



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2016

**Tatiana Cláudia
Amorim Nogueira
Baptista**

**Análise da incidência de TCA e seus precursores em
cortiça e sua relação com as características
edafoclimáticas de origem**

**Analysis of TCA incidence and its precursors in cork
and its relation with soil and climatic characteristics
of origin**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2016

**Tatiana Cláudia
Amorim Nogueira
Baptista**

**Análise da incidência de TCA e seus precursores em
cortiça e sua relação com as características
edafoclimáticas de origem**

**Analysis of TCA incidence and its precursors in cork
and its relation with soil and climatic characteristics
of origin**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro e da Engenheira Ana Cristina Lopes Cardoso, Diretora do Departamento de Investigação e Desenvolvimento da Cork Supply Portugal.

Dedico este trabalho à minha família pelo incansável apoio.

O júri

Presidente

Dr.^a. Rita Maria Pinho Ferreira

Professora Auxiliar do Departamento de Química, da Universidade de Aveiro

Arguente

Dr.^a. Paula Cristina de Oliveira Rodrigues Pinto

Investigadora do RAIZ - Instituto de Investigação da Floresta e Papel

Orientador

Dr.^a. Carmen Sofia da Rocha Freire Barros

Investigadora Principal do Departamento de Química, CICECO, da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

É com grande alegria e satisfação que, neste momento, faço uma retrospectiva do meu percurso académico. Gostava de começar por fazer um agradecimento especial à Cork Supply Portugal por me ter recebido e pelas ótimas condições proporcionadas. Agradeço à Engenheira Ana Cristina pelo acompanhamento, encorajamento e por todo o apoio e confiança que depositou em mim desde o primeiro dia. Um agradecimento à Doutora Carmen Freire por todo o apoio prestado, pela simpatia e disponibilidade com que sempre me recebeu.

Agradeço ainda a todos os elementos da equipa I&D da Cork Supply, pela boa disposição, motivação e apoio nos momentos mais difíceis.

Um obrigada também à Inês, a minha companheira durante estes anos de percurso académico.

Agradeço a Deus por toda a força que me tem dado e um enorme obrigado à minha família, sem eles certamente não teria conseguido levar este trabalho até ao fim!

Palavras-chave

Cortiça, HS-SPME-GC-MS, validação de método analítico, TCA, clorofenóis, características edafoclimáticas.

Resumo

A cortiça é um material de excelência e dos produtos com maior destaque na economia portuguesa, quer pelo elevado nível de exportações quer pela criação de emprego associada a este setor. A aplicação dada à cortiça com maior relevância económica é a rolha natural para vedação de vinhos. Contudo, alguns compostos halogenados presentes na cortiça, ao migrarem para o vinho, podem comprometer a sua qualidade levando a perdas significativas tanto para a indústria corticeira como para os produtores de vinho. Neste sentido, é de extrema importância o desenvolvimento e a aplicação de métodos de análise que permitam a quantificação simultânea das principais moléculas identificadas como responsáveis pelos desvios organoléticos dos vinhos. O presente trabalho surge com o objetivo de validar um método para análise simultânea de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) e clorofenóis em cortiça e a sua posterior aplicação na análise de cortiças provenientes de diferentes locais da Península Ibérica, de forma a verificar uma possível relação entre a concentração destes compostos e as características edafoclimáticas de origem da cortiça.

Com o objetivo de validar o método de análise, foram realizados estudos de linearidade, limiares analíticos, precisão, exatidão e robustez. Estes estudos permitiram considerar o método analítico como validado e implementá-lo nas análises de rotina do laboratório.

Ao longo deste trabalho analisaram-se 46 amostras de cortiça, das quais 32 eram provenientes de Portugal e 14 de Espanha. Os resultados obtidos permitiram concluir que a cortiça da região da Andaluzia é aquela com valores médios e máximos mais elevados tanto para o TCA como para os clorofenóis, sendo a densidade do montado uma possível explicação para esta ocorrência, uma vez que, nesta região, o montado de sobro é muito denso (elevado número de árvores, pouca luz e exposição solar e mau arejamento), possivelmente propiciando o desenvolvimento fúngico e consequente formação destes compostos.

Keywords

Cork, HS-SPME-GC-MS, analytical method validation, TCA, chlorophenols, soil and climate characteristics.

Abstract

Cork is an excellence material and one of the most relevant products of the portuguese economy, either by the high level of exports and the number of jobs created by this industrial sector. The most important application of cork is as cork stopper for sealing wine bottles. However, some halogen containing compounds, by migrating to the wine, can compromise its quality causing significant financial losses for both the cork industry and winemakers. In this way, it's extremely important the development and application of methods of analysis to allow the quantification of those molecules responsible for the sensory deviations of wine.

This work arises with the aim of validating a method for the simultaneous analysis of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and chlorophenols in cork and it's subsequent application in the analysis of cork samples from different locations in the Iberian Peninsula, to verify a possible relationship between the concentration of these compounds and the characteristics of the climate and the soil of the original cork tree.

In order to validate the analytical method, linearity, analytical precision, accuracy and robustness studies have been performed. These studies allowed the validation of the analytical method and its implementation in the laboratory routine analysis.

Throughout this thesis 46 cork samples were analyzed; 32 of them came from Portugal and 14 from Spain. The obtained results allow to conclude that the cork from Andalusian region is the one with higher values for both TCA and chlorophenols, being the density of the cork oak forest one possible explanation for this manifestation, once in this region the forest is denser (high number of trees, few light and sun exposure and bad aeration) providing, possibly, a higher fungi development and consequently the formation of these compounds.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	xix
Índice de Tabelas	xxiii
Lista de Abreviaturas	xxvii
Lista de Símbolos.....	xxix
1. Introdução Geral.....	1
1.1. Cortiça.....	3
1.2. Montado de sobro: características do clima e do solo	4
1.3. Estrutura e composição da cortiça	5
1.4. A cortiça como responsável pela contaminação dos vinhos.....	6
1.4.1. A origem do problema	7
1.4.2. Formação de clorofenóis	10
1.4.3. Mecanismo de formação de TCA.....	10
1.5. Extração dos compostos a partir da matriz da cortiça.....	12
1.6. Técnicas de extração e análise	12
1.6.1. Microextração em Fase Sólida	13
1.6.1.1. Fases estacionárias	14
1.6.1.2. Sistemas de extração	17
1.6.1.3. Influência das condições experimentais em HS-SPME	18
1.6.2. Derivatização da amostra	19
1.6.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	21
1.7. Validação do método analítico.....	23
1.7.1. Gama de Trabalho/Linearidade.....	24
1.7.2. Limiares Analíticos	25
1.7.3. Precisão	27
1.7.4. Exatidão.....	28

1.7.5. Robustez.....	29
2. Objetivos do trabalho	31
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Reagente e Materiais.....	37
3.2. Equipamento	37
3.3. Procedimento Experimental.....	38
3.3.1. Amostragem de cortiça.....	38
3.3.2. Preparação da amostra.....	40
3.3.3. Preparação e derivatização das amostras	41
3.3.4. Metodologia de HS-SPME/GC-MS.....	41
3.4. Tratamento de dados.....	42
3.4.1. Validação do Método	42
3.4.2. Análise da incidência de TCA e clorofenóis.....	44
4. Resultados e Discussão.....	45
4.1. Validação do Método.....	47
4.1.1. Gama de trabalho e Linearidade.....	47
4.1.2. Limiares Analíticos	50
4.1.3. Precisão	51
4.1.4. Exatidão.....	52
4.1.5. Robustez.....	53
4.2. Análise da incidência de TCA e clorofenóis nas amostras de cortiça	55
4.2.1. Relação entre a incidência dos compostos e a região.....	55
4.2.2. Relação entre a incidência dos compostos e o tipo de solo.....	58
4.2.3. Relação entre a incidência dos compostos e a densidade do montado.....	61
5. Conclusões.....	73
6. Bibliografia.....	77
7. Anexos.....	85

7.1. Anexo 1 – Preparação dos padrões da curva de calibração	87
7.2. Anexo 2 – Gama de trabalho e repetibilidade.....	88
7.3. Anexo 3 – Precisão intermédia	93
7.4. Anexo 4 – Exatidão	98
7.5. Anexo 5 – Robustez.....	103

Índice de Figuras

Figura 1 – A – Imagem de sobreiros; B – Imagem de pranchas de cortiça (7).	3
Figura 2 – Distribuição mais significativa das florestas de sobreiro no mundo (7).	4
Figura 3 – Fotografias de microscopia eletrónica de varrimento da cortiça natural: a) Corte radial; b) Corte tangencial (14).	5
Figura 4 – Escala de percepção sensorial do TCA (Adaptado de (33)).	8
Figura 5 – Mecanismos de formação do TCA (Adaptado de (2)).	11
Figura 6 – Etapas de um ciclo SPME: A- Penetração da agulha no vial e exposição à amostra; B- Dois tipos de extração: imersão direta e indireta; C- Dessorção dos compostos no interior do cromatógrafo (73).	14
Figura 7 – Representação esquemática de um dispositivo comercial de uma fibra de SPME (Adaptado de (74)).	15
Figura 8 – Representação esquemática dos processos de absorção e adsorção (78).	17
Figura 9 – Representação esquemática dos sistemas de extração em SPME: A - extração direta; B – extração por espaço de cabeça.	18
Figura 10 – Reação de acetilação do TCP.	20
Figura 11 – Representação esquemática do processo de dessorção térmica dos compostos no injetor do cromatógrafo.	21
Figura 12- Representação esquemática de um equipamento de GC-MS: A – Injeção da amostra; B - Separação dos compostos da amostra; C - Identificação dos compostos (Adaptado de (88)).	22
Figura 13 – Modelo conceptual de um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo: A - No modo SIM, Q1 e Q3 permanecem fixos para uma razão m/z específica; B – No modo Full Scan MS/MS, o Q1 permanece fixo para a razão m/z do ião de interesse e o Q3 opera no modo de varrimento (Adaptado de (87)).	23
Figura 14 – Mapa de Portugal e Espanha com localização das herdades de proveniência das amostras de cortiça. Estão apresentadas 7 regiões representadas com cores diferentes.	40
Figura 15 - Etapas na preparação da amostra de cortiça.	40
Figura 16 – Cromatograma típico de um padrão de 4,00 ng/L de TCA e 8,00 ng/L de clorofenóis.	47
Figura 17 – Curva de calibração obtida para o composto TCA.	48
Figura 18 – Curva de calibração obtida para o composto 2,4-DCP.	49

Figura 19 - Curva de calibração obtida para o composto 2,6-DCP.....	49
Figura 20 - Curva de calibração obtida para o composto TCP.....	49
Figura 21 - Curva de calibração obtida para o composto PCP.....	50
Figura 22 – Percentagem de amostras de cortiça acima do limite de quantificação para cada composto.	55
Figura 23 – Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função da região de origem das amostras.....	57
Figura 24 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função da região de origem das amostras.....	57
Figura 25 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função da região de origem das amostras (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).....	58
Figura 26 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função da região de origem das amostras.....	58
Figura 27 - Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.....	60
Figura 28 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.....	60
Figura 29 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).....	61
Figura 30 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.....	61
Figura 31 – Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função do nível de densidade do montado.	62
Figura 32 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).	62
Figura 33 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).	63
Figura 34 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado.	63

Figura 35 - Montado de sobro típico da região da Andaluzia: montado muito denso (nível 1).....	64
Figura 36 – Análise de Componentes Principais (Biplot) dos compostos, região e tipo de solo das diferentes amostras analisadas.....	67
Figura 37 – Resumo dos principais resultados obtidos.	68
Figura 38– Mapa de Portugal e Espanha com representação das amostras de cortiça em estudo e potencial risco de contaminação com TCA e clorofenóis. Vermelho - risco elevado de contaminação; Laranja – risco intermédio de contaminação; Verde – baixo risco de contaminação.	69
Figura 39 – Representação gráfica da incidência dos compostos em Portugal e Espanha.	70
Figura 40 – Representação gráfica da concentração média dos compostos (ng/L) em Portugal e Espanha (* diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)).....	71
Figura 41 – Representação gráfica dos valores máximos de concentração (ng/L) em Portugal e Espanha.	71

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estrutura química e limites de percepção sensorial dos halofenóis e haloanisóis responsáveis por desvios sensoriais em vinhos (2,36–40).	9
Tabela 2 – Metodologias para análise de cloroanisóis e clorofenóis em várias matrizes usando como técnica de extração a SPME.	13
Tabela 3 – Propriedades e aplicações de fases estacionárias para SPME disponíveis comercialmente (70–72,77).	16
Tabela 4 – Caracterização das amostras por tipo de solo, características climáticas e região de origem.	39
Tabela 5 – Concentrações dos padrões utilizados na curva de calibração.	41
Tabela 6 – Tempo de retenção, energia de colisão e transições características (m/z) para cada um dos compostos estudados.	42
Tabela 7 – Avaliação da gama de trabalho do método em estudo.	48
Tabela 8 – Parâmetros das curvas de calibração.	50
Tabela 9 – Avaliação dos limites analíticos.	51
Tabela 10 – Avaliação da repetibilidade do método.	51
Tabela 11 – Avaliação da precisão intermédia do método.	52
Tabela 12 – Avaliação da exatidão do método.	53
Tabela 13 – Avaliação da robustez do método.	54
Tabela 14 – Percentagem de resultados acima do limite de quantificação para cada composto, para cada tipo de solo.	59
Tabela 15 – Percentagem de amostras por nível de densidade do montado.	65
Tabela 16 - Matriz de correlação dos diferentes compostos e da região e tipo de solo, resultante da Análise de Componentes Principais.	66
Tabela 17 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto TCA: padrão 1 da curva de calibração.	88
Tabela 18 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto TCA: padrão 7 da curva de calibração.	88
Tabela 19 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto 2,4-DCP: padrão 1 da curva de calibração.	89
Tabela 20 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto 2,4-DCP: padrão 7 da curva de calibração.	89

Tabela 21 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o 2,6-DCP: padrão 1 da curva de calibração.	90
Tabela 22 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o 2,6-DCP: padrão 7 da curva de calibração.	90
Tabela 23 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o TCP: padrão 1 da curva de calibração.	91
Tabela 24 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o TCP: padrão 7 da curva de calibração.	91
Tabela 25 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o PCP: padrão 1 da curva de calibração.	92
Tabela 26 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o PCP: padrão 1 da curva de calibração.	92
Tabela 27 - Resultados da precisão intermédia para o TCA.	93
Tabela 28 - Resultados da precisão intermédia para o 2,4-DCP.	94
Tabela 29 - Resultados da precisão intermédia para o 2,6-DCP.	95
Tabela 30 - Resultados da precisão intermédia para o TCP.	96
Tabela 31 - Resultados da precisão intermédia para o PCP.	97
Tabela 32 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCA (fortificação com 2,00 ng/L).	98
Tabela 33 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCA (fortificação com 4,00 ng/L).	98
Tabela 34 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,4-DCP (fortificação com 2,00 ng/L).	99
Tabela 35 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,4-DCP (fortificação com 4,00 ng/L).	99
Tabela 36 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,6-DCP (fortificação com 2,00 ng/L).	100
Tabela 37 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,6-DCP (fortificação com 4,00 ng/L).	100
Tabela 38 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCP (fortificação com 2,00 ng/L).	101
Tabela 39 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCP (fortificação com 4,00 ng/L).	101

Tabela 40 - Resultados dos ensaios de recuperação para o PCP (fortificação com 2,00 ng/L).	102
Tabela 41 - Resultados dos ensaios de recuperação para o PCP (fortificação com 4,00 ng/L).	102
Tabela 42 - Resultados da robustez para o TCA – Ensaio A a E.	103
Tabela 43 - Resultados da robustez para o 2,4-DCP – Ensaio A a E.	104
Tabela 44 - Resultados da robustez para o 2,6-DCP – Ensaio A a E.	105
Tabela 45 - Resultados da robustez para o TCP – Ensaio A a E.	106
Tabela 46 - Resultados da robustez para o PCP – Ensaio A a E.	107

Lista de Abreviaturas

2,4-DCP - 2,4-Diclorofenol

2,6-DCP - 2,6- Diclorofenol

ACP - Análise de componentes principais

CAR – Carboxeno

CSG – Grupo Cork Supply

CSP - Cork Supply Portugal

CID - Dissociação induzida por colisão

CPOMT - Clorofenol-O-metiltransferase

D₅-TCA - Deutério 2,4,6-tricloroanisol

DI-SPME - Microextração em fase sólida direta

DVB – Divinilbenzeno

ECD - Detetor de captura eletrónica

EI - Impacto electrónico

GC - Cromatografia gasosa

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa

HS-SPME - Microextração em fase sólida por espaço de cabeça

HS-SPME-GC-MS - Microextração em fase sólida associada à cromatografia gasosa e espetrometria de massa

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD - Limite de deteção

LQ - Limite de quantificação

MDMP - 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina

MHS-SPME - Microextração em fase sólida por headspace múltiplo

MRM – Monitorização de reações múltiplas

MS - Espetrómetro de massa

MS/MS - Espetrometria de massa tandem

NUTS - Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

PA – Poliacrilato

PCA - Pentacloroanisol

PCP - Pentaclorofenol

PDMS – Polidimetilsiloxano

PI - Padrão interno

Q1 - Primeiro quadrupolo
Q3 - Terceiro quadrupolo
TBA - 2,4,6-Tribromoanisol
TCA - 2,4,6-Tricloroanisol
TCP - 2,4,6-Triclorofenol
TeCA - 2,3,4,6-Tetracloroanisol
TeCP - 2,3,4,6-Tetraclorofenol
SBSE - Extração sortiva em barras de agitação
SIM – Monitorização de íão selecionado
SPE - Extração em fase sólida
SPME - Microextração em fase sólida
SRM – Monitorização de reação selecionada
VOCs – Compostos orgânicos voláteis

Lista de Símbolos

CV - Coeficiente de variação

CV_{pi} - Coeficiente de variação da precisão intermédia

CV_{ri} - Coeficiente de variação da repetibilidade

m/z - Razão massa/carga

R^2 - Coeficiente de determinação

R - Correlação linear

r - Limite de repetibilidade

S - Desvio padrão

S_{pi} - Desvio padrão da precisão intermédia

S_{ri} - Desvio padrão da repetibilidade

1. Introdução Geral

“*Eucaliptos são para nós, os pinheiros para os nossos filhos e os sobreiros para os nossos netos*” (1).

1.1. Cortiça

A cortiça é uma matéria-prima de excelência, renovável e reciclável, que apresenta características únicas muito apreciadas na indústria vitivinícola (2,3). É o tecido vegetal que constitui o revestimento exterior do tronco e ramos do sobreiro, *Quercus suber L* (Figura 1-A). Esta árvore, de porte médio e de folha persistente, pode viver cerca de 200 anos apesar dos mais de 15 descortiçamentos, intercalados por períodos mínimos de nove anos, que lhe são feitos (4–6). A capacidade única de regeneração da casca do sobreiro ao longo de toda a sua vida faz da cortiça um dos principais recursos naturais de Portugal e permite a sua exploração industrial sendo, ainda, justificação para o cultivo intensivo desta espécie (5).

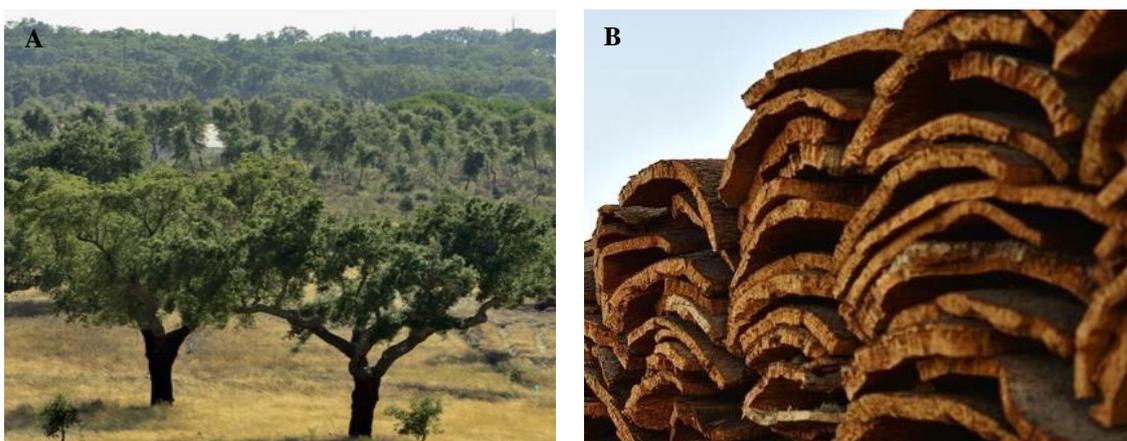


Figura 1 – A – Imagem de sobreiros; B – Imagem de pranchas de cortiça (7).

A primeira tiradia da cortiça, ou primeira extração, efetua-se ao fim de 20 a 30 anos de crescimento após o sobreiro atingir um perímetro de 70 centímetros a uma altura de cerca de 1,3 metros do solo, sendo esta cortiça denominada de cortiça virgem (8,9). O descortiçamento deve ser efetuado por operadores especializados, com cuidados especiais, habitualmente entre maio e agosto, período em que a tiradia é mais fácil pelo facto da cortiça se desprender melhor do tronco (10). A extração é realizada manualmente com auxílio de um machado e a cortiça é retirada do tronco sob a forma de pranchas que possuem uma espessura adequada ao processamento industrial (Figura 1-B). Após o

terceiro descortiçamento obtém-se o produto que reúne as características ideais para comercialização. Estas são chamadas de cortiças amadias ou de reprodução (5).

Portugal é líder mundial na produção e exportação de cortiça, muito em parte favorecido pela sua localização geográfica mas também pelo esforço contínuo para o seu desenvolvimento. Por outro lado, Portugal é ainda o quarto maior importador mundial de cortiça, com o objetivo de a transformar e voltar a exportar sob a forma de produtos finais. O principal produto de cortiça exportado (70,1%) são as rolhas de cortiça, seguida de produtos para aplicação no setor da construção civil (4). Este setor emprega cerca de nove mil trabalhadores, distribuídos por quase 650 empresas, a maioria no norte do país, e produz, diariamente, cerca de 40 milhões de rolhas (4).

1.2. Montado de sobreiro: características do clima e do solo

O sobreiro é uma árvore típica da região mediterrânica ocidental, com ampla distribuição em todo o sul da Europa e norte de África sendo uma das espécies florestais mais importantes na Península Ibérica, de onde se pensa ser originário (11–14). Aqui, formam-se extensas florestas de sobreiros, designadas por montados de sobreiro, um dos ecossistemas mais ricos do mundo e que está fortemente presente em Portugal: 34 por cento da área mundial, sendo que 84 por cento está localizada no Alentejo (7,14). Na Figura 2 encontra-se representada a distribuição geográfica do montado em Portugal e no mundo.

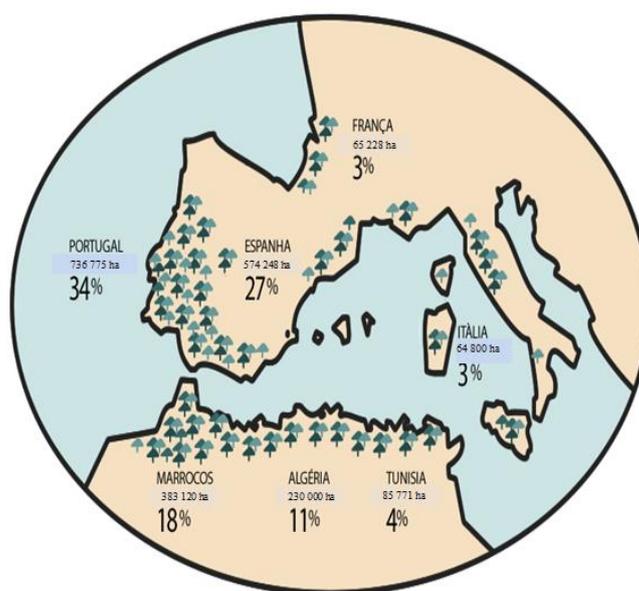


Figura 2 – Distribuição mais significativa das florestas de sobreiro no mundo (7).

Os sobreiros são pouco exigentes em relação ao tipo de solo onde se desenvolvem. À exceção dos solos calcários, adaptam-se bem a solos de baixa fertilidade como graníticos, xistosos e principalmente arenosos (15). O montado é, também, um sistema bem adaptado a verões quentes, secos e com déficit de água (característicos do clima mediterrânico) permitindo a obtenção continuada de recursos em locais onde outras culturas não sobreviveriam (14,15). Assim, os montados de sobreiro constituem uma barreira importante ao avanço da desertificação e erosão dos solos e, ao mesmo tempo, contribuem para a manutenção da biodiversidade. Nestas áreas desenvolvem-se e permanecem várias espécies de fauna e flora, demonstrando que é possível assegurar a exploração de um recurso natural sem pôr em causa a sustentabilidade e preservação do ecossistema (4,11).

1.3. Estrutura e composição da cortiça

A cortiça possui uma estrutura celular que lhe confere características únicas sendo definida, em termos biológicos, como um tecido homogéneo não diferenciado constituído por células mortas suberificadas, com paredes celulósicas finas e estrutura compacta e regular sem espaços intercelulares (16). As imagens de microscopia eletrónica de varrimento de cortes axiais e tangenciais da cortiça, apresentadas na Figura 3, mostram que a sua estrutura se assemelha a uma parede de tijolos, sendo as células idênticas a prismas retangulares dispostos em colunas paralelas à direção radial da árvore (14).

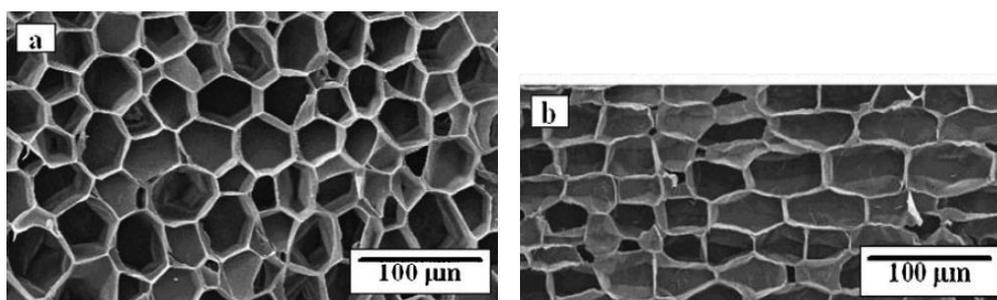


Figura 3 – Fotografias de microscopia eletrónica de varrimento da cortiça natural: a) Corte radial; b) Corte tangencial (14).

A suberina é o principal componente da cortiça (aproximadamente 40%), seguindo-se a lenhina (22%), os polissacarídeos (18%), os extratáveis (15%) e ainda os compostos inorgânicos (1,2%) (14,17,18). As propriedades da cortiça estão estreitamente relacionadas com a estrutura celular do tecido suberoso e com a composição química das

suas paredes (14). Estas são compostas por dois tipos de componentes: estruturais e não-estruturais. Os componentes estruturais, como o nome indica, estão presentes nas paredes celulares da cortiça e são responsáveis pela sua forma e propriedades físicas e químicas e destes fazem parte, maioritariamente, a suberina, a lenhina e os polissacarídeos (5,19). Por sua vez, os componentes não estruturais da cortiça são os extratáveis e os compostos inorgânicos. Os extratáveis são compostos solúveis e de baixa massa molecular que podem ser extraídos com solventes de polaridade adequada e, normalmente, são classificados em dois grupos: os lípidos (como a cerina, friedelina, betulina e o ácido betulínico), que são removidos com solventes de baixa polaridade e os compostos fenólicos (tal como o ácido elágico, ácido protocatecuico, ácido vanílico e ácido gálico) tipicamente extraídos com solventes polares (5,20). Os compostos inorgânicos como o cálcio, sódio, potássio, fósforo e o magnésio, constituem o resíduo da combustão completa do material (5).

Fatores como a localização geográfica, o clima, as condições do solo e, ainda, as dimensões e idade do sobreiro bem como as suas condições de crescimento influenciam a constituição química da cortiça e, conseqüentemente, as suas propriedades (14,18). A análise da composição química de cortiças provenientes de quatro locais diferentes (18) permitiu confirmar que a localização tem influência na composição química das cortiças, tendo-se ainda verificado diferenças entre as cortiças virgens e as de reprodução, principalmente em relação ao teor de extratáveis (16,9% na cortiça virgem e 14,2% na cortiça de reprodução) e de suberina (35,2% na cortiça virgem e 39,4% na cortiça de reprodução). Concluiu-se ainda que, em cortiças virgens, o teor de extratáveis e polissacarídeos é influenciado pela localização geográfica não se tendo encontrado diferenças nos teores de suberina e lenhina com a localização (18).

1.4. A cortiça como responsável pela contaminação dos vinhos

A rolha de cortiça é um produto natural de exceção que, devido às suas propriedades únicas (material leve e de baixa densidade, impermeável a líquidos e gases e que possui elevada elasticidade e compressibilidade) tem sido muito usado para vedar garrafas de vinho, incluindo vinhos de elevada qualidade que são armazenados durante longos períodos de tempo. No entanto, a contaminação do vinho com compostos com aromas fúngicos indesejáveis, o denominado “gosto a rolha” é um dos problemas que a indústria corticeira tem vindo a combater desde longa data uma vez que os defeitos

sensoriais do vinho são responsáveis por perdas económicas consideráveis para ambas as indústrias (21,22): estima-se que 2 a 7 % dos vinhos engarrafados sejam afetados por desvios organoléticos provocados por contaminantes e, destes, cerca de 80% têm como responsável pela contaminação o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (23,24). Estes números têm vindo a diminuir como resultado de um forte investimento da indústria no estudo da problemática do TCA (25,26).

Apesar das rolhas de cortiça serem, por muitos, consideradas como as principais fontes de contaminação do vinho, tem sido demonstrado que, durante a produção ou conservação do vinho, o contacto direto com produtos ou atmosferas contaminados também são possíveis fontes de contaminação (27–29). É importante notar que a contaminação das rolhas de cortiça pode acontecer em qualquer altura da sua produção, desde a cortiça no sobreiro até ao seu armazenamento em caves ou adegas, funcionando, neste último caso, apenas como um veículo de transmissão da contaminação (2,30).

1.4.1. A origem do problema

Os haloanisóis e os halofenóis são os compostos indicados como responsáveis pela contaminação do vinho com aromas fúngicos. São compostos muito voláteis com limites de perceção muito baixos, facilmente detetados sensorialmente, tanto em água como em soluções alcoólicas ou vinho. Os halofenóis mais comuns e que podem indicar eventuais fontes de contaminação são o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), o 2,6- diclorofenol (2,6-DCP), o 2,4,6-triclorofenol (TCP), o 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) e o pentaclorofenol (PCP). Em relação aos haloanisóis, estes sim com papel relevante na qualidade organolética dos vinhos, o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é o composto associado ao “sabor a rolha” (23,31), sendo que outros cloroanisóis e bromoanisóis como o 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (TBA) são, também, muitas vezes apontados como causadores de desvios sensoriais (2,28,32). Estes resultam da reação entre compostos com um ou mais átomos de halogéneo (cloro ou bromo, neste caso) e derivados dos anisóis, podendo ser transferidos para o vinho pelo contacto com materiais contaminados originando odores a mofo e bafio, bastante desagradáveis, que depreciam a qualidade do vinho (27,29).

Os haloanisóis não apresentam efeitos tóxicos nos níveis sensoriais em que são detetáveis e os limites sensoriais destes compostos dependem de fatores como o grau de halogenação, o tipo de matriz e a sensibilidade de perceção de cada pessoa (33). Para uma

concentração de TCA superior a 10 ng/L, o consumidor é capaz de, facilmente, detetar e rejeitar o vinho devido ao cheiro a mofo. Quando em concentrações inferiores a 5 ng/L, o TCA pode ser indetável ou estar camuflado pelos sabores e aromas do vinho (33) (Figura 4). Os restantes haloanisóis e os halofenóis têm limites de percepção bastante superiores. Na Tabela 1 apresentam-se as estruturas químicas e os limites de percepção sensorial dos principais halofenóis e haloanisóis responsáveis por aromas fúngicos.

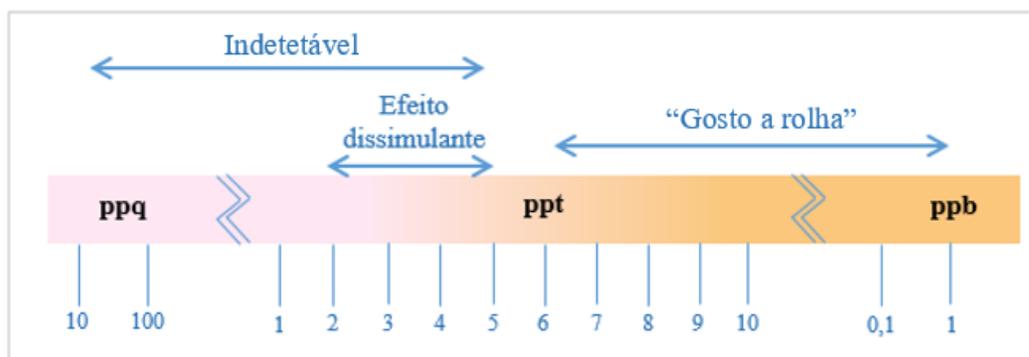
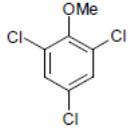
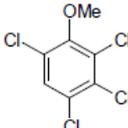
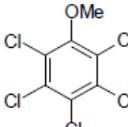
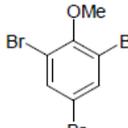
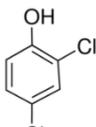
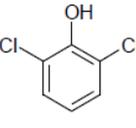
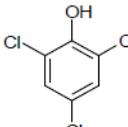
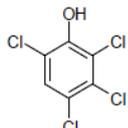
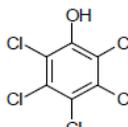


Figura 4 – Escala de percepção sensorial do TCA (Adaptado de (33)).

Para além dos haloanisóis e halofenóis, existem descritos na literatura outros compostos contaminantes, ocasionalmente identificados em cortiça, capazes de causar desvios organoléticos, de entre os quais se destacam a geosmina (aroma terroso), a 1-octen-3-ona (aroma a cogumelo) (34,35), o guaiacol (aroma a fumo, fenólico ou medicinal), o 2-metilisoborneol (aroma terroso, lamacento, mofo) e o 1-octen-3-ol (aroma a cogumelo) (21). Foi, ainda, identificada a presença da 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) em rolhas de cortiça, um composto de origem bacteriana responsável pelo aroma a pimento (21,28).

Tabela 1 – Estrutura química e limites de percepção sensorial dos halofenóis e haloanisóis responsáveis por desvios sensoriais em vinhos (2,36–40).

Composto	Estrutura Química	Limites de percepção sensorial
2,4,6-TCA		Em água: 30-300 pg/L Em vinho e solução alcoólica: 1,5-3 ng/L (branco) e 6 ng/L (tinto)
2,3,4,6-TeCA		Em água: 4 ng/L Em vinho e solução alcoólica: 10-15 ng/L
PCA		> 10 µg/L
2,4,6-TBA		Em água: 8-30 pg/L Em vinho e solução alcoólica: 3 ng/L
2,4-DCP		Em vinho e solução alcoólica: > 0,90 µg/L
2,6-DCP		Em água: 200 µg/L Em vinho e solução alcoólica: 0,032 µg/L
2,4,6-TCP		Em água: 300 µg/L Em vinho e solução alcoólica: > 0,90 µg/L
2,3,4,6-TeCP		Em água: 600 µg/L Em vinho e solução alcoólica: > 0,90 µg/L
PCP		Em água: 1600 µg/L Em vinho e solução alcoólica: > 0,90 µg/L

1.4.2. Formação de clorofenóis

Os clorofenóis são os compostos orgânicos precursores dos cloroanisóis e a sua formação ocorre da reação, em solução aquosa, entre uma fonte de cloro e uma unidade fenol ou através da hidrólise de clorobenzenos. São compostos com grande espectro de ação e elevada toxicidade para os organismos vivos daí terem sido fortemente utilizados como inseticidas ao longo de várias décadas, até ter sido proibida a sua utilização em toda a Europa (2,24,41). Como são bastante persistentes e resistentes, estes compostos permanecem no ambiente por longos períodos de tempo levando à sua acumulação nos solos e cursos de água podendo ser detetados em qualquer ecossistema (2,24). Para além de tudo isto, os solos do montado de sobre em Portugal são, na sua grande maioria, caracterizados como sendo ácidos, sem drenagem e muito pobres em matéria orgânica, o que favorece a persistência e acumulação dos clorofenóis e cloroanisóis correspondentes (15). O TCP foi, ainda, bastante utilizado no tratamento e conservação de madeiras podendo, também, ter contaminado muitas adegas para além dos montados de sobre (31).

Por outro lado, também é conhecido que os clorofenóis podem ser encontrados em sistemas onde não tenha ocorrido intervenção humana (42), podendo ter origem na reação direta entre os produtos resultantes da degradação da lenhina e de açúcares com fontes de cloro presentes no meio ambiente ou, ainda, através da participação de cloroperoxidasas existentes em algumas plantas e microorganismos, na presença de peróxido de hidrogénio e cloro inorgânico (Figura 5).

1.4.3. Mecanismo de formação de TCA

A formação de cloroanisóis ocorre no meio ambiente por biometilação (ou O-metilação) dos seus precursores clorofenóis (31,43–48), realizada por diferentes microorganismos, tais como fungos filamentosos (*Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Cephaloascus* sp.) que se desenvolvem nas pranchas de cortiça e em elementos de madeira utilizados nas caves (48). Esta reação, catalisada pela enzima clorofenol O-metiltransferase (CPOMT), é promovida pelos fungos devido à elevada toxicidade dos clorofenóis para estes microorganismos, como resultado de um mecanismo de defesa que ocorre quando os clorofenóis conseguem atravessar a parede celular e membrana citoplasmática e atingir o interior da célula. O mecanismo de formação de TCA a partir do TCP encontra-se sumariado na Figura 5.

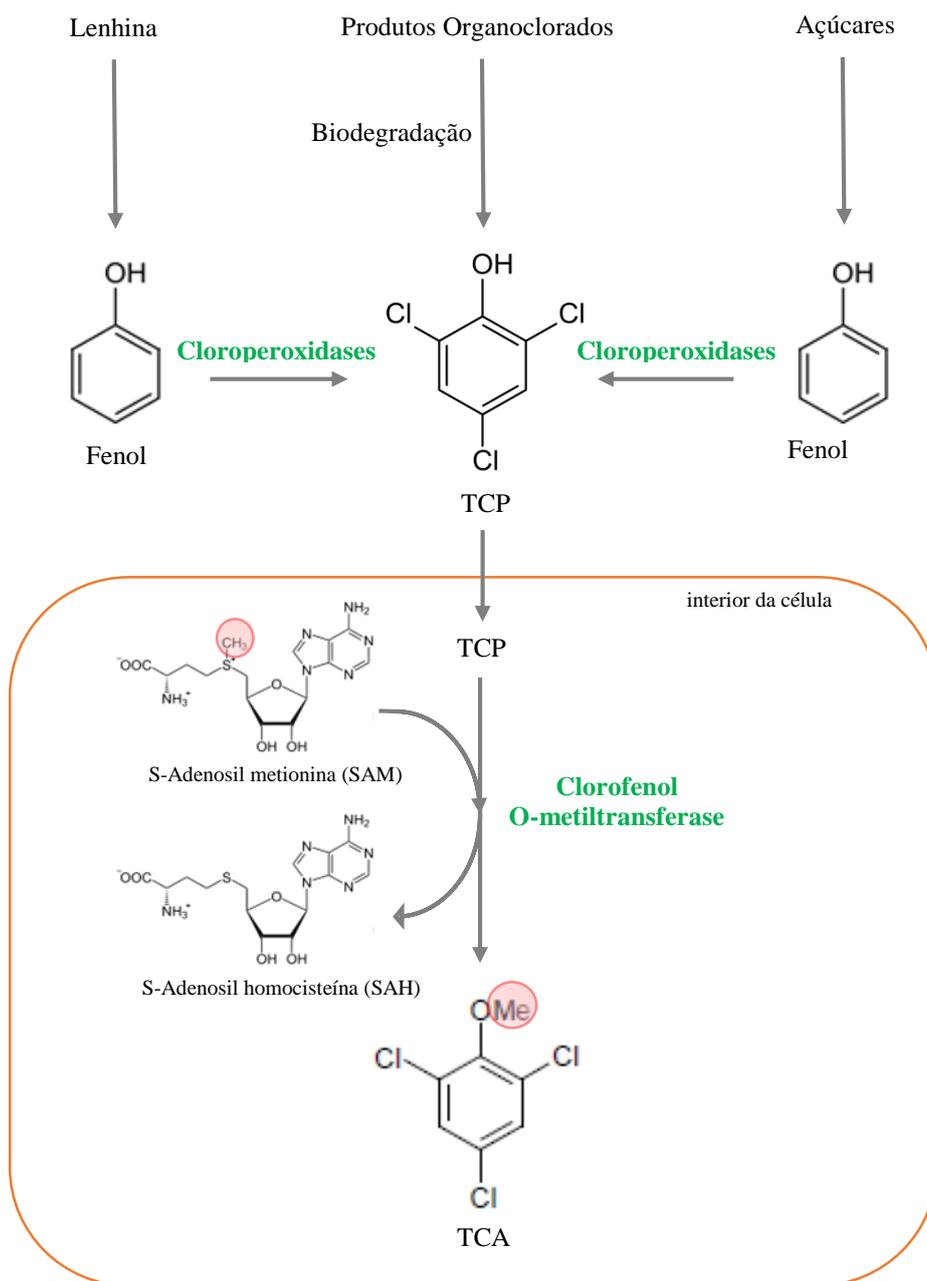


Figura 5 – Mecanismos de formação do TCA (Adaptado de (2)).

A biometilação é descrita como sendo a principal via de formação do TCA, do TeCA, do PCA e do TBA (2) e é a única hipótese que reúne consenso entre a comunidade científica para justificar a presença destes compostos na cortiça e em adegas (31,47,48).

1.5. Extração dos compostos a partir da matriz da cortiça

Uma seleção adequada de ferramentas e instrumentos analíticos permite obter uma boa separação e quantificação dos compostos a analisar. A complexidade da matriz, as propriedades físico-químicas dos compostos em estudo e a seletividade dos processos de extração determinam qual a estratégia analítica a aplicar.

Sendo a cortiça uma matriz sólida, o processo de extração torna-se complexo. A extração dos compostos a partir da matriz da cortiça pode ser feita em provetes ou em granulado usando solventes orgânicos ou simulantes de vinho. Neste trabalho seguiu-se a norma internacional ISO 20752 (49) como referência para a determinação de TCA e clorofenóis migráveis. O método utilizado nesta norma simula o fenómeno de migração de compostos que pode ocorrer quando rolhas de cortiça são usadas para vedar vinhos. Este método consiste em determinar o TCA migrável (do inglês *releasable*) baseando-se num equilíbrio entre a matriz sólida (rolha) e a líquida (simulante de vinho), depois de um período de maceração das rolhas em solução etanólica a 12% v/v, durante 24 h ± 2 h (49). Os compostos de interesse que migram para a solução vão, depois, ser extraídos pela respetiva técnica de concentração.

1.6. Técnicas de extração e análise

Grande parte dos estudos sobre métodos de análise envolvendo compostos responsáveis por desvios sensoriais associados à cortiça incidem sobretudo no estudo dos cloroanisóis, mais concretamente do TCA (31,41,50–60). Relativamente à análise conjunta de cloroanisóis e clorofenóis, as publicações existentes não são tão extensas uma vez que estes dois grupos de compostos exibem comportamentos químicos bastante diferentes (devido ao grupo OH dos clorofenóis) e, portanto, o processo mais habitual é a análise dos cloroanisóis e clorofenóis em separado. Ainda assim, existem várias publicações relativas à extração e análise simultânea destes compostos em várias matrizes, entre as quais cortiça e vinho. Destas publicações, algumas são baseadas na extração líquido-líquido usando n-hexano (61) ou diclorometano (51) como solventes e análise dos extratos orgânicos obtidos por cromatografia gasosa (GC). Também a extração em fase sólida (SPE) (55,62) e a microextração em fase sólida (SPME) (37,62–66) têm sido usadas para extração e purificação destes compostos. Ainda outra técnica de extração descrita na literatura é a extração sortiva em barras de agitação (SBSE), na qual

a extração e concentração dos compostos ocorre numa barra de agitação reutilizável que contém a fase estacionária (56,58,67,68). Contudo, a maioria dos métodos descritos utilizam a extração por SPME e a separação dos compostos por GC.

Na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos de metodologias, baseadas em SPME, que se encontram descritas na literatura para análise de cloroanisóis e clorofenóis em diferentes matrizes. A SPME é combinada com a separação por GC e deteção utilizando um detetor de captura eletrónica (ECD) ou espectrometria de massa (MS).

Tabela 2 – Metodologias para análise de cloroanisóis e clorofenóis em várias matrizes usando como técnica de extração a SPME.

Ano da publicação	Matriz	Metodologia		Ref.
		Extração	Separação e Deteção	
2004	Cortiça e vinho	SPE e HS-SPME (PDMS)	GC-ECD	(62)
2005	Vinho	MHS-SPME e HS-SPME; DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	GC-MS	(63)
2007	Vinho	HS-SPME; PDMS 100 µm	GC-MS e GC-ECD	(64)
2009	Cortiça e vinho	HS-SPME; PDMS-DVB 65µm:	GC-ECD	(65)
2010	Água	HS-SPME; PDMS-DVB 65µm: melhor fase estacionária para análise de clorofenóis	GC-MS	(66)
2010	Vinho	SPME; PDMS-DVB 65µm	GC-MS	(37)

SPE- Extração em fase sólida; SPME – Microextração em fase sólida; HS-SPME- Microextração em fase sólida por headspace; MHS-SPME – Microextração em fase sólida por headspace múltiplo; DVB- Divinilbenzeno; CAR- Carboxeno; PDMS: Polidimetilsiloxano.

O presente trabalho descreve a validação de um método analítico de microextração em fase sólida associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS) para a identificação e quantificação de TCA e clorofenóis em cortiça, sendo esta a técnica que será abordada de agora em diante com mais detalhe.

1.6.1. Microextração em Fase Sólida

A Microextração em Fase Sólida (SPME) é uma técnica de extração e pré-concentração simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, desenvolvida em 1990

por Janus Pawliszyn e seus colaboradores para análise de poluentes em água (69). Esta técnica surgiu como alternativa aos métodos tradicionais de extração e é capaz de fornecer um extrato representativo dos compostos responsáveis pelos aromas detetados a nível sensorial. Tem sido utilizada na análise de vários compostos, especialmente orgânicos voláteis e semi-voláteis de amostras ambientais, biológicas e alimentares (70).

A extração dos compostos é feita com recurso a um suporte com a forma de uma seringa que contém no seu interior uma fibra revestida com uma camada polimérica (fase estacionária) (71). A fibra é exposta à amostra, sorvendo os compostos que são, posteriormente, dessorvidos no injetor de um sistema cromatográfico (Figura 6).

A SPME dispensa o uso de solventes orgânicos e, dada a sua rapidez, simplicidade de utilização e automatização na preparação das amostras, tem um custo operacional relativamente baixo (72).

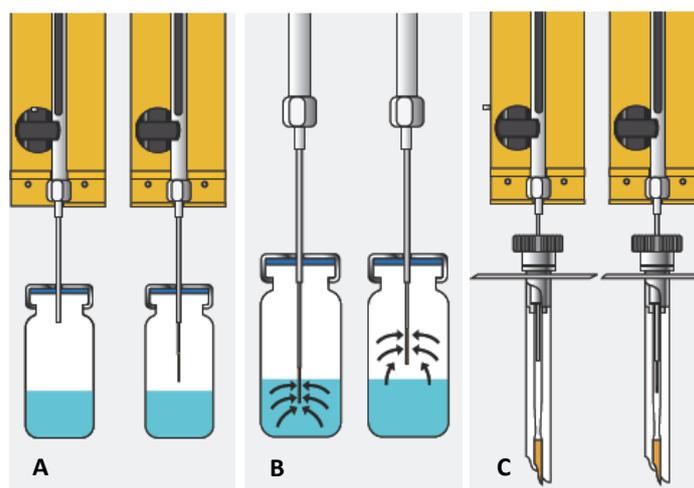


Figura 6 – Etapas de um ciclo SPME: A- Penetração da agulha no vial e exposição à amostra; B- Dois tipos de extração: imersão direta e indireta; C- Dessorção dos compostos no interior do cromatógrafo (73).

1.6.1.1. Fases estacionárias

O dispositivo utilizado em SPME para exposição da fase estacionária consiste num tubo cilíndrico de aço inoxidável que serve de suporte e proteção a uma fibra de sílica fundida, com 1 ou 2 cm de comprimento, revestida com uma película fina de várias fases estacionárias poliméricas, onde os analitos orgânicos provenientes da matriz da amostra são concentrados (74). Esta seringa de SPME contém na sua estrutura um êmbolo

que facilita a exposição e recolha da fase estacionária durante os processos de sorção e dessorção (Figura 7).

Os dispositivos de SPME comerciais são relativamente dispendiosos mas podem ser reutilizados inúmeras vezes, dependendo do tipo de aplicação, da composição da amostra, das condições experimentais e também dos cuidados no seu manuseamento (72).

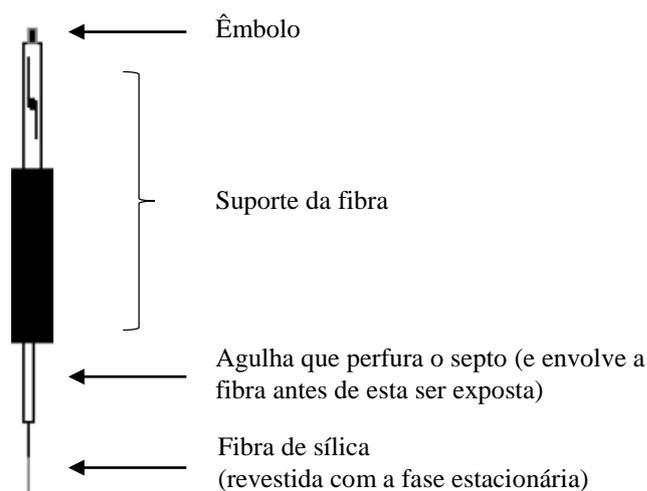


Figura 7 – Representação esquemática de um dispositivo comercial de uma fibra de SPME (Adaptado de (74)).

Um dos aspetos fundamentais a ter em conta no desenvolvimento de um método de SPME é a seleção de uma fase estacionária adequada para os compostos em análise (71,75). Existem vários tipos de fases estacionárias e a sua escolha depende da composição da fração volátil da amostra e das condições experimentais (Tabela 3). A fibra de SPME mais utilizada é a revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), um polímero apolar com maior afinidade para compostos apolares. Por sua vez, as fibras à base de poliacrilato (PA) são mais polares e, conseqüentemente, mais adequadas para a extração de compostos hidrofílicos (76). Estão também disponíveis no mercado outro tipo de fibras (Tabela 3) que resultam da combinação dos revestimentos anteriores com revestimentos como o divinilbenzeno (DVB) e o carboxeno (CAR) (71,74).

Tabela 3 – Propriedades e aplicações de fases estacionárias para SPME disponíveis comercialmente (70–72,77).

Fase Estacionária	Espessura do filme (µm)	Temperatura máx. do injetor do GC (°C)	Polaridade	Interação	Uso recomendado
PDMS	100	280	Apolar	Absorção	Compostos orgânicos apolares tais como VOCs, hidrocarbonetos
	30	280			aromáticos policíclicos, benzeno/ tolueno/ etilbenzeno/ xileno, pesticidas organoclorados
	7	340			
PDMS-DVB	65	270	Mista	Adsorção	VOCs, hidrocarbonetos aromáticos e aminas aromáticas
	60	270			
CAR-PDMS	75	320	Mista	Adsorção	VOCs, hidrocarbonetos
	85				
DVB-CAR-PDMS	50/30	270	Mista	Adsorção	VOCs e compostos orgânicos semi-voláteis
PA	85	320	Polar	Absorção	Compostos orgânicos polares tais como triazinas, pesticidas organofosforados e fenóis

PDMS: Polidimetilsiloxano; DVB- Divinilbenzeno; CAR- Carboxeno; PA: Poliacrilato; VOCs: Compostos orgânicos voláteis.

Dependendo das características da fibra selecionada, as interações entre os analitos e a fase estacionária podem ser do tipo absorvente e/ou adsorvente (Figura 8). Numa fase estacionária absorvente os analitos migram para o interior da fase estacionária, onde ficam retidos, funcionando quase como uma esponja (Figura 8-A). Neste caso, a absorção do analito depende, essencialmente, da espessura do filme e da dimensão do analito (76,78) e praticamente não existe competição entre os compostos a extrair. Numa fase estacionária adsorvente, os analitos são retidos à superfície de uma estrutura cristalina que pode apresentar poros de diferentes tamanhos. Na fibras do tipo adsorvente, os locais superficiais disponíveis para sorção são mais limitados do que nas absorventes, podendo ocasionar competição entre os analitos e, por outro lado, para concentrações elevadas de analito, pode ocorrer saturação da fibra com consequente perda de linearidade na resposta (78,79).

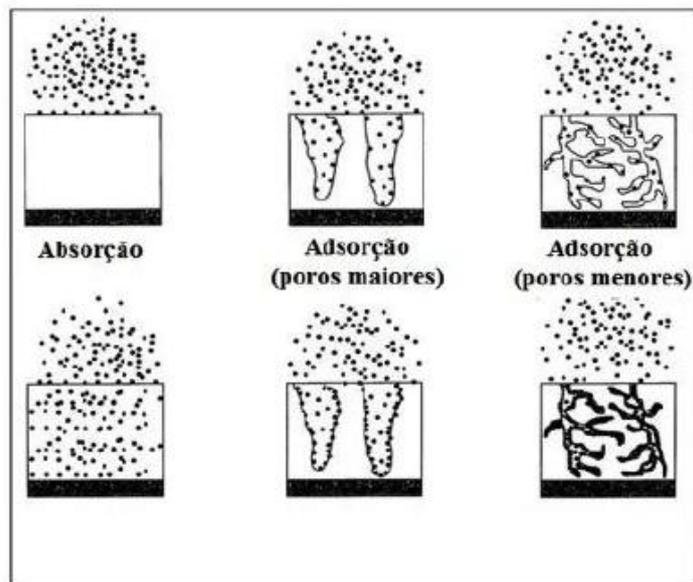


Figura 8 – Representação esquemática dos processos de absorção e adsorção (78).

Uma fase estacionária mista beneficia da sinergia entre a adsorção e a absorção, o que proporciona uma elevada retenção dos analitos por parte da fase estacionária (80).

1.6.1.2. Sistemas de extração

Como a SPME é uma técnica baseada em processos de absorção e adsorção, a amostra, sólida ou líquida, é inicialmente colocada num frasco selado e termostatizada para que ocorra a libertação e passagem dos compostos voláteis da matriz para o espaço de cabeça (do inglês *headspace*). Se o tempo de exposição for o suficiente, é estabelecido um equilíbrio entre a fase que contém a amostra e a fase que contém os componentes voláteis. É importante manter as mesmas condições experimentais para cada ensaio realizado, em especial a agitação e o tempo de extração, de forma a se obterem dados reprodutíveis.

A extração pode funcionar segundo dois sistemas diferentes (Figura 9): extração direta (*Direct Immersion: DI-SPME*) ou extração por espaço de cabeça (*Headspace: HS-SPME*) (74,78,81). Na extração direta, a fibra de SPME é colocada diretamente em contacto com a amostra (sistema de duas fases: amostra – fase estacionária), o que pode diminuir a durabilidade da fibra. Na extração por espaço de cabeça a fase estacionária é inserida na fase de vapor, a qual tende para o equilíbrio com a amostra (sistema de três fases: amostra- espaço de cabeça - fase estacionária), evitando-se a contaminação por moléculas não-voláteis que estejam presentes na matriz da amostra. A HS-SPME é

utilizada, essencialmente, na análise de compostos voláteis que têm facilidade em se difundir da matriz ou, também, quando existe a necessidade de derivatizar os analitos (71). Assim, no desenvolvimento de metodologias analíticas é essencial o estudo prévio das propriedades físico-químicas dos analitos presentes na amostra (como a massa molecular, os grupos funcionais, polaridade e pressão de vapor) bem como os efeitos de matriz.

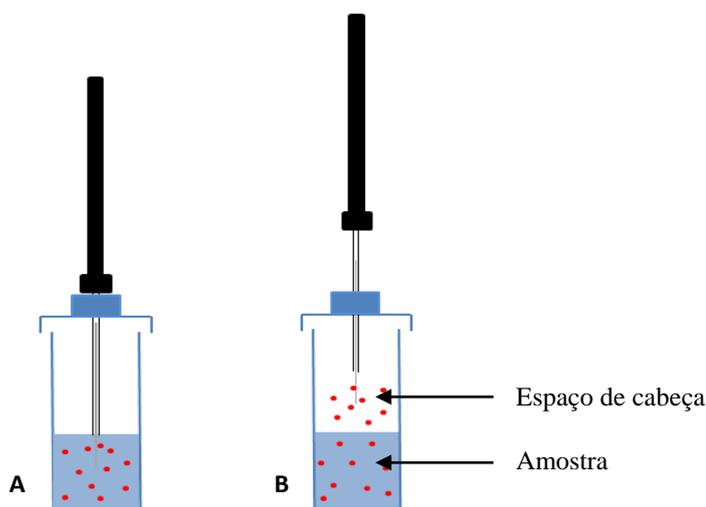


Figura 9 – Representação esquemática dos sistemas de extração em SPME: A - extração direta; B – extração por espaço de cabeça.

Para além da polaridade dos analitos, do tipo de fase estacionária e do modo de extração (DI-SPME e HS-SPME) selecionados, existem muitos outros parâmetros que podem influenciar o processo de extração e que serão apresentados de seguida (71).

1.6.1.3. Influência das condições experimentais em HS-SPME

A extração pode ser afetada por diversos parâmetros, os quais devem ser otimizados de forma a melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade da metodologia analítica. Durante a sorção dos compostos, as condições que mais influência podem ter no processo incluem a composição e volume da amostra, a força iónica da solução, a agitação, o tempo e a temperatura de extração (82,83).

A razão β ou razão volume de espaço de cabeça/volume da amostra é a razão entre o volume de gás e o volume da amostra sendo que este parâmetro deve ser controlado de forma a que o espaço de cabeça seja o suficiente e adequado para que as moléculas se volatilizem (81). O efeito da força iónica, fenómeno designado por “*salting out*”, ocorre

aquando da adição de um eletrólito forte (como o NaCl) à amostra, o qual diminui a solubilidade dos compostos orgânicos dissolvidos na matriz da amostra facilitando a sua passagem para a fase de vapor (74,77). O tempo de contacto entre a fase estacionária e a amostra influencia a quantidade de compostos extraídos, até se atingir o equilíbrio (amostra-fase gasosa-fase estacionária) (64,81). O equilíbrio pode não chegar a acontecer sendo, assim, de extrema importância o controlo do tempo de extração. Compostos semi-voláteis e polares demoram mais tempo a serem extraídos e, conseqüentemente, a atingir o equilíbrio entre as fases do sistema, do que os compostos voláteis e não polares (78). Trabalhar em sistemas com agitação promove a difusão dos compostos semi-voláteis da amostra para o espaço de cabeça e, por sua vez, favorece o transporte dos analitos até à fase estacionária (74). Esta revela-se bastante importante para analitos menos voláteis e deve ser constante durante o tempo em que ocorre a extração (81).

A temperatura também tem influência no processo de extração uma vez que afeta o equilíbrio entre as fases do sistema. Por um lado, o aumento da temperatura de extração provoca a volatilização das moléculas da fase estacionária para a fase gasosa uma vez que o processo de absorção dos compostos pela fase estacionária é um processo exotérmico. Assim, o coeficiente de partição entre a fase estacionária e a fase gasosa diminui e, conseqüentemente, a sorção dos compostos pela fibra também (84). No entanto, o aumento da temperatura, com conseqüente aumento da pressão de vapor e volatilidade dos compostos, melhora a eficácia do processo de transferência dos analitos da fase líquida para o espaço de cabeça (aumenta o coeficiente de partição entre a amostra e a fase gasosa) levando a um aumento na concentração de analitos na fase gasosa e, assim, a um aumento da sorção dos mesmos pela fibra (64,83,84).

Depois dos analitos serem recolhidos na fibra, dá-se o processo de dessorção dos compostos no injetor, etapa na qual é importante considerar os seguintes parâmetros: volatilidade dos analitos, espessura do revestimento da fibra, temperatura do injetor e tempo de dessorção (78). A utilização de sistemas automáticos de injeção permite um maior controlo na posição de injeção, profundidade da fibra no injetor e no tempo de dessorção.

1.6.2. Derivatização da amostra

O principal desafio na análise de espécies orgânicas são os compostos polares. Apesar de existirem fases estacionárias polares para SPME, nem sempre se alcança a

sensibilidade desejada optando-se, então, por incluir um pré-tratamento da amostra de forma a promover a transformação química dos compostos em causa em espécies mais apolares e, conseqüentemente, mais voláteis o que facilita a sua extração da matriz da amostra (77).

Apesar da análise de TCA por SPME não necessitar da etapa de derivatização, a polaridade e reatividade do grupo OH dos clorofenóis faz com que esta etapa adicional seja fundamental. O comportamento químico dos clorofenóis dificulta não só a extração por SPME como também influencia negativamente a sua separação e detecção por cromatografia gasosa, uma vez que se obtêm picos largos e com cauda, o que dificulta a sua correta quantificação.

Os métodos que habitualmente se utilizam para a derivatização dos compostos fenólicos são a acilação, alquilação e alilação. Tais métodos permitem a conversão dos compostos em espécies apolares o que aumenta a sua volatilidade, melhora o formato dos picos cromatográficos, a resolução e a sensibilidade analítica (85). O agente derivatizante habitualmente utilizado na derivatização de clorofenóis por acilação é o anidrido acético. A primeira etapa da reação de acetilação é uma desprotonação do grupo OH do composto clorofenólico na presença de uma base, à qual se segue o ataque nucleofílico ao grupo carbonilo do agente derivatizante dando origem ao derivado acetilado (Figura 10).

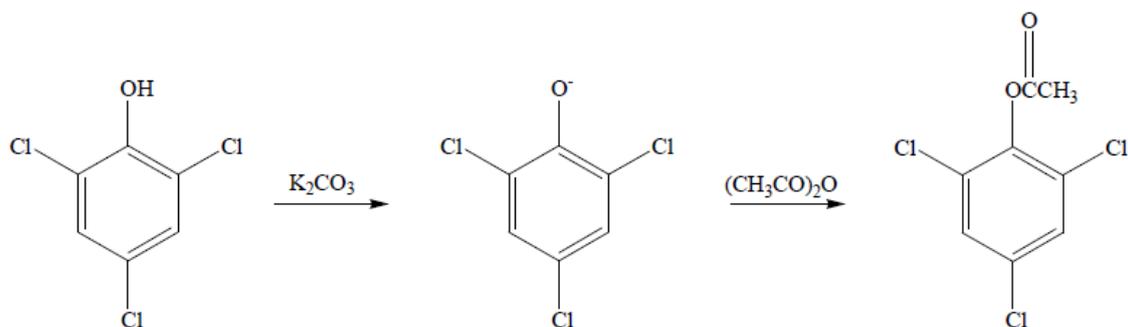


Figura 10 – Reação de acetilação do TCP.

De entre as diversas vantagens que a acetilação dos clorofenóis apresenta, destacam-se as seguintes:

- É uma reação rápida que dá origem a derivados com um padrão de fragmentação característico, passíveis de serem analisados por cromatografia gasosa;

- A adição de um grupo acetilo diminui a polaridade do composto fenólico proporcionando uma melhor eficiência de extração;
- Promove a derivatização de grandes volumes de amostra de uma forma exequível e económica (85).

1.6.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação que se baseia no arrastamento da amostra vaporizada por uma fase móvel (gás de arraste) ao longo de uma coluna que contém a fase estacionária. O elevado poder de separação da cromatografia gasosa, aliado à capacidade de identificação da espectrometria de massa permite identificar os diversos componentes de uma mistura.

Após a extração da amostra, a fibra de SPME é introduzida no injetor do cromatógrafo onde ocorre a dessorção térmica dos compostos (Figura 11).

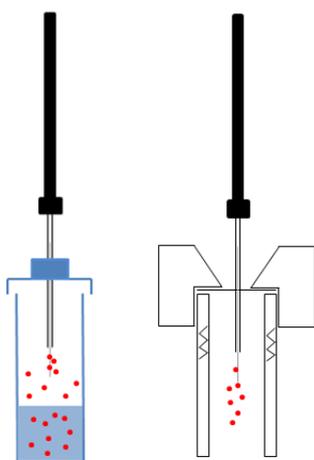


Figura 11 – Representação esquemática do processo de dessorção térmica dos compostos no injetor do cromatógrafo.

A injeção da amostra pode ser realizada em modo *split* ou *splitless*. Na técnica de injeção *splitless*, a totalidade da amostra injetada é dirigida para a coluna cromatográfica enquanto que, no modo de injeção *split*, só uma parte da amostra é direcionada para a coluna (86). A coluna cromatográfica encontra-se no interior de um forno e é revestida interiormente com uma fase estacionária. A amostra atravessa a coluna com a ajuda de um gás de arraste ocorrendo, assim, a separação dos diferentes componentes da mistura. Os primeiros compostos a serem eluídos são os que apresentam um ponto de ebulição

menor (mais voláteis) ou com pouca afinidade para a fase estacionária. À medida que as moléculas chegam ao espectrômetro de massa, são ionizadas sob vácuo e formam-se iões com diferentes razões massa/carga (m/z) que são separados por diferentes campos elétricos e, de seguida, detetados tendo em conta a sua abundância (Figura 12) (86,87).

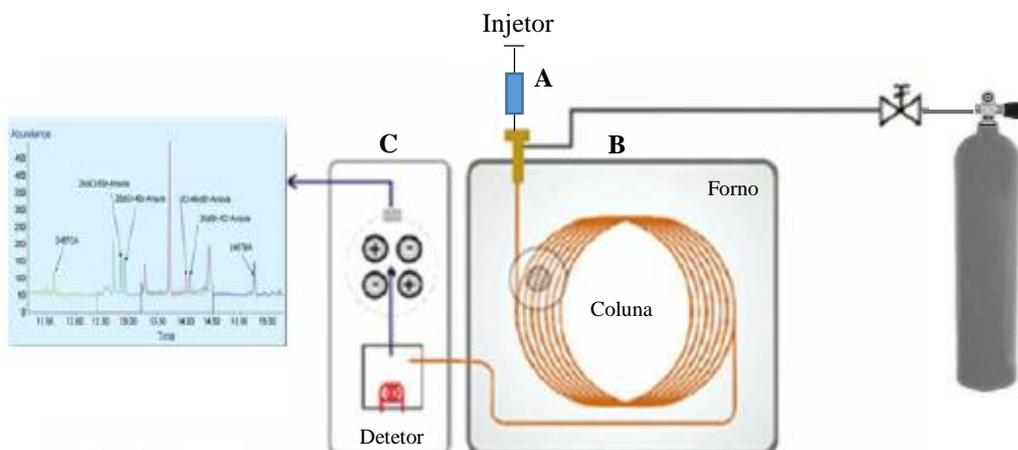


Figura 12- Representação esquemática de um equipamento de GC-MS: A – Injeção da amostra; B - Separação dos compostos da amostra; C - Identificação dos compostos (Adaptado de (88)).

Cada composto apresenta um padrão de fragmentação característico e, conseqüentemente, um espectro de massa específico, o qual, para um mesmo detetador, depende apenas da energia de ionização e da temperatura a que a esta ocorre. Os cromatogramas obtidos permitem observar os tempos de retenção característicos de cada composto e fazer uma análise quantitativa através das áreas cromatográficas dos picos. Cada ponto do cromatograma tem associado um espectro de massa a partir do qual é possível obter informação estrutural fundamental para a identificação e quantificação dos compostos (86).

O equipamento utilizado para deteção neste trabalho é um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo. Este instrumento é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo é utilizado como célula de colisão, onde os iões selecionados no primeiro quadrupolo (Q1) sofrem fragmentação por dissociação induzida por colisão (collision-induced dissociation - CID) (Figura 13). Na CID, o ião precursor sofre sucessivas colisões com um gás inerte (habitualmente Ar, He, N₂) dando origem aos iões fragmento. Estes iões fragmento formados na célula de colisão seguem para o terceiro quadrupolo (Q3) onde sofrem um segundo processo de seleção. Neste processo existe sempre uma diferença de potencial responsável por garantir que os iões formados no Q1

ou os iões fragmento gerados na célula de colisão são transmitidos até chegarem ao detetor (87).

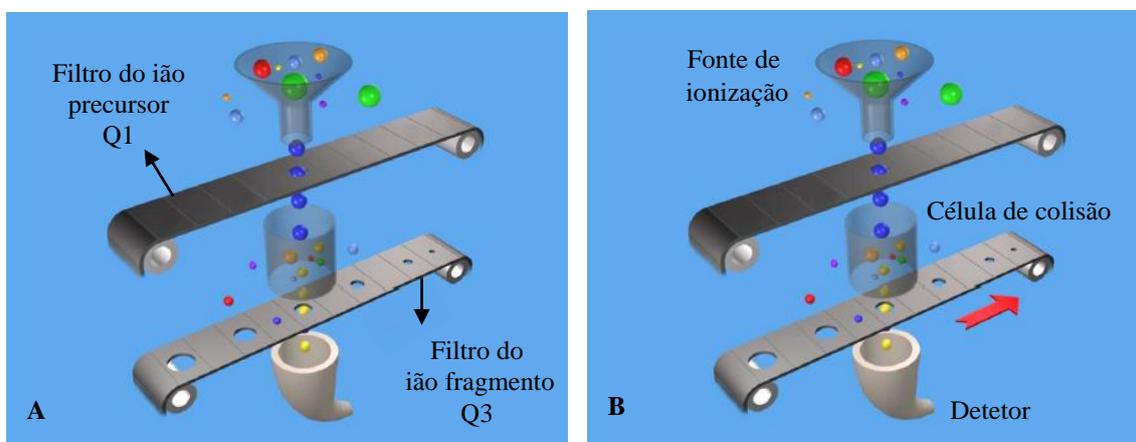


Figura 13 – Modelo conceptual de um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo: A - No modo SIM, Q1 e Q3 permanecem fixos para uma razão m/z específica; B – No modo Full Scan MS/MS, o Q1 permanece fixo para a razão m/z do ião de interesse e o Q3 opera no modo de varrimento (Adaptado de (87)).

Este equipamento é um dos sistemas mais sensíveis de MS/MS uma vez que ambos os quadrupolos podem trabalhar no modo de varrimento ou de seleção (SIM – Monitorização do Ião Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*). O modo mais sensível de operação de um triplo quadrupolo, chamado SRM (Monitorização de Reação Seleccionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*), consiste em operar ambos os quadrupolos no modo de seleção e apenas monitorizar um ião precursor e um ião fragmento específico. Em trabalhos com fins quantitativos é utilizado o modo de aquisição conhecido como MRM (Monitorização de Reações Múltiplas, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), em que se executam vários SRMs para os mesmos iões precursores (Figura 13-A) (87).

1.7. Validação do método analítico

A validação de um método analítico é um processo de avaliação que deve fazer parte de qualquer rotina analítica de um laboratório e é utilizado para confirmar se o procedimento analítico aplicado numa determinada análise é adequado ao seu propósito (89–94). Ou seja, o principal objetivo do método de validação é demonstrar que a metodologia permite a obtenção de resultados analíticos corretos uma vez que todas as intervenções realizadas durante a execução de uma metodologia estão associadas a erros

e incertezas que, ao acumularem-se, podem alterar o valor do resultado final (91,94). Os laboratórios devem ser capazes de demonstrar que os métodos por si utilizados são credíveis (94,95) e, para isso, a validação de um método de ensaio é um processo que deve ser considerado quando se desenvolve ou se efetuam adaptações em metodologias já validadas: os resultados da validação do método podem ser usados para estimar a qualidade, credibilidade e consistência dos resultados analíticos (89,92).

A validação de um método analítico deve obedecer a um conjunto de requisitos mínimos (89,91,92):

- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limites Analíticos (Limite de Detecção: LD; Limite de Quantificação: LQ);
- Precisão (Repetibilidade; Reprodutibilidade; Precisão Intermédia);
- Exatidão;
- Robustez.

1.7.1. Gama de Trabalho/Linearidade

A gama de trabalho de um método analítico é o intervalo de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado e deve abranger a gama de concentrações onde se situam as amostras a analisar (91,96). Segundo a norma ISO 8466-1 (97), devem ser preparados dez pontos de calibração (não devendo ser inferior a cinco), distribuídos de igual modo na gama de concentrações a utilizar. Para determinar a gama de trabalho devem ser preparadas e analisadas dez réplicas independentes dos padrões de maior e menor concentração a partir das quais são calculadas as variâncias associadas (89):

$$S^2_{()} = \frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

Sendo:

- y_i os valores individuais da resposta do instrumento;
- \bar{y} a média aritmética dos valores das respostas do instrumento;
- n o número de repetições efetuadas.

As variâncias respetivas ao primeiro e último padrão ($S_{(1)}^2$ e $S_{(10)}^2$), devem ser avaliadas pelo teste de homogeneidade de variâncias de forma a averiguar se existem diferenças significativas entre os limites da gama de trabalho (89). Para isso, efetua-se o cálculo da função PG:

$$PG = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{s_1^2}{s_{10}^2} \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2$$

O valor de PG é, depois, comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher-Snedecor, para n-1 graus de liberdade. Considera-se que as diferenças entre as variâncias não são significativas e, portanto, a gama de trabalho está bem ajustada quando $PG \leq F$. Já se $PG > F$, a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser ajustada, de forma a que a diferença entre as variâncias do primeiro e último padrão permitam alcançar $PG \leq F$ (89).

A linearidade do método refere-se ao intervalo onde existe uma relação linear entre os valores medidos e as concentrações do analito, ou seja, é o intervalo de concentrações onde os resultados são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (91). Para avaliar a linearidade deve-se recorrer a uma representação gráfica da curva de calibração ($y = mx + b$) e ao cálculo e análise do coeficiente de correlação linear (R), que permite estimar a adequabilidade da reta como modelo matemático. Os valores de R, em análise química, devem ser superiores a 0,995 (89). Apesar do coeficiente de correlação linear ser um indicador de interdependência entre o sinal e as respetivas concentrações, deve também ser utilizado o coeficiente de determinação (R^2) para avaliar a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais. Quanto mais próximo este valor estiver da unidade menor será a dispersão dos pontos experimentais, ou seja, haverá um melhor ajustamento dos pontos à reta (96). É importante notar que os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade.

1.7.2. Limiares Analíticos

Para que o trabalho laboratorial seja rigoroso deve-se obedecer a limites de controlo que são estabelecidos no processo de validação. Os limiares analíticos do método

são constituídos pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ) que indicam a concentração a partir da qual é possível detetar e quantificar o composto em análise, respetivamente (91,96).

O limite de detecção é a menor concentração a partir da qual é possível detetar a presença do analito com certeza estatística, ou seja, corresponde à menor quantidade de substância que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada (91,96). Um resultado inferior ao LD não significa a ausência do analito, apenas permite afirmar, com uma probabilidade definida, que a concentração do componente em causa é inferior ao referido limite. O limite de quantificação pode ser definido como a menor concentração medida, a partir da qual é possível quantificar o analito, de forma exata e precisa (91,96). Normalmente o LQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. Uma vez que o método envolve a utilização de uma calibração linear, o LD e LQ podem ser calculados através das seguintes expressões (89):

$$LD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b} \qquad LQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Onde:

- 3,3 e 10 são constantes atribuídas segundo recomendação da IUPAC;
- b é o declive da curva de calibração;
- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração:

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

A atualização dos limites de detecção e quantificação deve ser efetuada sempre que se faz uma nova curva de calibração e sempre que ocorram alterações em fatores que possam ter influência no resultado final, como analista, reagentes, equipamento, entre outros (89). É de salientar que, desde que se observe estabilidade nos valores dos limites, ao longo do tempo, poder-se-á definir os limiares analíticos como uma média aritmética de um conjunto de curvas de calibração (89).

1.7.3. Precisão

A precisão de um método analítico é um parâmetro determinado pela norma ISO 5725-1 (98) e permite avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes realizados sobre a mesma amostra, em condições definidas. Existem três parâmetros para avaliar esta dispersão: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia (89,98).

A repetibilidade e a precisão intermédia de um método analítico podem ser determinadas através da execução de n medições (habitualmente, $n \geq 10$ para a repetibilidade e $n \geq 15$ para a precisão intermédia), em condições definidas. Estes parâmetros são, normalmente, expressos através do desvio padrão (S) e do coeficiente de variação (CV). O desvio padrão da repetibilidade (S_{ri}) e da precisão intermédia (S_{pi}) podem ser calculados através da seguinte expressão geral (89):

$$S_{()} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

em que:

- n corresponde ao número de amostras/ padrões;
- y_k é o resultado individual obtido;
- \bar{y} representa a média aritmética dos resultados obtidos.

O coeficiente de variação da repetibilidade (CV_{ri}) e o coeficiente de variação da precisão intermédia (CV_{pi}), expressos em percentagem, cujo resultado é numericamente igual à razão do desvio padrão ($S_{()}$) e da média dos valores considerados (\bar{x}) são calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$CV_r(\%) = \frac{S_{()}}{\bar{x}} \times 100$$

O critério interno exigido para que se considere o método válido em termos de repetibilidade e precisão intermédia é que os respetivos coeficientes de variação para estes parâmetros se encontrem abaixo de 10%.

A repetibilidade do método, norma ISO 5725-2 (99), expressa a precisão do ensaio efetuado sobre uma mesma amostra em condições o mais equiparadas possível, tais como,

o mesmo analista, o mesmo equipamento, os mesmos reagentes, o mesmo laboratório, entre outros. Para determinar a repetibilidade de um método devem ser efetuadas uma série de análises, nunca inferiores a dez ($n \geq 10$), para a mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade (89). Estes ensaios permitem também calcular, para além do desvio padrão e coeficiente de variação da repetibilidade, como descrito acima, o limite de repetibilidade (r). Este é o limite abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos em condições de repetibilidade.

O limite de repetibilidade (r), para um nível de confiança de 95%, pode ser calculado através da seguinte expressão:

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$$

A reprodutibilidade, segundo a norma ISO 5725-3 (100), refere-se à precisão do método de ensaio quando aplicado à mesma amostra mas fazendo variar o mais possível as condições associadas à medição como, por exemplo, o laboratório, analistas, equipamentos, reagentes e épocas diferentes. Uma das formas de testar a reprodutibilidade do método é a participação em ensaios interlaboratoriais.

A precisão intermédia, de acordo com a norma ISO 5725-3 (100), avalia a precisão do método de ensaio quando aplicado sobre a mesma amostra no mesmo laboratório e utilizando o mesmo método mas definindo claramente qual ou quais as condições a variar (analistas, equipamentos, tempo entre análises, entre outros) (96). Este parâmetro de precisão é considerado como o mais representativo da variabilidade dos resultados (89). Um método simplificado que pode ser utilizado para estimar a precisão intermédia consiste em executar n medições ($n \geq 15$) sobre uma mesma amostra ou padrões e definir quais as condições de precisão a variar.

1.7.4. Exatidão

A exatidão avalia a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro para a grandeza em medição. Os processos habitualmente utilizados para avaliar este parâmetro são: a participação em ensaios interlaboratoriais, testes de recuperação e o estudo de materiais de referência certificados (89,96).

O valor da recuperação da amostra pode ser obtido a partir da seguinte expressão (96):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_R - C_A}{C_P} \times 100$$

em que:

- C_R é a concentração do analito na amostra fortificada;
- C_A é a concentração do analito na amostra não fortificada;
- C_P é a concentração do padrão utilizado para fortificar a amostra.

1.7.5. Robustez

Este parâmetro avalia a consistência dos resultados quando se aplicam deliberadamente pequenas variações aos parâmetros ou variáveis inerentes ao método de análise (96). Os testes de robustez são, geralmente, utilizados para indicar os fatores que influenciam, de forma significativa, os resultados produzidos pelo método em estudo. A análise dos resultados deve ser feita através da avaliação dos coeficientes de variação (consideram-se aceitáveis CV inferiores a 10%) e pela realização de testes estatísticos (análise das variâncias e teste- t).

A exigência na validação dos métodos depende da natureza do método e da sua aplicação sendo, contudo, necessário garantir um resultado válido e apropriado ao fim a que se destina.

2. Objetivos do trabalho

O estudo descrito nesta dissertação foi desenvolvido durante um estágio que decorreu na empresa Cork Supply Portugal (CSP). A CSP faz parte do Cork Supply Group (CSG), atualmente representado por subunidades empresariais em todo o mundo, especialmente nas regiões de maior produção vinícola, sendo que a exportação para estes países representa 95% dos negócios da empresa. Em Portugal, a empresa foi inaugurada em 1995 e conta, neste momento, com cerca de 200 trabalhadores, 12% dos quais trabalham nos Departamentos de Controlo de Qualidade e de Investigação & Desenvolvimento. O investimento em investigação e na qualidade está relacionado com a visão da empresa, que consiste principalmente em criar confiança e garantir sempre um produto de qualidade ao cliente. O lema da empresa “Redefinindo a Qualidade” demonstra claramente a sua aposta na qualidade.

Sendo as rolhas o maior volume de negócios da indústria corticeira, a problemática da contaminação da cortiça com compostos que depreciam a qualidade do vinho e a sua aceitação pelos consumidores, é de extrema relevância para este setor.

Várias metodologias têm sido desenvolvidas e implementadas pelas indústrias por forma a extrair ou destruir estes compostos presentes na cortiça. Todavia, nenhum dos métodos se revela totalmente eficiente e são, na sua maioria, bastante dispendiosos. Sabe-se que determinados fatores, como a localização geográfica, o clima, as condições do solo e, ainda, as dimensões e idade do sobreiro e as suas condições de crescimento influenciam a constituição química da cortiça e, conseqüentemente, as suas propriedades. Neste contexto, este estudo surge como uma necessidade de identificar potenciais regiões de compra de cortiça onde haja maior incidência dos compostos responsáveis pelos desvios organoléticos nos vinhos.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo a validação de um método analítico para análise simultânea de TCA e clorofenóis e a sua aplicação na análise de amostras de cortiça de diferentes proveniências de forma a verificar se existe uma relação entre as características edafoclimáticas de origem das cortiças e a incidência de TCA e clorofenóis.

3. Materiais e Métodos

No presente capítulo far-se-á uma descrição dos materiais, reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho, bem como dos procedimentos experimentais que serviram de base à execução das tarefas. Apresenta-se ainda uma breve descrição das metodologias aplicadas no tratamento de dados.

3.1. Reagente e Materiais

No presente trabalho utilizaram-se os seguintes reagentes: TCA (99%, Sigma Aldrich), 2,4-DCP (99%, Sigma Aldrich), 2,6-DCP (99%, Sigma Aldrich), TCP (98%, Sigma Aldrich), PCP (97%, Sigma Aldrich) e D₅-TCA (98 % D, Sigma Aldrich) tendo este último sido usado como padrão interno (PI). Usou-se ainda anidrido acético (Panreac, 99%), solução de carbonato de potássio a 10% (Sigma Aldrich, ≥99,0%), cloreto de sódio (Panreac, 99%) e etanol p.a. (99%, Aga).

Foram utilizados vials de vidro de 20 mL com septos de Silicone/PTFE de 16 mm (45°, dureza A, 1,3 mm de espessura) e tampas de rosca e magnéticas. Foram utilizadas fibras SPME (Supelco) com uma fase estacionária PDMS-DVB (65 µm), condicionadas durante 30 minutos a 250°C antes da sua primeira utilização.

3.2. Equipamento

O equipamento utilizado neste trabalho foi um cromatógrafo de fase gasosa Agilent 7890B, acoplado a um espectrómetro de massa (MS- 7000 C GC-TQ), equipado com uma coluna capilar Agilent J&W DB-5MS (5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de espessura de filme). O sistema encontra-se equipado com um amostrador automático CTC Analytics Combi PAL Heated Auto Sampler, garantindo a reprodutibilidade nas injeções.

Usou-se um liner de vidro Sky, Restek (0,75 mm i.d. x 6,35 mm o.d. e 78,5 mm de comprimento). Foi utilizado hélio (Helio Bip Ultra High Purity; Air Products) como gás de arraste. O software de controlo, aquisição e análise de dados utilizado foi o Masshunter, versão B.07.00. As condições da análise cromatográfica, incluindo o programa de temperaturas, encontram-se descritas no ponto 3.3.4.

3.3. Procedimento Experimental

A metodologia utilizada para análise simultânea de TCA e clorofenóis compreende cinco fases principais:

- i. Preparação da amostra: maceração da cortiça em solução etanólica a 12% v/v durante 72 horas;
- ii. Derivatização dos clorofenóis;
- iii. Extração dos componentes voláteis derivatizados (migram da matriz de cortiça por contato das rolhas ou cortiça com vinho ou simulante) por SPME.
- iv. Cromatografia em fase gasosa: os compostos são dessorvidos no injetor do cromatógrafo e arrastados ao longo da coluna capilar.
- v. Quantificação dos compostos: determinada através do método de padrão interno (curva de calibração previamente determinada).

3.3.1. Amostragem de cortiça

As amostras de cortiça, provenientes de 46 herdades localizadas na Península Ibérica, foram recolhidas por uma equipa especializada da Cork Supply (Montijo), de acordo com o procedimento de ensaio interno da empresa. A quantidade de amostra recolhida (aproximadamente 1 Kg de amostra) foi a suficiente para a preparação de três réplicas, o que fez um total de 138 análises. Em cada herdade, a amostragem foi feita de forma aleatória e foram registadas as coordenadas geográficas e as características dos solos. A localização das referidas herdades encontra-se representada na Figura 14. A divisão da localização das herdades foi feita de acordo com a Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS), o sistema hierárquico de divisão do território por regiões. Consideraram-se, para este efeito, as seguintes regiões portuguesas: Beira Baixa, Lezíria do Tejo, Alto Alentejo e Alentejo Central (de agora em diante apenas denominada Alto Alentejo), Baixo Alentejo e Alentejo Litoral (de agora em diante apenas denominada Baixo Alentejo) e Algarve. Consideraram-se ainda as regiões espanholas da Estremadura e Andaluzia. As informações referentes ao tipo de solo e características do clima estão apresentadas na Tabela 4. Recolheram-se também informações relevantes no que diz respeito à densidade do montado: decidiu-se classificar cada uma das amostras de acordo com o nível de densidade do montado de onde foi extraída, sendo que o nível 1 representa o montado mais denso, o qual é caracterizado por apresentar um relevo

bastante acentuado, elevada densidade de árvores, pouca luz e exposição solar e mau arejamento; o nível 3 de densidade representa um montado aberto, onde o número de árvores é reduzido e há pouca cobertura; o nível 2 de densidade do montado corresponde a um nível intermédio entre estes dois. Estes dados foram recolhidos durante o processo de amostragem e disponibilizados pela equipa de campo da CSP, especializada na tiradia da cortiça.

Tabela 4 – Caracterização das amostras por tipo de solo, características climáticas e região de origem.

Região	Número de amostras por região	Características climáticas	Características dos solos
Beira Baixa*	1	Verões quentes e invernos suaves; zonas muito secas.	Argiloso
Lezíria do Tejo	16	Temperaturas médias amenas no inverno e verão; precipitação moderada.	Maioritariamente arenosos
Alto Alentejo	3	Temperaturas médias no inverno e quentes no verão; precipitação fraca.	Argilosos
Baixo Alentejo	8	Temperatura média anual elevada; períodos de seca no verão.	Maioritariamente arenosos
Algarve	4	Clima temperado; precipitação reduzida.	Xistosos
Estremadura*	1	Verões muito quentes e secos; invernos frios e húmidos.	Argiloso
Andaluzia	13	Micro clima com influência do Mediterrâneo; Verões quentes e invernos suaves; precipitação e humidade elevada.	Maioritariamente rochosos graníticos

*Estas regiões não foram consideradas na análise da incidência de TCA e clorofenóis por região (sub-capítulo 4.2.1.) uma vez que apenas estão representadas por uma amostra.

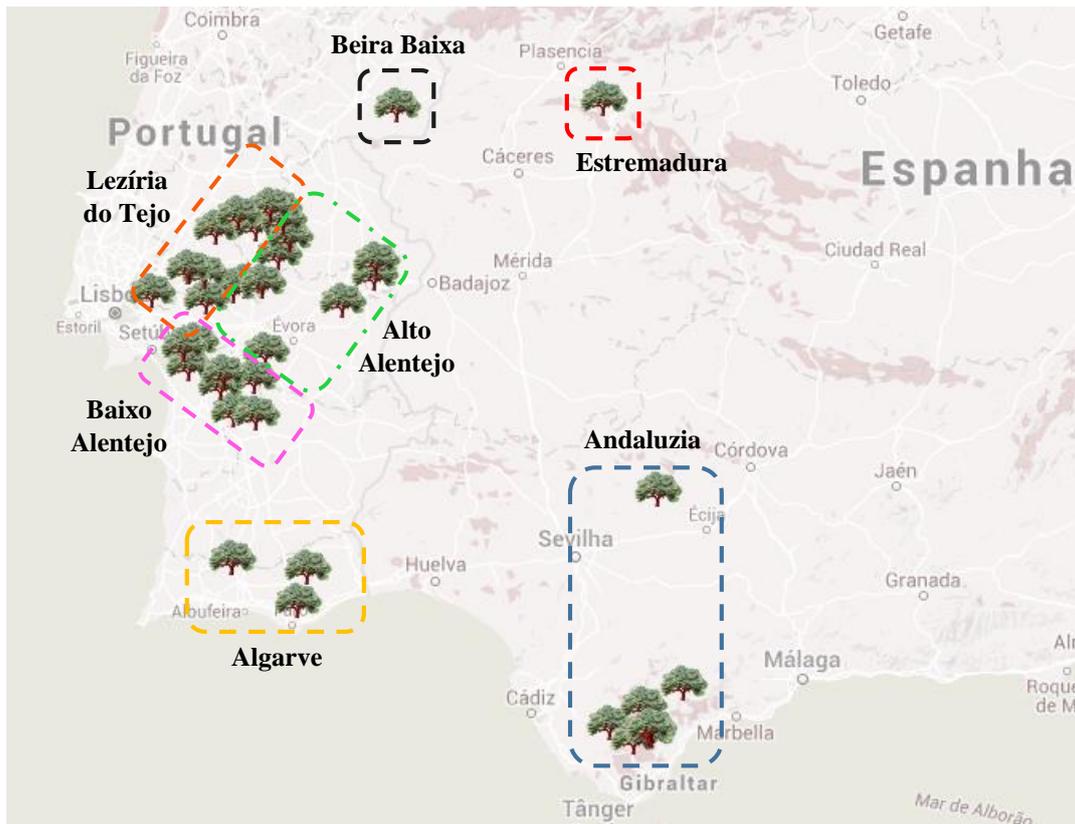


Figura 14 – Mapa de Portugal e Espanha com localização das herdades de proveniência das amostras de cortiça. Estão apresentadas 7 regiões representadas com cores diferentes.

3.3.2. Preparação da amostra

Começou-se por cortar as amostras de cortiça em pedaços com dimensões máximas de 50x50x50 mm (Figura 15-A). Para a preparação dos macerados, colocaram-se aproximadamente 250 g de cortiça (3 réplicas por amostra) em frascos de vidro de 2,5 L (Figura 15-B). Encheram-se os frascos com simulante de vinho (solução etanol/água a 12% v/v) de forma a que a cortiça ficasse totalmente submersa. Taparam-se os frascos com a respetiva tampa e deixou-se macerar durante 72 horas (Figura 15-C).

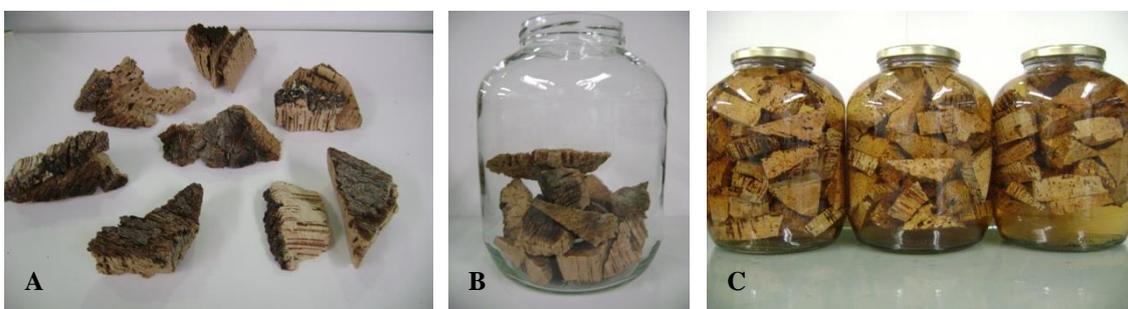


Figura 15 - Etapas na preparação da amostra de cortiça.

As soluções padrão de TCA (representado por CA) e clorofenóis (representados por CP) foram preparadas em simulante de vinho (Tabela 5), por diluição das respectivas soluções mãe com concentração de 10,00 µg/L (Anexo 7.1.).

Tabela 5 – Concentrações dos padrões utilizados na curva de calibração.

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão 7
CA (ng/L)	2,00	4,00	6,00	8,00	10,0	15,0	25,0
CP (ng/L)	4,00	8,00	12,0	16,0	20,0	30,0	50,0

As soluções padrão e as amostras foram analisadas no mesmo equipamento e usando as mesmas condições. A curva de calibração foi verificada entre análises e sempre que se mudou de fibra. Analisaram-se dois brancos no início de cada grupo de análises e três padrões no final das análises diárias.

3.3.3. Preparação e derivatização das amostras

Após a preparação das amostras ou padrões, pipetou-se uma alíquota de 5,00 mL da solução para um vial de 20 mL (razão $\beta = 3$) com, aproximadamente, 1 g de cloreto de sódio e adicionou-se 500,0 µL de solução de carbonato de potássio a 10% e 100,0 µL de anidrido acético. Adicionaram-se 30,0 µL de padrão interno (concentração final na amostra de 60,0 ng/L). Fechou-se o frasco com as respectivas tampas de rosca magnéticas e septo.

3.3.4. Metodologia de HS-SPME/GC-MS

Colocou-se o vial contendo a amostra preparada no ponto anterior no tabuleiro do amostrador automático, seguiu-se um período de incubação com agitação (500 rpm) durante 10 minutos a 50°C. De seguida, a fibra de SPME foi inserida no espaço de cabeça do vial durante 15 minutos (temperatura de extração de 50°C). A fibra de SPME foi, posteriormente, introduzida no injetor (230 °C) do cromatógrafo (modo splitless durante 2,5 minutos, 40mL/min), onde permaneceu durante 5 minutos para permitir a dessorção térmica dos compostos voláteis sorvidos na fibra. O programa de temperaturas do forno

foi de 60 °C durante 1 minuto, aumento de temperatura de 10°C por minuto até 200 °C e nova rampa de temperatura de 25°C/min até 275°C, onde permaneceu durante 1 minuto, perfazendo um total de 19 minutos de corrida. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com um fluxo constante de 1mL/min. O espectrómetro de massa operou em modo de impacto electrónico (EI) a 70 eV, com uma temperatura da fonte de iões a 230°C e temperatura do quadrupolo de 150°C, utilizando-se azoto como gás de colisão (1,5 mL/min). A deteção foi feita no modo MS/MS, com deteção de dois iões e quantificação do ião mais abundante, tendo como ião precursor e ião produto, os iões listados na tabela 6.

Tabela 6 – Tempo de retenção, energia de colisão e transições características (m/z) para cada um dos compostos estudados.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Transição (m/z)	Energia de colisão (V)
D ₅ -TCA (PI)	10,32	215 → 197 ^(a)	15
		217 → 199 ^(b)	15
2,4,6-TCA	10,36	212 → 197	10
		210 → 195	10
2,4-DCP	10,53	162 → 63	30
		98 → 63	5
2,6-DCP	10,22	162 → 63	30
		98 → 63	5
2,4,6-TCP	11,76	196 → 97	30
		132 → 97	10
PCP	15,91	266 → 167	30
		266 → 201	20

^(a) Para todas as transições listadas, a primeira linha corresponde à transição do ião quantificador.

^(b) Para todas as transições listadas, a segunda linha corresponde à transição do ião qualificador.

3.4. Tratamento de dados

3.4.1. Validação do Método

A validação do método teve início com o estudo da linearidade. Para tal, preparou-se uma reta de calibração constituída por 8 pontos, cada um analisado em triplicado e, para todos os padrões analisados, determinaram-se as áreas cromatográficas correspondentes aos compostos em estudo e ao padrão interno. De forma a obter uma

curva de calibração, representou-se graficamente a razão das áreas (área analito/área padrão interno) em função das concentrações do analito. Avaliou-se a linearidade através da análise do coeficiente de correlação da curva de calibração. De seguida, prepararam-se 10 réplicas dos pontos extremos da reta de calibração de forma a verificar a gama de trabalho do método. Para isso, a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo Teste de Fischer, como descrito em 1.7.1. A partir dos resultados da curva de calibração preparada, calcularam-se ainda os limites analíticos (LD e LQ) pelas equações apresentadas em 1.7.2.

De forma a avaliar a repetibilidade do método, foram preparadas dez réplicas do padrão de concentração mais baixa e dez réplicas do padrão de concentração mais alta, em condições de repetibilidade (mesmo analista, mesmo equipamento e no mesmo dia). Com o objetivo de testar a precisão intermédia do método analítico preparou-se um padrão de TCA e clorofenóis com concentração de 4,00 e 8,00 ng/L, respetivamente (Tabela 5 – Padrão 2) e dois analistas prepararam, em três dias diferentes, cinco réplicas da mesma amostra (condições a variar: tempo e operadores diferentes). Com recurso às expressões apresentadas no subcapítulo 1.7.3., calcularam-se os parâmetros de repetibilidade e de precisão intermédia.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, em que se preparou um padrão de 2,00 ng/L de TCA e 4,00 ng/L de clorofenóis (Tabela 5 – Padrão 1), e se fortificou a amostra com concentrações de 2,00 e 4,00 ng/L. Analisou-se a resposta do método a estas adições de padrão, calculando a percentagem de recuperação como descrito em 1.7.4. Estabeleceu-se como critério de aceitação para os ensaios de recuperação efetuados uma percentagem de recuperação entre 80 e 120%.

Por fim, de forma a avaliar a robustez do método, preparou-se um padrão com uma concentração teórica de 4,00 ng/L de TCA e 8,00 ng/L de clorofenóis (Tabela 5 – Padrão 2). A partir desta solução efetuaram-se os seguintes ensaios:

- Ensaio A - referência - Prepararam-se dez réplicas da solução padrão utilizando o procedimento habitual: 5,00 mL amostra + 30,0 µL de padrão interno.
- Ensaio B e C - variação no volume de amostra - Prepararam-se dez réplicas da solução padrão da seguinte forma: 4,80 mL amostra + 30,0 µL de padrão interno e 5,20 mL amostra + 30,0 µL de padrão interno.

- Ensaio D e E - variação no volume de padrão interno – Prepararam-se dez réplicas da solução padrão utilizando o seguinte procedimento: 5,00 mL de macerado + 28,0 µL de padrão interno e 5,00 mL de macerado + 32,0 µL de padrão interno.

Os resultados foram avaliados através da análise dos CV e, ainda, tratados estatisticamente, através da análise das variâncias e teste-*t*, de forma a verificar se existem diferenças significativas nas respostas do instrumento analítico às variações do volume de amostra e de padrão interno.

3.4.2. Análise da incidência de TCA e clorofenóis

Para proceder ao estudo da relação entre a incidência de TCA e clorofenóis e as características do solo e clima das regiões de origem da amostra, começou-se por fazer uma análise da distribuição de frequência dos compostos em estudo, ou seja, analisou-se a percentagem de incidência dos diferentes compostos em todas as cortiças estudadas. Posteriormente, escolheu-se a média como medida de tendência central e o desvio padrão como medida de dispersão para efetuar representações gráficas das concentrações dos compostos em função do tipo de solo e da região de proveniência das cortiças e, também, da densidade do montado. De forma a analisar os resultados obtidos utilizou-se o programa XLSTAT – *Statistical Software*, uma aplicação informática implementada no *Microsoft Office Excel*. Efetuaram-se análises de variância (teste-*F* e ANOVA), testes de Tukey e análise de componentes principais (ACP). Foram ainda efetuados testes-*t* para comparação de duas amostras independentes.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados referentes à validação do método analítico para análise simultânea de TCA e clorofenóis e subsequente estudo da incidência destes compostos em amostras de cortiça provenientes de diferentes locais na Península Ibérica. O objetivo é verificar se existe relação entre a incidência dos diferentes compostos e as características edafoclimáticas de origem da cortiça.

4.1. Validação do Método

A Figura 16 apresenta um cromatograma típico de uma solução padrão contendo TCA, 2,4-DCP, 2,6-DCP, TCP e PCP.

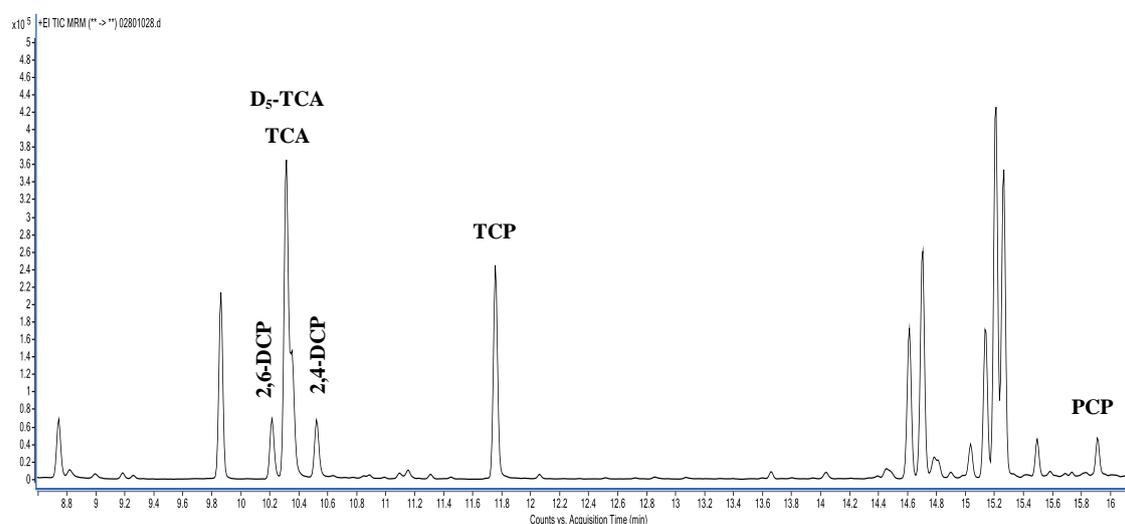


Figura 16 – Cromatograma típico de um padrão de 4,00 ng/L de TCA e 8,00 ng/L de clorofenóis.

4.1.1. Gama de trabalho e Linearidade

De forma a avaliar a adequabilidade da gama de trabalho pré-estabelecida (2,00 a 25,0 ng/L para o TCA e 4,00 a 50,0 ng/L para os clorofenóis), prepararam-se dez réplicas das soluções padrão correspondentes aos extremos da gama de concentrações e avaliou-se a homogeneidade das variâncias pelo Teste de Fischer, de acordo com o descrito no subcapítulo 1.5.1. A partir dos resultados obtidos (Anexo 7.2.), calcularam-se as variâncias e os valores de PG para cada composto (Tabela 7), os quais foram comparados com os valores tabelados da distribuição F de Fisher-Snedecor, para n-1 graus de liberdade ($F(n_{10-1}, n_{10-1}, 99,0\%) = 5,35$). Verificou-se, para um nível de confiança de 99%, a existência de homogeneidade das variâncias (valores de $PG \leq 5,35$), na gama de

concentrações estabelecida para a curva de calibração, ou seja, o intervalo de concentrações da gama de trabalho é adequado.

Tabela 7 – Avaliação da gama de trabalho do método em estudo.

Parâmetro	Composto				
	TCA	2,4-DCP	2,6-DCP	TCP	PCP
$S_{(1)}^2$	0,00101	0,0453	0,0805	0,0922	0,113
$S_{(7)}^2$	0,00212	0,140	0,245	0,454	0,491
PG	2,09	3,09	3,04	4,93	4,34
Gama de trabalho (ng/L)	2,00-25,0	4,00 - 50,0			

Nas Figuras 17 a 21 estão representadas as curvas de calibração obtidas para cada um dos compostos estudados na validação do método: TCA, 2,4-DCP, 2,6-DCP, TCP e PCP. Verificou-se a existência de uma relação linear entre a razão das áreas cromatográficas e as concentrações sendo que, os valores de R superiores a 0,995 indicam que o método analítico apresenta resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, na gama de concentrações estudada. Por sua vez, os valores de R^2 acima de 0,999 confirmam a qualidade do ajuste dos pontos experimentais à reta (Tabela 8).

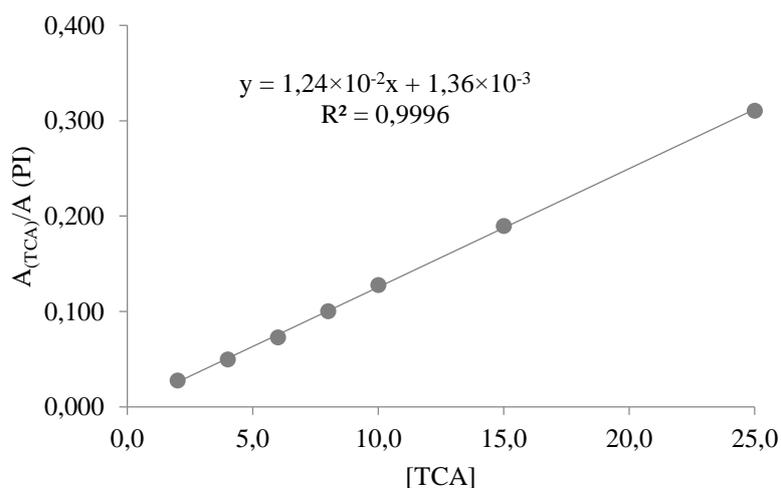


Figura 17 – Curva de calibração obtida para o composto TCA.

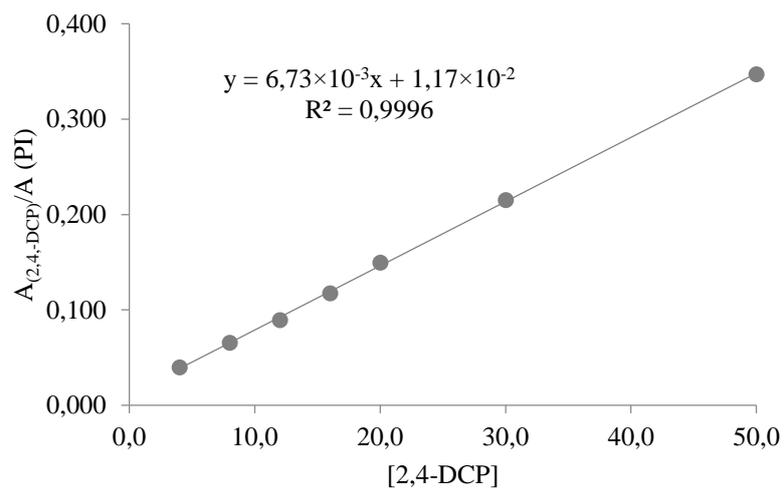


Figura 18 – Curva de calibração obtida para o composto 2,4-DCP.

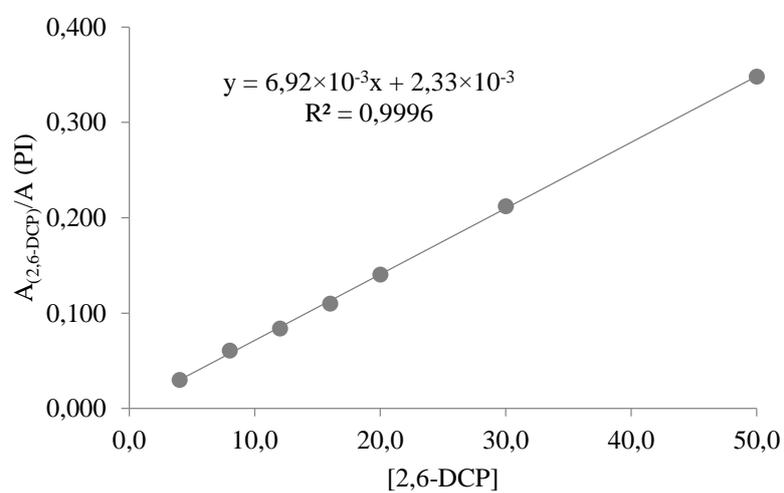


Figura 19 - Curva de calibração obtida para o composto 2,6-DCP.

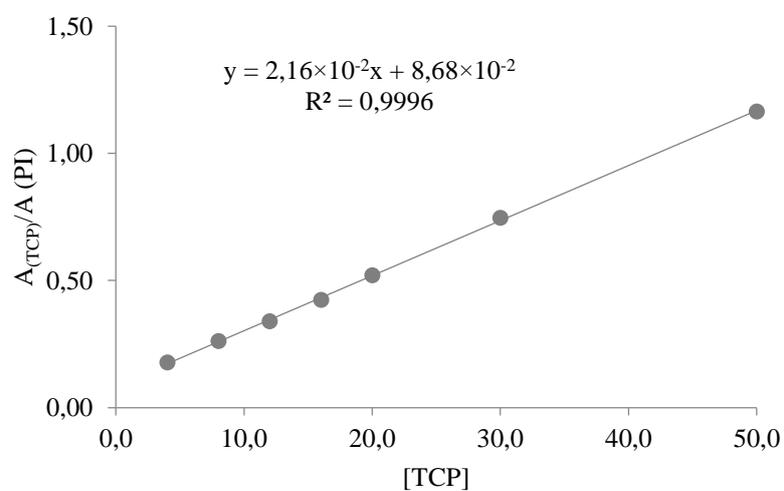


Figura 20 - Curva de calibração obtida para o composto TCP.

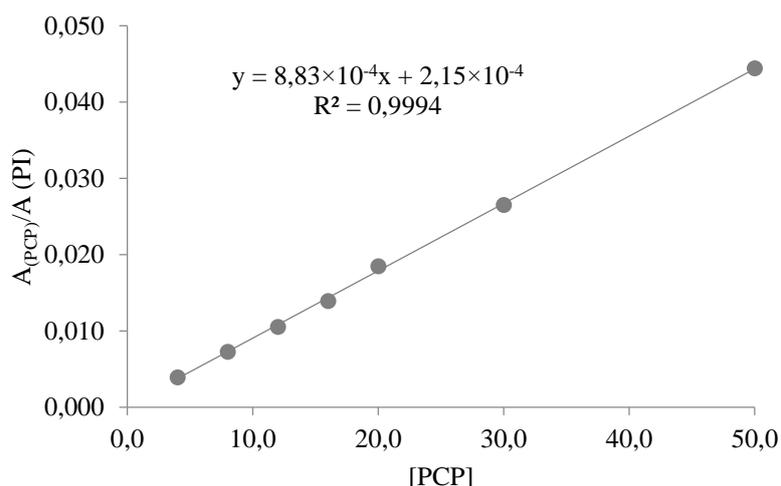


Figura 21 - Curva de calibração obtida para o composto PCP.

4.1.2. Limiares Analíticos

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das equações da reta com ajuste linear. Os resultados obtidos encontram-se listados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros das curvas de calibração.

Analito	m	b	$S_{y/x}$	R^2	R	LD (ppt)	LQ (ppt)
TCA	$1,24 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^{-3}$	0,9996	0,9998	0,538	1,79
2,4-DCP	$6,72 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-2}$	$2,40 \times 10^{-3}$	0,9996	0,9998	1,07	3,57
2,6-DCP	$6,91 \times 10^{-3}$	$2,33 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-3}$	0,9996	0,9998	0,971	3,23
TCP	$2,16 \times 10^{-2}$	$8,68 \times 10^{-2}$	$7,41 \times 10^{-3}$	0,9996	0,9998	1,03	3,43
PCP	$8,83 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-4}$	$3,80 \times 10^{-4}$	0,9994	0,9997	1,29	4,30

Os valores dos limites analíticos devem ser inferiores à concentração mais baixa da curva de calibração (2,00 ng/L para o TCA e 4,00 ng/L para os clorofenóis) para serem considerados aceitáveis na gama de trabalho determinada. Este requisito é cumprido para todos os compostos, com exceção do PCP, cujo limite de quantificação é ligeiramente superior a 4,00 ng/L. Assim, depois de determinados estes limites e com o objetivo principal de testar o LQ do PCP, analisaram-se uma série de dez padrões com concentrações próximas do limite de quantificação, em condições de precisão intermédia

(diferentes analistas), e avaliaram-se os respectivos coeficientes de variação. Estes não excederam os 10% (Tabela 9), como recomendado pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), concluindo-se, assim, que a precisão e exatidão conseguida em concentrações próximas do LQ é satisfatória (89).

Tabela 9 – Avaliação dos limites analíticos.

Parâmetro	Composto				
	TCA	2,4-DCP	2,6-DCP	TCP	PCP
Concentração teórica (ng/L)	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Média (ng/L)	2,13	3,91	4,10	4,10	3,93
CV (%)	1,73	3,51	3,14	4,83	8,04

4.1.3. Precisão

4.1.3.1. Repetibilidade

Iniciou-se o estudo da precisão do método com a avaliação da repetibilidade. A solução padrão com concentração mais baixa da curva de calibração foi analisada dez vezes e os resultados estão apresentados no Anexo 7.2. Na Tabela 10 encontram-se as medidas de repetibilidade necessárias para avaliação deste parâmetro.

Tabela 10 – Avaliação da repetibilidade do método.

Composto	Média (ng/L)	S_{ri}	$CV_{ri}(\%)$	r
TCA	2,08	0,0318	1,53	0,0890
2,4-DCP	3,98	0,213	5,34	0,596
2,6-DCP	4,23	0,284	6,71	0,794
TCP	4,22	0,304	7,20	0,850
PCP	3,86	0,336	8,71	0,942

Através da análise da Tabela 10, é possível verificar que os limites de repetibilidade são mais altos para os clorofenóis do que para o TCA. Para cada caso, o r

apresentado, significa que, para um nível de confiança de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaios realizados em condições de repetibilidade não deve exceder esse valor. O limite de repetibilidade para o TCA é igual a 0,09 e para o TCP igual a 0,85 isto é, a diferença entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade não deve exceder o valor de 0,09 unidades de concentração para o TCA e 0,85 unidades de concentração para o TCP, expressos em ng/L. A repetibilidade, expressa em termos de coeficiente de variação, é inferior a 10% para todos os compostos em estudo o que permite considerar o método válido para este parâmetro.

4.1.3.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada através da análise de trinta réplicas de uma solução padrão com concentração 4,00 ng/L de TCA e 8,00 ng/L de clorofenóis, preparadas por dois analistas em três dias diferentes. No Anexo 7.3. são apresentados todos os resultados referentes à precisão intermédia.

Tabela 11 – Avaliação da precisão intermédia do método.

Composto	Média (ng/L)	S_{pi}	$CV_{pi}(\%)$
TCA	4,20	0,126	2,99
2,4-DCP	7,97	0,508	6,37
2,6-DCP	8,41	0,370	4,39
TCP	7,75	0,285	3,68
PCP	7,86	0,647	8,23

Pela análise da Tabela 11, é possível concluir que o TCA é o composto que apresenta valores mais baixos de desvio padrão e coeficiente de variação. Ainda assim, o método é válido em termos de precisão intermédia para todos os compostos uma vez que os CV respetivos a cada composto são inferiores a 10%.

4.1.4. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, realizaram-se ensaios de recuperação, nos quais se fortificou a amostra com soluções de concentrações conhecidas (2,00 e 4,00

ng/L). Os valores médios das percentagens de recuperação para cada um dos compostos em estudo são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Avaliação da exatidão do método.

Analito	Concentração do padrão utilizado: 2,00 ng/L			Concentração do padrão utilizado: 4,00 ng/L		
	% Recuperação	DP (%)	CV (%)	% Recuperação	DP (%)	CV (%)
TCA	104	6,00	5,73	109	5,00	4,77
2,4-DCP	93,0	6,00	6,89	84,0	6,00	6,96
2,6-DCP	82,0	4,00	4,34	98,0	6,00	6,51
TCP	88,0	7,00	8,42	85,0	5,00	6,00
PCP	91,0	9,00	9,46	88,0	6,00	6,78

É possível afirmar que os ensaios efetuados são válidos e, conseqüentemente, considerar o método analítico exato, uma vez que as percentagens de recuperação, relativamente à amostra não fortificada, se encontram na gama de $100\pm 20,0\%$, tanto na adição de uma solução de 2,00 como de 4,00 ng/L. No Anexo 7.4. são apresentados todos os resultados referentes a estes ensaios.

4.1.5. Robustez

Os resultados médios das concentrações obtidas para cada um dos compostos em estudo, quando se fez variar volume de amostra (B e C) ou o volume de padrão interno (D e E) em relação ao ensaio de referência (A), são apresentados na Tabela 13. No Anexo 7.5. encontram-se todos os resultados referentes aos testes de robustez efetuados e a respetiva análise estatística (teste-*F* para comparação das variâncias de duas amostras e teste-*t* para comparação das médias de duas amostras independentes).

Tabela 13 – Avaliação da robustez do método.

Composto		Ensaio A	Ensaio B	Ensaio C	Ensaio D	Ensaio E
TCA	Média	3,99	3,97 ^(a)	4,04 ^(a)	3,99 ^(a)	3,98 ^(a)
	DP	0,148	0,108	0,0695	0,139	0,0602
	CV (%)	3,72	2,71	1,72	3,50	1,51
2,4-DCP	Média	7,76	7,47 ^(a)	7,45 ^(a)	7,52 ^(a)	7,59 ^(a)
	DP	0,387	0,423	0,407	0,502	0,149
	CV (%)	4,99	5,67	5,47	6,68	1,96
2,6-DCP	Média	7,93	8,12 ^(a)	8,14 ^(a)	8,03 ^(a)	7,84 ^(a)
	DP	0,437	0,592	0,562	0,629	0,242
	CV (%)	5,51	7,28	6,90	7,82	3,09
TCP	Média	7,66	7,61 ^(a)	7,40 ^(a)	7,29 ^(a)	6,83 ^(b)
	DP	0,41	0,60	0,50	0,65	0,29
	CV (%)	5,33	7,95	6,74	8,97	4,21
PCP	Média	8,43 ^(b)	7,77 ^(b)	7,38 ^(b)	7,10 ^(b)	6,63 ^(b)
	DP	0,384	0,657	0,733	0,975	0,647
	CV (%)	4,55	8,45	9,93	13,7	9,76

^(a) Indica que o ensaio não apresenta diferenças estatísticas significativas relativamente ao ensaio de referência.

^(b) Indica que o ensaio apresenta diferenças estatísticas significativas relativamente ao ensaio de referência

Da análise dos dados apresentados na Tabela 13, é possível verificar que o método é robusto para os compostos TCA, 2,4-DCP e 2,6-DCP, uma vez que os CV de todos os ensaios são inferiores a 10% e os testes estatísticos permitem concluir, com 95% de confiança, que não existem diferenças significativas entre o ensaio de referência e os ensaios em que se variou o volume de amostra ou o volume de padrão interno. Para o composto TCP, o método mostrou-se robusto para todos os ensaios, à exceção do ensaio E, quando se adiciona 32,0 µL de padrão interno, apesar do CV ser inferior a 10%, a análise estatística evidencia diferenças significativas, para um nível de confiança de 95%, relativamente ao ensaio de referência. Por sua vez, o método não é robusto para análise de PCP, na gama de trabalho utilizada uma vez que, apesar de apresentar valores de CV inferiores a 10% em todos os ensaios, à exceção do ensaio D,

os testes estatísticos efetuados revelam a existência de diferenças significativas entre as médias de cada um dos ensaios e a média do ensaio de referência.

4.2. Análise da incidência de TCA e clorofenóis nas amostras de cortiça

A análise das 46 amostras de cortiça fez um total de 138 análises, das quais resultaram os dados que são apresentados de seguida. O gráfico da Figura 22 representa a percentagem de resultados que se encontram acima do limite de quantificação do composto em causa. Os compostos detetados e quantificados nas amostras de cortiça foram o TCA, 2,4-DCP, 2,6-DCP e o TCP sendo que o PCP não foi detetado em nenhuma das amostras de cortiça e, portanto, não será alvo de estudo. O 2,4-DCP foi o composto mais vezes identificado e quantificado, estando presente em 67% das amostras. Na literatura encontra-se descrito que este composto é, também, dos clorofenóis mais frequentes no meio ambiente como resultado do uso, e consequente degradação, de compostos orgânicos como reguladores de crescimento, e pesticidas, nomeadamente, fenoxiherbicidas e biocidas fenólicos (42). Por sua vez, o TCA e o 2,6-DCP foram detetados e quantificados em cerca de 20% das amostras e o TCP em 39% das amostras.

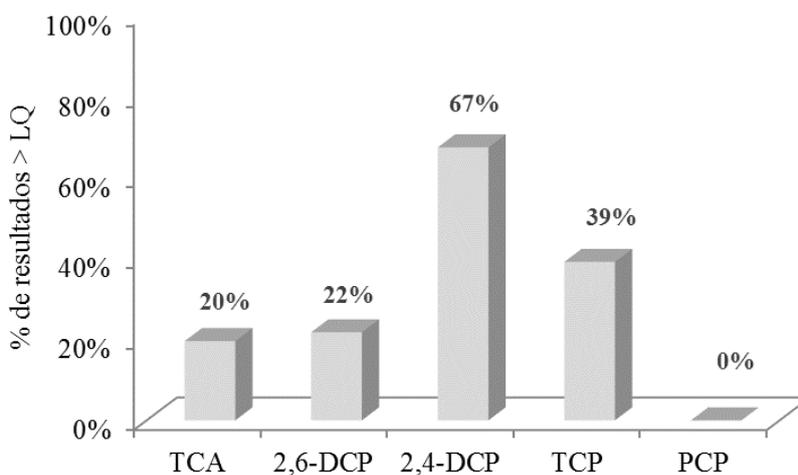


Figura 22 – Percentagem de amostras de cortiça acima do limite de quantificação para cada composto.

4.2.1. Relação entre a incidência dos compostos e a região

Analisados os resultados obtidos para cada um dos compostos em estudo, foi possível verificar que os clorofenóis surgem nas amostras de cortiça em concentrações

superiores à do TCA, sendo o TCP o composto que surge em concentrações mais elevadas. Estes resultados foram já reportados num estudo (101), no qual se analisou a incidência de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo de montados de sobro. Por outro lado, e de acordo com o descrito acima, o 2,4-DCP é o composto mais vezes identificado nas amostras e o que apresenta maior homogeneidade de concentrações nas diferentes regiões, ou seja, é o composto mais vezes quantificado e em níveis de concentração próximos.

A análise ANOVA efetuada mostrou que, para um nível de confiança de 95%, não existem diferenças significativas de contaminação entre os diferentes locais de recolha das amostras para todos os compostos à exceção do 2,6-DCP ($\alpha = 0,05$). A região com valores médios e máximos mais elevados para todos os compostos é a Andaluzia sendo ainda, à exceção do 2,6-DCP, a região que apresenta maior variabilidade nos resultados, principalmente para o TCP. Desta forma, apesar de não existirem diferenças estatísticas significativas de contaminação entre as diferentes regiões de proveniência das amostras para o TCA, 2,4-DCP e TCP, é possível concluir que os valores médios e máximos de contaminação são sempre superiores em cortiças provenientes da região da Andaluzia (Figuras 23 a 26).

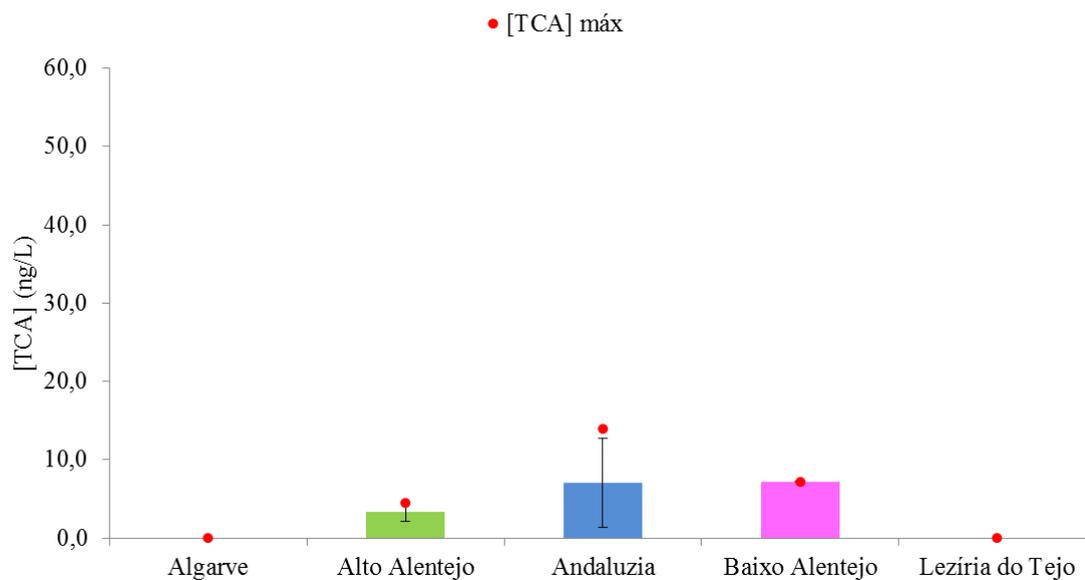


Figura 23 – Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função da região de origem das amostras.

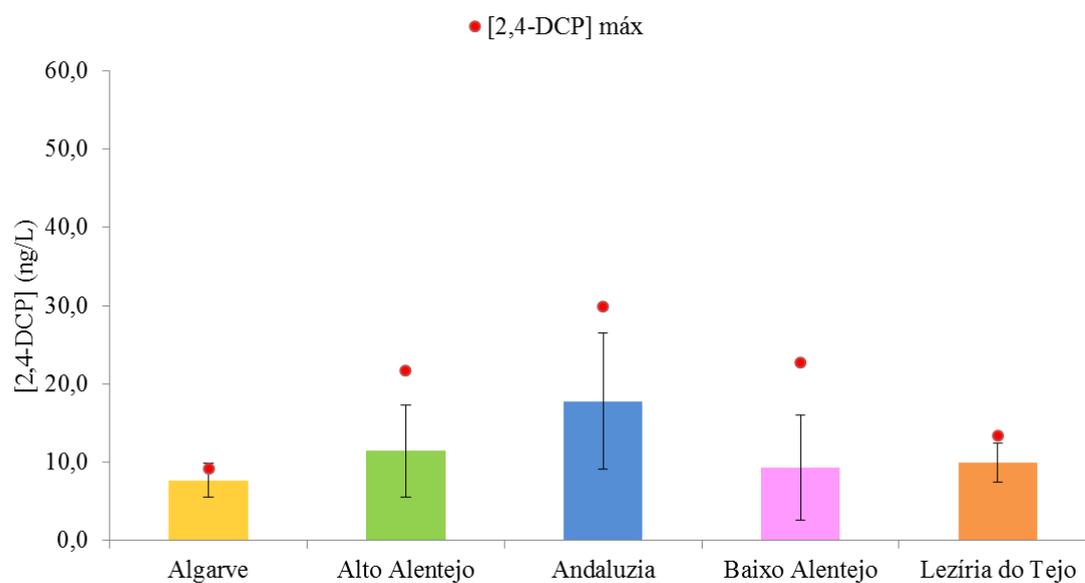


Figura 24 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função da região de origem das amostras.

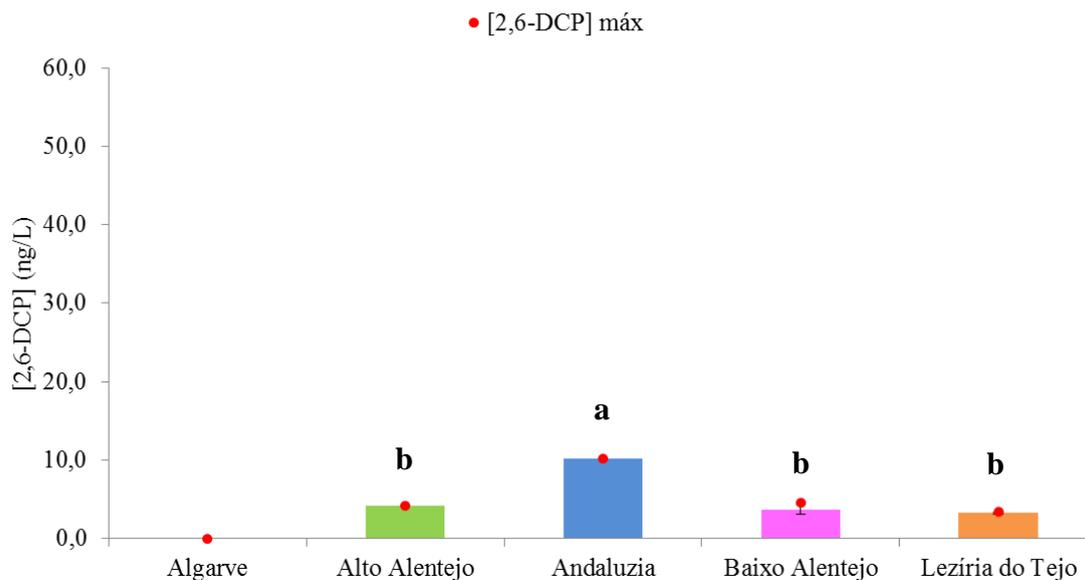


Figura 25 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função da região de origem das amostras (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).

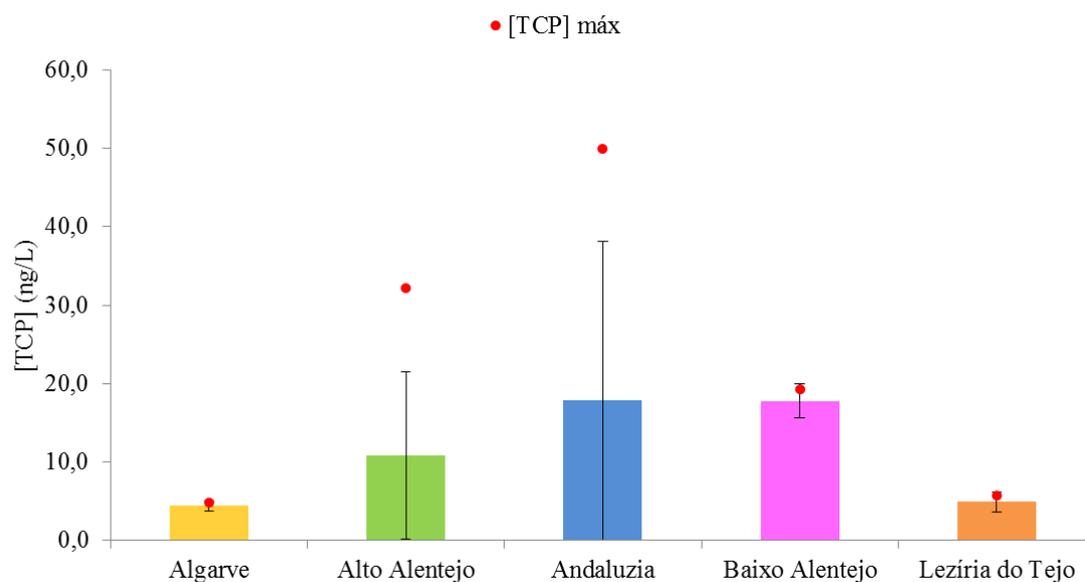


Figura 26 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função da região de origem das amostras.

4.2.2. Relação entre a incidência dos compostos e o tipo de solo

A Tabela 14 apresenta a percentagem de resultados que se encontram acima do limite de quantificação para cada tipo de solo, ou seja, a incidência dos compostos tendo em conta o tipo de solo de onde as amostras de cortiça foram recolhidas. É possível

verificar que, à exceção do 2,6-DCP, todos os compostos são encontrados com maior frequência em solos argilosos, o que é expectável que aconteça uma vez que, teoricamente, estes solos absorvem e retêm os compostos com mais facilidade.

Tabela 14 – Percentagem de resultados acima do limite de quantificação para cada composto, para cada tipo de solo.

Tipo de solo	TCA	2,4-DCP	2,6-DCP	TCP
Granítico	27%	64%	9%	27%
Arenoso	14%	67%	33%	38%
Argiloso	30%	80%	20%	50%
Xistoso	0%	50%	0%	50%

As Figuras 27 a 30 representam a concentração dos compostos em função do tipo de solo de origem das amostras. Estatisticamente, e apesar da grande variabilidade entre os diferentes grupos de solo analisados, é possível afirmar, após a análise ANOVA efetuada, que não existem diferenças significativas ($\alpha=0,05$) de contaminação entre cada tipo de solo, para todos os compostos à exceção do 2,6-DCP. É possível verificar que a concentração média dos compostos, assim como os valores máximos, são superiores para amostras de cortiça provenientes de solos graníticos. Estes resultados podem ser justificados através dos resultados apresentados no sub-capítulo anterior: a região da Andaluzia é aquela que apresenta índices de contaminação mais elevados e, aqui, os solos de onde as amostras de cortiça foram extraídas são predominantemente graníticos. Os elevados teores de contaminação com estes compostos no sul de Espanha foram também verificados por (102) em amostras de solo (terra) onde se desenvolvem sobreiros.

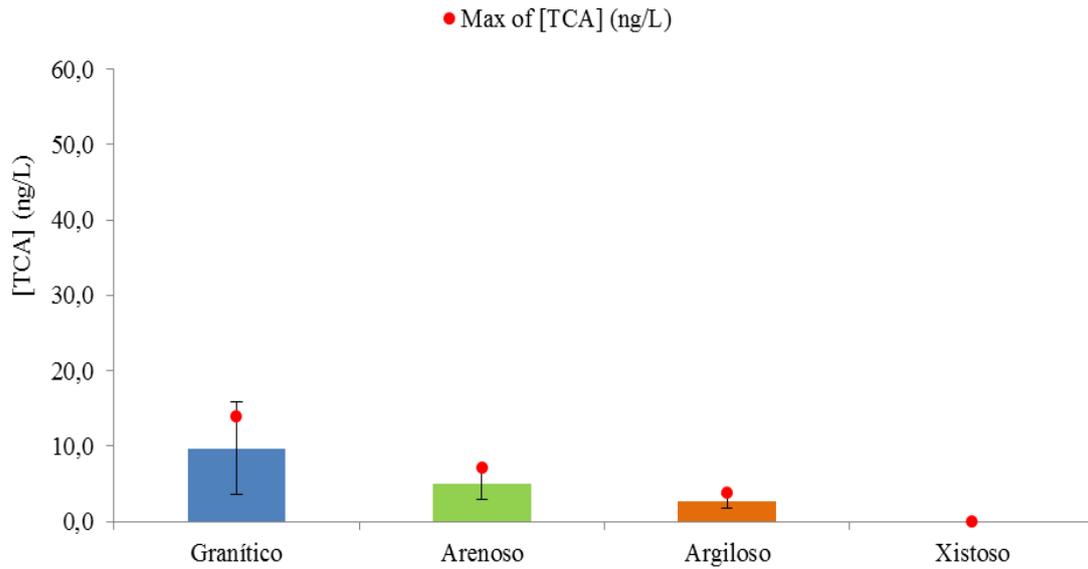


Figura 27 - Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.

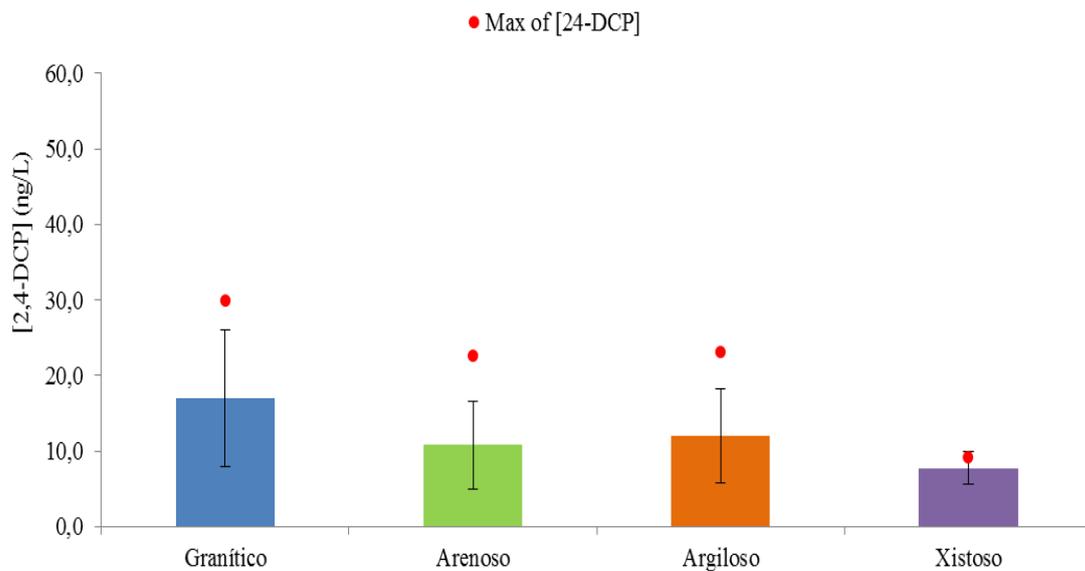


Figura 28 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.

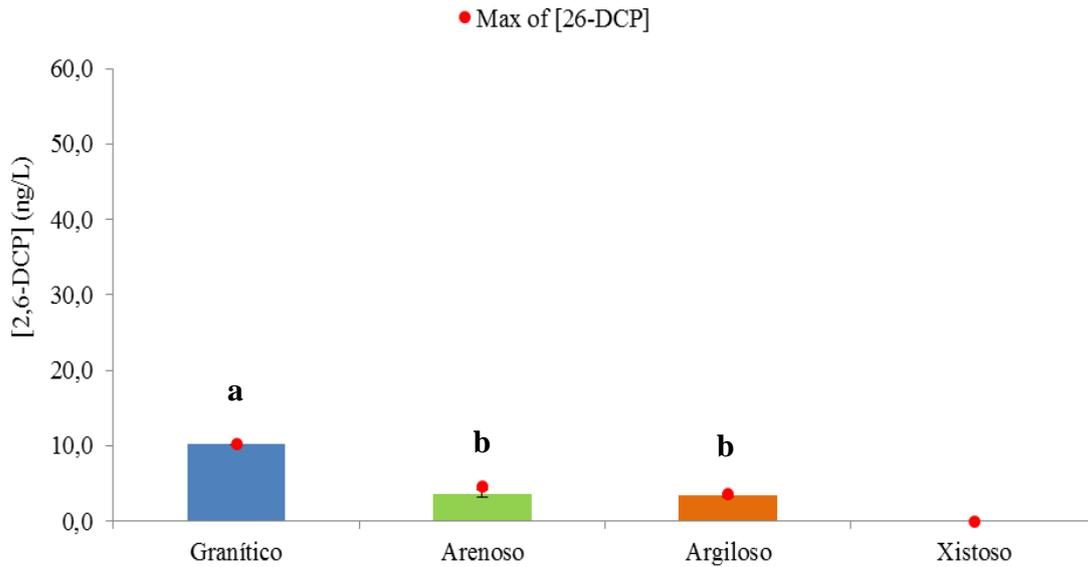


Figura 29 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).

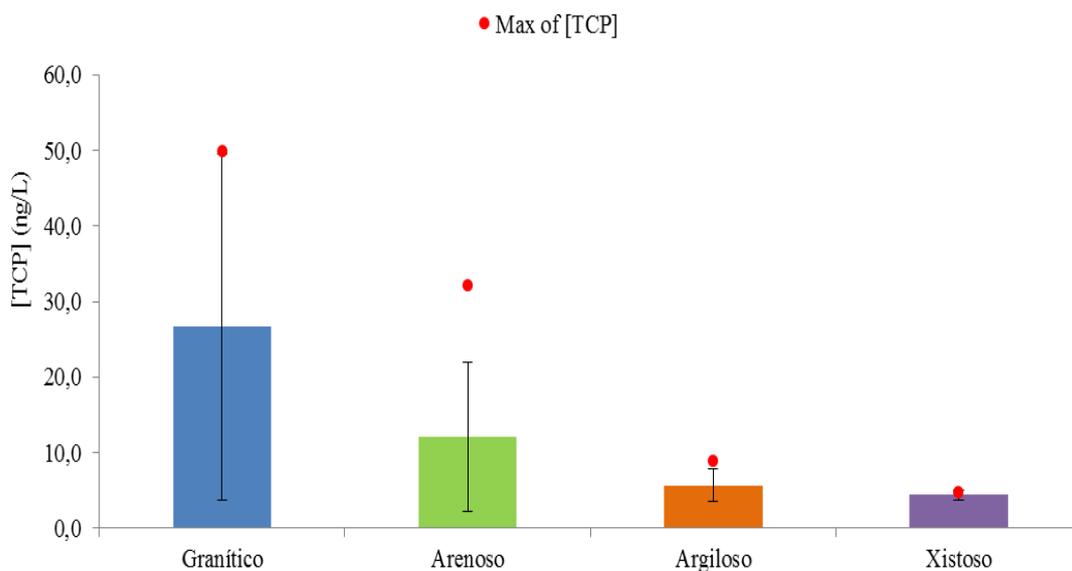


Figura 30 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função do tipo de solo de proveniência das amostras.

4.2.3. Relação entre a incidência dos compostos e a densidade do montado

A experiência da equipa de campo da CSP fez com que considerássemos a densidade do montado como um fator preponderante na análise dos resultados. Os resultados apresentados nas Figuras 31 a 34 mostram que a concentração média de TCA

e clorofenóis, e respetivos valores máximos, é mais elevada em montados mais densos (nível 1).

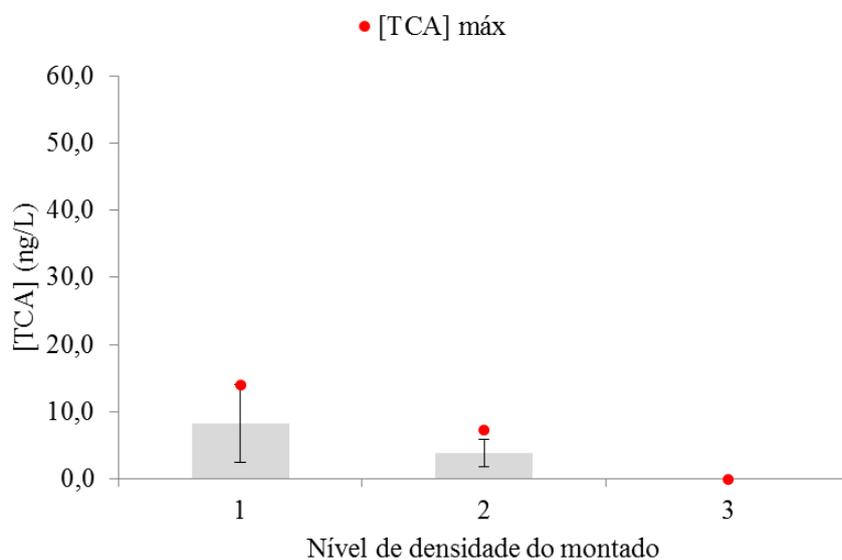


Figura 31 – Representação gráfica da concentração de TCA (ng/L) em função do nível de densidade do montado.

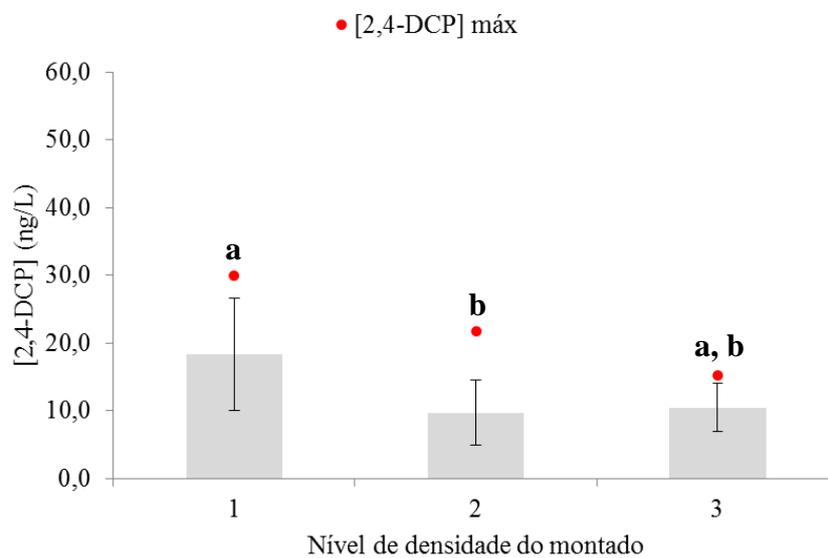


Figura 32 - Representação gráfica da concentração de 2,4-DCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).

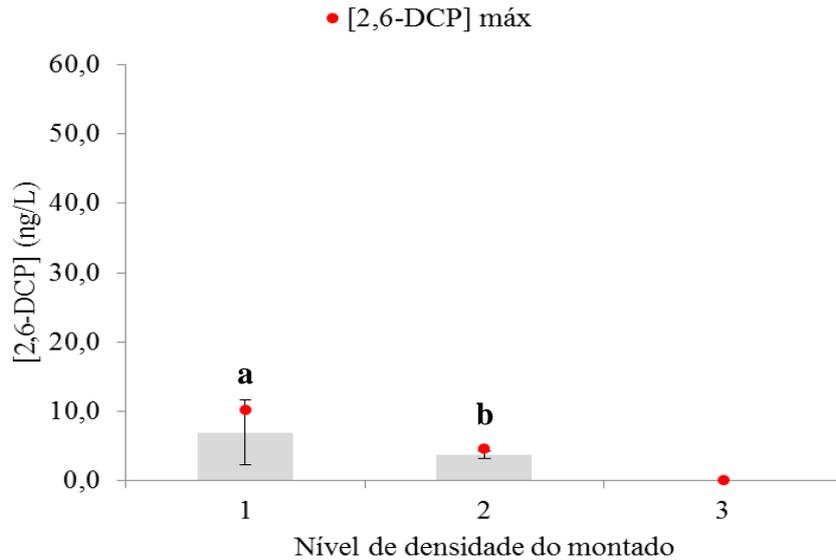


Figura 33 - Representação gráfica da concentração de 2,6-DCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado (letras iguais indicam amostras estatisticamente semelhantes entre si).

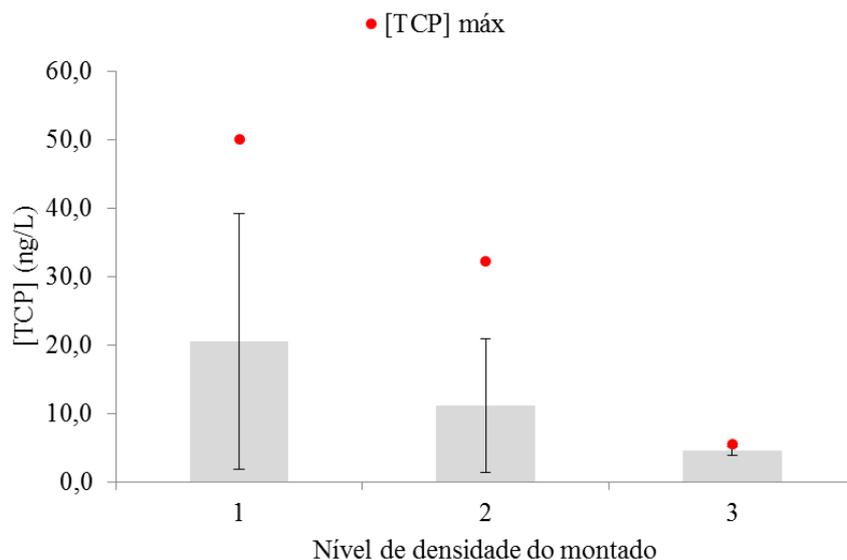


Figura 34 - Representação gráfica da concentração de TCP (ng/L) em função do nível de densidade do montado.

Foi efetuada uma análise ANOVA para verificar se existem diferenças significativas nas concentrações de TCA e clorofenóis entre os diferentes níveis de densidade do montado. Os resultados obtidos permitem afirmar, com 95% de confiança, que não existem diferenças significativas entre os níveis de densidade do montado para o TCA e para o TCP uma vez que os valores de p são superiores a 0,05. Contudo, para o

2,4-DCP e para o 2,6-DCP, as concentrações diferem significativamente consoante o nível de densidade. Assim, apesar de estatisticamente não ser possível afirmar que os níveis de contaminação com TCA e TCP são diferentes consoante a densidade do montado de onde a cortiça foi extraída, é possível concluir que os valores médios e máximos das concentrações, tanto de TCA como dos clorofenóis, são superiores em cortiças provenientes de montados com elevada densidade. A região da Andaluzia é caracterizada por montados densos (12 das 13 amostras provenientes da Andaluzia foram classificadas com o nível 1 de densidade do montado), com muitos sobreiros e baixo arejamento e exposição solar, o que conduz a uma elevada humidade dos solos (Figura 35) e, conseqüentemente, a que haja condições propícias para o desenvolvimento de fungos. Assim, estes resultados levam-nos a concluir que a densidade do montado é um dos fatores mais importantes e que mais influência tem na concentração de TCA e clorofenóis uma vez que se criam condições de temperatura e humidade ideais que permitem um maior desenvolvimento fúngico nos sobreiros. Estes resultados foram também observados num outro estudo (102) realizado com amostras de solo, no qual se demonstrou que existe uma relação positiva entre os níveis de contaminação dos solos e a humidade.



Figura 35 - Montado de sobreiro típico da região da Andaluzia: montado muito denso (nível 1).

De forma a tentar relacionar o nível de densidade do montado com as regiões de origem das amostras de cortiça, construiu-se a Tabela 15; 86% das amostras de cortiça

caracterizadas com o nível 1 de densidade do montado são provenientes da Andaluzia, 72% das amostras classificadas com o nível 2 tiveram origem nas regiões do Alto e Baixo Alentejo e, por fim, 80% das amostras classificadas com o nível 3 de densidade do montado foram recolhidas das regiões da Lezíria do Tejo e Algarve. Estes resultados vão de encontro aos apresentados no sub-capítulo 4.2.1. (Figuras 23 a 26): as amostras caracterizadas com o nível 1 de densidade correspondem, em 86% das vezes, às amostras recolhidas na Andaluzia e são aquelas com níveis de contaminação superiores. Já em 72% das vezes, as amostras caracterizadas com nível 2 de densidade são provenientes do Alto e Baixo Alentejo e correspondem àquelas com níveis de contaminação intermédio. Por sua vez, as amostras recolhidas nas regiões da Lezíria do Tejo e Algarve são, em 80% dos casos, provenientes de solos com densidade nível 3 e são aquelas que apresentam níveis médios de contaminação inferiores para todos os compostos.

Tabela 15 – Percentagem de amostras por nível de densidade do montado.

Nível de densidade do montado	% de amostras	Regiões
Nível 1	86%	Andaluzia
Nível 2	72%	Alto e Baixo Alentejo
Nível 3	80%	Algarve e Lezíria do Tejo

Para visualizar, de forma esquemática, as diferenças registadas entre os compostos analisados, a região, o tipo de solo e a densidade do montado foi ainda realizada uma análise de componentes principais. A matriz de correlação apresentada na Tabela 16 permite verificar a relação existente entre as diferentes variáveis.

Tabela 16 - Matriz de correlação dos diferentes compostos e da região e tipo de solo, resultante da Análise de Componentes Principais.

Variáveis	Região	Densidade	Tipo de solo	[TCA] (ng/L)	[26-DCP] (ng/L)	[24-DCP] (ng/L)	[TCP] (ng/L)
Região	1	-0,381	0,658	0,157	0,039	0,053	0,015
Densidade	-0,381	1	-0,520	-0,275	-0,108	-0,198	-0,151
Tipo de solo	0,658	-0,520	1	0,227	-0,073	0,198	0,073
[TCA] (ng/L)	0,157	-0,275	0,227	1	0,346	0,509	0,744
[26-DCP] (ng/L)	0,039	-0,108	-0,073	0,346	1	0,225	0,159
[24-DCP] (ng/L)	0,053	-0,198	0,198	0,509	0,225	1	0,514
[TCP] (ng/L)	0,015	-0,151	0,073	0,744	0,159	0,514	1

Os coeficientes de correlação positivos assinalados a cinzento na Tabela 16 indicam a existência de uma relação direta significativa entre os diferentes pares de compostos e, quanto mais próximo da unidade forem estes valores, mais estreita é a relação entre eles. Os coeficientes de correlação negativos indicam a existência de correlação inversa, ou seja, quando uma das variáveis aumenta, a outra diminui. No gráfico Biplot apresentado na Figura 36 é possível observar, a vermelho, a relação existente entre as variáveis. Quanto mais próximos estiverem os pontos vermelhos, maior correlação existe entre as variáveis.

Quando se projetam os indivíduos no gráfico (amostras de cortiça provenientes de montados com densidades diferentes), quanto mais próximos se encontrarem os pontos, maior é a semelhança entre as amostras. Verifica-se que as amostras estão distribuídas por todo o referencial sendo que as variáveis região, tipo de solo, TCA, 2,4-DCP, 2,6-DCP e TCP estão positivamente relacionadas com o eixo F1. Os dois primeiros fatores (F1 e F2) representam 63,07% da variabilidade total sendo que o primeiro eixo (F1) representa 37,95% da variância e o segundo eixo (F2) representa 25,12% dessa variância. À exceção da densidade, todas as variáveis se encontram positivamente relacionadas entre si e negativamente relacionadas com a densidade. As variáveis região e tipo de solo apresentam comportamento bastante semelhante entre si. As amostras provenientes de

montados de densidade nível 1 estão claramente separadas das restantes e estão positivamente relacionadas com os compostos em estudo.

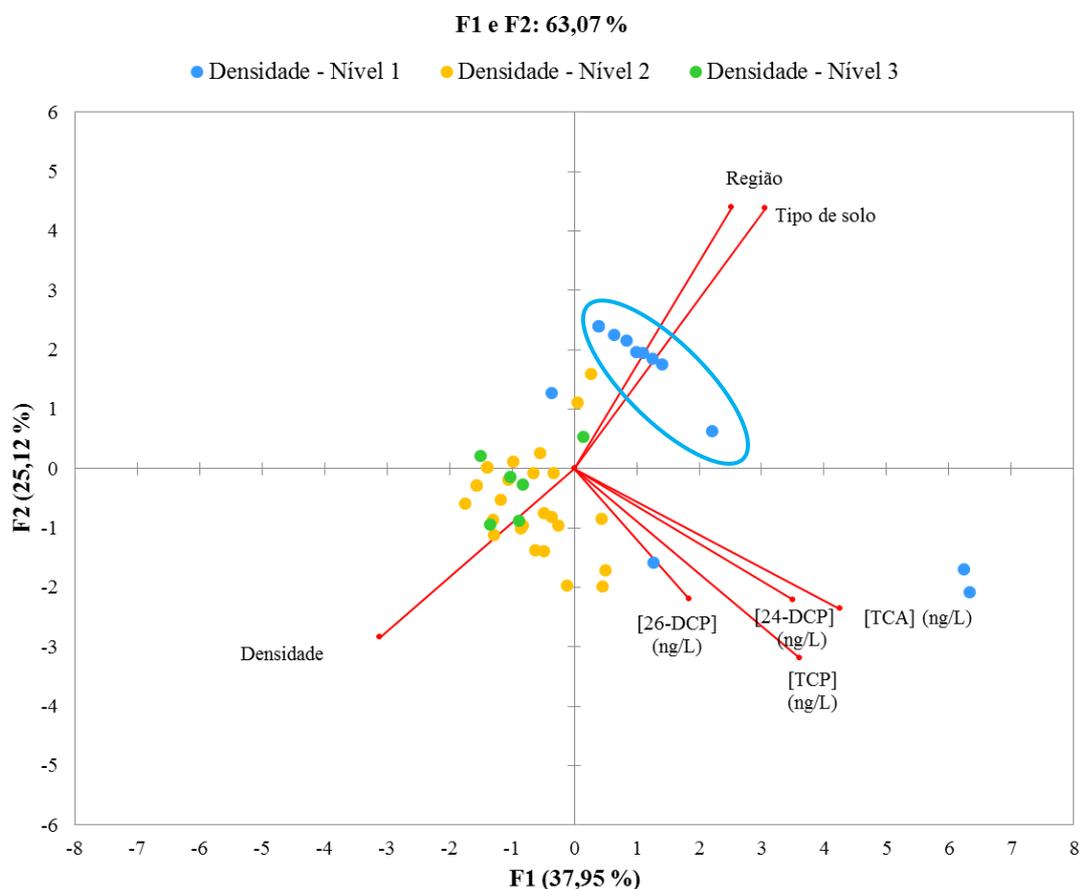


Figura 36 – Análise de Componentes Principais (Biplot) dos compostos, região e tipo de solo das diferentes amostras analisadas.

Os principais resultados obtidos neste trabalho encontram-se sumariados na Figura 37. Verifica-se que as contaminações mais elevadas dos compostos em estudo ocorrem em amostras provenientes da região da Andaluzia, de solos graníticos e de montados de densidade elevada (sendo todas as características comuns à região da Andaluzia). Não foi possível estabelecer uma relação entre o tipo de solo granítico e a concentração dos compostos em estudo mas a hipótese proposta é que as características do relevo e clima da região da Andaluzia são as que mais influenciam a contaminação, sobrepondo-se por completo à variável tipo de solo. Por outro lado, propôs-se uma explicação para o facto de amostras provenientes de montados muito densos terem níveis

de contaminação com TCA e clorofenóis elevados, justificando assim os maus resultados das amostras recolhidas na Andaluzia.

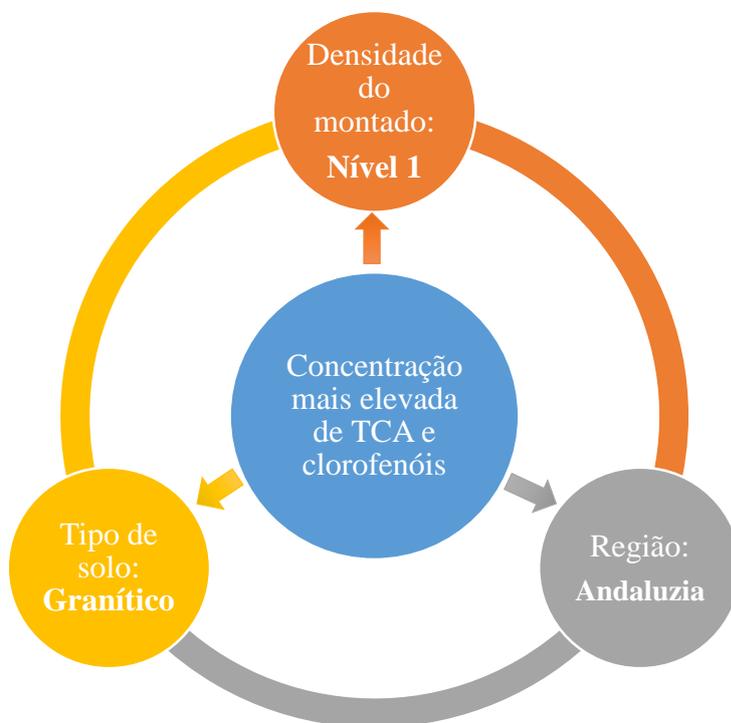


Figura 37 – Resumo dos principais resultados obtidos.

Posto isto, elaborou-se um mapa de risco para visualizar as potenciais zonas de perigo de contaminações elevadas destes compostos (Figura 38) onde a vermelho surgem as amostras provenientes de montados com elevada densidade (nível 1), a laranja as amostras provenientes de montados de densidade intermédia (nível 2) e, por fim, a verde, as amostras provenientes de montados pouco densos (nível 3), que parecem ser aqueles que implicam um menor risco de contaminações e, portanto, a compra de cortiça proveniente destes locais será uma aposta mais segura. A região da Andaluzia é, sem dúvida, a que apresenta um maior risco de contaminação, muito em parte por apresentar um micro-clima único com influência do Mediterrâneo, elevados índices de precipitação, montados densos e com pouca exposição solar e arejamento e, ainda, um relevo bastante acentuado.



Figura 38– Mapa de Portugal e Espanha com representação das amostras de cortiça em estudo e potencial risco de contaminação com TCA e clorofenóis. Vermelho - risco elevado de contaminação; Laranja – risco intermédio de contaminação; Verde – baixo risco de contaminação.

Os resultados apresentados indicam uma pior qualidade da cortiça quando esta é extraída na região da Andaluzia e, por esse motivo, decidiu-se fazer uma breve comparação entre as amostras recolhidas em Portugal e em Espanha.

Os resultados obtidos mostram que a incidência (número de vezes que os compostos são quantificados) de clorofenóis é superior em Portugal enquanto que a incidência de TCA é superior em Espanha (Figura 39). Como vimos atrás, estes resultados podem ser explicados pela transformação microbiológica dos clorofenóis em TCA, como resultado de um mecanismo de defesa à toxicidade dos clorofenóis para estes microorganismos. Praticamente todas as amostras provenientes de Espanha são da região da Andaluzia. Nesta região, como explicado no sub-capítulo 4.2.3., os montados são bastante densos o que favorece o desenvolvimento fúngico e conseqüente transformação dos clorofenóis em TCA. Desta forma, em Espanha, a incidência de contaminação com clorofenóis é mais reduzida e a contaminação com TCA mais elevada.

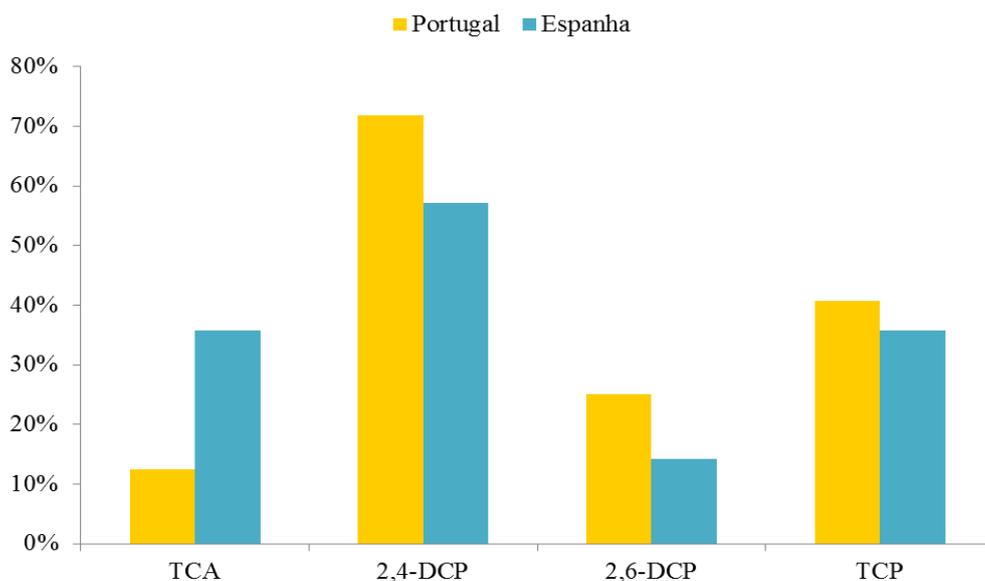


Figura 39 – Representação gráfica da incidência dos compostos em Portugal e Espanha.

Pela análise dos gráficos representados nas Figuras 40 e 41, é possível verificar que a concentração média e máxima de TCA e clorofenóis é superior nas amostras de cortiça com origem em Espanha. A concentração de TCA nas amostras recolhidas em Espanha é 1,6 vezes superior às das amostras recolhidas em Portugal. Esta diferença é mais acentuada para os clorofenóis, sendo 1,7 vezes superior para o 2,4-DCP e 1,9 vezes superior para o 2,6-DCP e para o TCP. Efetuou-se um teste-*t* para amostras independentes de forma a avaliar se existem diferenças significativas entre as amostras de cortiça proveniente de Portugal e a cortiça proveniente de Espanha. Esta análise estatística permitiu concluir, com 95% de confiança, que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) no que diz respeito à concentração de clorofenóis. Em relação à concentração de TCA, verificou-se que não existem diferenças estatísticas significativas entre as amostras recolhidas em Portugal ou em Espanha.

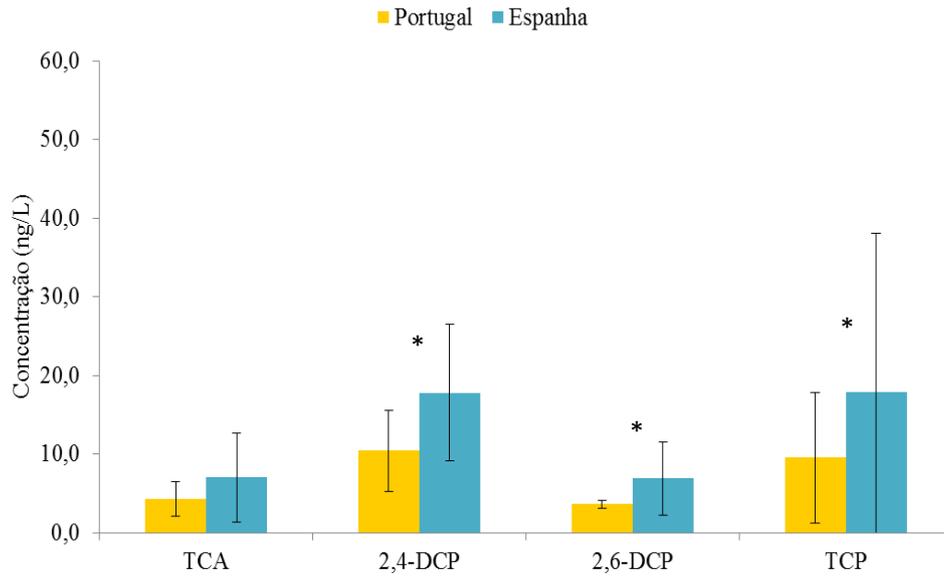


Figura 40 – Representação gráfica da concentração média dos compostos (ng/L) em Portugal e Espanha (* diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$)).

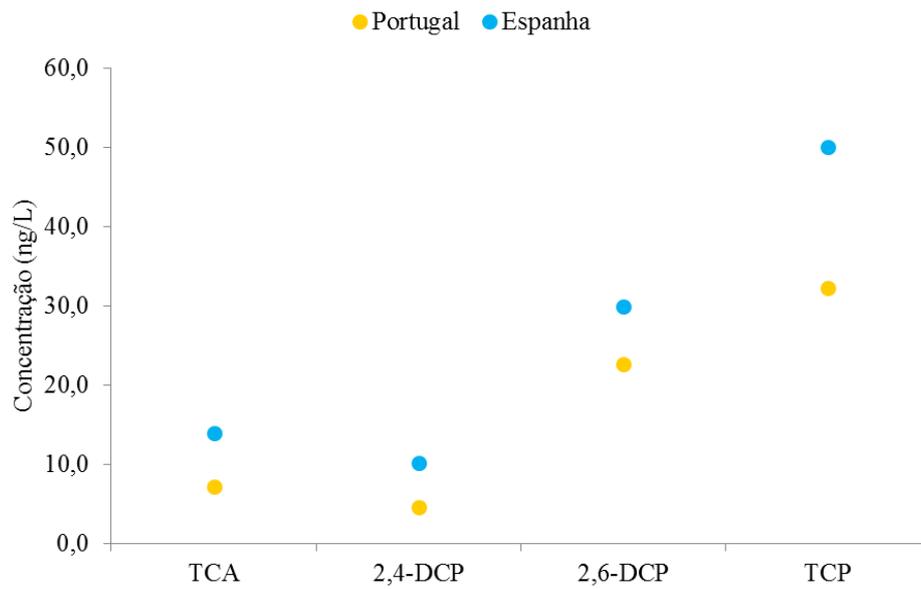


Figura 41 – Representação gráfica dos valores máximos de concentração (ng/L) em Portugal e Espanha.

5. Conclusões

A validação de um método analítico é um dos aspetos fundamentais na garantia da credibilidade dos resultados fornecidos por um laboratório. Neste trabalho, com o objetivo de validar o método para análise simultânea de TCA e clorofenóis utilizado no departamento de I&D da Cork Supply, avaliaram-se diferentes parâmetros inerentes à validação de um método: gama de trabalho, linearidade, repetibilidade, precisão intermédia, robustez e exatidão. A gama de trabalho do método ficou definida entre 2,00 e 25,0 ng/L para o TCA e 4,00 e 50,0 ng/L para os clorofenóis. A linearidade foi verificada entre os limites da gama de trabalho sendo que existe uma correlação linear entre as concentrações de padrões conhecidos e as áreas dos picos cromatográficos. O método apresenta limites de quantificação abaixo de 2,00 ng/L para o TCA e abaixo de 4,00 ng/L para os clorofenóis, à exceção do PCP, o qual apresenta um LQ de 4,30. Os limites analíticos foram testados, em condições de precisão intermédia e os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 10% permitindo concluir que a precisão e exatidão atingida em concentrações próximas do limite de quantificação é satisfatória. Em termos de repetibilidade, determinaram-se os limites de repetibilidade para cada composto e os respetivos coeficientes de variação, os quais se encontram abaixo de 10% permitindo considerar a metodologia validada em termos de repetibilidade. Na análise da precisão intermédia fez-se variar os dias em que se efetuaram as análises e os analistas que prepararam a amostra e analisaram-se os coeficientes de variação que foram inferiores a 10%, permitindo, assim, concluir que o método é preciso. A exatidão foi aferida através de ensaios de recuperação. Uma vez que se aceitam como válidos valores de recuperação entre 80 e 120% confirmou-se a exatidão do método. Por último, foi testada a robustez através da variação do volume de amostra ou de padrão interno e concluiu-se que o método é robusto para todos os compostos, à exceção do PCP. De notar que, para o TCP, o método não é robusto quando se adiciona 32,0 µL de padrão interno.

Assim, depois de avaliados e verificados todos os requisitos inerentes à validação do método, foi possível considerar o método analítico proposto como validado e implementá-lo nas análises de rotina do laboratório.

Relativamente ao estudo desenvolvido na caracterização e análise das amostras de cortiça, este trabalho focou-se essencialmente sobre a problemática da origem ambiental das contaminações da cortiça tentando correlacionar a incidência de compostos suscetíveis de causar desvios sensoriais nos vinhos com a origem das cortiças. Assim, os resultados obtidos mostraram que a contaminação das diferentes amostras de cortiça com

TCA e clorofenóis é muito variável. Foi possível verificar que a concentração de clorofenóis é superior à concentração de TCA sendo o TCP o composto que aparece em concentrações mais elevadas e o 2,4-DCP o composto mais frequentemente encontrado nas amostras de cortiça. Verificou-se uma elevada correlação entre as variáveis “tipo de solo” e “região” uma vez que cada região tem associado um tipo de solo diferente e, portanto, a distribuição dos resultados é bastante semelhante não sendo possível distinguir o impacto destas duas variáveis no que toca à respetiva relação com os resultados analíticos. Constatou-se, assim, que a região da Andaluzia é aquela que apresenta níveis médios e máximos mais elevados para todos os compostos, para além de apresentar uma grande variabilidade nos resultados, ou seja, a Andaluzia apresenta-se como sendo a região de onde é extraída cortiça com maior probabilidade de causar desvios sensoriais. De acordo com a experiência da equipa da CSP, estes resultados estão relacionados com a elevada densidade dos montados nesta zona, o que parece ficar demonstrado pelos resultados do presente trabalho.

Desta forma, este estudo permitiu identificar as principais variáveis com influência na contaminação das cortiças e caracterizar diferentes locais com potencial risco de contaminação tornando-se, assim, numa ferramenta científica e comercial bastante útil na compra de matéria-prima. A Cork Supply tem vindo a efetuar um longo percurso de investigação na problemática do TCA de forma a tentar dar resposta ao mercado cada vez mais exigente e, este trabalho, é uma contribuição importante na prevenção deste problema, inserindo-se claramente no princípio da empresa: “Qualidade desde a floresta até à rolha”.

No final deste trabalho é importante referir que, futuramente, outras variáveis devem ser incluídas de forma a efetuar uma melhor e mais completa caracterização das amostras de cortiça e, conseqüentemente, permitir uma análise mais pormenorizada dos resultados. Fatores como a idade dos sobreiros e a idade dos montados podem ter influência no grau de contaminação da cortiça e não foram incluídos neste estudo. Assim, é muito importante continuar a alimentar a base de dados criada neste trabalho, aumentando o número de amostras de cortiça em estudo e o número de locais de proveniência de forma a cobrir uma maior área geográfica. Uma utilização harmonizada de todas as informações permitirá estabelecer uma relação ainda mais estreita entre o nível de contaminação e as características de origem da cortiça.

6. Bibliografia

- (1) Ditado Popular.
- (2) Coque, J. J. R., Pérez, E. R., Goswami, M., Martínez, R. F., Garvia, S. C., Rodríguez, M. L. A., and Martín, J. F. M. (2006) Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis, in *INBIOTEC, APCOR*, pp 1–66. Santa Maria de Lamas, Portugal.
- (3) Prat, C., Besalú, E., Bañeras, L., and Anticó, E. (2011) Multivariate analysis of volatile compounds detected by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography: A tool for sensory classification of cork stoppers. *Food Chem.* 126(4), 1978–1984.
- (4) APCOR. (2015) Cortiça|Cork 2015. *Anuário Cortiça 2015*.
- (5) Fortes, M. A., Rosa, M. E., and Pereira, H. (2004) A Cortiça, 2ª Edição. *Inst. Super. Técnico Press*. Lisboa.
- (6) Oliveira, M. A., and Oliveira, L. (2000) A cortiça. Ed. Corticeira Amorim, Lisboa.
- (7) <http://www.apcor.pt/montado/sobreiro/>, acedido em Novembro de 2015.
- (8) Gil, L. (1998) Cortiça - Produção, Tecnologia e Aplicação. INETI, Lisboa.
- (9) Gil, L. (2012) Cortiça, in *Ciência e Engenharia de Materiais de Construção*, pp 665–715. IST Press, Lisboa.
- (10) Silva, J. (2007) Os Montados - Muito para além das árvores. *Coleção Árvores e Florestas Port. J. Público/ Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento/ Liga para a Proteção da Nat.* 9.
- (11) Pereira, H. (2007) Cork: Biology, Production and uses, in *Cork: Biology, Production and uses*. Amsterdão.
- (12) Lumaret, R., Tryphon-Dionnet, M., Michaud, H., Sanuy, A., Ipotesi, E., Born, C., and Mir, C. (2005) Phylogeographical variation of chloroplast DNA in cork oak (*Quercus suber*). *Ann Bot* 96, 853–861.
- (13) Neto, P. (1994) Cortiça. Tecnologia Corticeira – 1º ano. *Coleção Aprendiz. Prof. Edição IEF*.
- (14) Silva, S. P., Sabino, M. A., Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., and Reis, R. L. (2005) Cork: properties, capabilities and applications. *Int. Mater. Rev.* 50, 345–365.
- (15) Carmona Belo, C., Silva Pereira, M., Moreira, A. C., Seita Coelho, I., Onofre, N., and Ambrósio Paulo, A. (2009) Montado, in *Ecossistemas e Bem-Estar Humano: Avaliação para Portugal do Millennium Ecosystem Assessment.*, pp 251–293. Escolar Editora, Lisboa.
- (16) Silva Pereira, C., Giselle, G. A., Oliveira, A. C., Emília Rosa, M., Pereira, H., Moreno, N., and Vitória San Romão, M. (2006) Effect of fungal colonization on mechanical performance of cork. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57, 244–250.
- (17) Rocha, S. (1997) Estudo da composição química, da estrutura celular e dos componentes voláteis da cortiça de *Quercus suber* L. I – Em função de ataques microbiológicos. II – Em função do processo de autoclavagem. Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Universidade de Aveiro.
- (18) Pereira, H. (1988) Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Sci. Technol.* 22, 211–218.
- (19) Neto, P. C., and Evtuguin, D. (2003) Química de Materiais Lenhocelulósicos na Universidade de Aveiro: Breve revisão de uma década de investigação. *Bol. da Soc. Port. Química* 37–46.
- (20) Conde, A. J. R. G., Cadahia, E., Garcia-Vallejo, E., and Simón, C. M. (1997) Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus suber*. *J. Agric. Food Chem.* 7, 2695–2700.
- (21) Sefton, M. A., and Simpson, R. F. (2005) Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Aust. J. Grape Wine Res* 11, 226–240.
- (22) Insa, S., Salvado, V., and Anticó, E. (2006) Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples. *J. Chromatogr. A* 1112, 215–221.

- (23) Butzke, E. C., Evans, J. T., and Ebeler, E. S. (1999) Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM. *ACS Symp. Ser 714*, 208–216.
- (24) Simpson, R. F., and Sefton, M. A. (2007) Origin and fate of 2,4,6-trichloroanisole in cork bark and wine corks. *Aust. J. Grape Wine 13*, 106–116.
- (25) Robinson, J. (2010) Southwold 2006s - overview, in *Bordeaux Vintage 2006*.
- (26) Parker, R. (2009) The Grand Garnacha Tasting, in *WineFuture Conference*.
- (27) Barker, D. A., Capone, D. L., Pollnitz, A. P., McLean, H. J., Francis, I. L., Oakey, H., and Sefton, M. A. (2001) Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment. *Aust. J. Grape Wine Res 7*, 40–46.
- (28) Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., and Labadie, D. M. (2004) Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem. 52*, 1255–1262.
- (29) Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Barker, D. A., McLean, H. J., Pollnitz, A. P., and Sefton, M. A. (1999) Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Aust. J. Grape Wine Res 5*, 91–98.
- (30) Mazzoleni, V., and Maggi, L. (2007) Effect of wine style on the perception of 2,4,6-trichloroanisole, a compound related to cork taint in wine. *Food Res. Int. 40(6)*, 694–699.
- (31) Buser, H. R., Zanier, C., and Tanner, H. (1982) Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food Chem. 30*, 359–362.
- (32) Vlachos, P., Kamppiotti, A., Kornaros, M., and Lyberatos, G. (2007) Development and evaluation of alternative processes for sterilization and deodorization of cork barks and natural cork stoppers. *Eur. Food Res. Technol. 225*, 653–663.
- (33) Mesquita, A. C., Macku, C., Gonzalez, L., Schleussner, C., Herwatt, J. W., Kirch, L. C., and Schwartz, R. J. (2009) Sensory Screening for Large-Format Natural Corks by “Dry Soak” Testing and Its Correlation to Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Releasable Trichloroanisole (TCA) Analysis. *J. Agric. Food Chem. 57*, 7962–7968.
- (34) Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., Colnec, A., and Dubourdieu, D. (2002) Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem. 50*, 3277–3282.
- (35) Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., and Dubourdieu, D. (2000) Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem. 48*, 4835–4838.
- (36) Boutou, S., and Chatonnet, P. (2007) 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. *J. Chromatogr. A 1141*, 1–9.
- (37) Capone, D. L., van Leeuwen, K. A., Pardon, K. H., Daniel, M. A., Elsey, G. M., Coulter, A. D., and Sefton, M. A. (2010) Identification and analysis of 2-chloro-6-methylphenol, 2,6-dichlorophenol and indole: Causes of taints and off-flavours in wines. *Aust. J. Grape Wine Res. 16*, 210–217.
- (38) Curtis, R., Land, D., Griffiths, M., Gee, M., Robinson, D., Peel, J., and Dennis, J. M., C. y G. (1972) 2,3,4,6-tetrachloroanisole: association with musty taint in chickens and microbiological formation. *Nature 235*: 223–224.
- (39) Griffiths, N. (1974) Sensory properties of chloroanisoles. *Chem. Sens. Flavor 1*, 187–195.
- (40) Chatonnet, P. (2004) Índole, origen y consecuencia de la presencia de anisoles en el mundo vinícola. *Fund. para la Cult. del Vino 9*–19.
- (41) Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K., and Sefton, M. A. (1996) The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Aust. J. Grape Wine Res. 2*, 184–190.

- (42) Michałowicz, J., and Duda, W. (2007) Phenols – Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* 16, 347–362.
- (43) Cserjesi, A. J., and Johnson, E. L. (1972) Methylation of Pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. *Can. J. Microbiol.* 45–49.
- (44) Gee, J. M., and Peel, J. L. (1974) Metabolism of 2,3,4,6-Tetrachlorophenol by Micro-organisms from Broiler House Litter. *J.Gen.Microbiol.* 237–243.
- (45) Neilson, A. H., Lindgren, C., Hynning, P.-Å., and Remberger, M. (1988) Methylation of Halogenated Phenols and Thiophenols by Cell Extracts of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 54, 524–530.
- (46) Prak, S., Gunata, Z., Guiraud, J. P., and Schorr-Galindo, S. (2007) Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiol.* 24, 271–280.
- (47) Coque, J. J. R., Alvarez-Rodríguez, M. L., and Larriba, G. (2003) Characterization of an inducible chlorophenol O-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of chloroanisoles and determination of its role in cork taint of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5089–5095.
- (48) Álvarez-Rodríguez, L. M., López-Ocaña, L., López-Coronado, M. J., Rodríguez, E., Martínez, J. M., Larriba, G., and Coque, R. J. (2002) Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O methylation of 2, 4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol* 68, 5860–5869.
- (49) International Organization for Standardization (ISO). (2007) ISO 20752 - Cork stoppers — Determination of releasable 2, 4, 6-trichloroanisol (TCA). Geneva, Switzerland.
- (50) Riu, M., Mestres, M., Busto, O., and Guasch, J. (2006) Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr* 1107, 240–247.
- (51) Chatonnet, P., Labadie, D., and Boutou, S. (2003) Simultaneous assay of chlorophenols and chloroanisoles in wines and corks or cork-based stoppers. Application in determining the origin of pollution in bottled wines. *OENO One* 37(3), 181–193.
- (52) Pena-Neira, A., de Simon, B., Garcia.Vallejo, M., Hernandez, T., Cadahia, E., and Suarez, J. (2000) Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food Res. Technol.* 211 (4), 257–261.
- (53) Insa, S., Anticó, E., and Ferreira, V. (2005) Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines. *J. Chromatogr (1-2)*, 235–242.
- (54) Sanvicens, N., Moore, E., Guilbaullt, G., and Marco, M. (2006) Determination of haloanisols in white wine by immunosorbent solid-phase extraction followed by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem* 54, 9176–9183.
- (55) Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T., and Goldberg, D. M. (2002) Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.* 50(5), 1032–39.
- (56) Zalacain, A., Alonso, G. L., Lorenzo, C., Iñiguez, M., and Salinas, M. R. (2004) Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *J. Chromatogr. A* 1033, 173–178.
- (57) Carasek, E., Cudjoe, E., and Pawliszyn, J. (2007) Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled solid-phase microextraction fiber. *J. Chromatogr. A* 1138 (1-2), 10.
- (58) Callejon, R. M., Trancoso, A. M., and Morales, M. L. (2007) Analysis for chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 71, 2092–2097.

- (59) Boudaoud, N., and Eveleigh, L. (2003) A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers. *J. Agric. Food Chem.* 51 6, 1530–1533.
- (60) Gomez-Ariza, J., Garcia-Barrera, T., Lorenzo, F., and Beltran, R. (2006) Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine. *J. Chromatogr. A* 1112 (1-2), 133.
- (61) Martínez-Uruñuela, A., Rodríguez, I., Cela, R., González-Sáiz, J. M., and Pizarro, C. (2005) Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 549, 117–123.
- (62) Insa, S., Salvadó, V., and Anticó, E. (2004) Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples. *J. Chromatogr. A* 1047, 15–20.
- (63) Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., and Pizarro, C. (2005) Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation: Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine. *J. Chromatogr. A* 1089, 31–38.
- (64) Insa, S., Besalú, E., Salvadó, V., and Anticó, E. (2007) Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines. *J. Sep. Sci.* 30, 722–730.
- (65) Özhan, D., Anli, R. E., Vural, N., and Bayram, M. (2009) Determination of Chloroanisoles and Chlorophenols in Cork and Wine by using HS-SPME and GC-ECD Detection. *J. Inst. Brew.* 115, 71–77.
- (66) Limam, I., Guenne, A., Driss, M. R., and Mazeas, L. (2010) Simultaneous determination of phenol, methylphenols, chlorophenols and bisphenol-A by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry in water samples and industrial effluents. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 230–244.
- (67) Kawaguchi, M., Ishii, Y., Sakui, N., Ito, R., Inoue, K., Saito, K., and Nakazawa, H. (2004) Trace analysis of chlorophenols in river water samples by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Organohalogen Compd.* 66, 179–183.
- (68) Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P., and Hernández-Cerdoba, M. (2014) Stir bar sorptive extraction polar coatings for the determination of chlorophenols and chloroanisoles in wines using gas chromatography and mass spectrometry. *Talanta* 118, 30–36.
- (69) Arthur, C. L., and Pawliszyn, J. (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145–2148.
- (70) Pawliszyn, J. (1999) Applications of Solid Phase Microextraction. *R. Soc. Chem. Cambridge.*
- (71) Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., and Nogueira, J. M. F. (2004) Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. *Dep. Química e Bioquímica e Cent. Ciências Mol. e Mater. FCUL* 69–77.
- (72) Pawliszyn, J. (1997) Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. *Wiley-VCH, New York.*
- (73) <http://www.labsphere.biz/ctc-combipal.php>, accedido em Junho de 2016.
- (74) Kataoka, H., Lord, H. L., and Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 880, 35–62.
- (75) Lord, H., and Pawliszyn, J. (2000) Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A.*
- (76) Shirey, R. (2000) Optimization of Extraction Conditions and Fiber Selection for Semivolatile Analytes Using Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 38, 279–288.
- (77) Alpendurada, M. F. (2000) Solid-phase microextraction: A promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 889, 3–14.

- (78) Pawliszyn, J. (2000) Theory of Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 38, 270–278.
- (79) Górecki, T., Yu, X., and Pawliszyn, J. (1999) Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst* 124, 643–649.
- (80) Rocha, S. M., Coutinho, P., Barros, A., Delgadillo, I., and Coimbra, M. A. (2006) Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. *J. Chromatogr. A* 1114, 188–197.
- (81) Zhang, Z., and Pawliszyn, J. (1999) Headspace solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 65, 1843–1852.
- (82) Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., and Pizarro, C. (2004) Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A* 1056, 49–56.
- (83) Rocha, S., Ramalheira, V., Barros, A., Delgadillo, I., and Coimbra, M. A. (2001) Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5142–5151.
- (84) Jia, M., Zhang, Q. H., and Min, D. B. (1998) Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.* 8561, 2744–2747.
- (85) Gruzdev, I. V., Zenkevich, I. G., and Kondratenok, B. M. (2015) Derivatization in gas chromatographic determination of phenol and aniline traces in aqueous media. *Russ. Chem. Rev.* 84, 653–664.
- (86) Kitson, F. G., Larsen, B. S., and McEwen, C. N. (1996) Gas chromatography and Mass spectrometry – A practical guide, Capítulos 1 e 3.
- (87) Agilent. (2009) Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System - Concepts Guide. Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA.
- (88) https://www.researchgate.net/figure/280931991_fig4_Fig-4-Experimental-setup-for-GCMS, acedido em Julho de 2016.
- (89) Relacre. (2000) Guia Relacre 13, Validação de métodos internos de ensaio em análise química. *Assoc. Laboratórios Acreditados Port.* 1–30.
- (90) Walsh, M. C. (1999) Moving from official to traceable methods. *Trends Anal. Chem.* 18, 616–623.
- (91) González, A. G., and Herrador, M. A. (2007) A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends Anal. Chem.* 26, 227–238.
- (92) Van Zoonen, P., Hoogerbrugge, R., Gort, S. M., Van De Wiel, H. J., and Van't Klooster, H. A. (1999) Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *Trends Anal. Chem.* 18, 584–593.
- (93) Feinberg, M. (2007) Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J. Chromatogr. A* 1158, 174–183.
- (94) Taverniers, I., De Loose, M., and Van Bockstaele, E. (2004) Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* 23, 535–552.
- (95) Wood, R. (1999) How to validate analytical methods. *Trends Anal. Chem.* 18, 624–632.
- (96) Araujo, P. (2009) Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 2224–2234.
- (97) International Organization for Standardization (ISO). (1990) ISO 8466-1. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- (98) International Organization for Standardization (ISO). (1994) ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement method and results. Part 1. General principles and definition. Geneva, Switzerland.

(99) International Organization for Standardization (ISO). (1994) ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland.

(100) International Organization for Standardization (ISO). (1994) ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. Geneva, Switzerland.

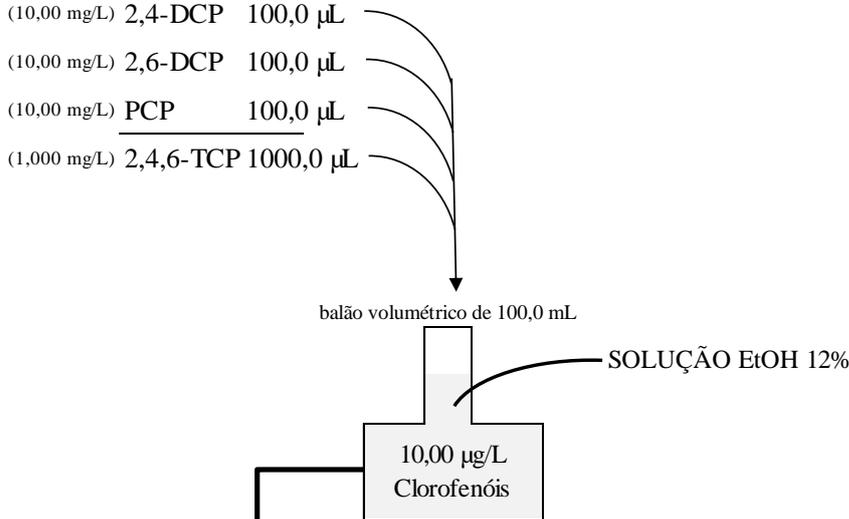
(101) Malheiro, A. I. R. (2010) Análise de cloroanisóis e clorofenóis em solos de montado de sobro com vista à avaliação do risco de contaminação da cortiça com 2,4,6-Tricloroanisol. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

(102) Marques, J. I. F. (2009) Desenvolvimento de um método para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo Tese de. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

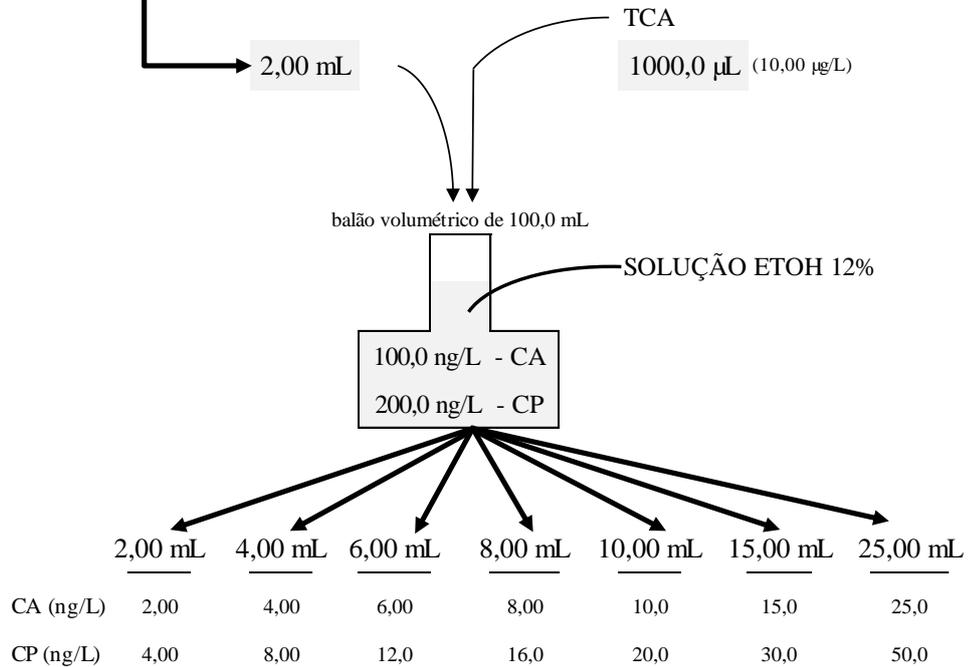
7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Preparação dos padrões da curva de calibração

Preparação da solução-mãe de clorofenóis:



Preparação da curva de calibração:



7.2. Anexo 2 – Gama de trabalho e repetibilidade

Tabela 17 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto TCA: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
2,00	2,07	10823	398960	0,027
	2,07	10818	399126	0,027
	2,15	10632	378354	0,028
	2,05	10179	378718	0,027
	2,04	10809	404602	0,027
	2,11	11451	415245	0,028
	2,06	11167	414725	0,027
	2,08	10706	394132	0,027
	2,08	11361	417867	0,027
	2,09	11360	415319	0,027
Média	2,08			
DP	0,0318			
VAR	0,00101			
CV	1,53%			
<i>r</i>	0,0890			

Tabela 18 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o composto TCA: padrão 7 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
25,0	24,9	131513	424077	0,310
	25,0	116872	375172	0,312
	24,9	120568	388749	0,310
	24,9	125276	403654	0,310
	24,9	128669	414493	0,310
	24,8	127035	409913	0,310
	24,8	116076	375031	0,310
	24,9	128968	415328	0,311
	24,9	117202	377867	0,310
	24,9	123322	396442	0,311
Média	24,9			
DP	0,0460			
VAR	0,00212			
CV	0,185%			
PG	2,095			

Tabela 19 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o compósito 2,4-DCP: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 - DCP)}{A(PI)}$
4,00	4,06	15588	398960	0,039
	4,42	16551	399126	0,041
	4,03	14704	378354	0,039
	3,94	14489	378718	0,038
	3,94	15477	404602	0,038
	3,91	15803	415245	0,038
	3,72	15242	414725	0,037
	3,92	15014	394132	0,038
	4,19	16674	417867	0,040
	3,69	15191	415319	0,037
Média	3,98			
DP	0,213			
VAR	0,0453			
CV	5,34%			
r	0,596			

Tabela 20 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o compósito 2,4-DCP: padrão 7 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 - DCP)}{A(PI)}$
50,0	50,0	147544	424077	0,348
	49,9	130420	375172	0,348
	49,5	134062	388749	0,345
	50,0	140550	403654	0,348
	49,8	143877	414493	0,347
	48,8	139363	409913	0,340
	49,8	130179	375031	0,347
	50,0	144601	415328	0,348
	49,9	131272	377867	0,347
	49,9	137847	396442	0,348
Média	49,8			
DP	0,374			
VAR	0,140			
CV	0,752%			
PG	3,089			

Tabela 21 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o 2,6-DCP: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6 - DCP)}{A(PI)}$
4,00	4,33	12895	398960	0,032
	3,98	11931	399126	0,030
	4,66	13079	378354	0,035
	4,39	12395	378718	0,033
	4,15	12558	404602	0,031
	4,55	14042	415245	0,034
	3,98	12392	414725	0,030
	4,41	12935	394132	0,033
	4,01	12565	417867	0,030
	3,79	11869	415319	0,029
Média	4,23			
DP	0,284			
VAR	0,0805			
CV	6,71%			
<i>r</i>	0,794			

Tabela 22 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o 2,6-DCP: padrão 7 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6 - DCP)}{A(PI)}$
50,0	50,2	148139	424077	0,349
	50,2	131110	375172	0,349
	49,9	135217	388749	0,348
	51,1	143612	403654	0,356
	50,2	144798	414493	0,349
	50,2	143193	409913	0,349
	50,5	131960	375031	0,352
	50,2	145152	415328	0,349
	51,3	134908	377867	0,357
	51,1	141153	396442	0,356
Média	50,5			
DP	0,495			
VAR	0,245			
CV	0,980%			
PG	3,044			

Tabela 23 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o TCP: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,4,6-TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
4,00	3,86	67896	398960	0,170
	4,15	70434	399126	0,176
	4,17	66954	378354	0,177
	4,33	68314	378718	0,180
	4,22	72048	404602	0,178
	4,64	77663	415245	0,187
	3,82	70265	414725	0,169
	3,98	68129	394132	0,173
	4,28	74913	417867	0,179
	4,75	78749	415319	0,190
Média	4,22			
DP	0,304			
VAR	0,0922			
CV	7,20%			
<i>r</i>	0,850			

Tabela 24 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o TCP: padrão 7 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[2,4,6-TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
50,0	47,5	472406	424077	1,114
	46,4	409168	375172	1,091
	46,6	425455	388749	1,094
	46,1	437180	403654	1,083
	47,6	462597	414493	1,116
	46,5	447984	409913	1,093
	47,5	417527	375031	1,113
	48,0	466911	415328	1,124
	47,8	423461	377867	1,121
	47,5	442010	396442	1,115
Média	47,1			
DP	0,674			
VAR	0,454			
CV	1,43%			
PG	4,926			

Tabela 25 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o PCP: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
4,00	4,16	1552	398960	0,004
	4,09	1529	399126	0,004
	3,70	1318	378354	0,003
	4,50	1586	378718	0,004
	3,72	1418	404602	0,004
	3,43	1348	415245	0,003
	3,41	1339	414725	0,003
	4,01	1480	394132	0,004
	3,73	1467	417867	0,004
	3,86	1506	415319	0,004
Média	3,86			
DP	0,336			
VAR	0,113			
CV	8,71%			
<i>r</i>	0,942			

Tabela 26 - Resultados da gama de trabalho e repetibilidade para o PCP: padrão 1 da curva de calibração.

Concentração teórica (ng/L)	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
50,00	43,9	16526	424077	0,039
	44,3	14773	375172	0,039
	43,1	14881	388749	0,038
	42,1	15106	403654	0,037
	42,5	15640	414493	0,038
	42,6	15508	409913	0,038
	43,7	14553	375031	0,039
	42,7	15742	415328	0,038
	42,9	14384	377867	0,038
	43,4	15283	396442	0,039
Média	43,1			
DP	0,701			
VAR	0,491			
CV	1,63%			
PG	4,338			

7.3. Anexo 3 – Precisão intermédia

Tabela 27 - Resultados da precisão intermédia para o TCA.

Analista	Dia	Concentração teórica (ng/L)	[TCA] (ng/L)	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
A	1	4,00	3,94	24550	487717	0,050
A	1		4,02	24096	469329	0,051
A	1		4,11	23331	445389	0,052
A	1		4,24	23302	431471	0,054
A	1		4,27	23425	430238	0,054
A	2		4,23	20958	388491	0,054
A	2		4,10	22737	435019	0,052
A	2		4,28	24678	452206	0,055
A	2		4,25	23913	441520	0,054
A	2		4,39	24454	437131	0,056
A	3		4,31	24752	451065	0,055
A	3		4,29	22834	417685	0,055
A	3		4,17	22131	416569	0,053
A	3		4,29	23624	431961	0,055
A	3		4,26	24152	444518	0,054
B	1		4,16	23189	437534	0,053
B	1		4,25	22891	423018	0,054
B	1		4,11	22457	428933	0,052
B	1		4,12	23131	439895	0,053
B	1		4,05	23690	458991	0,052
B	2		4,06	22754	439501	0,052
B	2		4,26	24527	451745	0,054
B	2		4,21	23070	429657	0,054
B	2		4,30	22585	412141	0,055
B	2		4,26	24845	458039	0,054
B	3		4,16	24164	455370	0,053
B	3		4,38	24431	437919	0,056
B	3		4,41	24428	434875	0,056
B	3		4,18	23282	436725	0,053
B	3		3,90	23376	469798	0,050
		Média	4,20			
		DP	0,126			
		CV	2,99%			

Tabela 28 - Resultados da precisão intermédia para o 2,4-DCP.

Analista	Dia	Concentração teórica (ng/L)	[2,4-DCP] (ng/L)	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4-DCP)}{A(PI)}$
A	1	8,00	7,95	31809	487717	0,065
A	1		7,79	30090	469329	0,064
A	1		7,89	28879	445389	0,065
A	1		8,09	28531	431471	0,066
A	1		8,26	28961	430238	0,067
A	2		8,23	26061	388491	0,067
A	2		8,39	29645	435019	0,068
A	2		7,97	29554	452206	0,065
A	2		8,08	29191	441520	0,066
A	2		7,73	27846	437131	0,064
A	3		7,98	29509	451065	0,065
A	3		8,18	27885	417685	0,067
A	3		7,96	27187	416569	0,065
A	3		8,06	28480	431961	0,066
A	3		7,95	28983	444518	0,065
B	1		8,11	29013	437534	0,066
B	1		7,83	27233	423018	0,064
B	1		7,66	27127	428933	0,063
B	1		7,48	27299	439895	0,062
B	1		7,92	29847	458991	0,065
B	2	8,02	28860	439501	0,066	
B	2	10,1	35937	451745	0,080	
B	2	7,83	27685	429657	0,064	
B	2	7,99	26994	412141	0,065	
B	2	6,94	26752	458039	0,058	
B	3	7,73	29028	455370	0,064	
B	3	8,21	29312	437919	0,067	
B	3	8,24	29208	434875	0,067	
B	3	7,19	26247	436725	0,060	
B	3	7,47	29113	469798	0,062	
		Média	7,97			
		DP	0,508			
		CV	6,37%			

Tabela 29 - Resultados da precisão intermédia para o 2,6-DCP.

Analista	Dia	Concentração teórica (ng/L)	[2,6-DCP] (ng/L)	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6 - DCP)}{A(PI)}$
A	1	8,00	7,89	27775	487717	0,057
A	1		8,04	27186	469329	0,058
A	1		8,73	27943	445389	0,063
A	1		8,94	27696	431471	0,064
A	1		8,47	26200	430238	0,061
A	2		9,27	25828	388491	0,066
A	2		8,86	27670	435019	0,064
A	2		8,26	26899	452206	0,059
A	2		8,55	27160	441520	0,062
A	2		8,68	27258	437131	0,062
A	3		8,17	26543	451065	0,059
A	3		7,96	23977	417685	0,057
A	3		8,58	25689	416569	0,062
A	3		8,50	26402	431961	0,061
A	3		8,85	28255	444518	0,064
B	1		7,92	24988	437534	0,057
B	1		8,66	26339	423018	0,062
B	1		8,41	25971	428933	0,061
B	1		8,31	26308	439895	0,060
B	1		8,45	27907	458991	0,061
B	2		8,22	26019	439501	0,059
B	2		8,08	26304	451745	0,058
B	2		8,07	24993	429657	0,058
B	2		8,92	26397	412141	0,064
B	2		7,97	26316	458039	0,057
B	3		7,99	26219	455370	0,058
B	3		8,68	27304	437919	0,062
B	3		8,57	26794	434875	0,062
B	3		8,42	26469	436725	0,061
B	3		7,86	26630	469798	0,057
		Média	8,41			
		DP	0,370			
		CV	4,39%			

Tabela 30 - Resultados da precisão intermédia para o TCP.

Analista	Dia	Concentração teórica (ng/L)	[TCP] (ng/L)	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
A	1	8,00	7,51	121595	487717	0,249
A	1		7,44	116243	469329	0,248
A	1		8,02	115865	445389	0,260
A	1		7,76	109845	431471	0,255
A	1		7,85	110412	430238	0,257
A	2		8,08	101584	388491	0,261
A	2		7,52	108488	435019	0,249
A	2		8,29	120360	452206	0,266
A	2		7,51	109985	441520	0,249
A	2		7,75	111161	437131	0,254
A	3		8,16	118783	451065	0,263
A	3		7,99	108453	417685	0,260
A	3		8,10	109111	416569	0,262
A	3		7,53	107811	431961	0,250
A	3		8,08	116214	444518	0,261
B	1		7,95	113244	437534	0,259
B	1		7,93	109247	423018	0,258
B	1		7,50	106759	428933	0,249
B	1		7,34	108001	439895	0,246
B	1		7,82	117419	458991	0,256
B	2		7,86	112860	439501	0,257
B	2		7,79	115292	451745	0,255
B	2		7,38	105909	429657	0,246
B	2		7,96	106713	412141	0,259
B	2		7,44	113431	458039	0,248
B	3		7,24	110865	455370	0,243
B	3		7,80	111842	437919	0,255
B	3		8,06	113571	434875	0,261
B	3		7,60	109668	436725	0,251
B	3		7,39	115905	469798	0,247
		Média	7,75			
		DP	0,285			
		CV	3,68%			

Tabela 31 - Resultados da precisão intermédia para o PCP.

Analista	Dia	Concentração teórica (ng/L)	[PCP] (ng/L)	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
A	1	8,00	8,48	3757	487717	0,008
A	1		8,56	3649	469329	0,008
A	1		8,59	3473	445389	0,008
A	1		7,67	3017	431471	0,007
A	1		8,90	3475	430238	0,008
A	2		9,53	3355	388491	0,009
A	2		7,84	3106	435019	0,007
A	2		8,51	3496	452206	0,008
A	2		7,70	3099	441520	0,007
A	2		8,17	3249	437131	0,007
A	3		7,83	3215	451065	0,007
A	3		8,29	3148	417685	0,008
A	3		7,70	2922	416569	0,007
A	3		7,83	3081	431961	0,007
A	3		8,08	3267	444518	0,007
B	1		7,72	3079	437534	0,007
B	1		8,42	3236	423018	0,008
B	1		7,61	2977	428933	0,007
B	1		7,52	3016	439895	0,007
B	1		8,05	3361	458991	0,007
B	2		7,96	3183	439501	0,007
B	2		7,58	3122	451745	0,007
B	2		7,19	2819	429657	0,007
B	2		7,87	2953	412141	0,007
B	2		7,46	3115	458039	0,007
B	3		6,91	2877	455370	0,006
B	3		6,57	2635	437919	0,006
B	3		7,35	2917	434875	0,007
B	3		7,02	2801	436725	0,006
B	3		6,76	2905	469798	0,006
		Média	7,86			
		DP	0,647			
		CV	8,23%			

7.4. Anexo 4 – Exatidão

Tabela 32 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCA (fortificação com 2,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[TCA] (ng/L)	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
Não fortificada	2,00	--	2,07	10823	398960	0,027
1		101%	4,09	24752	474272	0,052
2		92,7%	3,93	23672	471938	0,050
3		104%	4,16	25287	476565	0,053
4		108%	4,23	26173	485161	0,054
5		103%	4,14	24639	466505	0,053
6		111%	4,29	24884	455501	0,055
7		104%	4,15	24022	453852	0,053
8		109%	4,25	24369	449634	0,054
9		95,3%	3,98	23891	470186	0,051
10		109%	4,25	25042	462856	0,054
	Média	104%				
	DP	5,94%				
	CV	5,73%				

Tabela 33 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCA (fortificação com 4,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[TCA] (ng/L)	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
Não fortificada	4,00	--	2,07	10823	398960	0,027
1		113%	6,60	37271	447511	0,083
2		112%	6,54	35518	430261	0,083
3		102%	6,15	27243	350462	0,078
4		113%	6,59	36450	437895	0,083
5		100%	6,08	34409	447802	0,077
6		113%	6,58	36025	433266	0,083
7		114%	6,64	36480	435384	0,084
8		104%	6,24	33582	426096	0,079
9		111%	6,50	36933	449860	0,082
10		112%	6,55	36952	446446	0,083
	Média	109%				
	DP	5,21%				
	CV	4,77%				

Tabela 34 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,4-DCP (fortificação com 2,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[2,4-DCP] (ng/L)	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4-DCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	2,00	--	4,06	15588	398960	0,039
1		96,7%	6,00	24702	474272	0,052
2		86,0%	5,78	23902	471938	0,051
3		104%	6,15	25296	476565	0,053
4		91,2%	5,89	24913	485161	0,051
5		97,2%	6,01	24326	466505	0,052
6		95,2%	5,97	23630	455501	0,052
7		89,8%	5,86	23215	453852	0,051
8		88,4%	5,83	22919	449634	0,051
9		95,6%	5,98	24419	470186	0,052
10		82,1%	5,71	23198	462856	0,050
Média		92,6%				
DP		6,38%				
CV		6,89%				

Tabela 35 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,4-DCP (fortificação com 4,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[2,4-DCP] (ng/L)	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4-DCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	4,00	--	4,06	15588	398960	0,039
1		80,1%	7,27	27127	447511	0,061
2		83,6%	7,41	26489	430261	0,062
3		92,6%	7,77	22426	350462	0,064
4		80,4%	7,28	26581	437895	0,061
5		87,4%	7,56	28032	447802	0,063
6		71,6%	6,93	25281	433266	0,058
7		89,7%	7,65	27524	435384	0,063
8		83,6%	7,41	26235	426096	0,062
9		84,3%	7,44	27783	449860	0,062
10		81,5%	7,33	27238	446446	0,061
Média		83,5%				
DP		5,81%				
CV		6,96%				

Tabela 36 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,6-DCP (fortificação com 2,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[2,6-DCP] (ng/L)	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6 - DCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	2,00	--	4,33	12895	398960	0,032
1		84,1%	6,02	20849	474272	0,044
2		80,5%	5,94	20509	471938	0,043
3		79,9%	5,93	20674	476565	0,043
4		78,5%	5,91	20953	485161	0,043
5		81,1%	5,96	20315	466505	0,044
6		88,5%	6,10	20299	455501	0,045
7		78,0%	5,89	19568	453852	0,043
8		78,2%	5,90	19396	449634	0,043
9		85,6%	6,05	20763	470186	0,044
10		84,2%	6,02	20351	462856	0,044
Média		81,9%				
DP		3,55%				
CV		4,34%				

Tabela 37 - Resultados dos ensaios de recuperação para o 2,6-DCP (fortificação com 4,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[2,6-DCP] (ng/L)	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6 - DCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	4,00	--	4,33	12895	398960	0,032
1		87,6%	7,84	25312	447511	0,057
2		98,8%	8,29	25668	430261	0,060
3		104%	8,48	21379	350462	0,061
4		108%	8,65	27221	437895	0,062
5		94,9%	8,13	26239	447802	0,059
6		102%	8,40	26200	433266	0,060
7		98,1%	8,26	25897	435384	0,059
8		97,4%	8,23	25262	426096	0,059
9		87,8%	7,85	25475	449860	0,057
10		97,5%	8,23	26471	446446	0,059
Média		97,5%				
DP		6,35%				
CV		6,51%				

Tabela 38 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCP (fortificação com 2,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[TCP] (ng/L)	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	2,00	--	4,12	70204	398960	0,176
1		91,4%	5,95	102203	474272	0,215
2		76,6%	5,66	98694	471938	0,209
3		86,8%	5,86	101747	476565	0,214
4		83,8%	5,80	102960	485161	0,212
5		98,0%	6,08	101872	466505	0,218
6		96,5%	6,05	99165	455501	0,218
7		80,1%	5,73	95583	453852	0,211
8		84,2%	5,81	95494	449634	0,212
9		83,9%	5,80	99802	470186	0,212
10	96,1%	6,05	100688	462856	0,218	
Média		87,7%				
DP		7,39%				
CV		8,42%				

Tabela 39 - Resultados dos ensaios de recuperação para o TCP (fortificação com 4,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[TCP] (ng/L)	A (2,4,6-TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	4,00	--	4,12	70204	398960	0,176
1		83,6%	7,47	111102	447511	0,248
2		75,3%	7,14	103741	430261	0,241
3		92,4%	7,82	89691	350462	0,256
4		86,9%	7,60	109983	437895	0,251
5		79,6%	7,31	109657	447802	0,245
6		85,0%	7,52	108103	433266	0,250
7		90,9%	7,76	110846	435384	0,255
8		85,0%	7,53	106330	426096	0,250
9		87,5%	7,63	113234	449860	0,252
10	82,0%	7,40	110243	446446	0,247	
Média		84,8%				
DP		5,09%				
CV		6,00%				

Tabela 40 - Resultados dos ensaios de recuperação para o PCP (fortificação com 2,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[PCP] (ng/L)	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
Não fortificada	2,00	--	4,14	1546	398960	0,004
1		96,7%	6,08	2648	474272	0,006
2		92,9%	6,00	2603	471938	0,006
3		93,4%	6,01	2633	476565	0,006
4		97,8%	6,10	2718	485161	0,006
5		94,2%	6,03	2584	466505	0,006
6		93,8%	6,02	2520	455501	0,006
7		90,6%	5,96	2485	453852	0,005
8		90,2%	5,95	2459	449634	0,005
9		94,8%	6,04	2609	470186	0,006
10	67,6%	5,50	2346	462856	0,005	
Média		91,2%				
DP		8,63%				
CV		9,46%				

Tabela 41 - Resultados dos ensaios de recuperação para o PCP (fortificação com 4,00 ng/L).

Amostra	Fortificação (ng/L)	% Recuperação	[PCP] (ng/L)	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$	
Não fortificada	4,00	--	4,14	1546	398960	0,004	
1		88,9%	7,70	3139	447511	0,007	
2		93,3%	7,88	3086	430261	0,007	
3					ERRO		
4		91,2%	7,79	3107	437895	0,007	
5		85,1%	7,55	3082	447802	0,007	
6		90,2%	7,75	3060	433266	0,007	
7		95,8%	7,97	3160	435384	0,007	
8		85,2%	7,55	2933	426096	0,007	
9		86,8%	7,62	3123	449860	0,007	
10	75,3%	7,15	2917	446446	0,007		
Média		88,0%					
DP		5,96%					
CV		6,78%					

7.5. Anexo 5 – Robustez

Tabela 42 - Resultados da robustez para o TCA – Ensaio A a E.

Ensaio	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
A Ref.	3,72	29226	615113	0,048
	4,03	27533	534949	0,051
	4,02	26328	512708	0,051
	4,04	27339	530091	0,052
	4,21	26712	497895	0,054
	4,09	25841	495337	0,052
	3,76	24671	513759	0,048
	3,94	25738	511415	0,050
	4,01	26461	517279	0,051
	4,03	26799	521517	0,051
Média	3,99			
DP	0,148			
CV	3,72%			

Ensaio	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
B	4,06	26514	512227	0,052
	4,07	25368	489254	0,052
	3,85	25191	512250	0,049
	3,95	25041	497007	0,050
	3,87	24621	498200	0,049
	4,10	27319	522727	0,052
	4,08	27207	522309	0,052
	3,99	26028	510858	0,051
	3,79	25707	530760	0,048
	3,97	21603	426522	0,051
Média	3,97			
DP	0,108			
CV	2,71%			

Ensaio	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
C	4,00	27327	535789	0,051
	3,98	26482	521018	0,051
	4,04	26978	522836	0,052
	4,13	25848	490462	0,053
	4,03	24128	468915	0,051
	4,13	24817	471744	0,053
	4,06	25394	490619	0,052
	4,04	24384	473092	0,052
	3,89	22256	447635	0,050
	4,06	26170	505340	0,052
Média	4,04			
DP	0,0695			
CV	1,72%			

Ensaio	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
D	3,62	26213	565720	0,046
	4,03	25953	504428	0,051
	4,00	24216	474894	0,051
	4,10	25383	485447	0,052
	4,01	25733	502875	0,051
	4,00	23498	460104	0,051
	4,11	25134	479408	0,052
	3,95	24176	479616	0,050
	4,00	26685	523042	0,051
	4,08	18970	364683	0,052
Média	3,99			
DP	0,139			
CV	3,50%			

Ensaio	[TCA]	A (TCA)	A (PI)	$\frac{A(TCA)}{A(PI)}$
E	3,97	27083	534458	0,051
	3,89	24719	497185	0,050
	4,05	27261	527747	0,052
	4,00	25164	492702	0,051
	3,97	26100	514525	0,051
	4,04	26485	513378	0,052
	3,97	25220	498157	0,051
	3,89	25361	511008	0,050
	4,06	26340	508967	0,052
	3,95	24184	479153	0,050
Média	3,98			
DP	0,602			
CV	1,51%			

Tabela 43 - Resultados da robustez para o 2,4-DCP – Ensaio A a E.

Ensaio	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 DCP)}{A(PI)}$
A Ref.	7,55	38445	615113	0,063
	8,22	35857	534949	0,067
	8,19	34265	512708	0,067
	8,28	35748	530091	0,067
	7,91	32339	497895	0,065
	7,49	30769	495337	0,062
	7,49	31907	513759	0,062
	7,11	30469	511415	0,060
	7,55	32338	517279	0,063
	7,82	33564	521517	0,064
Média	7,76			
DP	0,387			
CV	4,99%			

Ensaio	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 DCP)}{A(PI)}$
B	7,20	30830	512227	0,060
	7,78	31340	489254	0,064
	7,22	30905	512250	0,060
	7,17	29818	497007	0,060
	7,58	31244	498200	0,063
	7,08	31016	522727	0,059
	7,92	33956	522309	0,065
	7,30	31067	510858	0,061
	7,07	31487	530760	0,059
	8,33	28909	426522	0,068
	Média	7,47		
DP	0,423			
CV	5,67%			

Ensaio	[2,4-DCP]	A 2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 DCP)}{A(PI)}$
C	7,02	31600	535789	0,059
	7,09	30980	521018	0,059
	7,05	30931	522836	0,059
	7,98	32098	490462	0,065
	8,13	31150	468915	0,066
	7,86	30492	471744	0,065
	7,30	29836	490619	0,061
	7,38	29023	473092	0,061
	7,54	27944	447635	0,062
	7,19	30363	505340	0,060
	Média	7,45		
DP	0,407			
CV	5,47%			

Ensaio	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A PI)	$\frac{A(2,4 DCP)}{A(PI)}$
D	6,53	31488	565720	0,056
	8,00	33062	504428	0,066
	7,55	29707	474894	0,063
	7,90	31485	485447	0,065
	7,21	30294	502875	0,060
	8,04	30270	460104	0,066
	7,44	29623	479408	0,062
	7,37	29392	479616	0,061
	7,10	31119	523042	0,059
	8,11	24184	364683	0,066
	Média	7,52		
DP	0,502			
CV	6,68%			

Ensaio	[2,4-DCP]	A (2,4-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,4 DCP)}{A(PI)}$
E	7,53	33338	534458	0,062
	7,60	31243	497185	0,063
	7,38	32386	527747	0,061
	7,59	30927	492702	0,063
	7,83	33130	514525	0,064
	7,52	32003	513378	0,062
	7,77	31897	498157	0,064
	7,48	31708	511008	0,062
	7,45	31464	508967	0,062
	7,74	30580	479153	0,064
	Média	7,59		
DP	0,149			
CV	1,96%			

Tabela 44 - Resultados da robustez para o 2,6-DCP – Ensaio A a E.

Ensaio	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6\ DCP)}{A(PI)}$
A Ref.	7,19	32016	615113	0,052
	7,80	30107	534949	0,056
	8,50	31336	512708	0,061
	7,89	30181	530091	0,057
	8,12	29139	497895	0,059
	8,46	30146	495337	0,061
	7,27	27040	513759	0,053
	7,87	29038	511415	0,057
	8,04	29968	517279	0,058
	8,17	30698	521517	0,059
Média	7,93			
D.P.	0,437			
C.V.	5,51%			

Ensaio	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6\ DCP)}{A(PI)}$
B	7,51	27812	512227	0,054
	8,23	29004	489254	0,059
	8,00	29555	512250	0,058
	7,70	27647	497007	0,056
	8,08	29009	498200	0,058
	7,92	29869	522727	0,057
	8,12	30547	522309	0,058
	8,17	30070	510858	0,059
	7,82	29947	530760	0,056
	9,68	29569	426522	0,069
Média	8,12			
DP	0,592			
CV	7,28%			

Ensaio	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6\ DCP)}{A(PI)}$
C	7,14	27706	535789	0,052
	7,81	29370	521018	0,056
	7,41	28012	522836	0,054
	8,30	29300	490462	0,060
	8,84	29762	468915	0,063
	8,26	28042	471744	0,059
	8,04	28444	490619	0,058
	8,78	29838	473092	0,063
	8,63	27773	447635	0,062
	8,24	30001	505340	0,059
Média	8,14			
DP	0,562			
CV	6,90%			

Ensaio	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6\ DCP)}{A(PI)}$
D	6,62	27228	565720	0,048
	7,84	28526	504428	0,057
	8,05	27548	474894	0,058
	8,04	28138	485447	0,058
	7,92	28720	502875	0,057
	8,52	28201	460104	0,061
	8,04	27789	479408	0,058
	8,44	29123	479616	0,061
	7,82	29506	523042	0,056
	9,06	23709	364683	0,065
Média	8,03			
DP	0,629			
CV	7,82%			

Ensaio	[2,6-DCP]	A (2,6-DCP)	A (PI)	$\frac{A(2,6\ DCP)}{A(PI)}$
E	7,56	29194	534458	0,055
	7,67	27531	497185	0,055
	7,39	28209	527747	0,053
	7,97	28327	492702	0,057
	7,97	29568	514525	0,057
	7,76	28760	513378	0,056
	8,05	28898	498157	0,058
	8,02	29562	511008	0,058
	7,82	28718	508967	0,056
	8,15	28128	479153	0,059
Média	7,84			
DP	0,242			
CV	3,09%			

Tabela 45 - Resultados da robustez para o TCP – Ensaio A a E.

Ensaio	[TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
A Ref.	7,15	148564	615113	0,242
	7,93	138207	534949	0,258
	8,08	134065	512708	0,261
	7,81	135503	530091	0,256
	7,67	125755	497895	0,253
	7,87	127298	495337	0,257
	6,88	121018	513759	0,236
	7,79	130543	511415	0,255
	7,34	127025	517279	0,246
8,11	136737	521517	0,262	
Média	7,66			
DP	0,408			
CV	5,33%			

Ensaio	[TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
B	7,70	129781	512227	0,253
	7,27	119426	489254	0,244
	7,50	127594	512250	0,249
	7,90	128017	497007	0,258
	7,38	122736	498200	0,246
	7,70	132468	522727	0,253
	7,38	128747	522309	0,246
	8,64	139781	510858	0,274
	6,39	119456	530760	0,225
	8,26	113254	426522	0,266
Média	7,61			
DP	0,605			
CV	7,95%			

Ensaio	[TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
C	6,83	125654	535789	0,235
	7,32	127703	521018	0,245
	6,95	123915	522836	0,237
	8,10	128454	490462	0,262
	7,46	116363	468915	0,248
	7,25	114906	471744	0,244
	6,78	114497	490619	0,233
	8,08	123774	473092	0,262
	7,96	115900	447635	0,259
	7,26	123177	505340	0,244
Média	7,40			
DP	0,498			
CV	6,74%			

Ensaio	[TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
D	5,96	122041	565720	0,216
	7,37	124213	504428	0,246
	7,77	120977	474894	0,255
	7,40	119772	485447	0,247
	7,01	119924	502875	0,238
	7,73	116892	460104	0,254
	7,27	116988	479408	0,244
	7,38	118169	479616	0,246
	6,65	120626	523042	0,231
	8,36	97617	364683	0,268
Média	7,29			
DP	0,654			
CV	8,97%			

Ensaio	[TCP]	A (TCP)	A (PI)	$\frac{A(TCP)}{A(PI)}$
E	6,68	123653	534458	0,231
	6,80	116269	497185	0,234
	6,94	125030	527747	0,237
	6,52	112265	492702	0,228
	6,78	120103	514525	0,233
	6,99	122168	513378	0,238
	7,55	124563	498157	0,250
	6,64	117699	511008	0,230
	6,66	117517	508967	0,231
	6,74	111467	479153	0,233
Média	6,83*			
DP	0,288			
CV	4,21%			

* $p < 0,05$ portanto, podemos concluir, com 95% de confiança, que existem diferenças significativas entre a média do referido ensaio e a média do ensaio A (Referência).

Tabela 46 - Resultados da robustez para o PCP – Ensaio A a E.

Ensaio	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
A	8,15	4560	615113	0,007
	8,57	4162	534949	0,008
	7,77	3629	512708	0,007
	8,14	3923	530091	0,007
	9,09	4105	497895	0,008
	8,40	3782	495337	0,008
	8,80	4103	513759	0,008
	8,36	3885	511415	0,008
	8,29	3899	517279	0,008
	8,76	4147	521517	0,008
Média	8,43			
DP	0,384			
CV	4,55%			

Ensaio	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
B	8,31	3868	512227	0,008
	8,35	3714	489254	0,008
	7,03	3291	512250	0,006
	7,98	3609	497007	0,007
	7,61	3455	498200	0,007
	7,88	3751	522727	0,007
	7,81	3716	522309	0,007
	7,23	3372	510858	0,007
	6,68	3244	530760	0,006
	8,84	3421	426522	0,008
Média	7,77*			
DP	0,657			
CV	8,45%			

Ensaio	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
C	5,86	2886	535789	0,005
	6,88	3277	521018	0,006
	7,39	3523	522836	0,007
	7,93	3540	490462	0,007
	8,01	3420	468915	0,007
	8,12	3485	471744	0,007
	7,92	3538	490619	0,007
	7,41	3196	473092	0,007
	7,71	3146	447635	0,007
	6,61	3057	505340	0,006
Média	7,38*			
DP	0,733			
CV	9,93%			

Ensaio	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
D	7,20	3719	565720	0,007
	6,45	2980	504428	0,006
	6,03	2633	474894	0,006
	7,57	3352	485447	0,007
	6,52	3003	502875	0,006
	8,16	3414	460104	0,007
	7,45	3257	479408	0,007
	6,94	3042	479616	0,006
	5,77	2780	523042	0,005
	8,94	2958	364683	0,008
Média	7,10*			
DP	0,975			
CV	13,7%			

Ensaio	[PCP]	A (PCP)	A (PI)	$\frac{A(PCP)}{A(PI)}$
E	6,60	3229	534458	0,006
	6,31	2877	497185	0,006
	7,29	3511	527747	0,007
	7,77	3488	492702	0,007
	6,30	2975	514525	0,006
	6,28	2959	513378	0,006
	7,27	3306	498157	0,007
	6,22	2916	511008	0,006
	5,58	2616	508967	0,005
	6,71	2944	479153	0,006
Média	6,63*			
DP	0,647			
CV	9,76%			

* $p < 0,05$ portanto, podemos concluir, com 95% de confiança, que existem diferenças significativas entre a média do referido ensaio e a média do ensaio A (Referência).