 13 - Cromatogramas obtidos em 2 colunas para a mesma amostra

Na Tabela 2 apresentam-se os valores de cada um dos parâmetros nas unidades do *software* (correspondentes ao intervalo entre 0 e 20 mL/min de fluxo de azoto), para o método com 12 segundos de tempo de análise.

Na Tabela 3 apresentam-se os parâmetros dos respetivos métodos cromatográficos para 20 segundos (MDI) e 12 segundos (MDI *Evolution*) e as principais diferenças entre as características físicas dos dois equipamentos.

Tabela 2 - Valores dos parâmetros para método com tempo de análise de 12 segundos na MDI Evolution

Parâmetros	Valor de fluxo ²
Gás de arraste (<i>Carrier gás</i>)	1800
Gás auxiliar (<i>Make-up</i>)	788
Coluna 1	2340
Coluna 2	2300
Coluna 3	2375
Coluna 4	2380
Coluna 5	2450
Coluna 6	2400
Coluna 7	2355
Coluna 8	2400
Sensibilidade	0,15

Tabela 3 - Comparação de parâmetros da MDI e MDI Evolution

	MDI	MDI Evolution
Câmaras de incubação	Posição vertical; Fecho/abertura realizado através de molas	Posição horizontal; Fecho/abertura através de um sistema pneumático
Sistema de amostragem	Móvel	Fixo
Temperaturas (°C)		
Injetor	130	115
Colunas	108	106
Detetor	200	200
Corrente do ECD (mV)	10	40
Fluxo de gás arraste ²	4000	1800
Fluxo de gás auxiliar	1500	788
Fluxo das colunas cromatográficas		
1	4000	2340
2	3500	2300
3	2900	2375
4	4000	2380
5	3600	2450
6	3600	2400
7	3850	2355
8	4000	2400
Sensibilidade	0,15	1,0

² As unidades de *software* correspondem a um intervalo entre 0 e 20 mL/min de fluxo de azoto.

4 Validação/Resultados obtidos

A validação do equipamento MDI *Evolution* foi dividida em duas fases; na primeira fase foram analisadas rolhas de cortiça natural com concentrações de TCA previamente conhecidas, quantificadas por SPME-GC-ECD, método de rotina usado no departamento de I&D da Amorim & Irmãos. Na segunda fase foram analisadas diretamente na MDI *Evolution* rolhas de cortiça natural retiradas de um lote com elevada incidência em TCA. Estas rolhas foram separadas pela máquina em rolhas positivas (rolhas com concentração de TCA igual ou superior a 2 ng/L), negativas (rolhas com concentração de TCA inferior a 2 ng/L) e falsos positivos (picos secundários integrados no software como TCA). Posteriormente, analisaram-se estas rolhas por SPME-GC-ECD para comparação dos resultados.

Na primeira fase desta validação foram testadas cerca de 100 rolhas com concentração previamente conhecida. As rolhas analisadas foram divididas em diferentes valores de concentração de TCA. Cada rolha foi analisada nas 8 colunas tendo-se obtido as áreas dos picos de TCA, em mV/s. Foi calculado o valor médio das áreas das colunas e foi definido o limite mínimo de deteção de 0,1 mV/s (Anexo 3). As rolhas analisadas com áreas iguais ou superiores a este valor são consideradas positivas pelo equipamento. Convém referir que neste método foi definido o valor mínimo de deteção para 0,1 mV/s pois para valores inferiores o ruído associado ao sinal do detetor sobrepunha-se ao pico de TCA.

Tabela 4 - Comparação entre os resultados obtidos para rolhas com concentração conhecida (quantificadas pelo método de SPME-GC-ECD) e o método de deteção da MDI Evolution

Concentração	Resultados	
TCA > 20 ng/L	Nº rolhas com TCA > 20 ng/L	22
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	21
	Eficácia MDI Evo (%)	95,5%
5 <TCA ≤ 20 ng/L	Nº rolhas com 5 <TCA ≤ 20 ng/L	26
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	25
	Eficácia MDI Evo (%)	96,2%
2 <TCA ≤ 5 ng/L	Nº rolhas com 2 <TCA ≤ 5 ng/L	22
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	21
	Eficácia MDI Evo (%)	95,5%
0,5 <TCA ≤ 2 ng/L	Nº rolhas com 0,5 <TCA ≤ 2 ng/L	27
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	23
	Eficácia MDI Evo (%)	85,2%

Na Tabela 3, apresentam-se os valores de eficácia da MDI *Evolution* relativamente às 100 rolhas analisadas para as diferentes concentrações de TCA definidas pelo método de SPME. O objetivo deste estudo é determinar a partir de que valor de concentração de TCA a deteção é total.

Para rolhas com concentração de TCA entre 2 e 5 ng/L a eficácia de deteção foi de 95,5%. Para valores de concentração acima desse intervalo a eficácia de deteção atinge os 96,2%. Abaixo desse valor de concentração há uma redução da eficácia de deteção para 85,2%.

Na segunda fase desta validação, foram analisadas na MDI *Evolution* 1000 rolhas de cortiça natural de um lote com elevada incidência em TCA. Estas rolhas foram classificadas em duas categorias: rolhas positivas e negativas. Destas 1000 rolhas analisadas, 724 foram posteriormente maceradas e analisadas pelo método de rotina (SPME-GC-ECD) para permitir a comparação de resultados entre os 2 métodos e o cálculo da eficácia deste processo. Destas 724 rolhas analisadas por SPME-GC-ECD, resultaram 337 positivas, sendo as restantes 387 rolhas negativas.

Na Tabela 4, encontra-se a distribuição das rolhas positivas por diferentes valores de concentração de TCA.

Tabela 5 - Distribuição das rolhas analisadas por SPME-GC-ECD por diferentes valores de concentração

TCA [ng/L]	SPME-GC-ECD
TCA \geq 2	193
2 \leq TCA <5	50
0,5 \leq TCA <2	94
Não detetadas	387

Tal como na primeira fase desta validação, as rolhas analisadas foram divididas por diferentes valores de concentração de TCA. Para cada uma deste foi calculado o número de rolhas detetadas pelo método de SPME-GC-ECD e o número de rolhas detetadas na MDI *Evolution*. A divisão entre esses dois valores permite obter a eficácia do método da MDI *Evolution* em cada um desses valores de concentração de TCA. No Anexo 4, encontram-se os valores das rolhas quantificadas por SPME-GC-ECD e o resultado após análise na MDI *Evolution*.

A MDI *Evolution* classificou como rolhas positivas 371 e as restantes 353 rolhas como negativas. As comparações dos resultados obtidos entre os dois métodos e a eficácia da MDI *Evolution* por gamas de concentração apresentam-se na Tabela 5.

Tabela 6 - Comparação entre os resultados obtidos por SPME-GC-ECD e MDI Evolution

Concentração de TCA [ng/L]	Resultados Obtidos	
TCA ≥ 5 ng/L	Nº rolhas com TCA ≥ 5 ng/L	141
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	122
	Eficácia MDI Evo (%)	87%
TCA ≥ 2 ng/L	Nº rolhas com TCA ≥ 2 ng/L	193
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	152
	Eficácia MDI Evo (%)	79%
2 ng/L ≤ TCA < 5 ng/L	Nº rolhas com TCA entre 2 e 5 ng/L	50
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	30
	Eficácia MDI Evo (%)	60%
0,5 ng/L ≤ TCA < 2 ng/L	Nº rolhas com TCA entre 0,5 e 2 ng/L	94
	Nº rolhas detetadas pela MDI Evo	24
	Eficácia MDI Evo (%)	26%

Na Tabela 5, apresentam-se os valores de eficácia de deteção de TCA da *MDI Evolution* para as 724 rolhas analisadas. Para rolhas com concentração de TCA superior a 5 ng/L, o equipamento detetou 122 das 141 rolhas analisadas, correspondendo a uma eficácia de deteção de 87%. Nesta gama de concentração não foi possível a deteção de cerca de 19 rolhas, algumas delas com concentração considerável. Para rolhas com concentração de TCA superior a 2 ng/L detetaram-se 152 das 193 analisadas, correspondendo a uma eficácia de deteção de 79%. Para concentrações de TCA compreendidas entre 2 e 5 ng/L, foram detetadas 30 das 50 analisadas, apresentando uma eficácia de deteção de 61%. A análise de rolhas abaixo do limite de deteção do equipamento permitiu a deteção de 26% das rolhas analisadas.

Em comparação com os resultados obtidos com a primeira geração deste equipamento, a diminuição do tempo de análise provocou uma diminuição na sensibilidade do GC. A redução do tempo de análise de 20 (MDI) para 12 segundos (*MDI Evolution*) obriga a uma saída do pico de TCA em menores tempos de retenção, afetando assim a separação entre compostos. Este facto diminui a resolução entre os picos de oxigénio e de TCA, fator que pode ser o principal responsável pela perda de sensibilidade do GC.

Foram ainda rejeitadas pela MDI *Evolution* 131 rolhas resultantes da integração de picos secundários, que são designados de falsos positivos. A análise destas rolhas por SPME-GC-ECD revelou que 41 continham efetivamente TCA, ou seja, aproximadamente 31,2% das rolhas rejeitadas pela MDI *Evolution* pela integração de picos secundários contêm TCA.

Em relação à integração dos picos secundários (falsos positivos), a redução do tempo de análise teve um efeito negativo na qualidade analítica do sistema. No GC-ECD da MDI, a integração de picos secundários resultava na rejeição de rolhas negativas para o TCA, constituindo resultados falsos positivos. Estes picos secundários apresentam uma geometria característica que os distingue dos picos de TCA pois apresentam uma concavidade negativa abaixo da linha de base do detetor. A redução do tempo de análise no novo GC provoca a contração destes picos para menores tempos de retenção e a consequente alteração da sua geometria. Assim, picos que aos “olhos do utilizador” parecem secundários são afinal picos de TCA, levando ao aumento de falsos positivos no GC.

Os resultados obtidos nesta segunda fase da validação permitem concluir que o equipamento é capaz de detetar concentrações de TCA iguais ou superiores a 2 ng/L em 12 segundos em 79% dos casos. Para rolhas com concentração de TCA igual ou superior a 5 ng/L a eficácia de deteção é de cerca de 87%.

Estes resultados são muito promissores a nível cromatográfico, levando a que após esta validação foi proposto o *scale-up* da MDI *Evolution*.

5 Conclusões

Como anteriormente referido, o objetivo principal deste projeto foi a otimização da nova máquina de deteção individual de TCA em rolhas de cortiça natural, *MDI Evolution*.

Na primeira fase do projeto, otimizaram-se vários parâmetros cromatográficos tais como: temperatura das colunas, temperatura do detetor, temperatura do injetor, fluxos das colunas, gás de arraste (*carrier* gás) e de gás auxiliar (*make-up*). Estes parâmetros foram otimizados de forma a reduzir o tempo de análise e o limite mínimo de deteção do TCA. Esta fase foi concluída com sucesso, tendo-se obtido um método cromatográfico que permite um tempo de análise de 12 segundos e um limite mínimo de deteção de 2 ng/L.

A segunda fase deste projeto, teve como objetivo a validação do método cromatográfico obtido para a *MDI Evolution*. Inicialmente esta validação consistiu na análise de 100 rolhas com concentração conhecida de TCA, tendo-se obtido com este método uma eficácia de deteção de 95,5% para rolhas com concentração superior a 2 ng/L. Na segunda fase desta validação, foram analisadas 1000 rolhas de um lote com elevada incidência em TCA, onde 724 rolhas foram posteriormente maceradas e analisadas pelo método de rotina (SPME-GC-ECD).

Dos resultados obtidos da comparação entre os dois métodos para as 724 rolhas de cortiça natural, obteve-se uma eficácia de deteção de 79% para rolhas com concentração de TCA igual ou superior a 2 ng/L.

Os avanços a nível cromatográfico conseguidos no decorrer desta dissertação e os promissores resultados obtidos na deteção de TCA a 12 segundos levaram a que a *MDI Evolution* prosseguisse para um processo de *scale-up*.

6 Melhorias e trabalhos futuros

O protótipo da MDI *Evolution* ficará concluído colocando o *auto sampler* que vai permitir que o módulo de alimentação se torne automático. Por outro lado, haverá também aumento do número de câmaras de incubação, de 4 para 8. A par desta, estão a ser testados e desenvolvidos novos *upgrades* para a MDI *Evolution*, com o objetivo de melhorar o seu desempenho.

Os *upgrades* que estão a ser desenvolvidos estão relacionados com a redução do período de incubação das rolhas de cortiça natural no interior das câmaras, e com a redução do limite mínimo de deteção do cromatógrafo.

De maneira a reduzir o período de incubação da rolha dentro das câmaras, o equipamento estará dotado de um sistema de pré-incubação da rolha. A ideia será adaptar um sistema capaz de pré-aquecer 12 rolhas de cortiça natural até 80 °C, com o objetivo de reduzir o tempo necessário à extração do TCA quando a rolha entrar na câmara de incubação.

Em relação à redução do limite mínimo de deteção do cromatógrafo, está a ser desenvolvido um sistema de concentração de TCA que permitirá a redução do limite de deteção de 2 para 0,5 ng/L. Este *upgrade* contemplará a introdução de uma pré-coluna no interior do GC que irá comportar 2 temperaturas de operação (8 e 200 °C). A baixa temperatura permite a retenção/concentração do TCA na pré-coluna que será libertado após o aquecimento, numa amostra que pode atingir concentrações de TCA 10 vezes mais elevadas.

7.Referências

- Amorim. (2013). *Relatório e Contas 2013*. Obtido de http://www.amorim.com/xms/files/Investidores/5_Relatorio_e_Contas/PT_R_C_Corticeira_Amorim2013.pdf.
- Amorim. (s.d.). <http://www.amorim.com/corticeira-amorim/apresentacao/>. Obtido em Abril de 2014
- AmorimCork. (2014). Obtido em 23 de Março de 2014, de <http://www.amorimcork.com/pt/products/catalogue/natural-cork-stopper/>
- AmorimCork. (2014). *A Cortiça*. Obtido em 12 de Abril de 2014, de <http://www.amorim.com/a-cortica/caracteristicas/>.
- APCOR. (2007). *A new technology for volatiles reduction on natural cork stoppers*. Obtido em Março de 2014, de http://apcor.pt/userfiles/File/INNOCORK_E_Oct_07.pdf.
- APCOR. (2011). O combate ao 2,4,6-tricloroanisol (TCA), Manual técnico de rolhas, 19-26 Obtido em 23 de Março de 2014, de http://apcor.pt/userfiles/File/Publicacoes/Manual_Rolhas_PT.pdf
- APCOR. (2013). *Anuário 2013*. Obtido em 23 de Março de 2014, de <http://apcor.pt/artigo/242.htm>.
- APCOR. (2014). *Do sobreiro à cortiça- um sistema sustentável*. Obtido em 12 de Abril de 2014, de <http://apcor.pt/artigo/382.htm>.
- Cabral et al. (2012). *The case of cork. Em Distilled Spirits - Science and Sustainability. Proceedings of the Worldwide Distilled Spirits Conference; Walker, G., Fotheringham, R., Goodall, I., Murray, D. (editors) British Library Cataloguing in Publication Data/Nottingham Univ.*
- Cefage-UE. (2012/12). *Message in a bottle:Process innovations in the cork stopper fightback*.
- CELIEGE. (2011). *Código Internacional das Práticas Rolheiras versão 6.0, CELIEGE European Cork Federation (online)*. Obtido em Abril de 2014, de <http://www.apcor.pt/userfiles/File/CIPR/CIPR2011PT.pdf>.
- Chatonnet,P. (2004). *Etude de la réduction de la teneur en 2,4,6-Trichloroanisole présent dans le liège por un système d'entraînement continu à la vapeur,Revue Française d' Oenologie,209,22-26*.

- Coque et al. (2006). *Wine Contamination by Haloanisoles: Towards the development of biotechnological strategies to remove chloroanisoles from cork stoppers*, INBIOTEC, APCOR, 36-40.
- Cork Supply, US 79025882. (2007). *Homepage*: <http://www.corksupply.com/commitment-quality/innocork.aspx>.
- Costa. (2012). *Otimização de equipamento industrial para a quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- CQC. (2014). <http://www.corkqc.com/S-mat/SPMEstats-q413.pdf>. Obtido em Abril de 2014
- Fortes, M. (2004). *A Cortiça*, Instituto Superior Técnico, 12-17, Portugal.
- Hervé et al. (2004). *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork*, ETS Laboratories.
- Liège, C. C. (s.d.). *Código Internacional das Práticas Rolheiras*. Versão 5.2006.
- M. Riu, M. M. (Novembro de 2006). *Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines*.
- Pereira, C. et al. (2007). *Reduction of the 2,4,6-trichloroanisole content in cork stoppers using gamma radiation*.
- Pereira, P. (2012). *Novos métodos rápidos para a quantificação de 2,4,6 - Tricloroanisol*, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal.
- Sefton et al. (2007). *Origin and fate of 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) in cork bark and wine corks*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13, 106-116.
- Sefton, et al. (2005). *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural corks closures to wine- review*. *Australian Journal of Grape and Wine research* 11, 226-240.

Anexo 1 **Especificações das colunas cromatográficas**

Tipo de coluna: colunas *phenomenex* ZB-5HT Inferno

Gama de Temperaturas: -60 a 400/430 °C

Revestimento: Resina de poliamida

Condições operatórias favoráveis: baixa polaridade; elevada estabilidade; gama alargada de temperaturas e baixo sangramento.

Material: colunas não metálicas estáveis até 430 °C.

Anexo 2 Testes de fluxo de gás auxiliar (Make-up)

Na Figura 14, representa-se a regressão linear para uma dada gama de valores de fluxo de gás auxiliar (*make-up*).

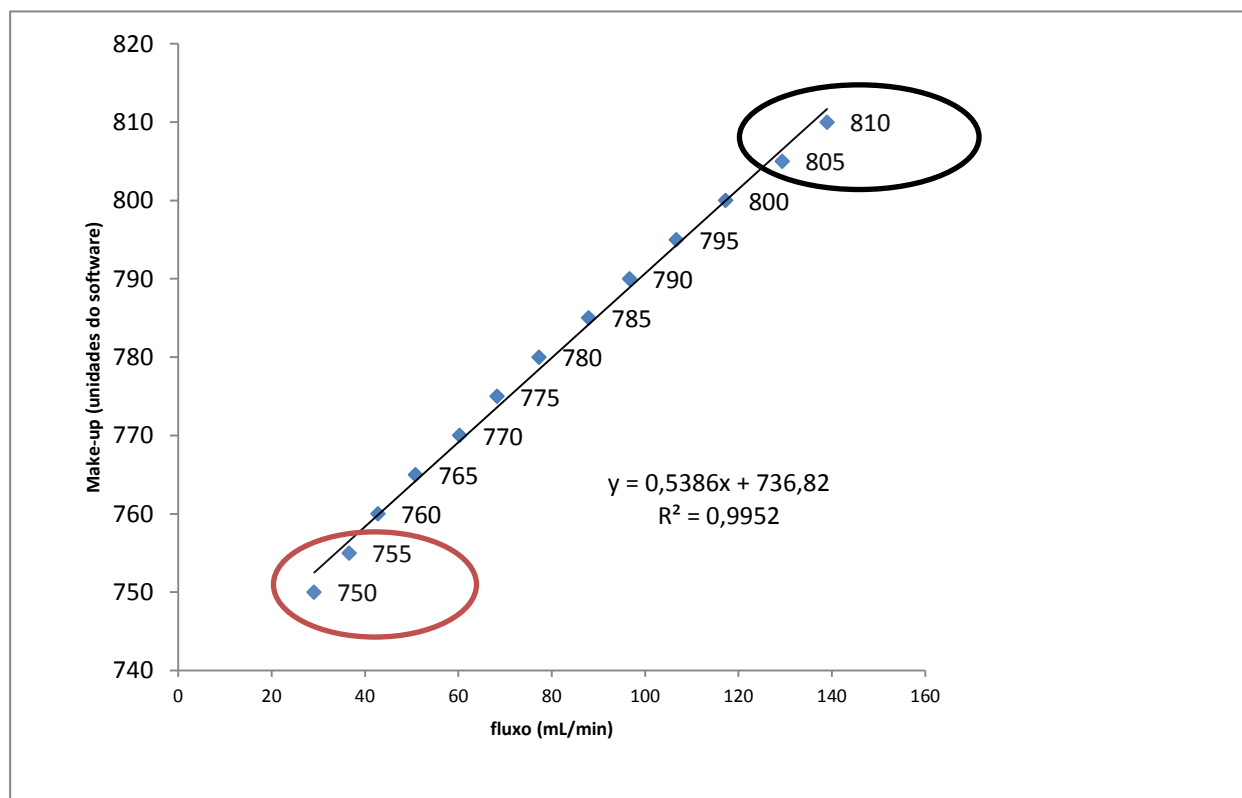


Figura 14 - Representação da regressão linear para uma dada gama de valores de fluxo de gás auxiliar (*Make-up*)

Os valores de fluxo de gás auxiliar (*make-up*) que se encontram na zona linear, isto é, entre 760 e 800 (unidades do software, correspondentes a um fluxo de azoto entre 0 e 20 mL/min) permitem um escoamento de azoto laminar. É neste intervalo que o fluxo de *make-up* deve ser otimizado. Abaixo desses valores (círculo avermelhado) o fluxo de gás auxiliar (*make-up*) é insuficiente para se notar algum efeito na análise. Acima dos mesmos (círculo a negro) entramos em escoamento turbulento e o azoto dispersa a amostra.

Anexo 3 Resultados da Validação obtidos pela MDI Evolution

A Tabela 6, apresenta os resultados obtidos para a deteção de TCA na MDI Evolution relativamente a 100 rolhas com concentração de TCA conhecida, determinada pelo método de rotina SPME-GC-ECD. As rolhas com valor de TCA detetado por este processo apresentam um valor superior a 0,1 mV/s, para a média das áreas dos picos de TCA obtidos nas 8 colunas cromatográficas.

Tabela 7 - Resultados da deteção de rolhas com concentração conhecida na MDI Evolution

Rolha	TCA (ng/L)	Área (mV/s)								
		Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Coluna 4	Coluna 5	Coluna 6	Coluna 7	Coluna 8	Média
1	63	7,46	8,75	9,35	6,17	6,95	7,82	9,13	8,86	8,1
2	40	1,19	1,43	1,67	1,52	1,51	1,19	1,32	0,85	1,3
3	32	0,91	1,21	1,74	1,71	1,75	1,63	1,68	1,7	1,5
4	25	0,91	1,11	1,26	1,32	1,25	1,11	1,08	0,64	1,1
5	20	0,56	0,54	0,82	0,98	0,81	0,81	0,65	0,25	0,7
6	27	0,39	1,98	1,13	1,37	2,37	2,39	2,48	0,91	1,6
7	30	3,07	4,07	4,15	4,74	4,45	4,02	3,76	0	3,5
8	37	4,17	4,61	4,91	5,16	4,81	4,69	3,83	0	4,0
9	52	1,72	2,3	2,62	2,47	2,28	2,22	2,5	1,4	2,2
10	55	0,66	0,86	1,13	1,82	0,89	1,62	0,84	0,64	1,1
11	64	0	0,04	0,34	0,21	0,46	0,15	0,23	0,12	0,2
12	42	0	0	0,27	0,18	0,21	0,22	0,16	0	0,1
13	62	7,06	7,61	10,13	12,18	10,45	10,65	8,2	7,35	9,2
14	50	11,8	13,74	11,29	10,05	12,37	12,99	12,98	12,4	12,2
15	25	2,61	2,46	2,56	2,73	2,73	2,79	2,79	2,44	2,6
16	21	1,63	1,8	1,35	1,93	1,98	1,86	1,83	1,61	1,7
17	17	0,43	0,5	0,54	0,57	0,67	0,62	0,68	0,54	0,6
18	10	0,3	0,36	0,44	0,51	0,61	0,65	0,64	0,4	0,5
19	7,2	0,78	0,23	0,25	0,4	0,41	0,36	0,32	0,27	0,4
20	7	1,45	1,7	2,02	1,87	1,87	2	2,03	1,67	1,8
21	5,7	0,35	0,54	0,51	0,4	0,58	0,47	0,56	0,35	0,5
22	5	0,6	0,6	0,53	0,49	0,77	0,72	0,63	0,38	0,6
23	3	0,19	0,37	0,4	0,36	0,42	0,45	0,35	0,18	0,3
24	2,8	0,17	0,38	0,28	0,36	0,39	0,31	0,36	0,22	0,3
25	3,5	0,22	0,28	0,38	0,44	0,5	0,44	0,48	0,41	0,4
26	2,1	0,19	0,35	0,27	0,23	0,3	0,35	0,46	0,42	0,3
27	2,5	0,59	1,09	0,7	0,2	0,71	0,89	0,65	0,55	0,7
28	3	0,02	0,15	0,19	0,23	0,14	0,15	0,13	0,02	0,1
29	3,5	0	0,03	0,62	0,7	0,65	0,62	0,56	0,62	0,5
30	2,8	0	0,09	0,35	0,24	0,29	0,26	0,24	0,22	0,2
31	5	0,6	0,6	0,53	0,49	0,77	0,72	0,63	0,38	0,6

32	2,3	0,03	0,04	0,09	0,35	0,09	0,08	0,27	0,04	0,1
33	1,9	0	0,03	0,03	0,07	0,04	0,07	0,02	0,07	0,0
34	1,7	0	0,01	0,02	0,08	0,01	0,06	0,01	0	0,0
35	1,6	0,05	0,02	0,04	0,06	0,06	0,05	0,03	0,08	0,0
36	1,4	0,09	0,17	0,2	0,02	0,19	0,15	0,16	0,14	0,1
37	1,3	0,14	0,17	0,14	0,22	0,25	0,05	0,15	0,08	0,2
38	1,1	0,12	0,02	0,12	0,19	0,18	0,23	0,15	0,05	0,1
39	1,1	0,33	0,35	0,38	0,43	0,33	0,39	0,5	0,44	0,4
40	1,3	0,05	0,28	0,71	0,57	0,64	0,62	0,49	0,29	0,5
41	1,9	0,25	0,37	0,41	0,34	0,29	0,38	0,36	0,28	0,3
42	0,8	0,09	0,39	0,5	0,13	0,29	0,45	0,29	0,12	0,3
43	0,9	0,12	0	0	0,32	0,39	0,29	0,37	0	0,2
44	0,8	0,09	0,39	0,5	0,13	0,29	0,45	0,29	0,12	0,3
45	1	0,27	0,45	0,55	0,22	0,19	0,34	0,54	0,01	0,3
46	1,9	0,25	0,37	0,41	0,34	0,29	0,38	0,36	0,28	0,3
47	0,6	0,02	0,06	0,18	0,22	0,28	0,28	0,29	0,07	0,2
48	0,5	0,1	0,17	0,23	0,37	0,25	0,46	0,57	0,02	0,3
49	0,7	0,01	0,1	0,12	0,17	0,14	0,11	0,14	0,02	0,1
50	0,9	0,02	0,03	0,24	0,45	0,26	0,22	0,3	0,04	0,2
51	0,5	0,03	0,15	0,29	0,3	0,22	0,31	0,33	0,18	0,2
52	0,6	0,22	0,38	0,63	0,73	0,36	0,28	0	0	0,4
53	0,8	0	0,19	0,38	0,49	0,4	0,38	0,46	0,13	0,3
54	1,5	0,09	5,19	1,37	0,03	0,22	0,15	0,02	0,01	0,9
55	1,5	2,79	3,67	4,19	4,92	4,61	4,54	5,1	3,72	4,2
56	1	0,12	0,42	0,71	0,9	1,01	0,86	1,03	0,55	0,7
57	22	0,12	0,48	0,33	0,46	0,51	0,27	0	0	0,3
58	40	0,78	1,36	1,63	1,55	1,12	1,58	0,75	0,42	1,1
59	13	0,37	0,52	0,45	0,44	0,28	0,1	0,49	0	0,3
60	11,8	0,12	0,1	0,2	0,15	0,18	0,21	0,19	0	0,1
61	9	0,01	0,07	0,26	0,27	0,43	0,13	0	0	0,1
62	14	0,67	1,02	0,96	0,82	0,89	0,8	0,74	0,1	0,8
63	20	3,59	4,37	4,28	4,54	4,13	4,48	3,41	0,17	3,6
64	13	0,16	0,54	0,46	0,51	0,49	0,6	0,67	0,03	0,4
65	10	0,08	0,27	0,22	0,23	0,24	0,22	0,19	0,02	0,2
66	5,7	0,02	0,06	0,09	0,06	0,11	0,06	0,03	0	0,1
67	7	0,17	0,12	0,08	0,16	0,12	0,2	0,17	0	0,1
68	3,1	0,25	0,29	0,3	0,31	0,16	0,23	0,21	0	0,2
69	5	0,1	0,23	0,19	0,23	0,18	0,17	0,12	0,02	0,2
70	7,2	0,14	0,18	0,09	0,08	0,04	0,19	0,08	0,02	0,1
71	10	0,13	0,25	0,25	0,23	0,27	0,22	0,19	0,01	0,2
72	3	0,2	0,23	0,41	0,35	0,3	0,41	0,42	0,2	0,3
73	2,8	0,14	0,3	0,34	0,3	0,23	0,27	0,3	0,1	0,2
74	1,9	0,27	0,62	0,79	0,88	0,57	0,49	0,61	0,1	0,5
75	1,5	0,65	1,53	2,01	1,92	1,73	1,21	2,2	0,39	1,5
76	11,8	0,23	0,59	0,5	0,52	0,29	0,12	0,39	0,01	0,3

77	55	0,59	0,63	0,47	1,05	0,68	0,89	0,78	0,22	0,7
78	20	1,06	1,27	1,32	1,43	0,96	1,21	1,13	0,42	1,1
79	14	0,15	0,21	0,26	0,25	0,2	0,22	0,11	0,04	0,2
80	13	0,37	0,44	0,3	0,34	0,23	0,2	0,12	0,02	0,3
81	52	4,26	2,73	4,74	2,57	2,24	4,96	4,62	2,09	3,5
82	80	3,36	3,47	2,63	1,48	2,14	2,88	3,1	1,38	2,6
83	33	0,68	1,06	1,24	1,2	1,19	1,07	1,18	0,49	1,0
84	20	0,32	0,9	1,02	0,88	0,74	1,04	0,95	0,4	0,8
85	5	0,33	0,3	0,15	0,32	0,3	0,41	0,34	0,14	0,3
86	3,1	0,17	0,2	0,17	0,31	0,04	0,25	0,14	0,05	0,2
87	2,8	0,01	0,22	0,03	0,41	0,36	0,23	0,12	0,07	0,2
88	2,3	0,04	0,28	0,39	0,25	0,31	0,11	0,16	0,04	0,2
89	1,9	0,1	0,14	0,12	0,11	0,15	0,15	0,13	0,05	0,1
90	20	0,12	0,08	0,11	0,1	0,11	0,15	0,08	0,09	0,1
91	10	0,18	0,12	0,14	0,23	0,14	0,14	0,16	0,12	0,2
92	14	0,13	0,12	0,11	0,13	0,12	0,15	0,13	0,07	0,1
93	7	0,17	0,27	0,05	0,23	0,1	0,18	0,21	0	0,2
94	5	0,08	0,1	0,15	0,21	0,13	0,03	0,08	0,1	0,1
95	3	0,02	0,04	0,04	0,15	0,02	0,06	0,03	0,07	0,1
96	2,1	0,24	0,51	0,49	0,54	0,45	0,3	0,48	0,04	0,4
97	0,8	0,12	0,1	0,1	0,13	0,09	0,03	0,04	0,01	0,1
98	0,6	0,05	0,12	0,23	0,05	0,29	0,25	0,4	0,1	0,2
99	55	0,06	0,12	0,07	0,1	0,09	0,08	0,1	0,08	0,1
100	52	4,26	2,73	4,74	2,57	2,24	4,96	4,62	2,09	3,5

É necessário referir, que as rolhas detetadas são as que possuem uma média das áreas superior a 0,1 mV/s.

Anexo 4 Resultados obtidos pela MDI Evolution da análise de rolhas de um lote com elevada incidência em TCA

Na Tabela 7, apresentam-se os resultados obtidos da deteção na MDI Evolution de 724 rolhas provenientes de um lote com elevada incidência em TCA.

É de referir que na validação correspondente à MDI Evo, os resultados foram divididos em três categorias: T (rolhas positivas, isto é, rolhas com TCA), N (rolhas não detetadas) e F (rolhas rejeitadas pela integração de picos secundários).

Tabela 8 - Resultados obtidos da deteção de 1071 rolhas provenientes de um lote com elevada incidência em TCA na MDI Evolution

Rolha	TCA [ng/L]/ SPME-GC-ECD	MDI Evo	Área(mV/s)
1	10,9	N	0,0
2	24,9	N	0,0
3	8,3	T	0,5
4	0,0	F	0,0
5	20,6	T	1,0
6	13,3	T	4,6
7	12,2	T	0,4
8	81,6	T	0,6
9	16,5	N	0,0
10	0,5	T	0,5
11	14,4	T	0,5
12	5,5	T	1,2
13	19,6	T	0,3
15	111,3	T	0,5
16	2,9	T	0,5
17	41,9	T	1,6
19	0,5	N	0,0
20	0,0	N	0,0
21	0,0	N	0,0
22	4,8	N	0,0
23	0,0	N	0,0
24	0,0	N	0,0
25	0,0	N	0,0
26	0,0	N	0,0
27	1,3	N	0,0
28	0,0	N	0,0
29	0,0	N	0,0
30	0,0	N	0,0
32	0,0	N	0,0

33	11,9	T	1,7
34	14,4	T	0,2
35	11,2	T	0,2
36	61,0	T	1,9
37	62,0	T	0,4
38	10,7	T	0,1
39	0,0	T	0,8
40	0,0	T	0,7
41	1,7	T	2,9
42	0,0	F	1,0
45	1,4	T	0,2
46	3,3	T	0,4
47	0,0	F	1,0
48	0,0	T	1,2
49	0,0	T	0,3
51	0,9	T	0,7
52	1,5	T	0,4
54	0,1	F	1,0
57	0,6	T	0,7
60	0,0	T	0,1
63	0,0	F	1,0
67	0,0	T	0,3
71	7,9	T	1,3
73	0,0	T	0,6
75	0,5	T	0,6
77	0,5	T	0,5
78	294,1	T	6,2
79	0,0	T	0,8
80	0,5	T	0,9
83	0,0	F	1,0
86	0,0	F	1,0
91	0,5	T	1,1
94	5,9	F	1,0
97	0,0	T	0,4
107	0,0	T	0,4
110	0,0	T	0,9
117	0,0	T	0,6
123	0,7	T	0,6
129	9,3	T	1,2
132	18,4	T	1,5
135	0,0	T	0,6
136	0,0	T	0,9
138	0,0	T	1,1
139	0,0	T	0,7
140	26,5	T	2,9

144	11,3	T	1,3
146	0,0	T	0,8
147	16,5	F	1,0
149	0,6	T	0,5
153	0,0	T	0,9
156	0,0	T	0,5
157	0,0	F	1,0
158	0,0	T	0,8
161	0,0	T	1,4
162	0,5	T	0,6
164	0,0	T	0,5
165	0,5	T	0,8
168	0,0	T	1,0
171	0,0	T	0,4
173	0,0	F	1,0
174	5,6	T	0,7
175	0,0	T	1,0
176	0,0	T	1,2
178	0,6	T	0,5
180	0,0	T	0,2
182	0,5	F	1,0
184	11,0	T	0,8
185	0,0	T	0,6
186	14,5	T	1,3
187	14,4	T	0,6
189	10,7	T	0,5
190	10,7	T	6,6
191	10,8	T	0,6
192	19,6	T	1,0
193	7,5	T	0,3
194	1,9	T	1,5
195	2,2	T	1,5
197	101,2	T	5,9
198	8,0	T	1,9
199	23,4	T	1,5
200	2,8	T	0,8
202	0,5	T	0,5
203	25,6	T	1,2
204	0,0	T	0,2
206	7,2	T	0,7
207	13,1	T	5,1
208	11,0	T	0,5
209	14,1	T	1,6
210	14,2	T	0,6
216	2,4	N	0,0

231	14,2	T	0,4
241	3,6	F	1,0
243	0,0	F	1,0
246	0,0	F	1,0
247	0,3	F	1,0
250	0,3	F	1,0
253	78,3	T	0,9
255	0,0	F	1,0
258	0,0	N	0,0
259	0,0	N	0,0
272	9,1	T	0,4
275	0,3	F	1,0
277	0,0	F	1,0
278	3,2	F	1,0
283	0,0	F	1,0
284	0,4	F	1,0
285	0,5	F	1,0
286	27,7	T	0,9
289	0,4	F	1,0
292	0,0	F	1,0
293	0,6	F	1,0
294	0,0	F	1,0
295	1,3	F	1,0
297	0,0	F	1,0
298	2,2	F	1,0
300	2,9	F	1,0
301	0,2	F	1,0
304	0,7	F	1,0
306	0,0	F	1,0
308	0,1	F	1,0
310	0,3	F	1,0
311	0,2	F	1,0
315	0,3	F	1,0
316	42,4	T	1,5
317	0,2	F	1,0
318	0,1	F	1,0
319	20,5	T	0,5
320	0,0	F	0,0
321	0,0	F	1,0
322	0,0	F	1,0
323	0,0	F	1,0
324	6,8	T	0,2
325	3,7	T	0,6
327	0,0	N	0,0
329	0,9	F	1,0

330	8,1	F	1,0
331	0,0	N	0,0
332	0,3	N	0,0
333	7,5	N	0,0
334	0,0	F	1,0
335	0,6	T	0,2
337	11,3	T	0,6
339	0,0	T	0,2
340	9,6	F	1,0
341	0,0	N	0,0
342	0,0	F	0,0
345	3,9	T	0,3
346	0,1	N	0,0
347	0,0	F	1,0
348	2,0	F	1,0
349	0,0	N	0,0
350	5,7	T	0,2
351	3,7	F	1,0
352	4,0	T	0,2
353	4,7	T	0,3
354	0,0	F	1,0
356	0,0	F	1,0
358	0,1	F	1,0
360	0,0	F	1,0
361	0,0	F	1,0
362	0,0	N	0,0
365	0,0	N	0,0
366	25,0	T	1,0
367	0,0	N	0,0
368	0,1	F	1,0
369	4,0	F	1,0
370	0,0	F	1,0
371	0,0	N	0,0
372	1,5	N	0,0
373	0,0	F	1,0
374	23,8	T	3,8
375	0,1	N	0,0
376	0,0	N	0,0
377	0,2	N	0,0
378	0,5	N	0,0
379	0,0	N	0,0
381	0,0	F	1,0
382	1,0	N	0,0
383	0,0	N	0,0
384	0,2	F	1,0

385	0,0	T	0,2
387	0,0	N	0,0
388	0,0	F	1,0
389	0,2	N	0,0
390	0,0	N	0,0
391	0,5	T	0,1
392	0,6	N	0,0
393	0,0	N	0,0
394	6,4	T	0,1
395	0,0	F	1,0
396	0,0	F	1,0
397	0,1	T	0,4
398	0,2	N	0,0
399	0,5	N	0,0
400	0,0	N	0,0
401	0,0	T	1,4
402	0,0	N	0,0
403	0,0	N	0,0
404	0,0	T	0,2
405	0,0	N	0,0
406	4,0	N	0,0
407	0,0	N	0,0
408	4,3	F	1,0
409	0,1	F	1,0
410	0,0	F	1,0
412	10,4	T	0,1
413	0,0	N	0,0
414	2,8	T	1,0
415	0,0	N	0,0
416	10,0	N	0,0
417	0,0	F	1,0
418	0,1	N	0,0
419	0,0	F	1,0
420	0,0	N	0,0
421	0,3	F	1,0
422	0,2	N	0,0
423	11,4	T	0,2
424	0,0	N	0,0
425	0,0	F	1,0
426	0,2	F	1,0
427	0,0	N	0,0
428	14,2	T	0,7
429	1,0	N	0,0
430	0,0	N	0,0
431	0,2	N	0,0

432	0,3	N	0,0
433	0,0	F	1,0
434	11,2	T	0,2
435	0,2	N	0,0
436	0,0	N	0,0
437	1,8	F	1,0
438	8,2	T	0,6
440	0,0	N	0,0
441	0,0	N	0,0
442	0,0	F	1,0
444	0,0	N	0,0
445	0,0	F	1,0
446	0,0	F	1,0
447	0,0	F	1,0
448	0,0	F	1,0
449	29,8	T	0,8
450	0,0	N	0,0
451	0,0	F	1,0
452	0,0	F	1,0
453	0,0	F	1,0
454	0,5	N	0,0
455	0,0	N	0,0
456	18,8	T	1,7
457	0,0	N	0,0
458	0,0	F	1,0
459	3,1	N	0,0
460	0,5	F	1,0
461	0,5	F	1,0
462	2,3	F	1,0
463	0,0	F	1,0
464	0,0	F	1,0
465	0,0	F	1,0
466	0,6	F	1,0
467	0,0	N	0,0
471	0,5	N	0,0
472	2,7	T	1,0
473	0,0	N	0,0
474	0,0	N	0,0
475	0,0	N	0,0
476	0,0	N	0,0
477	0,0	F	1,0
478	0,0	N	0,0
480	0,0	F	1,0
481	5,2	N	0,0
483	1,6	N	0,0

484	0,0	N	0,0
485	0,0	N	0,0
488	0,0	F	1,0
489	1,9	F	1,0
490	0,5	N	0,0
491	0,9	N	0,0
492	3,3	N	0,0
493	0,0	N	0,0
494	0,0	F	1,0
495	10,4	T	0,2
496	0,0	F	1,0
497	0,0	N	0,0
498	0,0	F	1,0
499	0,0	T	1,0
500	0,9	N	0,0
501	0,0	N	0,0
502	4,7	N	0,0
503	0,7	N	0,0
504	0,0	N	0,0
505	2,1	N	0,0
506	0,0	N	0,0
508	0,0	N	0,0
510	79,6	T	1,0
511	2,8	F	1,0
512	3,0	F	1,0
513	0,0	N	0,0
514	0,5	N	0,0
515	0,0	F	1,0
516	0,0	F	1,0
517	0,0	F	1,0
518	0,0	N	0,0
519	8,4	T	0,1
520	0,0	N	0,0
521	7,8	T	1,0
522	0,7	N	0,0
523	0,5	T	1,0
524	0,5	N	0,0
525	0,6	F	1,0
526	2,4	F	1,0
527	0,0	N	0,0
528	4,2	T	0,1
529	17,0	T	3,8
530	0,0	F	1,0
531	0,0	N	0,0
532	0,0	N	0,0

533	0,0	F	1,0
534	14,8	N	0,0
535	1,7	F	1,0
536	0,0	N	0,0
537	0,5	F	1,0
538	0,0	F	1,0
539	0,0	T	1,0
541	0,0	N	0,0
542	0,0	N	0,0
543	0,0	N	0,0
544	0,0	N	0,0
545	0,0	N	0,0
546	1,2	T	0,5
547	8,2	T	0,2
548	0,0	N	0,0
549	0,6	N	0,0
550	0,0	F	1,0
551	1,2	F	1,0
552	0,0	F	1,0
553	0,0	F	1,0
554	0,0	F	1,0
555	13,0	T	1,0
556	5,3	T	0,5
557	0,0	N	0,0
558	44,6	T	0,1
559	0,0	N	0,0
560	15,5	T	1,0
561	12,1	T	0,5
562	0,7	F	1,0
563	5,0	N	0,0
565	4,6	T	1,0
566	0,0	T	1,0
567	0,0	N	0,0
568	3,6	N	0,0
569	32,1	T	1,0
570	0,0	N	0,0
573	0,0	F	1,0
574	0,0	F	1,0
576	0,0	N	0,0
577	0,0	N	0,0
578	60,1	T	1,0
579	0,0	T	1,0
580	0,7	N	0,0
585	0,0	N	0,0
594	0,0	N	0,0

595	17,6	T	0,2
596	0,0	N	0,0
597	47,1	T	0,2
598	0,0	N	0,0
599	0,0	F	1,0
601	0,0	N	0,0
602	32,1	T	0,2
603	0,0	N	0,0
607	24,5	T	1,0
608	0,0	N	0,0
609	13,3	T	0,7
611	19,7	F	1,0
612	0,0	F	1,0
615	1,3	F	1,0
616	0,0	F	1,0
617	0,9	N	0,0
618	0,0	N	0,0
620	2,5	N	0,0
622	0,0	N	0,0
623	1,1	F	1,0
624	0,0	F	1,0
626	0,0	N	0,0
627	0,0	N	0,0
628	0,0	N	0,0
631	0,0	N	0,0
632	0,0	N	0,0
633	0,0	N	0,0
634	0,9	F	1,0
635	0,0	F	1,0
637	0,0	N	0,0
640	0,5	F	1,0
642	0,0	F	1,0
643	11,7	F	1,0
644	0,0	F	1,0
645	0,1	F	1,0
647	0,4	N	0,0
648	3,1	N	0,0
649	0,6	F	1,0
650	0,0	N	0,0
651	2,5	N	0,0
652	0,2	N	0,0
653	0,0	N	0,0
654	0,1	N	0,0
655	0,2	N	0,0
656	0,0	N	0,0

657	0,0	F	1,0
658	0,3	F	1,0
659	0,7	F	1,0
660	0,0	F	1,0
661	0,0	F	1,0
662	0,2	N	0,0
663	0,0	F	1,0
665	0,2	N	0,0
666	0,0	N	0,0
667	0,0	F	1,0
668	0,0	F	1,0
669	0,0	F	1,0
671	0,3	N	0,0
672	0,0	N	0,0
673	0,0	N	0,0
674	0,0	N	0,0
675	0,0	F	1,0
676	0,2	N	0,0
677	0,4	N	0,0
678	0,0	N	0,0
680	2,3	N	0,0
681	15,3	N	0,0
682	0,2	N	0,0
683	7,1	N	0,0
684	0,1	F	1,0
685	0,2	N	0,0
686	0,0	N	0,0
687	0,1	F	1,0
688	0,0	N	0,0
689	0,0	N	0,0
690	6,2	N	0,0
691	0,1	N	0,0
692	0,0	N	0,0
693	3,7	N	0,0
694	0,0	N	0,0
695	0,0	N	0,0
696	0,0	N	0,0
697	0,3	F	1,0
698	0,2	F	1,0
699	1,4	N	0,0
700	15,3	T	1,0
701	0,0	N	0,0
702	42,9	T	2,5
703	8,9	F	1,0
705	0,1	N	0,0

706	0,2	N	0,0
707	0,0	N	0,0
708	0,0	N	0,0
709	0,0	N	0,0
710	1,5	N	0,0
711	0,2	N	0,0
712	0,2	N	0,0
713	8,5	T	0,8
714	0,2	N	0,0
715	9,5	T	1,0
716	0,1	N	0,0
717	0,2	N	0,0
718	0,2	N	0,0
719	0,0	N	0,0
720	0,0	N	0,0
721	0,8	N	0,0
722	0,0	N	0,0
725	0,3	N	0,0
726	117,6	T	1,7
727	0,0	F	1,0
728	0,0	N	0,0
729	0,2	N	0,0
730	0,0	F	1,0
731	0,0	N	0,0
732	0,1	N	0,0
733	16,9	T	0,7
734	0,0	N	0,0
735	0,0	N	0,0
736	0,3	N	0,0
737	0,0	N	0,0
738	0,0	N	0,0
739	0,7	N	0,0
740	0,2	N	0,0
741	0,1	N	0,0
742	0,2	N	0,0
743	0,1	F	1,0
744	0,0	N	0,0
745	0,4	N	0,0
747	0,0	N	0,0
748	0,2	N	0,0
749	73,3	T	0,7
750	2,4	N	0,0
751	0,0	N	0,0
752	13,2	N	0,0
753	0,3	N	0,0

754	0,2	N	0,0
755	0,3	N	0,0
756	0,0	N	0,0
757	0,3	N	0,0
758	0,0	N	0,0
759	105,1	T	1,0
760	0,0	N	0,0
761	0,2	N	0,0
762	0,3	F	1,0
763	0,0	N	0,0
764	0,0	N	0,0
765	0,0	F	1,0
766	0,0	N	0,0
767	0,2	N	0,0
768	0,8	N	0,0
769	1,2	N	0,0
770	0,3	N	0,0
772	0,0	N	0,0
773	0,6	F	1,0
781	20,8	T	0,6
782	10,1	T	0,1
784	89,4	T	5,4
785	10,3	T	2,0
786	24,5	T	0,2
787	111,3	T	0,5
788	80,7	T	1,2
789	70,5	T	0,1
790	12,1	T	0,1
791	8,1	T	0,1
792	6,2	T	1,8
793	120,6	T	0,9
794	1,3	T	1,0
795	0,0	N	0,0
796	18,1	T	1,0
797	1,4	T	0,2
798	1,7	T	0,1
799	14,9	T	0,2
800	9,8	T	0,1
802	63,1	T	0,4
803	28,9	T	0,4
805	0,3	N	0,0
806	0,6	F	1,0
807	0,0	F	1,0
808	0,0	F	1,0
809	0,0	F	1,0

810	2,2	T	0,1
811	0,9	F	1,0
812	0,0	F	1,0
813	0,2	N	0,0
814	37,3	T	0,3
815	0,9	N	0,0
816	0,3	N	0,0
817	0,8	F	1,0
818	0,2	F	1,0
819	0,3	N	0,0
820	4,5	T	0,1
821	0,0	N	0,0
822	0,3	F	1,0
823	0,3	N	0,0
824	0,0	N	0,0
825	0,4	N	0,0
826	0,0	F	1,0
827	0,4	N	0,0
828	0,2	F	1,0
829	0,3	N	0,0
830	0,4	N	0,0
831	9,1	N	0,0
832	0,1	N	0,0
833	0,0	N	0,0
834	0,8	N	0,0
835	0,0	N	0,0
836	0,3	F	1,0
837	0,3	N	0,0
838	0,4	F	1,0
839	0,2	F	1,0
840	0,0	T	1,0
841	7,8	N	0,0
842	0,3	N	0,0
843	0,2	N	0,0
844	0,3	N	0,0
845	16,9	N	0,0
846	2,5	N	0,0
847	1,0	N	0,0
848	0,3	N	0,0
849	0,0	T	0,1
850	0,8	N	0,0
851	3,7	T	0,2
852	0,0	N	0,0
853	0,2	N	0,0
854	8,0	N	0,0

855	1,8	N	0,0
856	0,5	N	0,0
857	0,3	N	0,0
858	0,0	N	0,0
859	4,5	N	0,0
860	0,6	N	0,0
861	2,8	N	0,0
862	0,3	N	0,0
863	0,5	N	0,0
864	0,7	N	0,0
865	3,1	N	0,0
866	0,0	N	0,0
867	1,4	N	0,0
869	1,0	N	0,0
871	0,8	N	0,0
872	14,2	N	0,0
873	0,1	N	0,0
875	0,4	N	0,0
876	0,6	N	0,0
877	0,0	N	0,0
878	0,5	N	0,0
879	0,4	N	0,0
881	1,0	N	0,0
882	7,9	N	0,0
884	0,3	N	0,0
887	0,8	N	0,0
888	0,5	N	0,0
890	0,0	N	0,0
892	0,3	N	0,0
894	0,2	F	1,0
895	0,4	N	0,0
896	0,4	F	1,0
897	0,2	N	0,0
898	0,3	N	0,0
903	3,9	N	0,0
905	0,2	N	0,0
906	0,4	N	0,0
908	67,2	N	0,0
909	0,4	N	0,0
910	18,7	T	1,0
911	0,0	N	0,0
912	0,2	N	0,0
913	0,3	N	0,0
916	0,3	N	0,0
917	0,5	F	1,0

920	19,5	F	1,0
921	0,3	N	0,0
924	4,4	N	0,0
927	0,5	N	0,0
928	0,3	N	0,0
941	0,0	N	0,0
942	0,3	N	0,0
950	0,0	N	0,0
955	0,0	N	0,0
971	0,0	N	0,0
973	0,0	N	0,0
977	0,0	N	0,0
978	19,7	T	0,2
980	0,0	N	0,0
981	0,8	N	0,0
985	0,0	N	0,0
987	0,0	N	0,0
988	0,0	N	0,0
990	0,0	N	0,0
992	0,0	F	1,0
993	0,0	N	0,0
994	0,0	N	0,0
995	4,9	T	0,0
996	0,0	N	0,0
998	0,0	F	1,0
1001	0,0	N	0,0
1002	0,0	N	0,0
1003	0,0	N	0,0
1004	0,0	N	0,0
1005	2,7	F	1,0
1006	0,0	N	0,0
1008	0,0	N	0,0
1009	0,0	N	0,0
1010	0,0	N	0,0
1011	0,0	N	0,0
1015	0,0	N	0,0
1016	0,5	F	1,0
1018	0,0	N	0,0
1019	0,6	N	0,0
1022	4,3	N	0,0
1024	0,0	N	0,0
1025	0,0	N	0,0
1038	4,9	T	1,0
1039	20,4	T	1,0
1042	2,9	T	1,0

1043	8,6	T	1,0
1046	16,5	T	1,0
1047	0,0	T	1,0
1049	0,0	N	0,0
1050	0,0	N	0,0
1051	0,2	N	0,0
1052	0,1	N	0,0
1053	28,9	T	1,0
1054	0,1	N	0,0
1055	0,1	N	0,0
1056	0,3	N	0,0
1057	0,0	N	0,0
1058	0,2	N	0,0
1059	0,0	N	0,0
1060	0,0	N	0,0
1061	12,0	T	1,0
1068	6,8	T	1,0
1069	41,3	T	1,0
1070	86,62	T	1,0
1071	101,8	T	1,0

