

**Mestrado Integrado em Engenharia Química**

**Análise crítica do método cromatográfico para  
quantificação de TCA e soluções para a sua  
melhoria**

**Tese de Mestrado**

de

**José Luís dos Reis Duarte**

**Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação**

Realizado na

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



Orientador na FEUP: **Prof. Margarida Bastos**

Orientador na Amorim & Irmãos, S.A: **Doutor Miguel Cabral**



**Departamento de Engenharia Química**

**Fevereiro de 2016**



## Agradecimentos

Não posso deixar de agradecer a todos que me ajudaram a terminar esta fase da minha vida académica.

Agradeço a oportunidade de ter realizado a dissertação numa empresa de renome que é a Amorim & Irmão, que me permitiu crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Doutor Miguel Cabral agradeço a disponibilidade mostrada e por me ter ensinado muito mais para além do tema desenvolvido no âmbito deste projeto.

À professora Margarida Bastos por ter demonstrado conhecimento e gentileza ao longo desta fase e também ao longo do percurso académico. A todos os professores do Departamento de Engenharia Química da FEUP a quem devo muito do conhecimento adquirido ao longo dos anos de curso.

À minha família, em particular aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e se mantiveram ao meu lado nos momentos menos positivos, incentivando-me a superar-me todos os dias e a dar sempre o meu melhor em todas as situações.

À minha namorada que aturou todo o mau humor dos dias menos conseguidos e mesmo assim se manteve ao meu lado, contribuindo sempre com uma palavra carinhosa.

Aos meus amigos que se mantiveram fieis e me acompanharam ao longo desta fase também ao longo de toda a minha vida.

Um especial obrigado às pessoas que me fizeram sentir em casa (no trabalho). Obrigado à Eliana Reis, por toda a paciência, zelo e companheirismo, à Ana Malheiro por toda a dedicação demonstrada, à Salomé Reis, Patrícia Oliveira e Inês Guimarães por me proporcionarem aprendizagem com o ótimo ambiente de companheirismo e boa disposição.

Um obrigado ao Doutor Paulo Lopes, Doutora Isabel Roseira e José Pedro Machado pela simpatia demonstrada.

Obrigado aos restantes estagiários da A&I que me acompanharam nesta fase da vida académico-profissional e que juntos partilhámos muitas experiências que ficarão para a vida.

## Resumo

Com base numa auditoria externa foi estudada a hipótese de melhoria e validação do método de análise e quantificação de TCA do departamento de I&D da A&I, com a inclusão de quatro novas retas de calibração para o SPME/GC-ECD que preenchiam os parâmetros inerentes à validação de métodos cromatográficos e as necessidades de análises de rotina da empresa.

Foram propostas alterações nas gamas de trabalho, tempos de extração e exposição da fibra ao TCA, foi apresentada uma rampa de temperatura alternativa e procedeu-se à implementação da mudança do tempo de abertura da válvula do injetor e tempo de exposição da fibra PDMS ao TCA presente na amostra.

Os resultados obtidos a partir das mudanças efetuadas mostraram que a abertura da válvula do injetor ao fim de 2 minutos e o tempo de exposição da fibra de 24 minutos forneceram melhores resultados na análise de TCA.

As análises estatísticas, necessárias para a validação dos métodos e realizadas para as quatro metodologias propostas, revelaram que todas as curvas se encontravam dentro das especificações de validação de métodos cromatográficos.

Todas as metodologias propostas se apresentam precisas e exatas, e com limiares de quantificação e deteção mais ajustados; os ensaios de recuperação efetuados em matrizes de cortiça natural promovem bons resultados.

**Palavras-chave:** TCA, validação método cromatográfico, GC-ECD, SPME, Cortiça

---

## **Abstract**

The possibility of improvement for an analytical method of analysis and quantification of TCA, through the inclusion of four new calibration curves for SPME/GC-ECD, was studied and validated. The studied calibration curves met the parameters suggested by previous external audit, the inherent specifications to the chromatographic and analytical methods validation, and the needs of the company.

Changes in the working range, extraction time and exposure of the fiber to the TCA were proposed, an alternative temperature ramp was presented and a change in the opening time of the nozzle valve was implemented.

The results obtained from the modified parameters showed that an opening valve time of 2 minutes and 24 minutes of PDMS fiber exposure time provided better results in the TCA analysis.

Statistical analysis required for the validation of the methods, performed for the four curve proposals, revealed all the curves are within the specifications of validation of the chromatographic methods. All the proposed methodologies are precise and accurate, and quantification and detection thresholds are more adjusted; the recovery experiments made in natural cork matrices promote good results.

**Keywords:** TCA, chromatographic method validation, GC-ECD, SPME, Cork



## 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.

*Fevereiro 2016*

---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1	Apresentação da Empresa .....	1
1.2	A Cortiça .....	1
1.3	2,4,6-Tricloroanisol.....	3
1.4	Contributos do trabalho.....	4
1.5	Organização da Tese.....	5
<b>2</b>	<b>Contexto e Estado da Arte .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Parâmetros de validação de um método analítico .....</b>	<b>11</b>
3.1	Gama de trabalho .....	11
3.2	Linearidade.....	12
3.3	Sensibilidade .....	13
3.4	Limiares analíticos .....	14
3.5	Precisão .....	15
3.6	Exatidão.....	15
<b>4</b>	<b>Descrição Técnica .....</b>	<b>16</b>
4.1	Material e equipamento.....	16
4.1.1	Materiais: .....	16
4.1.2	Reagentes.....	17
4.1.3	Equipamento utilizado.....	17
4.2	Metodologia.....	17
4.2.1	Preparação das soluções.....	17
4.2.2	A análise cromatográfica .....	18
4.2.3	Observação de resultados e garantia de qualidade.....	19
4.3	Metodologias abordadas.....	20
4.3.1	Método de referência de análise de TCA.....	20
4.3.2	Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA (0,5 a 5,5 ng/L) .	21
4.3.3	Metodologia para gama alta de concentrações de TCA (0,5 a 28 ng/L) ....	21



---

4.3.4	Metodologia para gama intermédia de concentrações de TCA (0,5 a 11 ng/L) .....	21
<b>5</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>23</b>
5.1	Método de referência de análise de TCA .....	23
5.2	Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA .....	24
5.3	Metodologia para gama alta de concentrações de TCA .....	28
5.3.1	Alteração dos parâmetros operacionais .....	31
5.4	Metodologia de gama alta de concentrações de TCA após a alteração dos parâmetros operacionais.....	33
5.5	Metodologia gama intermédia .....	37
<b>6</b>	<b>Discussão de resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>46</b>
7.1	Objetivos Realizados.....	47
7.2	Outros Trabalhos Realizados .....	47
7.3	Limitações e Trabalho Futuro .....	47
7.4	Apreciação final .....	48
<b>8</b>	<b>Referências .....</b>	<b>49</b>
Anexo 1	Preparação da solução-mãe de TCA.....	50
Anexo 2	Preparação de soluções-mãe de Padrão interno .....	51
Anexo 3	Preparação dos padrões de calibração .....	52
Anexo 4	Cálculos auxiliares.....	53
Anexo 5	Metodologia SPME-GC/ECD .....	54
Anexo 6	Metodologia de gama baixa (0,5 a 5,5 ng/L e PI de 5,5 ng/L).....	56
Anexo 7	Metodologia de gama alta 0,5 a 28 ng/L e Padrão interno de 28 ng/L) .	57
Anexo 8	Metodologia gama alta 2 (0,5 a 28,0 ng/L e Padrão interno de 28,0 ng/L) .....	58
Anexo 9	Metodologia de gama intermédia (0,5 a 11,0 ng/L) e Padrão interno de 11,0 ng/L .....	59
Anexo 10	Outras referências consultadas e não referenciadas no documento ....	60

# Índice de Figuras

<i>Figura 1: Ilustração representativa da “morte da cortiça”</i> .....	2
<i>Figura 2: Mecanismo de formação do TCA.</i> .....	3
<i>Figura 3:SPME: a) Disposição dos vials no suporte do auto-sampler; b) Momento da desorção do TCA da fibra de PDMS no injetor.</i> .....	18
<i>Figura 4: SPME/GC-ECD: a) Vista geral; b) Pormenor SPME; c)Forno e coluna cromatográfica.</i> .....	19
<i>Figura 5: Cromatograma típico onde se destacam o pico de TCA e o pico de padrão interno.</i> .....	19
<i>Figura 6: Carta de controlo de padrões 2 ng/L do método de referência para o GC-ECD 8</i> .....	23
<i>Figura 7 Reta de calibração para gama baixa de concentrações de TCA<sup>1</sup>.</i> .....	25
<i>Figura 8: Linearidade a) Análise de resíduos; b)teste de Rikilt para a gama baixa de concentrações.</i> .	27
<i>Figura 9: Reta de calibração da gama alta de concentrações de TCA<sup>1</sup>.</i> .....	29
<i>Figura 10: Linearidade: a) Análise de resíduos; b)teste de Rikilt para a gama alta de concentrações.</i>	31
<i>Figura 11: Cromatograma de uma amostra 28,0 ng/L de TCA da nova rampa de temperatura.</i> .....	33
<i>Figura 12: Reta de calibração da gama alta 2 de concentrações de TCA<sup>1</sup>.</i> .....	34
<i>Figura 13:Linearidade: a) Análise de resíduos; b)Teste de Rikilt para a gama alta 2 de concentrações.</i> .....	36
<i>Figura 14: Reta de calibração da gama intermédia de concentrações de TCA.</i> .....	38
<i>Figura 15:Linearidade:a) Análise de resíduos; b)teste de Rikilt para a gama intermédia de concentrações.</i> .....	40
<i>Figura A5.1: Injetor de modo Split/Splitless</i> .....	54
<i>Figura A6.1: Ajuste: a) linear; b) polinomial de linearidade gama baixa.</i> .....	56
<i>Figura A7.1: ajuste: a) linear; b) polinomial de linearidade gama alta</i> .....	57
<i>Figura A8.1: ajuste: a) linear; b) polinomial de linearidade gama alta2</i> .....	58
<i>Figura A9.1: ajuste: a) linear; b) polinomial de linearidade gama intermédia</i> .....	59

# Índice de Tabelas

<i>Tabela 1: Limiares de percepção sensorial dos principais contaminantes da cortiça. ....</i>	<i>4</i>
<i>Tabela 2: Resumo dos parâmetros operacionais das metodologias estudadas. ....</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 3: Parâmetros e limites de aceitação para o GC-ECD 8 definidos ao longo de 2015. ....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 4: Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA. ....</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 5: Parâmetros analíticos da reta referente à metodologia gama baixa de concentrações ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 6: Área de TCA / Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 5,5 ng/L. ....</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 7: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama baixa de concentrações de TCA. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 8: Avaliação da linearidade da reta de gama baixa de concentrações de TCA. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 9: Testes de resíduos e Rikilt aplicado à gama baixa de concentrações de TCA. ....</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 10: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para gama baixa. ....</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 11: Limiares analíticos referentes à metodologia de gama baixa de concentrações de TCA. ...</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 12: Teste de recuperação aplicados à metodologia de gama baixa de concentrações de TCA... </i>	<i>27</i>
<i>Tabela 13: Metodologia para gama alta de concentrações de TCA. ....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 14: Parâmetros analíticos da reta referente à metodologia gama alta de concentrações de TCA ....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 15: Área de TCA / Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 28 ng/L.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 16: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama alta de concentrações de TCA. ....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 17: Avaliação da linearidade da reta de gama alta de concentrações de TCA.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 18: Testes de resíduos e Rikilt aplicados à gama alta de concentrações de TCA.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 19: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama alta de concentrações de TCA..</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 20: Limiares analíticos referentes ao método gama alta. ....</i>	<i>31</i>
<i>Tabela 21: Tempos de exposição da fibra SPME ao TCA no headspace do vial. ....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 22: Tempos de abertura da válvula Split/Splitless do injetor. ....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 23: Metodologia de gama alta 2 de concentração de TCA. ....</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 24: Parâmetros analíticos da reta e da metodologia gama alta 2 de concentrações de TCA. ...</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 25: Área de TCA/Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 28 ng/L. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 26: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama alta 2 de concentrações de TCA. ....</i>	<i>35</i>

---

<i>Tabela 27: Avaliação da linearidade da reta gama alta 2 de concentração TCA. ....</i>	<i>35</i>
<i>Tabela 28: Testes de resíduos e Rikilt aplicados à gama alta 2 de concentração de TCA. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 29: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama alta 2. ....</i>	<i>36</i>
<i>Tabela 30: Limiares analíticos da metodologia gama alta 2 de concentrações de TCA. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 31: Teste de recuperação no método de gama alta 2 de concentrações de TCA. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 32: Metodologia gama intermédia de concentrações de TCA. ....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 33: Parâmetros analíticos da reta associada à metodologia de gama intermédia. ....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 34: Área de TCA/Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 11 ng/L. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 35: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama intermédia de concentrações de TCA. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 36: Avaliação da linearidade Avaliação da linearidade da gama intermédia de concentrações de TCA. ....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 37: Testes de resíduos e Rikilt aplicados à gama intermédia de concentrações de TCA. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 38: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama intermédia de concentrações. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 39: Limiares analíticos referentes à metodologia de gama intermédia. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 40: Teste de recuperação para a metodologia de gama intermédia. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabela A2.1: Preparação de soluções-mãe de PI. ....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela A3.1: Preparação de padrões de calibração ....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela A6.1: Gama de trabalho metodologia gama baixa ....</i>	<i>56</i>
<i>Tabela A7.1: Gama de trabalho metodologia gama alta ....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela A8.1: Gama de trabalho metodologia gama alta 2. ....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela A9.1: Gama de trabalho metodologia gama intermédia ....</i>	<i>59</i>

## Notação e Glossário

$S_m$	Desvio padrão do método
$s$	Desvio padrão
F	Teste de Fisher/Snedcor
DS	Função de calibração linear (Teste de <i>Mandel</i> )

### *Índice*

i	Índice ou contador representativo de uma amostra
---	--

### *Lista de Siglas*

A&I	Amorim & Irmãos
CV <sub>m</sub>	Coefficiente de variação do método
GC	Cromatografia gasosa
ECD	Electron Capture Detector (Deteção por Captura Eletrónica)
I&D	Investigação e Desenvolvimento
FR	Fator resposta (Teste de Rikilt)
ISO	International Standard Organization
LIC	Limite Inferior de Controlo
LIE	Limite Inferior de Especificação
LSC	Limite Superior de Controlo
LSE	Limite Superior de Especificação
LD	Limite de Deteção
LQ	Limite de Quantificação
µg/L	Micrograma por litro
mL	Mililitro
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massa)
ng/L	Nanograma por litro
PG	Valor teste associado à gama de trabalho
PI	Padrão Interno
PCP	Pentaclorofenol
TCA	2,4,6- Tricloroanisol
TCP	2,4,6- Triclorofenol
TeCP	2,3,4,6 - Tetraclorofenol
SPME	Solid Phase Micro Extraction (Microextração em fase sólida)
UI	Unidade industrial
VT	Valor teste associado à linearidade (Teste de Mandel)



# 1 Introdução

## 1.1 Apresentação da Empresa

A corticeira Amorim SPGS, SA., foi criada em 1870 e detém uma posição de liderança mundial na indústria da cortiça. Apresenta um vasto leque de produtos de origem natural e de alta qualidade, desde rolhas, têxteis, compósitos, revestimentos e isolamentos que abrangem cerca de 64% do volume de negócio.

Os principais mercados dos produtos produzidos são Austrália, Chile, África do Sul, Argentina, os EUA e os mercados mais clássicos como Portugal, França, Itália, Espanha e Alemanha.

A empresa é constituída por 30 unidades industriais espalhadas pelo mundo, sendo que em Portugal se encontram 8 destas. São elas a Amorim & Irmãos, a Champcork, a De Sousa, a Equipar, a Top Series, a Amorim Distribuição, a Vasconcelos e Lyncke e a Portocork. Existem ainda 17 *sales companies*, estrategicamente localizadas nos mais importantes países produtores de vinho (Corticeira Amorim, 2015).

Na unidade industrial (Portocork), é onde se encontra atualmente o departamento do I&D sob a responsabilidade do Doutor Miguel Cabral e que tem como principal missão o combate ao contaminante TCA que dá o sabor a mofo e bafio presente em alguns vinhos.

## 1.2 A Cortiça

A cortiça é a casca do sobreiro (*Quercus suber L*), tratando-se de uma matéria-prima totalmente natural, com propriedades únicas que lhe conferem um caráter inigualável. É leve, impermeável a líquidos e a gases, elástica e compressível, isolante térmico e acústico, tem uma combustão lenta e é muito resistente ao atrito. Além disso, é totalmente biodegradável, renovável e reciclável. As características descritas provêm da estrutura molecular da cortiça, que se apresenta composta por células microscópicas preenchidas com um gás semelhante ao ar atmosférico, e as paredes celulares são maioritariamente formadas por suberina, lenhina e polissacarídeos, apresentando também compostos extrativos como cinzas, compostos fenólicos e ceroides (Fortes et al., 2004).

O sobreiro é uma espécie florestal autóctone que possui enorme importância em termos climáticos, porque fixa quantidades significativas de  $CO_2$  contribuindo para diminuir as elevadas amplitudes térmicas e a secura características do clima mediterrânico. Este apresenta uma longevidade entre 250-350 anos e tem a capacidade de regenerar a sua casca, permitindo assim a sua exploração económica prolongada.

A extração da casca do sobreiro só é permitida, por lei, quando o perímetro da árvore à altura do peito (PAP) atinge os 70 cm, o que acontece após 20-35 anos. Nesta fase é extraída a

cortiça virgem que é muito irregular, pelo que não é usada em rolhas de cortiça natural, mas sim utilizada para granular e posteriormente usada por exemplo em pavimentos. Para o fabrico de rolhas de cortiça natural, apenas a cortiça da terceira tiradia é usada. A partir daqui e de 9 em 9 anos, o sobreiro é descortiçado e a cortiça usada para o fabrico de rolhas de cortiça bem como toda uma panóplia de outros produtos.

A gestão dos montados de sobre nomeadamente com a exploração da cortiça, gera importantes rendimentos ao nível local e regional tornando-se portanto, um fator socioeconómico que permite manter o emprego e o equilíbrio no mundo rural.

Com uma história milenar, a cortiça é um dos produtos naturais mais apreciados internacionalmente. Tida como uma joia da economia portuguesa, a indústria corticeira, para além da forte relação com a cultura vinícola, expande, também, a sua aplicabilidade a outras gamas de produtos, assegurando uma posição de referência no mercado mundial.

Apesar de tais marcos, a presença da cortiça no mercado nem sempre esteve assegurada. Por volta do ano 2000, o aparecimento de vedantes alternativos, nomeadamente vedantes sintéticos, aliados à muito frequente contaminação das rolhas de cortiça com TCA, pôs em causa a continuação da era de ouro para este vedante natural. A 2 de Outubro de 2002 uma situação inusitada acontece em Nova Iorque, na *Grand Central Station* uma cerimónia fúnebre da "morte da cortiça": a presença de um caixão contendo o corpo de Thierry Bouchon, *Bouchon* (rolha) que na sua juventude era conhecido por "Corky", morre após doença prolongada causada pela "toxina" 2,4,6-TCA (escrevia *Wine Spectator*). O caixão trazido por Randall Grahm é rodeado por grupo de pessoas formalmente vestidas de preto e de luto pelo acontecimento, cuja cerimónia foi acompanhada por um discurso elogioso proferido pela convidada Jancis Robinson (jornalista britânica e crítica de vinhos): " *Oh cork, Oh cork, Oh corky, Corky cork! How we shall miss thy cylindrical barky majesty. Thy uniquely obstructive presence in the bottlenecks of our favourite drinks*" [sic](Jancis Robinson, 2002).



Figura 1: Ilustração representativa da "morte da cortiça".



Tais afirmações só acentuavam os negros tempos que a cortiça passava e onde se verificou a ascensão dos vedantes sintéticos, já vistos como o futuro da indústria rolheira.

Este tipo de episódios levou a indústria corticeira a aplicar novos métodos de análise, deteção e eliminação de TCA e, desde 2009, que o sector mostra sinais de profunda melhoria, para os quais tem contribuído o aumento das exportações que representam cerca de 3% do total das exportações nacionais e rondam os 900 milhões de euros anuais, o que faz de Portugal o maior exportador de rolhas e outros produtos de cortiça do mundo.

### 1.3 2,4,6-Tricloroanisol

Desde a árvore até à garrafa, a cortiça passa por diversas condições/processos que favorecem o aparecimento de microrganismos e conseqüentemente dos seus metabolitos, muitos deles responsáveis por aromas indesejáveis. Estes aromas poderão, quando presentes na rolha de cortiça, ser transmitidos ao vinho, afetando as suas propriedades organoléticas e provocando um decréscimo na qualidade.

TCA (2,4,6-Tricloroanisol) é um composto cuja formação ocorre devido à interação de microrganismos com compostos à base de cloro, geralmente os clorofenóis, que eventualmente poderão estar na cortiça. O TCA é quimicamente estável mesmo em solução hidroalcoólica, o que o torna passível de contaminar os vinhos ao longo do tempo. É praticamente insolúvel em água, no entanto solúvel em álcool e benzeno (entre outros solventes) e sublima, lentamente, à temperatura ambiente.

Apesar de atualmente na União Europeia ser proibido o seu uso, os clorofenóis (2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) e pentaclorofenol (PCP)) foram durante muitos anos utilizados como inseticidas e fungicidas, tendo contaminado o ambiente, nomeadamente os solos, os lençóis freáticos, etc. (Chaudhry *et al.*, 2004). Também foram muito usados no tratamento antimicrobiano da madeira, nomeadamente a usada em paletes, vigas do teto, etc. Os clorofenóis são derivados dos fenóis que se combinam com um ou mais átomos de um halogéneo, neste caso específico o cloro. Na presença de microrganismos, nomeadamente fungos filamentosos, os clorofenóis são transformados em cloroanisóis pela ação de *O*-metiltransferases (Figura 2) (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003).

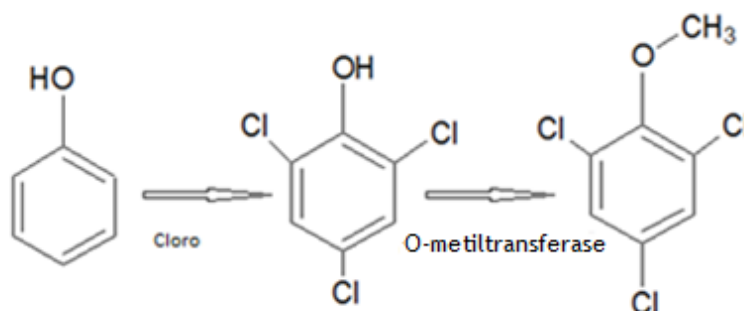


Figura 2: Mecanismo de formação do TCA.

Existem várias formas de analisar o TCA presente em produtos de cortiça, e uma das preferidas da indústria corticeira é a análise sensorial. Os cloroanisóis apresentam-se como compostos voláteis e que são facilmente detetados através do paladar e do olfato, uma vez que se caracterizam por baixos limiares de perceção sensorial, quer em água quer em soluções alcoólicas e vinho. Na Tabela 1 indicam-se os limites de perceção sensorial dos contaminantes mais comuns da cortiça.

Tabela 1: Limiares de perceção sensorial dos principais contaminantes da cortiça.

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

## 1.4 Contributos do trabalho

TCA (2,4,6-Tricloroanisol) apresenta-se como um problema de extrema importância nas rolhas de cortiça o que incentivou e continua a incentivar, a indústria a investir cada vez mais na resolução deste problema, através da otimização de processos com vista à sua resolução. De facto, a presença de TCA em rolhas de cortiça, pode ser responsável pela contaminação de vinhos, mesmo estando o TCA em concentrações muito baixas.

Um dos caminhos seguidos pela A&I, para o controlo dos problemas de TCA nos seus produtos, foi a implementação de um método de análise para o controlo deste analito em rolhas de cortiça. Este método permitiu que a empresa tivesse uma real noção da contaminação de cada lote de rolhas e ao mesmo tempo levou à produção de rolhas com valores de TCA muito

mais controlados. A quantidade de lotes produzidos, e conseqüentemente a quantidade de análises de TCA requeridas, tornaram premente a necessidade de desenvolver um método de análise de TCA expedito, para que o número de amostras analisadas seja significativo.

Recentemente a empresa decidiu auditar o seu método de análise de TCA por uma empresa externa, para tentar perceber as eventuais razões que estavam na base das discrepâncias existentes nos valores de TCA obtidos entre o laboratório de I&D da A&I e outros laboratórios externos nomeadamente nos Estados Unidos.

Este projeto resulta da referida auditoria, pois houve um conjunto muito significativo de propostas de alteração, parte das quais foram abordadas neste trabalho.

Como resultado final do mesmo, foi desenvolvido, validado e implementado um método para a quantificação de TCA, mais preciso e exato do que aquele que a empresa tinha em vigor.

## **1.5 Organização da Tese**

A presente tese está dividida em 7 capítulos.

No capítulo um faz-se uma breve introdução do Grupo Amorim, e da importância que a indústria da cortiça tem para Portugal e faz-se uma breve introdução do principal “inimigo” dos vedantes naturais, o TCA, que influencia a qualidade dos vinhos.

No segundo capítulo é abordada toda a problemática do TCA, sendo salientada a importância da análise cromatográfica

No terceiro capítulo são descritos os parâmetros que permitem a validação de um método analítico.

O quarto capítulo, Descrição Técnica, centra-se na explicação dos materiais, equipamentos e métodos bem como no desenho experimental realizado para o desenvolvimento de um novo método de quantificação de TCA. Bem como são evidenciados os métodos estudados durante a realização deste projeto.

No quinto capítulo são descritos pormenorizadamente os resultados obtidos para cada método estudado.

No sexto capítulo é feita a análise dos resultados obtidos.

No sétimo capítulo são apresentadas as conclusões baseadas nas deduções consideradas pertinentes e sustentadas pelos resultados obtidos no capítulo anterior bem como é feita a avaliação do trabalho realizado, fornecida a apreciação relativa à concretização dos objetivos propostos e as limitações encontradas. São referidas ainda possibilidades de trabalhos futuros, e a apreciação pessoal do trabalho desenvolvido.



## 2 Contexto e Estado da Arte

Os produtores de vinho há muito que consideram a rolha de cortiça natural como o vedante predileto da indústria vinícola.

Nos anos 90 a cortiça foi considerada como a principal fonte de TCA e outros compostos que poderiam contaminar os vinhos. Devido a este facto, vedantes alternativos entraram no mercado, o que provocou uma ameaça à liderança das rolhas de cortiça (Afonso, 2009). De facto, estes vedantes chegaram ao mercado e rapidamente tomaram conta de uma parte preocupante do mesmo, o que levou a perdas significativas da cota de mercado das rolhas de cortiça, mas ao mesmo tempo levou a indústria corticeira a acordar para uma realidade que não conhecia: a existência de concorrência. Este facto levou ao maior cuidado na produção das rolhas de cortiça, ao seu controlo e à aposta forte na inovação, sendo a A&I um claro exemplo disso mesmo.

Uma das principais razões para o aparecimento de vedantes alternativos prendeu-se com o problema do TCA nas rolhas de cortiça. Este pode estar no vinho mas resultante de diferentes proveniências, tais como contaminação de plásticos, borrachas, cartões, etc., contudo indiscutivelmente que a grande fonte de contaminação para o vinho é as rolhas de cortiça (*Baker et al., 2001*).

Perante esta realidade, nos últimos anos as empresas corticeiras desenvolveram várias estratégias de combate ao TCA.. As ações implementadas assentam em três aspetos: prevenção, descontaminação e controlo de qualidade. A prevenção consiste na implementação de várias medidas que previnam a formação de TCA durante a produção de rolhas, desde a floresta até ao cliente final. A descontaminação consiste na eliminação de TCA e outros compostos voláteis dos diferentes produtos de cortiça utilizados na produção de rolhas e, por fim, o controlo de qualidade que é realizado em quase todas as etapas do processo produtivo. (*Cabral et al., 2009*).

Este controlo de qualidade é efetuado nos diferentes laboratórios das unidades industriais da A&I, principalmente no que diz respeito à determinação dos parâmetros físico-mecânicos tais como absorção, relaxação, recuperação, classe visual, etc.. No departamento de I&D é feito o controlo de TCA e de outros contaminantes eventualmente responsáveis por aromas desagradáveis, quer através da análise cromatográfica quer por análise sensorial.

A quantificação de TCA por métodos repetíveis e passíveis de serem efetuados a nível industrial, só há cerca de 15 anos foi desenvolvida. Foi no Laboratório ETS, St. Elena, Califórnia, que a metodologia de cromatografia em fase gasosa acoplada a microextração em fase sólida (SPME) foi implementada com sucesso à molécula de TCA e um estudo

aprofundado da interação de TCA com a cortiça foi também realizado por especialistas daquele laboratório (ETS, 2000).

Este estudo, usando macerações de rolhas de cortiça em solução etanólica a 10%, mimetizando o que se passa numa garrafa de vinho, provou que a quantidade de TCA transmitida da rolha de cortiça para a maceração é resultado da combinação entre a localização de TCA na rolha, as propriedades físicas deste e a sua quantidade total presente na rolha. Mais recentemente, foi provado que o TCA presente nos interstícios da rolha de cortiça natural não migra para a superfície do vedante, e que a contaminação do vinho ocorre apenas por contacto direto da superfície da rolha com o líquido (*Lopes et al., 2011*).

Aquele estudo provou ainda que ao final de 24 horas de maceração de uma rolha de cortiça em solução etanólica, era atingido o equilíbrio no que ao TCA diz respeito; isto é TCA é lixiviado da superfície da rolha para a solução etanólica, tendo a sua concentração atingido o ponto de equilíbrio ao fim de 24 horas. Novos pontos de análise, nomeadamente após 48 ou 96 horas, não contribuíam para o aumento da concentração de TCA naquela solução.

A aplicação desta metodologia de análise aos lotes de rolhas de cortiça apresentava à partida um problema relacionado com o número de análises necessárias para evidenciar a real contaminação de um lote de rolhas. De facto, cada lote é composto por um número muito significativo de peças de cortiça (discos e rolhas, entre outras), pelo que uma amostragem representativa do lote implicaria tal número de amostras que tornava impossível a aplicação deste método de análise na rotina de controlo de qualidade na indústria. A solução encontrada foi a de usar macerações compostas de dez ou mais rolhas, tornando a amostragem mais representativa do lote em causa.

O facto de este método de análise usar macerações compostas, se por um lado é vantajoso, pelo que foi explicado em cima, por outro apresenta uma desvantagem relacionada com a possibilidade de absorção de TCA por rolhas que não estão contaminadas na maceração, originando uma concentração final resultante das médias das concentrações envolvidas na maceração, o que poderá de alguma forma mitigar a real contaminação do lote. Apesar desta desvantagem, ficou provado que a quantificação de TCA extraível se traduz num bom indicador da quantidade de TCA total presente nos lotes de rolhas de cortiça (*Hérve et al., 2004*).

O laboratório ETS desenvolveu a sua pesquisa com o primordial objetivo de desenvolver um método confiável e viável capaz melhorar o rastreio e a deteção de TCA em lotes de cortiça. A primeira fase desse projeto passou pela descoberta de novas ferramentas analíticas que previam a criação de um teste quantitativo e não destrutivo, capaz de gerar melhorias na sensibilidade e confiança relativamente aos métodos já existentes no mercado. Foram realizados testes que analisaram a transferência de TCA da cortiça para o macerado e

estudadas quais as condições ótimas que favoreciam o aparecimento de TCA na solução, bem como a comparação entre a quantidade de TCA presente nas macerações e o TCA possivelmente encontrado em vinhos engarrafados (Hérve et al.,2004).

O resultado do estudo revelou uma nova metodologia que adota uma combinação do uso de cromatografia gasosa (GC) acoplada à microextração em fase sólida (SPME) e a utilização da espectrometria de massa (MS) como meio de deteção. A utilização deste novo método não só elimina a possibilidade de falsos positivos e falsos negativos encontrados em análises sensoriais, como fornece informações quantitativas da contaminação do TCA. Esta combinação de técnicas criou um sistema de análise preciso e capaz de quantificar a presença de TCA em quantidades menores que o limiar de deteção humano.

Em resultado do método para a quantificação de TCA desenvolvido pelo ETS, a indústria corticeira de forma geral, e o Grupo Amorim de forma particular, implementaram este método de forma intensiva no controlo de qualidade das rolhas produzidas. Em consequência disso, muitos cromatógrafos de fase gasosa acoplados a SPME foram adquiridos pela indústria, mas de forma a adaptar esta análise à realidade industrial, os detetores usados são maioritariamente ECD e não MS e as macerações passaram a ser feitas com 10 rolhas.

No verão de 2015 foi efetuada uma auditoria externa ao método de análise de TCA implementado na A&I. Foram reportadas não conformidades e oportunidades de melhoria que a empresa decidiu implementar com vista a melhorar a qualidade dos resultados produzidos.

O projeto apresentado neste trabalho é consequente a esta auditoria. Nem sempre as sugestões apresentadas pela equipa auditora podem ser implementadas em contexto industrial, na medida em que tornariam a metodologia tão demorada que não útil naquele contexto. Assim, este projeto pretendeu por um lado atender às especificações técnicas apresentadas no relatório de auditoria e ao mesmo tempo considerar as necessárias particularidades resultantes de ser uma técnica a aplicar em contexto industrial

Assim, neste trabalho foi revista a metodologia de análise de TCA de forma a garantir a precisão e exatidão dos resultados, o que implicou alterações importantes nos parâmetros da curva de calibração e nos tempos de abertura/fecho das válvulas do injetor, bem como nos tempos de adsorção da fibra e testes com reformadas rampas de temperatura. Com estas novas condições foram encontrados os parâmetros de validação para este novo método de análise que seguidamente foi implementado no laboratório.





## 3 Parâmetros de validação de um método analítico

A validação de um método analítico tem como primordial objetivo avaliar o método e as variáveis inerentes à obtenção de resultados.

Existem vários parâmetros que podem influenciar a validação/rejeição de um método. Estes parâmetros, inerentes à validação dos métodos cromatográficos estão objetivamente descritos nas diferentes normas que existem para este efeito, ISO 8466-1, ISO 8466-2 e ISO 13528-2005, as quais foram seguidas no presente trabalho (RELACRE, 2000).

### 3.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho está relacionada com o traçado de uma curva de calibração e com os testes de homogeneidade de variâncias.

De acordo com a norma ISO 8466-1 é recomendada a análise de dez pontos de calibração (não devendo ser em número inferior a cinco) que se distribuem de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes.

Assim, determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão ( $S_1^2$  e  $S_{10}^2$ ) do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n-1}; \text{ sendo que } x_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j})}{n}; \text{ Para } i=1 \text{ e } i=10 \quad (1)$$

onde:

$i$  = o número do padrão (neste caso  $i$  vai de 1 a 10)

$j$  = o número de repetição efetuadas para cada padrão

$\bar{y}_i$  = Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração;

$n$  = Número de padrões de calibração;

De seguida são testadas as variâncias com o intuito de examinar se existem diferenças significativas entre extremos, nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste PG:

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \text{ se } S_{10}^2 > S_1^2 \text{ ou } PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}; \text{ se } S_{10}^2 < S_1^2 \quad (2)$$

Seguidamente, compara-se o valor-teste (PG) com o valor tabelado da distribuição  $F$  de *Snedecor/Fisher*, para  $n-1$  graus de liberdade, de onde vem a premissa:

-se  $PG \leq F$ : as diferenças de variância não são significativas, pelo que a gama de trabalho está bem ajustada.

-se  $PG > F$ : as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter  $PG \leq F$ .

## 3.2 Linearidade

De acordo com a ISO 8466, a linearidade de um método pode ser avaliada através de um modelo estatístico a partir de um conjunto de pares ordenados, e calculando a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não linear (ISO 8466-2), bem como os respetivos desvios-padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ . Neste cálculo, é recomendado o uso de pelo menos cinco pontos representativos dos padrões em estudo e que são a relação entre a concentração de TCA e o sinal produzido pela análise da amostra.

Existem vários testes que permitem estudar a linearidade associado a uma determinada reta de calibração, dos quais se destacam a análise dos resíduos, o teste de *Mandel* e o teste de *Rikilt* e associados à curva de calibração.

### • Análise dos resíduos

A análise dos residuais é baseada na mais simples verificação dos parâmetros devolvidos pela reta de calibração, isto é, a relação entre a concentração e o sinal obtido da análise dos padrões permite traçar uma reta de calibração. Desta, retira-se facilmente a sua equação de forma matemática  $y = bx + a$ , onde  $b$  representa o declive e  $a$  a ordenada na origem correspondente e a partir da qual se pode retirar o valor residual tomando a seguinte equação:

$$V_{residual} = \frac{sin\text{al} - \text{sin}\text{al}_{estimado}}{\text{sin}\text{al}_{estimado}} \times 100 \quad (3)$$

Para uma correta análise da linearidade com base nos residuais, deve ter-se em atenção que a sua soma deve ser próxima de zero.

### • Teste de *Mandel*

A aplicação deste teste estatístico permite avaliar a gama de linearidade em que o estudo está a decorrer, e fornece a certeza sobre se o método pode ser ou não usado na representação dos pontos experimentais tendo como referencia o desvio padrão residual entre o primeiro e o ultimo padrão analisado para o cálculo do valor teste (VT).

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(y_i - (a + b x))]^2}{N - 2}} \quad (4)$$

$$S_{\frac{y}{x}(2^{\circ})} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(y_i - (a + b x + c x^2))]^2}{N - 3}} \quad (5)$$

$$DS^2 = (N - 2)S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3)S_{\frac{y}{x}(2^{\circ})}^2 \quad (6)$$

$$VT = \frac{DS^2}{S_{\frac{y}{x}(2^{\circ})}^2} \quad (7)$$

onde:

$DS^2$  = diferença de variâncias;  $S_{y/x}$  = desvio residual e  $N$  = número de padrões.

O valor de teste de *Mandel* é comparado com a distribuição F de *Fisher /Snedcor* para um grau de confiança de 95% e posteriormente é tomada a decisão de linearidade/não linearidade associado aos pontos experimentais representados.

Se  $VT \leq F$ : a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.

Se  $VT > F$ : a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível até se atingir a linearidade.

- **Teste de *Rikilt***

Analogamente aos métodos em cima referenciados, o teste de *Rikilt* tem como função a determinação da gama de linearidade associado a um determinado método, mas tendo por base a análise ponto-a-ponto em cada concentração/sinal do método em estudo.

Este teste analisa o fator de resposta (FR), expresso em percentagem, que estabelece a relação entre o sinal produzido pelo analito/PI e a concentração de substância a analisar. Uma das principais razões para usar o FR passa pela compensação de não ser possível reproduzir injeções num cromatógrafo e por isso, é realizado o teste de *Rikilt* para analisar a linearidade associada ao método (van Trijp, 1991).

### 3.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método (ou equipamento) distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração. Este conceito de

sensibilidade (associado à magnitude do sinal), não deve ser confundido com limite de detecção, que está associado à capacidade de resolução do sinal.

### 3.4 Limiares analíticos

- **Limite de detecção**

Corresponde ao início da gama em que é possível distinguir, com uma confiança de 95 %, o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente da amostra. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato. De notar que uma leitura inferior ao limite de detecção não significa necessariamente, a ausência do analito a medir, mas sim que com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa é inferior a um determinado valor.

$$LD = X_0 + K \times s_0 \quad (8)$$

Se se considerar que a distribuição normal de erros é *Gausseana* então toma-se o valor de  $K \cong 3,3$  para um nível de confiança de cerca de 99,7%. Assim:

$$LD \cong X_0 + 3,3 \times s_0 \quad (9)$$

onde:  $X_0$  Corresponde à média das concentrações do menor padrão de analito;  
 $s_0$  Corresponde ao desvio padrão associado à concentração do menor padrão de analito.

- **Limite de quantificação**

Corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10 %) para se poder efetuar uma deteção quantitativa. Corresponde à menor pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração do qual se exclui o branco.

De notar que este limite deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida são satisfatórias. Este teste pode ser realizado através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação para estes padrões não deve exceder 10%.

$$LQ = X_0 + 10 \times s_0 \quad (10)$$

onde:  $X_0$  = A média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina;

$s_0$  = Desvio padrão associado a  $X_0$ .

### 3.5 Precisão

A precisão é um termo que pretende medir a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Esta dispersão pode ser avaliada segundo três medidas: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária.

Para determinar a repetibilidade de um método efetuam-se uma série de medições sobre uma mesma amostra, em condições de repetibilidade. Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método.

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios, diferentes operadores e diferentes equipamentos.

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: operadores ou equipamentos diferentes.

### 3.6 Exatidão

A exatidão pode ser definida como a capacidade de recuperação de um contaminante presente numa amostra. A exatidão traduz-se pela aproximação entre as médias dos valores obtidos e um valor de referência que é aceite como verdadeiro. Na prática, a exatidão pode ser estimada através da realização de ensaios de recuperação. Estes baseiam-se na operação de escolher várias amostras (padrões reais) com uma determinada matriz de concentração definida e fortifica-la com um acréscimo de contaminante e assim determinar a recuperação obtida.

$$Rec (\%) = \frac{[C_{obtida} - C_{analito\ nativo}]}{C_{adicionada}} \times 100 \quad (11)$$

Note-se que quanto mais perto de 100% melhor, no entanto, para que o método seja considerado exato, necessita ter recuperações entre 85 e 100% (ISO 8466).

## 4 Descrição Técnica

Neste capítulo encontra-se descrito todo o trabalho desenvolvido e realizado ao longo deste trabalho. Estudaram-se as melhorias possíveis de aplicar ao método de análise do TCA já existente, bem como se elaboraram novos métodos de análise SPME/GC-ECD capazes de corresponder às necessidades exigidas pela auditoria interna realizada ao laboratório e pelos pedidos de análises que constituem parte da rotina laboratorial do I&D da A&I.

Foram delineadas duas estratégias que passavam, inicialmente, pela construção e validação de retas de calibração com características intrínsecas ao método cromatográfico e, posteriormente recorreu-se à otimização de parâmetros capazes de fornecer uma análise mais precisa e exata do método já existente.

Projetaram-se e analisaram-se quatro retas que se mostrassem lineares, equidistantes entre pontos e capazes de obter resultados precisos e exatos. Foram preparados padrões internos de concentração diferente para cada reta e analisados os picos e as áreas correspondentes no cromatógrafo (GC-ECD).

Adicionalmente foram testados outros parâmetros nomeadamente rampas de temperatura, alteração dos tempos de abertura/fecho das válvulas em modo *Split/Splitless*, a influência do tempo de exposição da fibra no *headspace* do vial e consequentemente o tempo de extração de TCA. Estes estudos tiveram como objetivo melhorar as áreas dos picos de TCA e por esta via melhorar os respetivos resultados.

### 4.1 Material e equipamento

#### 4.1.1 Materiais:

- Tubos de cromatografia (*Vials*) de 20 mL;
- Cápsulas de 20 mm com septo de silicone/teflon;
- Fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm (Supelco, Ref 57301);
- Coluna apolar Zebron com fase estacionária de difenilpolidimetilsiloxano 30mx0,25mmx0,25µm (Ref ZB-5 MS);
- Macro Pipeta, Socorex 10 mL;
- Micropipeta, Gilson, Pipetman, 200 µL;
- Balão volumétrico 100 ± 0,1 mL;
- Balão volumétrico 2000 ± 0,6 mL;
- Proveta 250 ± 1,0 mL;
- Alcoolímetro.

### 4.1.2 Reagentes

- Álcool etílico 96% (V/V);
- Água desionizada;
- 2,4,6-Tricloroanisol (p.a), Sigma Aldrich;
- 2,3,6-Tricloroanisol (p.a), Sigma Aldrich;
- Hélio, B50, pureza 99.999%, Air Liquid;
- Azoto, B50, pureza 99.999%, Air Liquid;
- Cloreto de sódio 99%.

### 4.1.3 Equipamento utilizado

O laboratório I&D da A&I possui dez cromatógrafos (GC-ECD) de três marcas diferentes. São eles:

- Varian, modelo CP-3800 GC (GC-ECD's número 1,2,3,4 e 5);
- Bruker, modelo 450-GC (GC-ECD 6);
- Bruker Scion, modelo436-GC (GC-ECD's número 7,8,9 e 10), tendo para o projeto em causa sido utilizado o GC-ECD8 que usa o *software Compass CDS* e o auto-analisador utiliza o software Cycle Composer PAL 1.
- Balança analítica Kern, modelo ABS120-4, resolução 0,1 mg.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Preparação das soluções

- **Preparação de soluções mãe de TCA:** segue o procedimento que está descrito no Anexo1
- **Preparação das soluções de padrão interno**

O padrão interno é preparado com o objetivo de criar uma referência para a determinação da concentração de TCA presente numa determinada amostra. A escolha do padrão interno obedece a requisitos tais como possuir características semelhantes ao analito a analisar, uma vez que serve de referência mas, por outro lado, ter características físico-químicas diferentes para que o tempo de retenção seja diferente de modo a não coeluir com o analito. Esta característica, no caso do 2,3,6-TCA, resume-se à alteração da posição do um grupo cloro que culmina na alteração da eletronegatividade do composto. Assim sendo e com o intuito da obtenção de uma boa referência, deve ter-se em conta a gama de trabalho em vigor e mediante isso, prepara-se uma concentração de padrão interno que corresponda ao valor mais alto da gama de trabalho usada. O padrão interno é preparado com base no procedimento

descrito no anexo 2, variando a sua concentração em função das características de cada um dos métodos de análise de TCA desenvolvidos (ver secção 4.3).

- **Preparação dos padrões de calibração**

Os padrões de calibração são soluções com base hidroalcoólica a 12% (que simulam o conteúdo alcoólico do vinho) à qual se adiciona o padrão interno (de concentração específica de acordo com o método a ser utilizado) e um determinado volume de analito, que varia de acordo com a obtenção da concentração de padrão desejada. A preparação dos padrões de calibração segue o seguinte procedimento:

- 1- adicionar 2 g de cloreto e sódio num *vial* de 20 mL;
- 2- pipetar 10 mL de solução hidroalcoólica a 12% (v/v);
- 3- pipetar 100  $\mu$ L de PI;
- 4- pipetar um determinado volume de 2,4,6-TCA de acordo com a concentração final de analito desejada (consultar o anexo 3).

#### 4.2.2 A análise cromatográfica

Os *vials* contendo as amostras são colocados no suporte do *auto-sampler* (Figura 3a) e a sequência de amostras é preenchida no *software* do equipamento, de acordo com a sua codificação. De seguida, o braço robótico do auto-analisador pega numa amostra e coloca-a no incubador para a pré-aquecer. Esta fase é muito importante para o processo, uma vez que o TCA volatiliza, após atingir o ponto de ebulição e vai para o *headspace*, por ação de calor, agitação e cloreto de sódio (a saturação da solução hidroalcoólica com NaCl diminui a solubilidade do TCA na solução, facilitando a passagem do TCA para a fase de vapor).

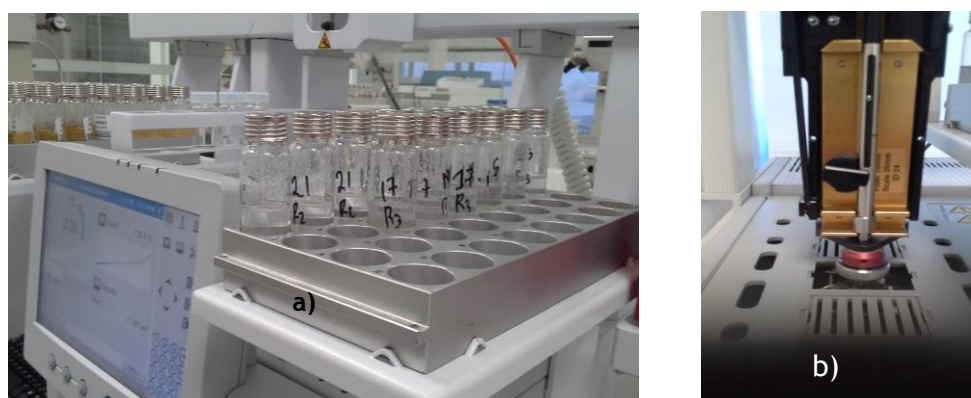


Figura 3:SPME: a) Disposição dos vials no suporte do auto-sampler; b) Momento da dessorção do TCA da fibra de PDMS no injetor.

De seguida a fibra é introduzida no *headspace* do vial onde ocorre a adsorção do TCA ao PDMS. Posteriormente a fibra é introduzida no injetor onde ocorre a vaporização e



posteriormente a dessorção de todos os analitos que foram adsorvidos, entre os quais TCA (Figura 3b). As várias peças de equipamento podem ser visualizadas no Anexo 4.

Após a vaporização do analito no injetor, a amostra é arrastada para a coluna (local onde se inicia a corrida cromatográfica) onde se dá o fenómeno da partição com a fase estacionária líquida da coluna cromatográfica. Após percorrer toda a coluna, o composto chega ao detetor e fruto da diferença de eletronegatividade, dá origem a “picos” correspondentes aos compostos presentes na amostra que são identificados com base nos tempos de retenção próprios de cada componente.

O equipamento utilizado para análise de cromatografia em fase gasosa com captura de eletrões (GC-ECD) é composto por várias peças de equipamento, que juntas permitem a obtenção de um cromatograma a partir do qual quantificamos o analito pretendido. Entre elas estão o incubador, a fibra, o injetor, a coluna, o detetor e o forno (Figura 4).

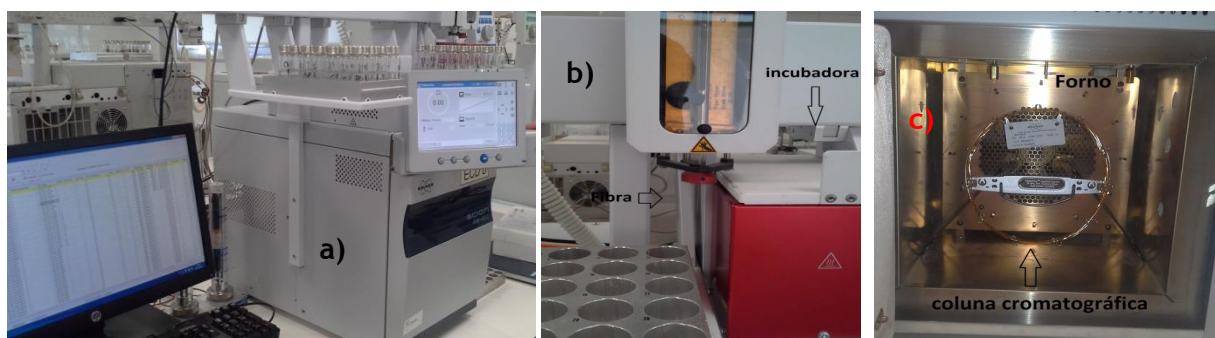


Figura 4: SPME/GC-ECD: a) Vista geral; b) Pormenor SPME; c) Forno e coluna cromatográfica.

#### 4.2.3 Observação de resultados e garantia de qualidade

Da análise em cima descrita resulta um cromatograma que apresenta picos referentes aos vários compostos encontrados na amostra analisada. Conhecendo o tempo de retenção de cada analito, é possível identificar quais os picos que representam os componentes presentes na solução: neste caso específico, o analito e o padrão interno (Figura 5).

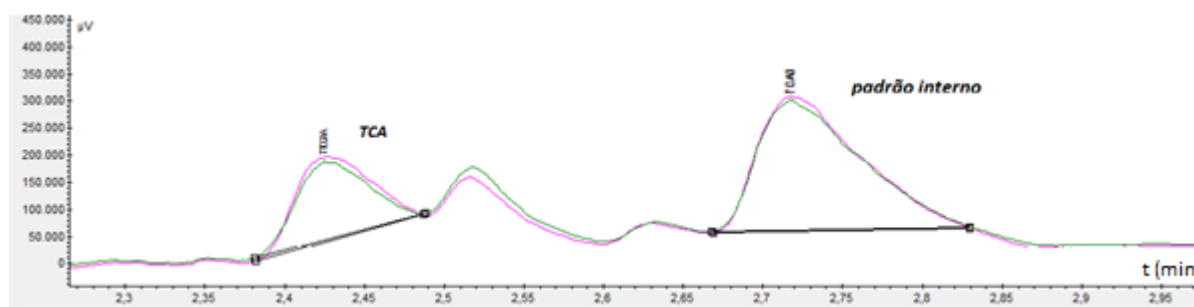


Figura 5: Cromatograma típico onde se destacam o pico de TCA e o pico de padrão interno.

Os dois componentes saem em tempos distintos uma vez que possuem diferentes eletronegatividades apesar de possuírem a mesma estrutura funcional, este facto permite a

sua detecção. Recorrendo à integração dos picos é possível determinar as áreas correspondentes ao padrão interno e ao analito e conseqüentemente calcular a concentração de TCA que a amostra analisada possui.

De modo a garantir a qualidade das análises cromatográficas, são analisados padrões de controlo que foram preparados tal como os padrões de calibração (consultar secção 4.2.1). Normalmente os padrões de controlo são colocados no final de cada sequência de análises, uma vez que têm como função determinar se os resultados obtidos estão corretos, e verifica a exatidão do método empregue, dado que aqueles padrões têm uma concentração conhecida.

A análise destes padrões de controlo ao longo de determinados períodos de tempo permite construir cartas de controlo que servem como medida da exatidão dos resultados cromatográficos.

### 4.3 Metodologias abordadas

#### 4.3.1 Método de referência de análise de TCA

Atualmente no laboratório do I&D da A&I a análise de TCA é realizada usando um método cuja curva de calibração é constituída pelos seguintes padrões: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 ng/L e que usa como padrão interno uma solução de concentração 20,0 ng/L.

A preparação destes padrões foi efetuada de acordo com o Anexo 1 e apesar de não possuir equidistância entre pontos, possui um elevado número de pontos oriundos da gama baixa de concentrações. Este facto resulta da necessidade da empresa usar as gamas de baixa de concentração de TCA como limiares de aceitação/rejeição dos lotes analisados. Um parâmetro importante neste método é o tempo que a fibra fica a adsorver os analitos no *headspace* do *vial* e que se situa nos 8 minutos.

Este método realiza as análises recorrendo ao modo *Split/Splitless*, que consiste na abertura de uma válvula presente no injetor e que automaticamente impele a saída da amostra (agora considerada resíduo) para a atmosfera. Neste método, a abertura desta válvula ocorre ao fim de 4 minutos. Outro dos parâmetros a ter em conta num método de análise cromatográfico é a rampa de temperatura a que o forno fica sujeito aquando da corrida da amostra ao longo da coluna.

O método de referência possui uma rampa de temperatura que se inicia a 90°C e aumenta gradualmente 15°C/min até aos 265°C. Assim, todo o processo de análise demora 12 minutos para cada amostra.

#### **4.3.2 Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA (0,5 a 5,5 ng/L)**

A metodologia de gama baixa foi pensada para concentrações baixas de TCA. De facto estas concentrações são aquelas que representam os limiares de aceitação/rejeição dos lotes de rolhas de cortiça e por isso têm uma importância crucial para a indústria corticeira.

Assim, este método contempla os pontos 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 ng/L e um padrão interno de 5,5 ng/L.

Esta nova abordagem faz uso do mesmo tempo de exposição da fibra (8 minutos), a abertura da válvula do modo *Split/Splitless* (4 minutos) e a rampa de temperatura usados no método de referência e acima descrita.

#### **4.3.3 Metodologia para gama alta de concentrações de TCA (0,5 a 28 ng/L)**

Esta metodologia foi pensada na perspectiva de incorporar a gama alta de concentrações de TCA, uma vez que o método anteriormente descrito (ver 4.3.2) apenas permite a análise até 5,5 ng/L, concentração por vezes inferior ao valor apresentado por algumas das amostras de rotina analisadas pelo laboratório.

Assim os novos padrões de calibração testados foram 0,5; 6,0; 11,5; 17,0; 22,5 e 28,0 ng/L e com um padrão interno de 28,0 ng/L.

Esta metodologia possui o ponto 0,5 ng/L com a intenção de integrar as abordagens gama alta e gama baixa simultaneamente, se assim for pretendido, fornecendo uma análise detalhada para cada uma das gamas de concentração.

Nesta nova curva de calibração foram alterados os parâmetros operacionais utilizados no método de referência. Nomeadamente tempo de exposição da fibra ao TCA presente no *headspace* do *vial* de 24 minutos e tempo da abertura de válvula do modo *Split/Splitless* de 2 minutos.

#### **4.3.4 Metodologia para gama intermédia de concentrações de TCA (0,5 a 11 ng/L)**

Esta metodologia foi criada como alternativa às metodologias anteriormente citadas uma vez que foi delineada para analisar a gama mais baixa e a gama intermédia de concentrações de TCA a que corresponde a especificação máxima de TCA para aceitação de lotes de produtos de cortiça na A&I.

Assim esta curva de calibração é composta pelos padrões 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11,0 ng/L e com um padrão interno de 11,0 ng/L.

Esta nova abordagem trabalha sobre gama de concentrações de TCA mais frequente nas amostras analisadas na A&I. De facto ela contempla as amostras de gama baixa e intermédia,

tendo a curva de calibração sido delineada para compreender todos os valores de TCA dentro de especificação de todos os produtos da A&I.

Esta metodologia utiliza um tempo de exposição da fibra ao TCA presente no *headspace* do *vial* igual ao usado no método de referência (8 minutos) e um tempo de abertura da válvula de *Split/Splitless* igual a 2 minutos.

Na tabela 2 encontram-se descritos detalhadamente todos os parâmetros das metodologias associadas à análise de TCA estudadas no presente trabalho, sendo possível fazer uma comparação entre elas.

Tabela 2: Resumo dos parâmetros operacionais das metodologias estudadas.

Características	Método		Metodologia		
	Referência	Gama baixa	Gama alta 1	Gama intermedia	Gama alta 2
Gama de trabalho (ng/L)	0,5 – 20,0	0,5-5,5	0,5-28,0	0,5-11,0	0,5-28,0
Ciclo de análise			SPME		
Seringa			Fibra de PDMS		
Detetor			ECD		
Tempo de pré-incubação (min)			2		
Temperatura de pré-incubação (° C)			50		
Velocidade de agitação (rpm)			250		
Abertura da válvula do injetor (Split/Splitless) (min)		4		2	
Penetração da fibra no vial (mm)			12		
Tempo de adsorção na fibra (min)			8		24
Local de dessorção			Injetor		
Penetração da fibra no injetor (mm)			40		
Tempo de dessorção no injetor (min)			4		
Tempo total de análise (min)			14		30
Temperatura no injetor (° C)			260		
Coluna			ZB-5MS 30mx0,25mmx0,25µm		

## 5 Resultados

### 5.1 Método de referência de análise de TCA

A curva de calibração correspondente ao método de referência obtida no GC-ECD 8 (contendo os pontos 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 ng/L e padrão interno de 20,0 ng/L) resultou de 3 injeções de cada um dos padrões de TCA de concentração definida.

Segundo estava definido no laboratório de I&D da A&I, a aceitação da curva de calibração passa por ter uma ordenada na origem e um declive que teriam de estar entre os valores máximo e mínimo da ordenada na origem e declive das últimas cinco retas obtidas. Verificase de acordo com a *Tabela 3* que a reta traçada estava dentro dos limites de aceitação definidos no laboratório.

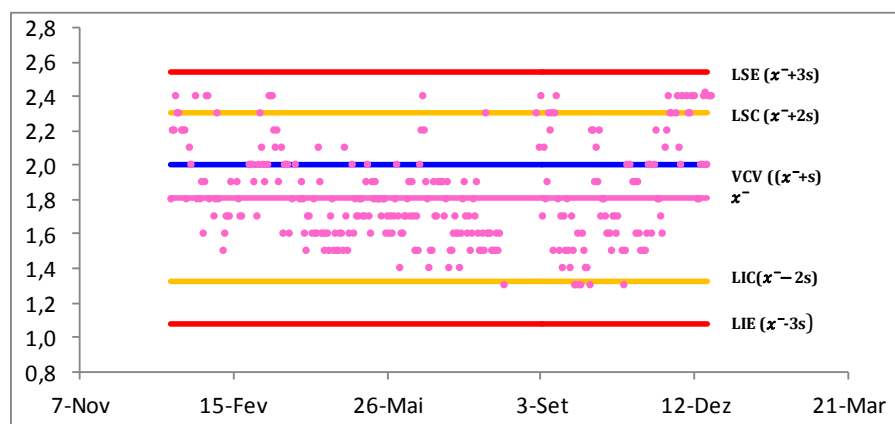
$$y = 1,658 x + 0,011$$

*Tabela 3: Parâmetros e limites de aceitação para o GC-ECD 8 definidos ao longo de 2015.*

	Limite inferior	Limite superior	Curva de 26/11/2015
Declive (b)	0,538	3,034	1,658
Ordenada na origem (a)	-0,321	0,551	0,011

O método de referência é controlado através da análise periódica de padrões de controlo, que são colocados no início e fim da corrida cromatográfica. Estes padrões são preparados com uma concentração de 2,0 ng/L de TCA.

Os resultados obtidos com os padrões de controlo são integrados numa carta de controlo (Figura 6). Face aos resultados, pode ver-se que o método apresenta uma variabilidade importante, não podendo ser considerado exato.



*Figura 6: Carta de controlo de padrões 2 ng/L do método de referência para o GC-ECD 8*

## 5.2 Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA

A reta de calibração correspondente à metodologia de gama baixa de concentrações de TCA contém os onze pontos equidistantes entre si, de **0,50 a 5,5 ng/L** e padrão interno de **5,5 ng/L**. Os padrões de calibração foram analisados em triplicado, estando representados na Tabela 4, a razão média da concentração (razão entre a concentração do analito ajustada ao volume do padrão de calibração e a concentração do padrão interno) e a razão média do sinal obtido (razão da área de analito e da área de padrão interno) para cada concentração.

Tabela 4: Metodologia para gama baixa de concentrações de TCA.

Concentração teórica do padrão de calibração (ng/L)	Concentração ajustada ao volume do padrão de calibração (ng/L)	Área analito (TCA) (uV.min)	Área de padrão interno (uV.min)	Média de [TCA] / [PI]	Média Área TCA / Área PI
0,5	0,498	1747,5	4062,0	0,091	0,422
		1853,1	4483,0		
		1981,2	4686,6		
1,0	0,990	2386,1	4350,4	0,180	0,547
		2287,6	4206,5		
		2288,5	4166,5		
1,5	1,478	2851,4	4194,5	0,269	0,679
		2700,2	4010,9		
		2664,7	3903,6		
2,0	1,961	2932,0	3644,9	0,357	0,803
		3013,3	3789,2		
		3236,3	3998,2		
2,5	2,493	4192,2	4327,9	0,453	0,966
		4347,4	4570,1		
		4366,3	4463,2		
3,0	2,991	5293,5	4907,7	0,544	1,089
		5099,5	4626,8		
		4873,1	4489,2		
3,5	3,488	4948,2	4151,8	0,634	1,203
		5221,2	4288,2		
		5266,7	4394,4		
4,0	3,984	7081,5	5228,7	0,724	0,346
		5466,1	4113,2		
		5584,8	4125,7		
4,5	4,480	5982,1	4216,6	0,815	0,415
		6486,2	4561,2		
		6707,7	4773,0		
5,0	4,975	7584,0	4957,1	0,905	1,535
		7601,1	4888,4		
		7985,2	5258,6		
5,5	5,47	8477,7	5030,0	0,995	1,683
		7473,7	4432,3		
		7584,2	4522,6		

Tendo em conta a Tabela 4, é possível traçar curva de calibração da metodologia em análise (Figura 7) de onde é possível retirar a equação (equação 12) e consequentemente os parâmetros que a caracterizam (Tabela 5), encontrando-se os cálculos auxiliares no Anexo 4.

$$y = 1,382 x + 0,313 \quad (12)$$

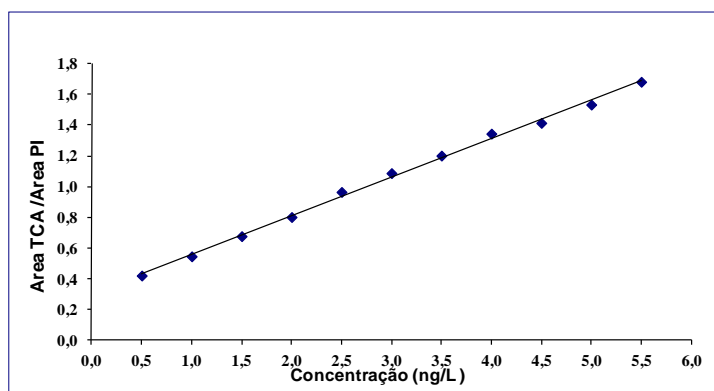


Figura 7 Retas de calibração para gama baixa de concentrações de TCA<sup>1</sup>.

Tabela 5: Parâmetros analíticos da reta referente à metodologia gama baixa de concentrações.

Declive (b)	1,382
Ordenada na origem (a)	0,313
Coefficiente de Correlação (r)	0,999
Coefficiente de Determinação (r <sup>2</sup> )	0,999
Sensibilidade (e)	1,382
Desvio Padrão do Ordenada na Origem (Sa)	0,016
Desvio Padrão do Método (Sm)	0,016
Coefficiente de Variação Método (CVm) (%)	2,980
Desvio Padrão residual reta (S <sub>V/X</sub> )	0,022

Com o objetivo da verificação da gama de trabalho a que esta metodologia está associada, foram trabalhados estatisticamente os valores obtidos a partir da repetição de 10 amostras das concentrações de 0,5 e 5,5 ng/l (Tabela 6), respetivamente a mais baixa e a mais alta concentração dos padrões de calibração da curva. Os resultados completos podem ser encontrados no Anexo 6.

Tabela 6: Área de TCA / Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 5,5 ng/L.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
y <sub>0,5</sub>	0,422	0,430	0,413	0,423	0,397	0,443	0,435	0,382	0,429	0,431
y <sub>5,5</sub>	1,683	1,685	1,686	1,677	1,696	1,693	1,698	1,681	1,704	1,760

Seguidamente, foram realizados testes estatísticos ao método, nomeadamente teste de homogeneidade de variâncias, onde y<sub>0,5</sub> e y<sub>5,5</sub> se referem ao primeiro e ultimo padrão de calibração estudado (Tabela 7). Tendo em conta esta tabela calcula-se o valor teste PG e com base nos ajustes linear e polinomial do sinal obtido calcula-se o valor teste VT (consultar secção 3.2) e compara-se com o valor tabelado do teste F de Fisher/Snedcor (Tabela 8).

<sup>1</sup> O gráfico apresentado foi traçado com base na relação: Área TCA/Área PI vs [TCA] / [PI], no entanto para facilitar a visualização da curva, esta é apresentada em função da Área TCA/Área PI vs [TCA] teórica.

Tabela 7: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama baixa de concentrações de TCA.

Média do Sinal para $y_{0,5}$	0,420
Desvio Padrão do Sinal para $y_{0,5}$	0,017
Desvio Padrão Relativo para $y_{0,5}$ (%)	4,14
Variância do Sinal para $y_{0,5}$	$3,02 \times 10^{-4}$
Média do Sinal para $y_{5,5}$	1,696
Desvio Padrão do Sinal para $y_{5,5}$	0,024
Desvio Padrão Relativo para $y_{5,5}$ (%)	1,41
Variância do Sinal para $y_{5,5}$	$5,73 \times 10^{-4}$

Tabela 8: Avaliação da linearidade da reta de gama baixa de concentrações de TCA.

<b>PG</b>	1,90
<b>F(n - 1 = 10 e 99%)</b>	4,85
<b>VT</b>	-0,05
<b>F (1, N - 3, 95%)</b>	3,39

O teste de resíduos e o teste de *Rikilt* dão informação complementar acerca da linearidade do método (consultar secção 3.2). O primeiro fornece informação acerca da diferença entre o sinal obtido em cada padrão de calibração e o sinal estimado, obtido a partir da equação da reta. O segundo determina o fator de resposta resultante da diferença entre a linearidade de um ponto da curva de calibração face ao ponto imediatamente anterior.

Nas Tabelas 9 e 10 estão representados os valores dos testes de resíduos e *Rikilt* para a curva de calibração da metodologia de gama baixa de concentração de TCA.

Tabela 9: Testes de resíduos e *Rikilt* aplicado à gama baixa de concentrações de TCA.

Média [TCA]/[PI]	Média Área TCA / Área PI	Média Área TCA / Área PI (estimado)	Resíduos (%)	Fator de Resposta (FR) (yi/xi)	FRi / FR médio (%)
0,091	0,422	0,438	-3,7	4,638	200,4
0,180	0,547	0,561	-2,5	3,040	131,3
0,269	0,679	0,684	-0,9	2,522	109,0
0,357	0,803	0,806	-0,4	2,249	97,2
0,453	0,966	0,939	2,9	2,133	92,1
0,544	1,089	1,065	2,3	2,001	86,5
0,634	1,203	1,189	1,1	1,897	81,9
0,724	1,346	1,313	2,5	1,859	80,3
0,815	1,415	1,439	-1,7	1,737	75,0
0,905	1,535	1,564	-1,9	1,696	73,2
0,995	1,683	1,688	-0,3	1,691	73,1



Tabela 10: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para gama baixa.

Soma dos resíduos	-2,51
Fator de Resposta (FR) Médio	2,31
Coefficiente de Variação do FR (%)	37,64

Na Figura 8 estão representados os resíduos e os resultados do teste de Rikilt para a reta de gama baixa de concentrações obtidos a partir dos resultados experimentais da Tabela 9.

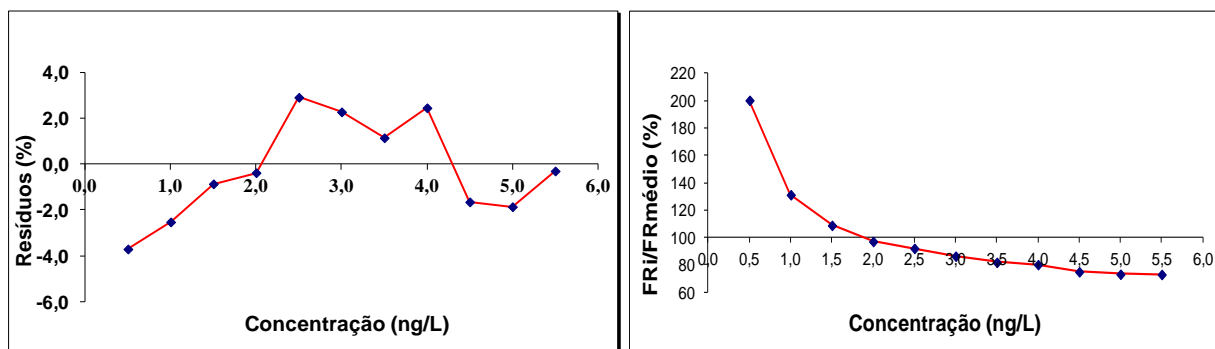


Figura 8: Linearidade a) Análise de resíduos; b) teste de Rikilt para a gama baixa de concentrações.

A determinação dos limiares analíticos (consultar secção 3.4) foi efetuada, recorrendo à análise, em condições de precisão intermediária (ver 3.5) de dez repetições do padrão mais baixo de concentração da reta gama baixa, nomeadamente 0,5 ng/L (Tabela 11).

Tabela 11: Limiares analíticos referentes à metodologia de gama baixa de concentrações de TCA.

<b>Concentração de Analito (ng/L)</b>	0,50	0,47	0,50	0,49	0,48	0,49	0,50	0,47	0,47	0,50
<b>LD (ng/L)</b>	0,531									
<b>LQ (ng/L)</b>	0,621									

Foram realizados ensaios de recuperação com vista à determinação da exatidão do método. Estes foram efetuados a partir de amostras de produção diária com valores de TCA próximos de 3 ng/l. A matriz destas amostras é resultado da lixiviação de rolhas de cortiça natural em solução etanólica a 12% (V/V) durante 24h. Estas amostras foram fortificadas com 1 ng/L de analito, foram analisadas e face aos resultados obtidos foi calculada a recuperação do analito em causa (Tabela 12).

Tabela 12: Teste de recuperação aplicados à metodologia de gama baixa de concentrações de TCA.

	Concentração inicial de TCA (ng/L)	Concentração de TCA após fortificação (ng/L)	Recuperação (%)
	3,31	4,23	92
	3,11	4,09	98
	3,31	4,29	98
<b>Média</b>	<b>3,24</b>	<b>4,2</b>	<b>96</b>

### 5.3 Metodologia para gama alta de concentrações de TCA

A curva de calibração correspondente à metodologia de gama alta contém os padrões de calibração: 0,5; 6,0; 11,5; 17,0; 22,5 e 28,0 ng/L e padrão interno de 28,0 ng/L.

Os padrões de cada concentração foram analisados em triplicado, estando representados na *Tabela 13*, a razão média da concentração (razão entre a concentração do analito ajustada ao volume do padrão de calibração e a concentração do padrão interno) e a razão média do sinal obtido (razão da área de analito e da área de padrão interno) para cada concentração.

A análise desta metodologia foi dividida em duas fases: primeiramente foi estudada a validação com base no método referência (apenas com a alteração da concentração dos padrões de analito e do padrão interno); seguidamente foi estudado o impacto das alterações operacionais nomeadamente o tempo de exposição da fibra ao TCA, a alteração do tempo de abertura da válvula *Split/Splitless* e a mudança na rampa de temperatura de aquecimento do forno.

*Tabela 13: Metodologia para gama alta de concentrações de TCA.*

Concentração teórica do padrão de calibração (ng/L)	Concentração ajustada ao volume do padrão de calibração (ng/L)	Área analito (TCA)(uV.min)	Área de padrão interno (uV.min)	Média da [TCA]/[PI]	Média da Área TCA/Área PI
0,5	0,498	370,6	9881,2	0,018	0,041
		370,6	9871,2		
		525,1	11180,8		
6,0	5,964	6916,0	14245,8	0,213	0,496
		6726,8	13633,7		
		5965,6	11722,1		
11,5	11,369	12389,1	12807,5	0,406	0,987
		13169,6	13242,7		
		14130,4	14130,4		
17,0	16,830	19802,9	12551,2	0,601	1,542
		20565,1	13399,0		
		18211,6	12024,3		
22,5	22,448	37112,1	17784,9	0,802	2,069
		31011,2	14957,1		
		30283,2	14789,6		
28,0	27,992	35573,4	13659,2	1,000	2,587
		37586,5	14652,6		
		39539,6	15253,4		

Tendo em conta a *Tabela 13*, é possível traçar a curva de calibração da metodologia em análise (*Figura 9*) de onde é possível retirar a equação (equação 13) e consequentemente os parâmetros que a caracterizam (*Tabela 14*), encontrando-se os cálculos auxiliares no Anexo 4.

$$y = 2,620 x - 0,041 \quad (13)$$

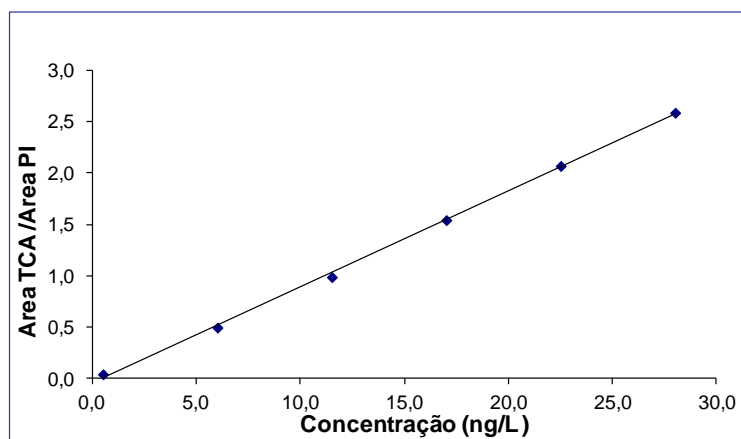


Figura 9: Reta de calibração da gama alta de concentrações de TCA <sup>1</sup>.

Tabela 14: Parâmetros analíticos da reta referente à metodologia gama alta de concentrações de TCA.

Declive (b)	2,620
Ordenada na origem (a)	- 0,041
Coefficiente de Correlação (r)	0,9997
Coefficiente de Determinação ( r <sup>2</sup> )	0,9993
Sensibilidade (e)	2,620
Desvio Padrão do declive (Sb)	0,034
Desvio Padrão do Ordenada na Origem (Sa)	0,017
Desvio Padrão do Método (Sm)	0,011
Coefficiente de Variação Método (CVm) (%)	2,11
Desvio Padrão residual reta (S <sub>Y/X</sub> )	0,028

Com o objetivo da verificação da gama de trabalho a que esta reta está associada, foram trabalhados estatisticamente os valores obtidos a partir da repetição de 10 amostras das concentrações de 0,5 e 28,0 ng/L (Tabela 15), respetivamente a mais baixa e a mais alta concentração dos padrões de calibração da curva. Os resultados podem ser encontrados no Anexo 7.

Tabela 15: Área de TCA / Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 28 ng/L

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
y <sub>0,5</sub>	0,038	0,038	0,047	0,020	0,020	0,012	0,029	0,014	0,016	0,191
y <sub>28,0</sub>	2,587	2,604	2,565	2,592	2,587	2,595	2,618	2,571	2,613	2,061

Seguidamente foram realizados testes estatísticos à metodologia, nomeadamente teste de homogeneidade de variâncias, onde y<sub>0,5</sub> e y<sub>28,0</sub> se referem ao primeiro e ultimo padrão de calibração estudado (Tabela 16). Tendo em conta esta tabela, calcula-se o valor teste PG e com base nos ajustes linear e polinomial do sinal obtido calcula-se o valor teste VT (consultar secção 3.2) e comparam-se com o valor tabelado do teste F de Fisher/Snedcor (Tabela 17).

<sup>1</sup> O gráfico apresentado foi traçado com base na relação: Área TCA/Área PI vs [TCA] / [PI], no entanto para facilitar a visualização da curva, esta é apresentada em função da Área TCA/Área PI vs [TCA] teórica.

Tabela 16: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama alta de concentrações de TCA.

Média do Sinal para $y_{0,5}$	0,042
Desvio Padrão do Sinal para $y_{0,5}$	0,053
Desvio Padrão Relativo para $y_{0,5}$ (%)	127,51
Variância do Sinal para $y_{0,5}$	$2,88 \times 10^{-3}$
Média do Sinal para $y_{28,0}$	2,539
Desvio Padrão do Sinal para $y_{28,0}$	0,169
Desvio Padrão Relativo para $y_{28,0}$ (%)	6,65
Variância do Sinal para $y_{28,0}$	$2,85 \times 10^{-2}$

Tabela 17: Avaliação da linearidade da reta de gama alta de concentrações de TCA.

PG	9,90
$F(n - 1 = 5 \text{ e } 99\%)$	10,97
VT	-0,03
$F(1, N - 3, 95\%)$	10,13

O teste de resíduos e o teste *de Rikilt* dão informação complementar acerca da linearidade da reta (ver 5.2.2 e 5.2.3.). O primeiro fornece informação acerca da diferença entre o sinal obtido em cada padrão de calibração e o sinal estimado, obtido a partir da equação da reta. O segundo determina o fator de resposta resultante da diferença entre a linearidade de um ponto da curva de calibração face ao ponto imediatamente anterior.

Nas Tabela 18 e 19 estão representados os valores dos testes de resíduos e *Rikilt* para a reta de calibração do método de gama alta.

Tabela 18: Testes de resíduos e Rikilt aplicados à gama alta de concentrações de TCA..

Média [TCA] / [PI]	Média Área TCA / Área PI	Média Área TCA / Área PI (estimado)	Resíduos (%)	Fator de Resposta (FR) ( $y_i/x_i$ )	FRi / FR médio (%)
0,018	0,041	0,007	515,97	2,278	92,5
0,213	0,496	0,518	-4,19	2,328	94,6
0,406	0,987	1,023	-3,53	2,432	98,8
0,601	1,542	1,534	0,52	2,566	104,2
0,802	2,069	2,061	0,40	2,580	104,8
1,000	2,587	2,580	0,28	2,587	105,1

Tabela 19: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama alta de concentrações de TCA..

:	Soma dos resíduos	509,4
	Fator de Resposta (FR) Médio	2,46
	Coefficiente de Variação do FR (%)	5,55

Na Figura 10 estão representados os resíduos e os resultados do teste de *Rikilt* para a reta de gama baixa de concentrações obtidos a partir dos resultados experimentais da Tabela 18.

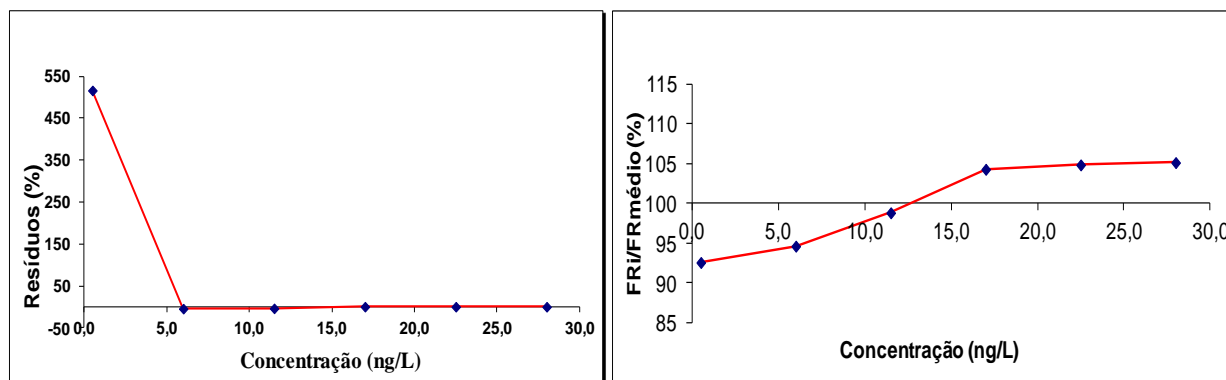


Figura 10: Linearidade: a) Análise de resíduos; b) teste de *Rikilt* para a gama alta de concentrações.

A determinação dos limiares analíticos (consultar secção 3.4) foi efetuada, recorrendo à análise, em condições de precisão intermédia (consultar secção 3.5) de dez repetições do padrão mais baixo de concentração, 0,5 ng/L, da reta gama alta (Tabela 20)

Tabela 20: Limiares analíticos referentes ao método gama alta.

Concentração de Analito (ng/L)	0,56	0,58	0,59	0,56	0,62	0,58	0,52	0,53	0,53	0,53
<b>LD (ng/L)</b>	0,668									
<b>LQ (ng/L)</b>	0,887									

### 5.3.1 Alteração dos parâmetros operacionais

Após validação da curva de calibração com padrões de gama alta, foram realizadas alterações operacionais com vista à otimização e melhor funcionamento desta metodologia.

- **Tempos de exposição da fibra ao TCA presente no *headspace* do vial**

Para este parâmetro foram testados diferentes tempos de exposição da fibra ao TCA presente no *headspace* do vial. Na Tabela 21 estão apresentados os resultados obtidos após os testes decorrerem a 8, 16 e 24 minutos de exposição. Verifica-se que à medida que o tempo de adsorção de TCA pela fibra aumenta, também aumenta a área do pico correspondente. O mesmo acontece com o padrão interno, pelo que não se verifica o aumento da razão das áreas com o aumento do tempo de exposição da fibra.

Tabela 21: Tempos de exposição da fibra SPME ao TCA no headspace do vial.

Tempo (min)	Área analito (uV.min)	Área PI (uV.min)	Área TCA/Área PI	Média
8	36702,3	12451,5	2,948	2,986
	35030,9	12192,2	2,873	
	35854,3	11428,9	3,137	
16	40826,6	14778,1	2,76	2,779
	39918,8	14464,5	2,76	
	44277,2	15723,5	2,82	
24	49092,3	18332,5	2,68	2,778
	43550,2	15297,2	2,85	
	47928,9	17057,7	2,81	

- **Alteração dos tempos de abertura da válvula do modo *Split/Splitless* do injetor**

Com vista à melhoraria da sensibilidade do método, foram testados quatro tempos para a abertura da válvula *Split/Splitless*. Na Tabela 22 estão apresentados os resultados referentes a testes com 1,2,e 4 minutos.

Tabela 22: Tempos de abertura da válvula *Split/Splitless* do injetor.

Tempo (min)	Área contaminante (uV.min)	Área PI (uV.min)
1	38776,2	12332,4
	42657,4	14849,3
	41425,0	15026,8
2	39634,7	17136,7
	37034,3	16136,0
	41683,1	18407,8
3	31481,0	11100,0
	31846,4	10924,5
	33028,5	11803,2
4	31762,5	9844,5
	32944,6	9880,9
	33310,0	10162,9

Verifica-se que abrindo a válvula *Split/Splitless* ao fim de 1 ou 2 minutos, a área do padrão interno e de TCA aumentam. A partir deste tempo e até 4 minutos, o valor destas áreas diminui e este facto poder-se-á dever à dispersão de TCA e padrão interno no sistema de injeção, que é maior a 4 do que a 2 minutos.

- **Rampa de temperatura**

Uma vez que todos os métodos apresentados anteriormente tinham na sua constituição a rampa de temperatura do método de referência, foi testada uma reformulada rampa de temperatura com o intuito de melhorar os resultados obtidos. Assim, e tendo em conta a

rampa de temperatura do método de referência (começa em 90 °C e sobe 15 °C/minuto até atingir 265°C) foi sugerida nova rampa de temperatura que começa a 50°C durante quatro minutos e sobe 40°C/minuto até aos 90°C voltando a subir 25°C/ minuto até à temperatura final de 265°C.

Foram posteriormente analisados padrões de calibração da reta gama alta com a alteração da rampa de temperatura assinalada, para visualizar a seu impacto (Figura 11).

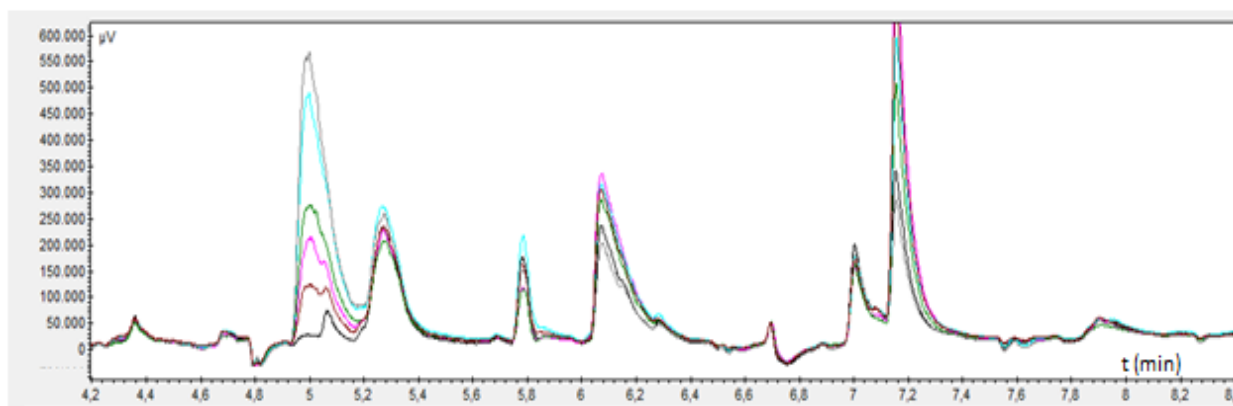


Figura 11: Cromatograma de uma amostra 28,0 ng/L de TCA da nova rampa de temperatura.

Pela análise da Figura 11 verifica-se um aumento do ruído na linha de base e consequentemente um decréscimo na qualidade visual dos picos, pelo que a rampa de temperatura proposta foi rejeitada.

#### 5.4 Metodologia de gama alta de concentrações de TCA após a alteração dos parâmetros operacionais

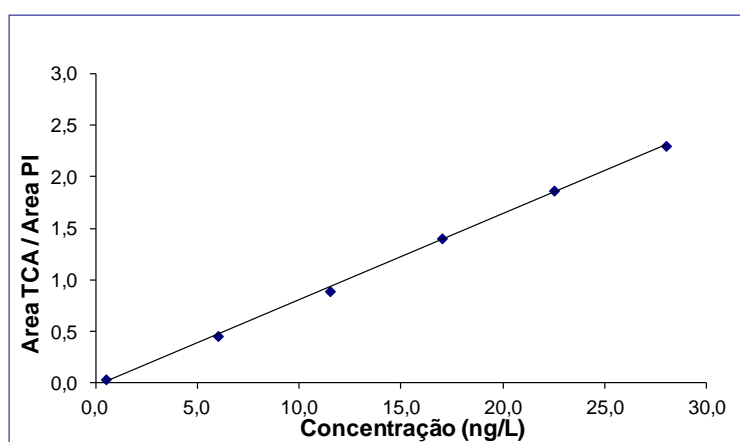
Esta metodologia, daqui em diante chamada de metodologia de gama alta 2, foi testada recorrendo às mesmas concentrações (mesma gama de trabalho) da reta gama alta mas tendo em consideração duas alterações efetuadas ao método: tempo de adsorção na fibra de 24 minutos em vez de 8 minutos e tempo de abertura da válvula de *Split/Splitless* de 2 em vez de 4 minutos.

Assim foram novamente analisados padrões de calibração correspondentes à gama alta, cujos resultados da concentração (razão entre a concentração do analito ajustada ao volume do padrão de calibração e a concentração do padrão interno) e a razão média do sinal obtido (razão entre a área de analito e da área de padrão interno) para cada concentração, estão presentes na Tabela 23.

Tabela 23: Metodologia de gama alta 2 de concentração de TCA.

Concentração teórica do padrão de calibração (ng/L)	Concentração ajustada ao volume do padrão de calibração (ng/L)	Área analito (TCA)(uV.min)	Área de padrão interno (uV.min)	Média da [TCA]/[PI]	Média da Área TCA/Área PI
0,5	0,498	624,6	17031,9	0,018	0,036
		686,9	18057,3		
		609,4	18267,0		
6,0	5,964	8620,9	18579,3	0,213	0,456
		7441,9	17870,4		
		8489,8	17425,3		
11,5	11,369	16423,8	17384,8	0,406	0,891
		14882,9	17410,6		
		14756,6	16910,8		
17,0	16,830	21996,6	16024,6	0,601	1,403
		22894,3	16092,2		
		22798,3	16128,4		
22,5	22,448	39800,7	21341,0	0,802	1,866
		29624,1	15856,3		
		33703,2	18065,6		
28,0	27,992	47180,5	20351,6	1,000	2,301
		45193,2	19709,6		
		50120,3	21882,0		

Tendo em conta a Tabela 23 é possível traçar a reta de calibração do método em análise (Figura 12). Os cálculos auxiliares podem ser visualizados no Anexo 4.

Figura 12: Reta de calibração da gama alta 2 de concentrações de TCA<sup>1</sup>.

Da reta em cima apresentada é possível retirar a sua equação e consequentemente os parâmetros que a caracterizam (Tabela 24). Na Tabela 25 estão representados os valores obtidos a partir da repetição de 10 amostras das concentrações de 0,5 e 28 ng/L. Os resultados finais podem ser encontrados no Anexo 8. Seguidamente, foram realizados testes de homogeneidade de variância, onde  $y_{0,5}$  e  $y_{28,0}$  se referem ao primeiro e último padrão estudado (Tabela 26).

$$y = 2,338x - 0,026 \quad (14)$$

<sup>1</sup> O gráfico apresentado foi traçado com base na relação: Área TCA/Área PI vs [TCA] / [PI], no entanto para facilitar a visualização da curva, esta é apresentada em função da Área TCA/Área PI vs [TCA] teórica.



Tabela 24: Parâmetros analíticos da reta e da metodologia gama alta 2 de concentrações de TCA.

Declive (b)	2,338
Ordenada na origem (a)	-0,026
Coefficiente de Correlação (r)	0,9996
Coefficiente de Determinação ( $r^2$ )	0,9993
Sensibilidade (e)	2,338
Desvio Padrão do declive (Sb)	0,032
Desvio Padrão do Ordenada na Origem (Sa)	0,016
Desvio Padrão do Método (Sm)	0,011
Coefficiente de Variação Método (CVm) (%)	2,20
Desvio Padrão residual reta ( $S_{Y/X}$ )	0,032

Tabela 25: Área de TCA/Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 28 ng/L.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$y_{0,5}$	0,037	0,038	0,033	0,016	0,010	0,011	0,014	0,014	0,015	0,016
$y_{28,0}$	2,318	2,293	2,290	2,316	2,280	2,322	2,333	2,326	2,384	2,248

Tabela 26: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama alta 2 de concentrações de TCA.

Média do Sinal para $y_{0,5}$	0,020
Desvio Padrão do Sinal para $y_{0,5}$	0,011
Desvio Padrão Relativo para $y_{0,5}$ (%)	53,67
Variância do Sinal para $y_{0,5}$	$1,20 \times 10^{-4}$
Média do Sinal para $y_{28,0}$	2,311
Desvio Padrão do Sinal para $y_{28,0}$	0,036
Desvio Padrão Relativo para $y_{28,0}$ (%)	1,57
Variância do Sinal para $y_{28,0}$	$1,31 \times 10^{-3}$

Tendo em conta a Tabela 26 calcula-se o valor teste PG e com base nos ajustes linear e polinomial do sinal obtido calcula-se o valor teste VT (consultar secção 3.2) e comparam-se com o valor tabelado do teste F de Fisher/Snedcor (Tabela 27).

Tabela 27: Avaliação da linearidade da reta gama alta 2 de concentração TCA.

PG	10,87
$F(n - 1 = 5 \text{ e } 99\%)$	10,97
VT	-0,03
$F(1, N - 3, 95\%)$	10,13

O teste de resíduos e o teste de Rikilt dão informação complementar acerca da linearidade do método (ver secção 3.2). O primeiro fornece informação acerca da diferença entre o sinal obtido em cada padrão de calibração e o sinal estimado, obtido a partir da equação da reta. O segundo determina o fator de resposta resultante da diferença entre a linearidade de um

ponto da curva de calibração face ao ponto imediatamente anterior. Nas Tabela 28 e 29 estão representados os valores da análise de resíduos e *Rikilt* para a curva de calibração do método de gama alta 2.

Tabela 28: Testes de resíduos e *Rikilt* aplicados à gama alta 2 de concentração de TCA.

Média [TCA]/[PI]	Média Área TCA / Área PI	Média Área TCA / Área PI (estimado)	Resíduos	Fator de Resposta (FR) ( $y_i/x_i$ )	FRi / FR médio (%)
0,018	0,036	0,016	121,3	2,001	90,3
0,213	0,456	0,472	-3,4	2,140	96,6
0,406	0,891	0,923	-3,5	2,194	99,0
0,601	1,403	1,379	1,7	2,334	105,3
0,802	1,866	1,849	0,9	2,327	105,0
1,000	2,301	2,312	-0,5	2,301	103,8

Tabela 29: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama alta 2.

Soma dos resíduos	116,5
Fator de Resposta (FR) Médio	2,22
Coefficiente de Variação do FR (%)	5,91

Na Figura 13 estão representados os resíduos e os resultados do teste de *Rikilt* para a reta de gama baixa de concentrações obtidos a partir dos resultados experimentais da Tabela 28.

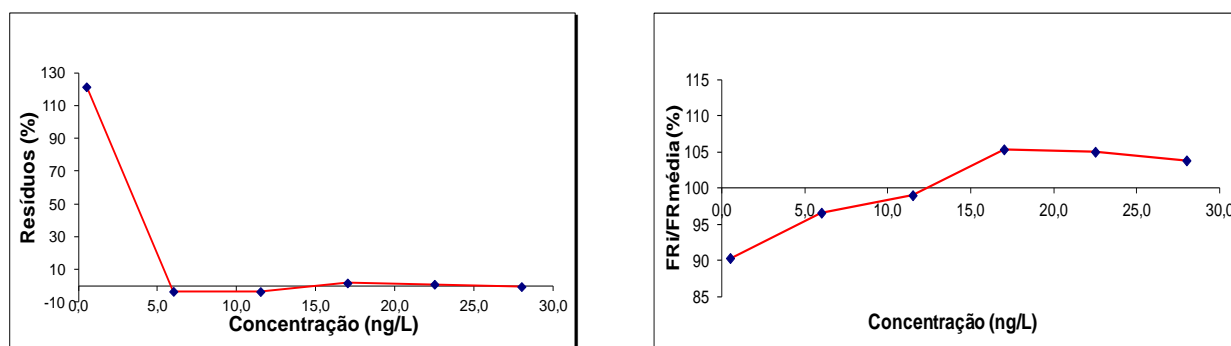


Figura 13: Linearidade: a) Análise de resíduos; b) Teste de *Rikilt* para a gama alta 2 de concentrações.

A determinação dos limiares analíticos (visualizar secção 3.4) foi efetuada, recorrendo à análise, em condições de precisão intermediária (consultar secção 3.5) de dez repetições do padrão mais baixo de concentração da reta gama alta 2 de concentrações de TCA (Tabela 30).

Foram realizados ensaios de recuperação com vista à determinação da exatidão do método. Estes foram efetuados a partir de amostras de produção diária com valores de TCA próximos de 1 ng/L. A matriz destas amostras é resultado da lixiviação de rolhas de cortiça natural em solução etanólica a 12% (V/V) durante 24h. Estas amostras foram fortificadas com 1 ng/L de

analito, foram analisadas e face aos resultados obtidos foi calculada a recuperação do analito em causa (Tabela 31).

Tabela 30: Limiares analíticos da metodologia gama alta 2 de concentrações de TCA.

Concentração de Analito (ng/L)	0,52	0,51	0,51	0,50	0,51	0,52	0,52	0,52	0,53	0,51
<i>LD (ng/L)</i>	0,543									
<i>LQ (ng/L)</i>	0,600									

Tabela 31: Teste de recuperação no método de gama alta 2 de concentrações de TCA.

Concentração inicial de TCA (ng/L)	Concentração de TCA após fortificação (ng/L)	Recuperação (%)
1,19	2,15	96,0
1,31	2,28	97,0
1,1	2,07	97,0
<b>Média</b>	<b>1,20</b>	<b>96,7</b>

## 5.5 Metodologia gama intermédia

A curva de calibração correspondente à metodologia de gama intermédia de concentrações contém os padrões de calibração **0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 e 11,0 ng/L** e padrão interno de **11,0 ng/L**.

Os padrões de cada concentração foram analisados em triplicado, estando representados na Tabela 32, a razão média da concentração (razão entre a concentração do analito ajustada ao volume do padrão de calibração e a concentração do padrão interno) e a razão média do sinal obtido (razão da área de analito e da área de padrão interno) para cada concentração.

Esta abordagem foi realizada de forma análoga às metodologias apresentados inicialmente (com as condições do método de referencia), à exceção do tempo de abertura das válvulas do modo *Split/Splitless* que neste caso foi de 2 minutos.

Tendo em conta a Tabela 32, é possível traçar à reta corresponde à metodologia em análise (Figura 14) e de onde é possível retirar sua equação (equação 15) e consequentemente os parâmetros que a caracterizam (Tabela 33). Os cálculos auxiliares podem ser encontrados no Anexo 4.

$$y = 2,299 x + 0,032 \quad (15)$$

Tabela 32: Metodologia gama intermédia de concentrações de TCA.

Concentração teórica do padrão de calibração (ng/L)	Concentração ajustada ao volume do padrão de calibração (ng/L)	Área analito (TCA)(uV.min)	Área de padrão interno (uV.min)	Média da [TCA]/[PI]	Média da Área TCA/Área PI
0,5	0,4980	682,2	6170,1	0,498	0,114
		778,2	6385,1		
		648,0	5971,6		
2,0	1,961	2664,1	5364,5	0,178	0,492
		2581,0	5256,4		
		2385,9	4871,1		
3,5	3,488	3711,3	4970,6	0,317	0,76
		3633,4	4622,9		
		4072,1	5455,2		
5,0	4,975	4413,2	4036,8	0,452	1,08
		5475,4	5077,0		
		5774,2	5356,0		
6,5	6,458	7189,0	5391,6	0,587	1,34
		7193,0	5327,4		
		6789,3	5077,6		
8,0	7,937	8301,3	4971,2	0,722	1,67
		8925,1	5287,3		
		7358,5	4445,4		
9,5	9,411	8330,7	4174,8	0,856	2,01
		8772,6	4339,1		
		9135,6	4552,6		
11,0	10,88	10465,2	4522,2	0,989	2,33
		10492,4	4454,6		
		10369,0	4452,1		

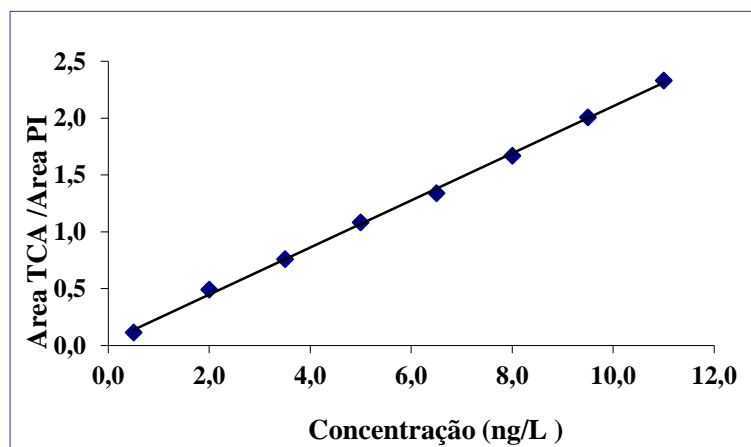


Figura 14: Reta de calibração da gama intermédia de concentrações de TCA.

Tabela 33: Parâmetros analíticos da reta associada à metodologia de gama intermédia.

Declive (b)	2,299
Ordenada na origem (a)	0,033
Coefficiente de Correlação (r)	0,9992
Coefficiente de Determinação ( r <sup>2</sup> )	0,9985
Sensibilidade (e)	2,299
Desvio Padrão do declive (Sb)	0,037
Desvio Padrão do Ordenada na Origem (Sa)	0,021
Desvio Padrão do Método (Sm)	0,013
Coefficiente de Variação Método (CVm) (%)	2,690
Desvio Padrão residual reta (S <sub>Y/X</sub> )	0,032

Na Tabela 34 estão representados os valores obtidos a partir da repetição de 10 amostras das concentrações de 0,5 e 11 ng/L. Os resultados completos podem ser encontrados no Anexo 9.

Tabela 34: Área de TCA/Área PI (y) para dez amostras de concentrações de TCA 0,5 e 11 ng/L.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$y_{0,5}$	0,152	0,132	0,152	0,134	0,108	0,148	0,136	0,150	0,148	0,104
$y_{11}$	2,333	2,249	2,381	2,334	2,393	2,344	2,397	2,401	2,329	2,366

Seguidamente, foram realizados testes estatísticos à metodologia, nomeadamente teste de homogeneidade de variâncias, onde  $y_{0,5}$  e  $y_{11}$  se referem ao primeiro e ultimo padrão estudado (Tabela 35).

Tabela 35: Teste de homogeneidade de variâncias aplicado à reta gama intermédia de concentrações de TCA.

Média do Sinal para $y_{0,5}$	0,136
Desvio Padrão do Sinal para $y_{0,5}$	0,0177
Desvio Padrão Relativo para $y_{0,5}$ (%)	13,02
Variância do Sinal para $y_{0,5}$	$3,14 \times 10^{-4}$
Média do Sinal para $y_{11}$	2,353
Desvio Padrão do Sinal para $y_{11}$	0,0461
Desvio Padrão Relativo para $y_{11}$ (%)	1,96
Variância do Sinal para $y_{11}$	$2,12 \times 10^{-3}$

Tendo em conta a Tabela 34, calcula-se o valor teste PG e com base nos ajustes linear e polinomial do sinal obtido calcula-se o valor teste VT (consultar secção 3.2) e comparam-se com o valor tabelado do teste F de Fisher/Snedcor (Tabela 36).

Tabela 36: Avaliação da linearidade Avaliação da linearidade da gama intermédia de concentrações de TCA.

PG	6,75
$F(n - 1 = 5 \text{ e } 99\%)$	6,99
VT	-0,05
$F(1, N - 3, 95\%)$	6,61

O teste de resíduos e o teste de *Rikilt* dão informação complementar acerca da linearidade do método (consultar secção 3.2). O primeiro fornece informação acerca da diferença entre o sinal obtido em cada padrão de calibração e o sinal estimado, obtido a partir da equação da reta. O segundo determina o fator de resposta resultante da diferença entre a linearidade de um ponto da curva de calibração face ao ponto imediatamente anterior. Nas Tabela 37 e 38 estão representados os valores dos testes de resíduos e *Rikilt* para a curva de calibração da metodologia de gama intermédia.

1 O gráfico apresentado foi traçado com base na relação: Área TCA/Área PI vs [TCA] / [PI], no entanto para facilitar a visualização da curva, esta é apresentada em função da Área TCA/Área PI vs [TCA] teórica.

Tabela 37: Testes de resíduos e Rikilt aplicados à gama intermédia de concentrações de TCA.

Média [TCA] / [PI]	Média Área TCA / Área PI	Média Área TCA / Área PI (estimado)	Resíduos	Fator de Resposta (FR) (yi/xi)	FRi / FR médio (%)
0,045	0,1137	0,1367	-16,9	2,526	104,2
0,178	0,4925	0,4426	11,3	2,767	114,2
0,317	0,7597	0,7623	-0,3	2,396	98,9
0,452	1,0833	1,0728	1,0	2,397	98,9
0,587	1,3402	1,3833	-3,1	2,283	94,2
0,722	1,6711	1,6938	-1,3	2,315	95,5
0,856	2,008	2,0020	0,3	2,346	96,8
0,989	2,3329	2,3078	1,1	2,359	97,3

Tabela 38: Análise dos resíduos e fator de resposta médio para a gama intermédia de concentrações.

Soma dos resíduos	-8,03
Fator de Resposta (FR) Médio	2,42
Coefficiente de Variação do FR (%)	6,46

Na Figura 15 estão representados os resíduos e os resultados do teste de Rikilt para a reta de gama baixa de concentrações obtidos a partir dos resultados experimentais.

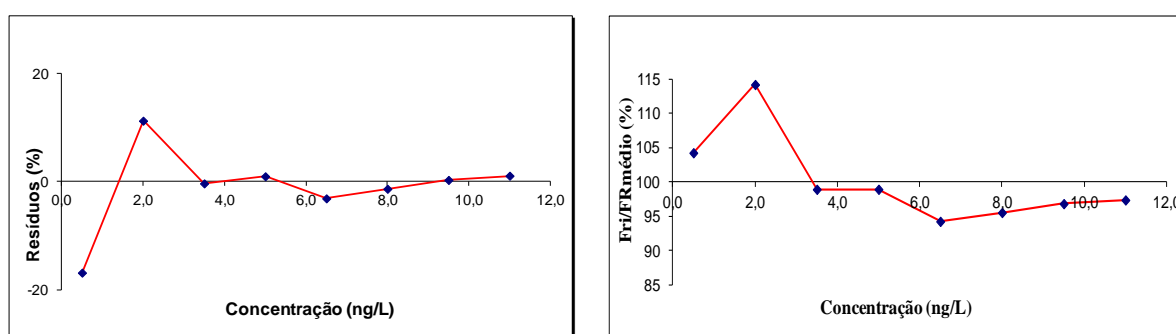


Figura 15: Linearidade: a) Análise de resíduos; b) teste de Rikilt para a gama intermédia de concentrações.

A determinação dos limiares analíticos (consultar secção 3.4) foi efetuada, recorrendo à análise, em condições de precisão intermédia (consultar secção 3.5) de dez repetições do padrão mais baixo de concentração (0,5 ng/L) da reta gama intermédia (Tabela 39).

Tabela 39: Limiares analíticos referentes à metodologia de gama intermédia.

Concentração de Analito (ng/L)	0,50	0,48	0,49	0,48	0,49	0,50	0,48	0,49	0,50	0,51	
LD (ng/L)						0,520					
LQ (ng/L)						0,575					

Foram realizados ensaios de recuperação com vista à determinação da exatidão do método. Estes foram efetuados a partir de amostras de produção diária com valores de TCA próximos de 3 ng/l e 1 ng/L respetivamente. A matriz destas amostras é resultado da lixiviação de rolhas de cortiça natural em solução etanólica a 12% (V/V) durante 24 horas. Estas amostras foram fortificadas com 1 ng/L de analito, foram analisadas e face aos resultados obtidos foi calculada a recuperação do analito em causa (Tabela 40).

*Tabela 40: Teste de recuperação para a metodologia de gama intermédia.*

Fortificação	Concentração inicial de TCA (ng/L)	Concentração com fortificação de TCA (ng/L)	Recuperação (%)
1 ng/L	1,25	2,23	98
	1,01	2,22	97
	1,01	1,98	97
Média	<b>1,09</b>	<b>2,1</b>	<b>97</b>
3 ng/L	4,06	3,1	96
	3,92	2,95	97
	3,96	2,97	99
Média	<b>3,98</b>	<b>3,01</b>	<b>97</b>

## 6 Discussão de resultados

Apesar do método de referência de quantificação de TCA apresentar bons indícios de precisão nos resultados analisados continha algumas lacunas do ponto de vista de exatidão e nos parâmetros da sua reta de calibração, nomeadamente equidistância entre pontos, gama de trabalho e linearidade. O método apresentava-se pouco exato, facto comprovado pela análise atenta da carta de controlo associada ao GC-ECD 8 (Figura 8) onde se evidenciava um desvio de  $\pm 1$  ng/L em relação à média de concentrações de padrão de controlo analisadas ao longo de um determinado período de tempo.

Na tentativa de colmatar as lacunas presentes no método em vigor no I&D da A&I, foi proposta uma metodologia focada na gama baixa de concentrações (0,5 a 5,5 ng/L). Da análise dos resultados obtidos com este método, é possível afirmar que possui baixa dispersão relativa ( $S_{y/x}$ ), suportados pelos baixos valores oriundos das dispersões relativas ao declive ( $S_b$ ) e ordenada na origem ( $S_a$ ) que culminam num coeficiente de variação do método reduzido (2,98%), (Tabela 5). Realizadas as dez repetições para os pontos extremos da reta de calibração (0,5 e 5,5ng/l) foi possível concluir que a gama de trabalho associada a esta metodologia se apresenta bem definida (Tabelas 6 e 7), uma vez que o valor teste PG é inferior ao valor F do teste de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 99%.

Relativamente à linearidade da curva de calibração, concluiu-se que esta era linear uma vez que para além do coeficiente de correlação ser superior a 0,995, o valor teste VT foi inferior ao teste F de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 95% (Tabela 8) e a soma dos resíduos encontrava-se relativamente próxima de zero. Apesar do teste de Rikilt se apresentar fora dos limites do FR (90-110%), a metodologia pôde ser validada (Figura 8, Tabelas 9 e 10). De forma a contornar os resultados obtidos na teste de Rikilt para esta metodologia, teria que se repetir o ensaio de toda a metodologia, ou então eliminar os pontos que se encontram fora da gama de validação para este teste de linearidade.

Os limiares analíticos, limite de deteção e de quantificação, obtidos a partir de 10 repetições do padrão de concentração mais baixo, 0,5ng/l, analisados em condições de precisão intermediária, apresentam valores de 0,531 e 0,621 ng/L respetivamente (Tabela 11). No que diz respeito aos testes de recuperação concluiu-se que a metodologia se apresentava exata, uma vez que mostrou recuperações perto dos 100% (Tabela12).

Embora esta metodologia apresentasse valores dos parâmetros de validação aceitáveis, para a realidade do laboratório, não seria suficiente trabalhar com uma curva de calibração até 5,5 ng/L e ter um limite de quantificação de 0,621 ng/L também não corresponderia às necessidades do mercado. Assim foi testada uma nova metodologia com uma curva de



calibração cujos padrões de calibração variavam entre 0,5 e 28ng/L de forma a contemplar também gamas altas de concentração de TCA.

Dos testes realizados, concluiu-se que a baixa dispersão relativa ao método ( $S_{y/x}$ ), suportados pelos baixos valores oriundos das dispersões relativas ao declive ( $S_b$ ) e ordenada na origem ( $S_a$ ) resultaram num coeficiente de variação do método relativamente reduzido (2,11%), (Tabela 14). Realizadas as dez repetições para os pontos extremos da reta de calibração (0,5 e 28,0 ng/l) foi possível concluir que a gama de trabalho associada a esta metodologia se apresenta bem definida (Tabela 15 e 16), uma vez que o valor teste PG é inferior ao valor F do teste de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 99%.

Quanto á linearidade da curva de calibração, concluiu-se que esta se apresentava linear uma vez que para além do coeficiente de correlação ser superior a 0,995, o valor teste VT foi inferior ao teste F de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 95%, e pela análise do teste de *Rikilt* que apresenta um valor do fator de resposta (FR) dentro dos limites (Tabela 17). A soma dos resíduos apresentava-se num valor muito superior a zero e este resultado poderá ser justificado pela grande diferença existente entre o último e o primeiro padrão analisados dado que os resíduos foram calculados tendo por base o declive e ordenada na origem da curva de calibração do método. Existe também a possibilidade de tal discrepância dos resultados residir no facto de que durante a análise terem ocorrido manutenções no equipamento, nomeadamente troca de fibra, que pode ter resultado na adulteração do sinal observado para o padrão de concentração mais baixa (Tabelas 18 e 19 e Figura 10).

Os limiares analíticos, limite de deteção e de quantificação, obtidos a partir de 10 repetições do padrão de concentração mais baixo, 0,5ng/l, analisados em condições de precisão intermediária, apresentam valores de 0,668 e 0,887 ng/L respetivamente (Tabela 20).

Uma vez que os resultados obtidos com a metodologia da gama alta não se mostraram os mais desejados, foram realizadas três alterações que poderiam melhorar o desempenho dos parâmetros de validação. Deste modo, foram realizados testes com vista alteração do tempo em que a fibra fica exposta à solução presente no *headspace do vial*, alteração do tempo de abertura da válvula de *Split/Splitless*, e a criação de uma nova rampa de temperatura. Foram realizados testes com triplicados durante 8, 16 e 24 minutos de exposição da fibra a adsorver TCA da amostra, tendo-se concluído que o maior tempo de adsorção conduzia a uma maior área dos picos cromatográficos, facto que se justifica pela necessidade de mais tempo para o TCA ser totalmente adsorvido na fibra.

Dos testes realizados para a mudança de tempo de abertura de válvula do injetor, concluiu-se que existia uma diferença significativa entre os resultados até aos 2 minutos e os resultados obtidos nos tempos seguintes, nomeadamente 3 e 4 minutos. Até 2 minutos as áreas de TCA e

de padrão interno tendiam a aumentar, no entanto a partir deste período de tempo essas áreas começavam a diminuir. É provável que este facto seja devido à dispersão de TCA e padrão interno no sistema de injeção, que é maior a 4 do que a 2 minutos. Desta forma a quantidade de analito e padrão interno que entra na coluna será ligeiramente menor.

A reformulação da rampa de temperatura não surtiu o efeito desejado, uma vez que gerou o aparecimento de novos picos, contribuindo para o aumento da dificuldade de quantificação de TCA (Figura11). Por este facto esta mudança operacional não foi tida em conta nas metodologias posteriormente estudadas.

A nova metodologia desenvolvida, designada por gama alta 2, foi implementada para incluir um tempo de adsorção de fibra de 24 minutos e um tempo de abertura de válvula de *Split/Splitless* de 2 minutos. Os resultados obtidos com esta nova metodologia mostraram baixa dispersão do método ( $S_{y/x}$ ), suportados pelos baixos valores oriundos das dispersões do declive ( $S_b$ ) e ordenada na origem ( $S_a$ ) que culminaram num coeficiente de variação do método reduzido (2,20 %), (Tabela 24). Realizadas as dez repetições para os pontos extremos da reta de calibração (0,5 e 28 ng/L) foi possível concluir que a gama de trabalho associada ao método gama alta se apresentava bem definida, uma vez que o valor teste PG foi inferior ao valor F do teste de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 99%.

Relativamente á linearidade da curva de calibração concluiu-se que esta se apresentou linear uma vez que para além do coeficiente de correlação ser superior a 0,995, o valor teste VT foi inferior ao teste F de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 95% (Tabelas 26 e 27), e pela análise do teste de *Rikilt* que apresentava um valor do fator de resposta (FR) dentro dos limites especificados (90-110%). A soma dos resíduos encontrava-se num valor muito superior a zero e este resultado pode ser justificado de forma análoga ao que acontece na reta gama alta original uma vez que a manutenção à estrutura do equipamento embora que necessária, pode ter alterado a qualidade dos resultados (Tabelas 28 e 29 e Figura 13).

Os limiares analíticos, limite de deteção e de quantificação, obtidos a partir de 10 repetições do padrão de concentração mais baixo, 0,5 ng/l, analisados em condições de precisão intermediária, apresentaram valores de 0,543 e 0,600 ng/L respetivamente (Tabela 30). Embora os resultados obtidos ao fim de 24 minutos de exposição da fibra ao TCA se apresentassem consideravelmente melhores, o tempo de análise total de cada amostra também aumentava substancialmente. De facto a produtividade de cada cromatógrafo seria manifestamente reduzida se o tempo de adsorção na fase de SPME passasse dos atuais 8 para 24 minutos, passando o I&D da A&I a fazer 1/3 das 800 amostras diárias. No que diz respeito aos testes de recuperação concluiu-se que a metodologia gama alta 2 apresentava uma elevada exatidão, uma vez que apresentou recuperações na ordem dos 100% (Tabela 31).

Assim tornou-se imperioso desenvolver uma metodologia capaz de contemplar uma gama de trabalho que satisfizesse toda a gama de concentrações definida pela A&I quanto às especificações dos seus produtos. Deste modo, foi criada a metodologia de gama intermédia, com uma gama de trabalho de 0,5 e vai até 11ng/L e que integra algumas características das metodologias anteriores, nomeadamente tempo de exposição da fibra SPME de 8 minutos (igual ao método de referência), tempo de abertura da válvula *Split/Splitless* de 2 minutos e a rampa de temperatura usada no método de referência (consultar secção 4.3.1).

Pela análise dos resultados obtidos foi possível afirmar que esta metodologia apresentava baixa dispersão ( $S_{y/x}$ ), baseada nos baixos valores oriundos das dispersões do declive ( $S_b$ ) e ordenada na origem ( $S_a$ ) que resultaram num coeficiente de variação do método bastante reduzido (0,30%), (Tabela 33). Realizadas as dez repetições para os pontos extremos da reta de calibração (0,5 e 11,0 ng/L) foi possível concluir que a gama de trabalho associada ao método se apresentava bem definida (Tabela 34), uma vez que o valor teste PG é inferior ao valor F do teste de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 99%.

No que diz respeito à linearidade da curva de calibração, concluiu-se que esta era linear uma vez que para além do coeficiente de correlação ser superior a 0,995, o valor teste VT foi inferior ao teste F de *Fisher/Snedcor* com um grau de confiança de 95% apesar do teste de *Rikilt* apresentar um valor do fator de resposta (FR) fora dos limites especificados (90-110%). Estes testes foram validados pela análise da soma dos resíduos, que se encontrava próximo de zero (Tabelas 37, 38 e Figura 15). De forma a corrigir os resultados obtidos no teste de *Rikilt* para esta metodologia, teria que se repetir o ensaio de toda a metodologia, ou então eliminar os pontos que se encontravam fora da gama de validação (rejeitados) para este teste de linearidade e voltar a recalcular.

Os limiares analíticos, limite de deteção e de quantificação, obtidos a partir de dez repetições do padrão de concentração mais baixo, 0,5 ng/L, analisados em condições de precisão intermediária, apresentavam valores de 0,520 e 0,575 ng/L respetivamente (Tabela 39). No que diz respeito aos testes de recuperação concluiu-se que a nova metodologia (gama intermédia) se apresentava exata, uma vez que mostrava recuperações na ordem dos 100 %, tanto para a fortificação de amostras com 3 ng/L como para a fortificação de amostras com 1 ng/L (Tabela 40).

De notar que todas as operações realizadas com as metodologias tiveram em conta a análise da razão de concentrações entre o TCA e o padrão interno em função do sinal (razão da área de TCA pela área de padrão interno).

## 7 Conclusões

Ao longo deste trabalho procedeu-se à otimização do método de análise da A&I para a quantificação de TCA por cromatografia em fase gasosa acoplada a microextração em fase sólida.

A partir de diferentes curvas de calibração, usando padrões de calibração de 0,5 ng/L até 28,0 ng/L foram estudadas quatro diferentes metodologias de análise de TCA com vista à implementação de uma que fosse capaz de responder às necessidades da empresa. As metodologias, depois de desenvolvidas, foram validadas e mostraram-se capazes de responder com o desempenho adequado aos parâmetros de validação necessários para a obtenção de um método mais preciso e exato do que o método de referência em vigor no I&D. Ao mesmo tempo as propostas de alteração ao método de referência preenchem as necessidades da empresa na medida em que, alterações à gama de trabalho e ao tempo de abertura da válvula de *Split/Splitless* foram suficientes para que o método cumprisse os parâmetros de validação, sem afetar o tempo de análise de cada macerado analisado.

Das metodologias propostas e face às especificações de mercado, a metodologia de gama intermédia de concentração de TCA apresentou-se como uma boa candidata à implementação. Possui um tempo de extração de 8 minutos, a rampa de temperatura igual ao método de referência e um tempo de abertura da válvula de *Split/Splitless* de 2 minutos. Tais características, associadas à gama de trabalho compreendida entre 0,5 e 11ng/L, geraram bons indicadores de limiares analíticos, nomeadamente o limite de deteção de 0,52 ng/L e limite de quantificação de 0,56 ng/L, contribuindo para a melhoria qualitativa e quantitativa relativamente ao método de referência.

As restantes metodologias propostas servem como referência para outras gamas de trabalho, uma vez que apesar de específicas para uma determinada gama de concentrações de TCA, apresentaram indicadores de *performance* superiores ao método de referência.

Assim, a partir deste trabalho, a empresa estará em condições de implementar um método cromatográfico mais preciso e exato do que aquele que atualmente usa na sua rotina laboratorial para a quantificação de TCA.

## 7.1 Objetivos Realizados

O trabalho realizado consistiu na criação de alternativas viáveis ao método de referência em vigor no laboratório do I&D da A&I.

Para o efeito procedeu-se à realização de análises de padrões de calibração pertencentes a três metodologias distintas e à análise dos parâmetros operacionais passíveis de serem alterados com o objetivo da melhoria do método de referência.

Os objetivos traçados foram atingidos pelo que os resultados do trabalho desenvolvido permitem que o laboratório do I&D da A&I possa proceder à implementação do método mais favorável à rotina diária de análises e, também, em futuros projetos procurar o seu aprofundamento.

## 7.2 Outros Trabalhos Realizados

No decorrer do estágio referente à dissertação no laboratório do Departamento de I&D da A&I, foram realizados trabalhos de rotina laboratorial. Diariamente o laboratório recebe cerca de 800 amostras diárias provenientes das oito unidades industriais, que são preparadas e analisadas recorrendo a GC-ECD e GC-MS para a deteção de TCA.

Esta colaboração contribuiu para a aquisição de experiência e conhecimentos que se mostraram úteis na fase da realização das análises referentes ao trabalho desenvolvido no decorrer da dissertação.

Foram aprendidas algumas técnicas de manutenção do equipamento de cromatografia, conceitos que permitiram uma melhor aprendizagem na hora de fazer testes a parâmetros modificáveis no cromatógrafo.

Foram realizados ainda outras tarefas: preparação de soluções-mãe, preparação de padrões, reclamações de clientes e preparação de análises sensoriais e desenvolvimento da qualidade olfativa relativamente aos odores encontrados na cortiça.

## 7.3 Limitações e Trabalho Futuro

Ao longo dos 5 meses de estágio, as dificuldades e limitações foram aparecendo. Um dos fatores mais relevantes para o desenvolvimento de um bom projeto é o tempo disponível para a sua realização e que muitas vezes se torna limitante para o trabalho. Aliado à escassez de tempo, junta-se a necessidade de conjugar o funcionamento normal de análises do laboratório com a necessidade de realização do trabalho de estágio e conseqüente esforço no sentido de encontrar tempo para o uso do equipamento sem comprometer o normal funcionamento da rotina de análises.

Como trabalho futuro, e uma vez que as retas de calibração foram validadas para as gamas de concentração estudadas, é de extrema relevância testar e implementar estes novos métodos nos restantes cromatógrafos disponíveis no departamento do I&D.

Importa no futuro testar novas rampas de temperatura capazes de fornecer resultados mais concretos, relativamente aos resultados conseguidos após as tentativas de implementação de uma nova e reformulada rampa de temperaturas no GC-ECD 8.

## **7.4 Apreciação final**

Dada a continua concorrência num mercado já muito explorado, a empresa Amorim & Irmãos possui o dever de fornecer aos seus clientes um produto final, rolhas de cortiça, com elevada qualidade. Tal só é possível se a deteção e quantificação dos contaminantes for capaz de seguir a tendência do mercado, fornecendo cada vez melhores resultados, contribuindo assim para que a A&I permaneça no topo da indústria corticeira.

O autor deste projeto otimizou o método de referência utilizado pelo laboratório de I&D da A&I, com a sugestão de quatro novas metodologias capazes de suprir as exigências do mercado e assim garantir a qualidade dos resultados.

Devido ao grau de complexidade, todo o trabalho realizado contribuiu para o enriquecimento pessoal e profissional do autor deste projeto, contribuindo num um acréscimo de conhecimento, complementando o conhecimento obtido durante a formação académica realizada ao longo do curso.

## 8 Referências

- Álvarez-Rodríguez, M.L., Análisis de la producción de 2,4,6-tricloroanisol por hongos filamentosos aislados de corcho. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Universidad de Extremadura, 2003.
- Bouton, S., Chatonnet, P., Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine, *Journal of Chromatography A*, 1141, 1-9, 2007.
- Cabral, M., Roseira, I., Lopes, P. Amorim: un caso de suceso en la lucha contra el TCA, *Revista Enología* nº3 Año VI Mayo-Junio, 26-28, 2009.
- Capone, D.L.; Skouroumounis, G. K. ; Barker, D. A. ; et al.. Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98, 1999.
- Coque, J.J.R, Rodríguez, M.L.A., Goswami, M., Martínez, R.F., Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles), INBIOTEC, ASECOR, 7-26, Lión, 2006.
- Coque, J.R., Pérez, E.P., Goswami, M., et al.. Contaminação do vinho por Haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis. APCOR Associação Portuguesa de Cortiça. 1-60, 2006.
- Chaudhry, G. R., e Chapalamadugu, S. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiological Reviews*, 55 (1), 59-79, 1991.
- Fortes, M.A., Rosa, M.E., Pereira, H., A Cortiça, 2ª Edição, Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2006.
- Hervé, E., Price, S., Burns, G. e Weber, P. Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork, ETS Laboratories, 2004.
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulos, D., et al.. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141-145, 1997.
- ISO 13528, Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, 2005
- ISO 5725-1, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods: general principles and definitions, Part1, First Edition, 1994.
- ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: basic method for determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method, Part 2, First Edition, 1994.
- ISO 5725-3, Accuracy (trueness and precision) of measurement method: intermediate measures of precision of a standard measurement method, Part 3, First Edition 1994
- ISO 8466-1, Water quality: Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Statistical evaluation of linear calibration function, Part 1, First Edition, 1990.
- ISO 8466-2, Water quality: Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Statistical evaluation of linear calibration function, Part 1, First Edition, 1990.
- ISO 20752. Rolhas de cortiça - Determinação do 2, 4, 6-tricloroanisole (TCA) libertável. 1ª Edição; (2007)
- ISO 22308. Rolhas de cortiça - Análise sensorial. 1ª Edição; (2005)
- Lopes, T., Estudos de migração de 2,4,6-tricloroanisol através de rolhas, Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Universidade do Porto, Porto, 2008.
- RELACRE; Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de ensaio em análise química, Associação de Laboratórios acreditados de Portugal, Fevereiro 2000.
- Robinson, Jancis. 2002. "Mourning the cork in New York", Acedido a 16 Janeiro 2016
- van Trijp, J.M.P and Ross. A.H, "RIKILT-DLO, Model for the Calculation of Calibration Curves," *RIKILT report 91.02*, Wageningen, Netherlands, 1991.

## Anexo 1 Preparação da solução-mãe de TCA

- Pesar 10 mg de 2,4,6-TCA numa balança analítica e dissolver com etanol a 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL, de onde se obtém uma concentração de 100 mg/L (**solução 1**);
- Pipetar 100 µL da solução 1 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL, de onde se obtém a concentração de 100µg/L (**solução 2**).
- Pipetar 10 mL da solução 2 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL, concentração obtida de 10µg/L (**solução 3**);
- Pipetar 10 mL da solução 3 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL, concentração obtida de 1µg/L (**solução 4**);
- Pipetar 10 mL da solução 4 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão volumétrico de 100 mL, concentração obtida de 100ng/L (**solução 5**).



## Anexo 2 Preparação de soluções-mãe de Padrão interno

- pesar 10 mg de 2,3,6-TCA numa balança analítica e dissolver com etanol a 96% (V/V) num balão de 100 mL, de onde se obtém uma concentração de 100 mg/L (**solução 6**);
- pipetar 100 µL da solução 6 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão de 100 mL, de onde se obtém a concentração de 100000µg/L (**solução 7**).
- pipetar 10 mL da solução 7 e diluir em etanol 96% (V/V) num balão de 100 mL, concentração obtida de 100µg/L (**solução 8**).

Finalmente da **solução 8** pipetar o volume necessário para se obter a concentração necessária para o fim a aplicar.

*Tabela A2.1: Preparação de soluções-mãe de PI.*

Concentração de PI (ng/L)	Volume de diluição (mL)	Volume de 2,3,6-TCA adicionado
5,5	100,0	550 µL
11,0		1,1 mL
20,0		2,0 mL
28,0		2,8 mL

## Anexo 3 Preparação dos padrões de calibração

Tabela A3.1. Preparação de padrões de calibração

Concentração de padrão	Volume de solução etanólica (ml)	Volume da solução 5 ( $\mu\text{L}$ ) de 2,4,6- TCA	Volume da solução 4 ( $\mu\text{L}$ ) de 2,4,6- TCA	Volume da solução 3 ( $\mu\text{L}$ ) de 2,4,6- TCA	Volume da solução de PI ( $\mu\text{L}$ )	
0,5	10,0	50			100	
1,0		100				
1,5		150				
2,0		200				
2,5			25			
3,0			30			
3,5			35			
4,0			40			
4,5			45			
5,0			50			
5,5			55			
6,0			60			
11,0			110			
11,5			115			
16,0			160			
17,0			170			
21,0						21
22,5						22,5
26,0						26
28,0						28

Solução 3: 2,4,6-TCA 10  $\mu\text{g/L}$

Solução 4: 2,4,6-TCA 1  $\mu\text{g/L}$

Solução 5: 2,4,6-TCA 100  $\text{ng/L}$

Solução de PI: 2,3,6-TCA concentração de acordo com a metodologia em questão

## Anexo 4 Cálculos auxiliares

$$\text{Declive (b)} \quad b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{A4.1})$$

$$\text{Ordenada na origem (a)} \quad a = \bar{y} - b \times \bar{x} \quad (\text{A4.2})$$

$$\text{Desvio Padrão do Declive (S}_b\text{)} \quad S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{A4.3})$$

$$\text{Desvio Padrão da ordenada na origem (S}_a\text{)} \quad S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \times \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{A4.4})$$

$$\text{Desvio Padrão do Método (S}_m\text{)} \quad S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (\text{A4.5})$$

$$\text{Coeficiente de variação do método (CV}_m\text{)} \quad CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{A4.6})$$

## Anexo 5 Metodologia SPME-GC/ECD

A cromatografia gasosa acoplada a microextração em fase sólida e cujo detetor é o ECD possui várias peças de equipamento. Assim:

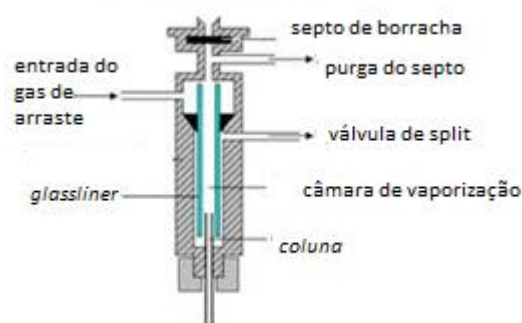
O **incubador** é a peça de equipamento que pré-aquece a amostra antes de ser analisada. Esta etapa é muito importante uma vez que a amostra vaporiza para o *headspace* do *vial* permitindo posteriormente a exposição á fibra.

A **fibra** é o componente responsável por realizar a adsorção do TCA, quando o *vial* se encontra na incubadora e a dessorção do mesmo para o injetor.

O **injetor** tem como finalidade vaporizar a amostra. A temperatura de operação no injetor deve ser suficiente para que a amostra seja vaporizada, antes de entrar na coluna. Normalmente usa-se uma determinada temperatura, que é escolhida considerando o componente da amostra com o menor ponto de ebulição (a menos volátil). Na parte superior do injetor encontra-se o septo, que é um pequeno disco de borracha siliconizada, cuja finalidade é isolar o sistema cromatográfico do meio ambiente. Existe ainda o *glassliner*, que é uma peça em vidro que possui baixa condução de calor, é inerte e minimiza a decomposição da amostra dentro do injetor.

Neste projeto foi utilizado o modo *Split/Splitless* para fins de análise, uma vez que este modo oferece o benefício da análise dos componentes da amostra através de uma vasta gama de concentrações sem a necessidade da sua diluição.

No modo *Split* o fluxo de gás de purga passa através do septo e ocorre a abertura da válvula de escape. Tal culmina na saída de parte da amostra, que é libertada para fora do sistema. Pelo contrário, no modo *Splitless*, verifica-se que a amostra vaporizada que vai ser analisada é totalmente enviada para a coluna cromatográfica, visto que as válvulas de escape se encontram fechadas (*Figura A5.1*).



*Figura A5.1: Injetor de modo Split/Splitless*

A **coluna** cromatográfica é o espaço físico onde se verifica a separação dos componentes de uma amostra. Existem vários tipos de coluna, no entanto, neste projeto foi usada a coluna capilar, porque permite a realização de separações delicadas e apesar de serem mais difíceis de operar possuem melhores tempos de análise, maior resolução e maior eficiência. Os componentes injetados são retidos pela fase estacionária da coluna e separam-se pelo facto de percorrerem a coluna com velocidades diferentes

O **detetor** é responsável pela deteção dos componentes que estão presentes na amostra. Ele mede a variação do sinal elétrico produzido pela variação da composição do gás de arraste. O GC-ECD (detetor usado nestes projeto) é utilizado para detetar moléculas e átomos presentes num composto gasoso, através da captura de eletrões que ionizam quando excitados. Quando as moléculas se deslocam através do detetor, este captura alguns dos eletrões na amostra o que provoca uma redução na corrente elétrica. Esta é assinalada pelo aparecimento de um pico positivo no cromatograma.

O ECD é utilizado para a deteção de componentes com eletronegatividade elevada, tais como compostos halogenados. Utiliza um emissor radioativo de partículas beta em conjunto com um gás de compensação que flui através da câmara do detetor. É utilizado azoto porque exhibe uma baixa energia de excitação e por isso torna-se fácil remover os eletrões. Estes, ao serem emitidos a partir do emissor de eletrões colidem com as moléculas do gás de compensação, resultando na afluência de eletrões livres. Consequentemente, os eletrões são acelerados para um ânodo carregado positivamente, gerando uma corrente. À medida que a amostra é transportada para o detetor, o gás transportador absorve moléculas de analito e assim, reduz a corrente entre o ânodo e o cátodo coletor. A concentração de analito é então proporcional ao grau de captura de eletrões.

O gás de transporte (Hélio) possui características de baixa concentração de água, oxigénio e impurezas, uma vez que estes podem interagir com a fase estacionária, causar ruído na linha de base e reduzir a resposta do detetor. Além disso, o gás de suporte deve ter níveis excepcionalmente baixos de hidrocarbonetos halogenados, uma vez que o ECD é extremamente sensível a estes compostos.

O **forno**, tal como o nome indica, é a peça responsável pelo aquecimento da coluna cromatográfica. Aqui, torna-se importante a aplicação de uma rampa de temperatura que se verifique adequada à análise em questão. Esta parte do processo é muito importante, pois delimita não só a temperatura de início e fim do processo analítico, mas também a subida/descida gradual ou repentina da temperatura que permitem a otimização da análise processual.

## Anexo 6 Metodologia de gama baixa (0,5 a 5,5 ng/L e PI de 5,5 ng/L)

Tabela A6.1: Gama de trabalho metodologia gama baixa.

Concentração		Sinal									
i	xi	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
1	0,091	0,422	0,430	0,413	0,423	0,397	0,433	0,435	0,382	0,429	0,431
2	0,180	0,547									
3	0,269	0,679									
4	0,357	0,803									
5	0,453	0,966									
6	0,544	1,089									
7	0,634	1,203									
8	0,724	1,346									
9	0,815	1,415									
10	0,905	1,535									
11	0,995	1,683	1,685	1,686	1,677	1,696	1,693	1,698	1,681	1,704	1,760

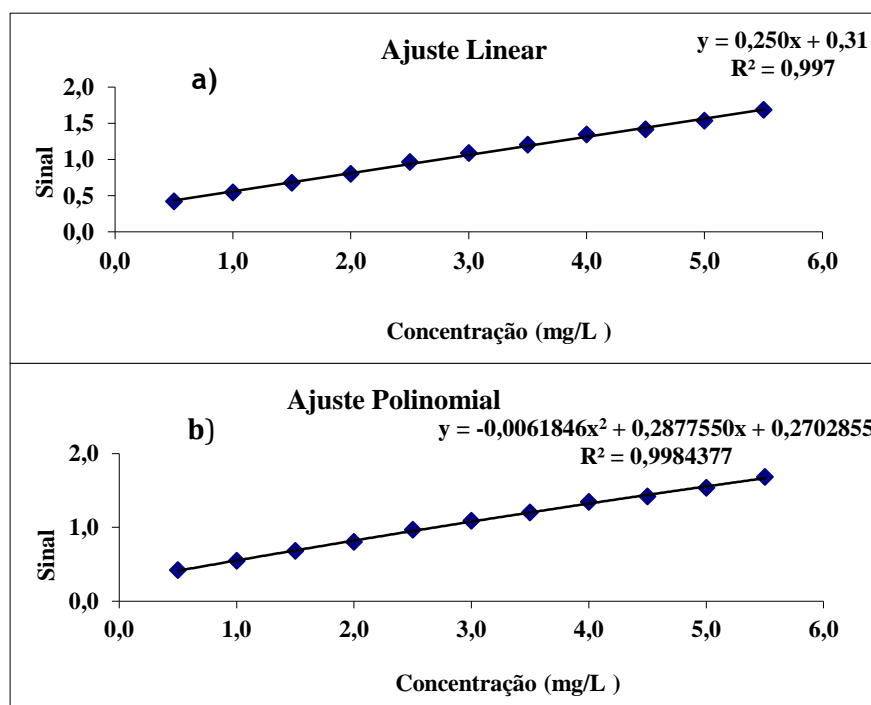


Figura A6.1: a) Ajuste: linear; b) ajuste polinomial de linearidade gama baixa.

## Anexo 7 Metodologia de gama alta 0,5 a 28 ng/L e Padrão interno de 28 ng/L)

Tabela A7.1: Gama de trabalho da metodologia gama alta.

Concentração xi	Sinal									
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
0,018	0,038	0,038	0,047	0,020	0,020	0,012	0,029	0,014	0,016	0,191
0,213	0,496									
0,406	0,987									
0,601	1,542									
0,802	2,069									
1,000	2,587	2,604	2,565	2,592	2,587	2,595	2,618	2,571	2,613	2,061

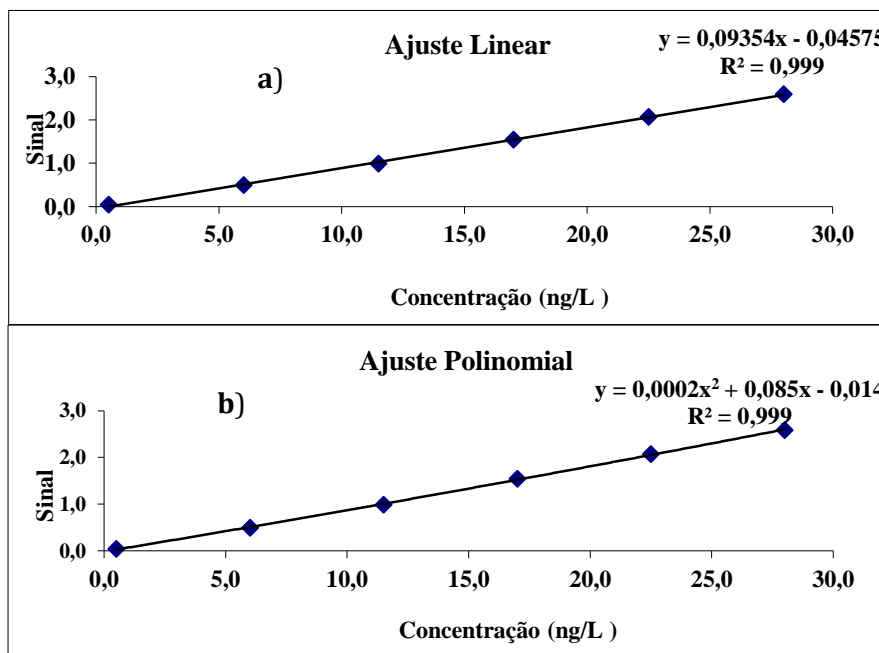


Figura A7.1: Ajustes: a) linear; b) polinomial de linearidade gama alta.

## Anexo 8 Metodologia gama alta 2 (0,5 a 28,0 ng/L e Padrão interno de 28,0 ng/L)

Tabela A8.1: Gama de trabalho metodologia gama alta 2.

Concentração xi	Sinal									
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
0,018	0,037	0,038	0,033	0,016	0,010	0,011	0,014	0,014	0,015	0,016
0,213	0,456									
0,406	0,891									
0,601	1,403									
0,802	1,866									
1,000	2,318	2,293	2,290	2,316	2,280	2,322	2,333	2,326	2,384	2,248

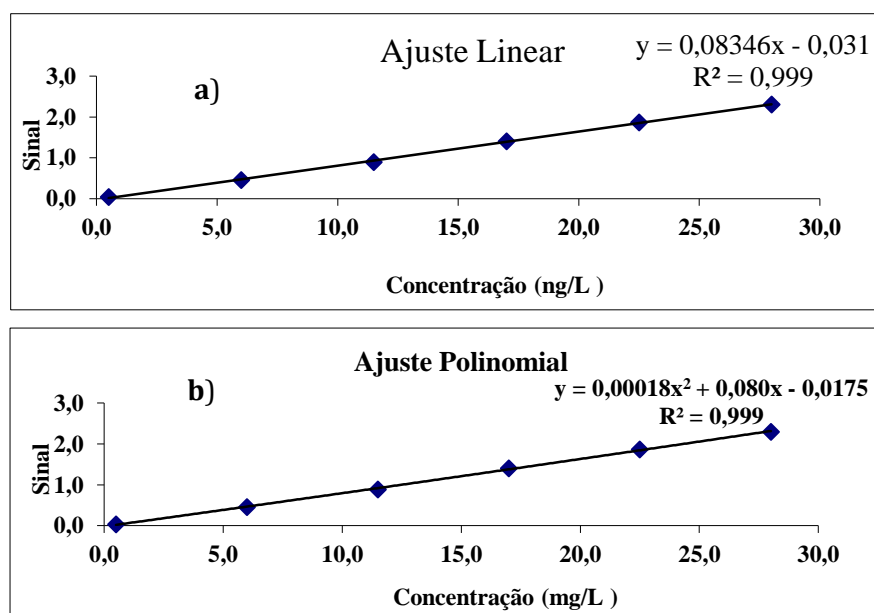


Figura A8.1: Ajustes: a) linear; b) polinomial de linearidade da gama alta 2.



## Anexo 9 Metodologia de gama intermédia (0,5 a 11,0 ng/L) e Padrão interno de 11,0 ng/L

Tabela A9.1: Gama de trabalho metodologia gama intermédia.

Concentração Xi	Sinal									
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	ensaio 4	ensaio 5	ensaio 6	ensaio 7	ensaio 8	ensaio 9	ensaio 10
0,045	0,152	0,132	0,152	0,134	0,108	0,148	0,136	0,150	0,148	0,104
0,178	0,492									
0,317	0,760									
0,452	1,083									
0,587	1,340									
0,722	1,671									
0,856	2,008									
0,989	2,333	2,249	2,381	2,334	2,393	2,344	2,397	2,401	2,329	2,366

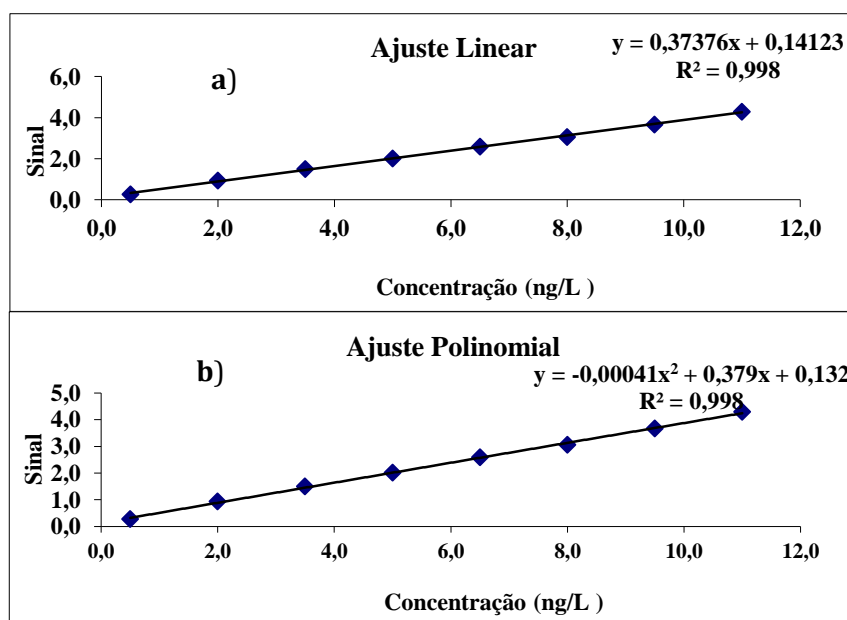


Figura A9.1- Ajustes: a) linear; b) polinomial de linearidade gama intermédia.

## Anexo 10 Outras referências consultadas e não referenciadas no documento

- Amon, J.M., Simpson, R. F., Wine corks: a review of the incident of cork related problems and the means for their avoidance, *Australian Grapegrower and Winemaker*, 286, 63-80, 1986.
- Amorimcork. Qualidade e I&D, disponível em <http://www.amorimcork.com> (acedido em 6 de Outubro de 2015).
- Alves, A. Complementos de Cromatografia, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2009.
- Barker, D.A, Capone, D.L., Pollnitz, A.P., Mclean, H.J., Francis, I.L., Oakey, H., Sefton, M.A., Adsorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 40-46, 2001.
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Bouton, S., Labadie, M.D., Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1255-1262, 2004.
- Chatonnet, P., Boutou, S., Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quatitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine, *Journal of Chromatography A*, 1141, 1-9, 2007.
- Cork quality council, <http://www.corkqc.com/S-mat/SensoryNotes3.pdf>, acedido a 17 Novembro de 2015.
- Grande, Marcelo, Cromatografia Gasosa: princípios básicos. Consultado em 15 Outubro 2015.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*, v. 48, p. 729-736, 1999.
- Miller, James N.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 2005
- Oliveira, K, “Cortiça, a “joia” da economia portuguesa”, (2011) <Http://jpn.up.pt/2011/06/08/cortica-a-joia-da-economia-portuguesa> consultado a 20 Outubro de 2015.
- Sefton, M.A. e Simpson, R.F. (2005) Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 226-240.
- Sefton, M.A. e Simpson, R.F. 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 (2007)
- Taber\_Cork\_i-278\_PTR, page 157, <https://www.bonnydoonvineyard.com/wp-content/uploads/2014/06/Ch15-The-Funeral-for-The-Cork.pdf>. Acedido a 21 Janeiro de 2016.
- VALIDATION of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH,. 5 p. (ICH Harmonised Tripartite Guideline). (CPMP/ICH/381/95). (1995)