



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

MIGRAÇÃO DE 2,4,6-TCA ATRAVÉS DE ROLHAS NEUTROCORK PARA UM VINHO E
IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE PARA MDMP

por

Bárbara Correia de Vasconcelos

Setembro de 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

MIGRAÇÃO DE 2,4,6-TCA ATRAVÉS DE ROLHAS NEUTROCORK PARA UM VINHO E IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE PARA MDMP

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar

por

Bárbara Correia de Vasconcelos

Local de Estágio: Amorim & Irmãos, S.A. - Departamento de Investigação e Desenvolvimento

Orientador: Prof. Doutor Miguel Cabral

Tutor: Prof. Doutora Maria Conceição Hogg

Setembro de 2012

Aos meus pais e ao meu irmão

RESUMO

Este trabalho incidiu sobre o estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) a partir da rolha de cortiça microaglomerada e o estudo de viabilidade da implementação do método de análise de 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) por SPME-GC/MS.

O primeiro estudo verificou a relação existente entre os níveis de contaminação com 2,4,6-TCA das rolhas de cortiça microaglomeradas de vários lotes (medido em termos de análise de grupo) e o nível de contaminação com 2,4,6-TCA (medido em termos de análise individual) encontrado em vinhos vedados com rolhas dos mesmos lotes. O método utilizado, neste estudo, para a quantificação de 2,4,6-TCA foi SPME-GC-MS. Ao fim de 3 meses, observou-se que os níveis de contaminação com 2,4,6-TCA dos vinhos eram idênticos aos encontrados na superfície da rolha em contacto com o vinho; esta contaminação ocorreu de forma relativamente rápida e não pareceu aumentar ao longo do tempo. Os níveis de contaminação com 2,4,6-TCA encontrados no vinho engarrafado são relativamente proporcionais aos níveis de contaminação com 2,4,6-TCA dos lotes de rolhas utilizados no ensaio.

O segundo estudo consistiu em desenvolver o método de análise de MDMP com base em literatura existente sobre o tema e implementar as condições presentes nessa literatura no SPME-GC-MS. O método de análise do composto referido foi optimizado; contudo, com um limite de quantificação muito superior ao limite de detecção sensorial deste mesmo composto em vinhos.

Palavras-chave: rolha de cortiça microaglomerada, 2,4,6-tricloroanisol, vinho, 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina.

ABSTRACT

This work focused on studying the mechanism of contamination of wine with 2,4,6-trichloroanisole (2,4,6-TCA) from microagglomerated corks, and the feasibility study of the implementation of the method of analysis of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine (MDMP) by SPME-GC/MS.

The first study examined the relationship between the levels of contamination with 2,4,6-TCA from the microagglomerated corks of several batches (measured in terms of group analysis) and the level of contamination with 2,4,6-TCA (measured in terms of individual analysis) found in wine sealed with corks of the same batch. The method used in this study to quantify 2,4,6-TCA was SPME-GC-MS. After 3 months, it was observed that the levels of contamination with 2,4,6-TCA from wine were identical to those found on the surface of the cork in contact with wine, this contamination occurred relatively quickly and did not appear to increase over time. Levels of 2,4,6-TCA contamination found in bottled wine are relatively proportional to the levels of contamination with 2,4,6-TCA from cork lots used in the experiment.

The second study was to develop the method of analysis of MDMP based on existing literature on the subject and to implement the conditions present in this literature in SPME-GC-MS. The method of analysis of the said compound was optimized, however with a quantification limit much higher than the detection limit of the same sensory compound in wine.

Keywords: microagglomerated cork, 2,4,6-trichloroanisole, wine, 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine.

AGRADECIMENTOS

O projecto realizado durante o estágio no Departamento de I&D da Amorim & Irmãos só foi possível graças ao contributo de diversas pessoas às quais gostaria de dirigir o meu sincero agradecimento.

Ao orientador da empresa, Prof. Doutor Miguel Cabral, pela oportunidade oferecida em estagiar no I&D, pelas palavras certas no momento certo, pela confiança depositada em mim e pelos inesgotáveis conhecimentos transmitidos.

À tutora da universidade, Prof. Doutora Maria Conceição Hogg, pelos conselhos, pela disponibilidade e pela ajuda prestada.

Ao Doutor Paulo Lopes pela paciência, compreensão e disponibilidade, assim como, pela atenção dispensada para comigo, pelos conselhos e pelo reconhecimento do meu trabalho.

À Dra. Isabel Roseira pela simpatia, boa disposição e interesse demonstrado.

Á Eng. Juliana Marques pela paciência, pelo incondicional acompanhamento ao longo do projecto, pela ajuda prestada na resolução de obstáculos encontrados e pelos conselhos.

Às colaboradoras do I&D, Eliana Reis, Salomé Reis, Patrícia Oliveira e Ana Malheiro, pela forma simpática com que me acolheram, por todos os bons momentos passados, pela companhia e ajuda prestada.

Ao estagiário Pedro Pereira, pela sua boa disposição e companheirismo.

À equipa da Amorim Cork Research pela afável recepção e simpatia.

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho, incentivo, sacrifício e apoio incondicional. Por nunca terem deixado de acreditar em mim e me transformarem naquilo que hoje sou.

Muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
AGRADECIMENTOS	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE QUADROS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
1. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1. A CORTIÇA	2
2.1.1. Estrutura	3
2.1.2. Constituição química	4
2.1.3. Propriedades da cortiça	5
2.2. ROLHAS DE CORTIÇA	5
2.3. CONTAMINAÇÃO DOS VINHOS ASSOCIADA ÀS ROLHAS DE CORTIÇA	6
2.3.1. Contaminantes	7
2.3.2. Fontes de contaminação das rolhas de cortiça	9
2.3.3. Estratégia de prevenção, remoção e controlo dos contaminantes	9
2.3.4. Mecanismos de contaminação do vinho pelas rolhas de cortiça	10
2.4. OBJECTIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1. ESTUDO DO MECANISMO DE CONTAMINAÇÃO DO VINHO COM 2,4,6-TCA A PARTIR DA ROLHA DE CORTIÇA MICROAGLOMERADA	12
3.1.1. Materiais	12
3.1.2. Engarrafamento e conservação	14
3.1.3. Análises de 2,4,6-TCA	15
3.1.4. Tratamento dos resultados	16
3.2. ESTUDO DE VIABILIDADE DA IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE MDMP POR SPME-GC/MS	16
3.2.1. Condições operatórias gerais	16
3.2.2. Fases de implementação	17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. ESTUDO DO MECANISMO DE CONTAMINAÇÃO DO VINHO COM 2,4,6-TCA A PARTIR DA ROLHA DE CORTIÇA MICROAGLOMERADA	19
4.1.1. Concentração de 2,4,6-TCA presente no vinho e nas rolhas de cortiça.....	19
4.1.2. Cinética de migração de 2,4,6-TCA.....	22
4.1.3. Estudo estatístico	22
4.2. ESTUDO DE VIABILIDADE DA IMPLEMENTAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE MDMP POR SPME-GC/MS	27
5. CONCLUSÕES GERAIS	30
6. TRABALHO FUTURO	31
7. OUTRAS ACTIVIDADES REALIZADAS	32
7.1. ANÁLISES DE CONTROLO DE 2,4,6-TCA EM PRODUTOS DE CORTIÇA	32
7.2. TESTES PARA OPTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE 2,4,6-TCA	32
7.2.1. Análise de 2,4,6-TCA com solução etanólica e vinho a 6 e 12 %.....	32
7.2.2. Análise de 2,4,6-TCA com soluções etanólicas a 12 ou 14 %.....	33
7.3. PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO RELATIVO À ABSORÇÃO DE CLOROANISÓIS E CLOROFENÓIS POR SOBREIROS ATRAVÉS DO SOLO.....	33
8. BIBLIOGRAFIA	34
9. APÊNDICES	37
9.1. APÊNDICE I – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE ROLHAS MICROAGLOMERADAS.....	37
9.2. APÊNDICE II – QUANTIFICAÇÃO DE 2,4,6-TCA POR SPME-GC-MS EM MACERADOS DE ROLHAS DE CORTIÇA OU EM VINHO	38
9.3. APÊNDICE III – QUANTIFICAÇÃO DE MDMP POR SPME-GC-MS.....	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – REPRESENTAÇÕES DO DETALHE DA ESTRUTURA DAS PAREDES CELULARES DA CORTIÇA MOSTRANDO OS SEUS PRINCIPAIS COMPONENTES: A) CORTE RADIAL: “L” LIMITE DA BASE DO PRISMA; “D” ESPESSURA DA PAREDE CELULAR; B) CORTE TANGENCIAL/AXIAL: “H” ALTURA DO PRISMA (FONTE: SILVA <i>ET AL.</i> , 2005).....	3
FIGURA 2.2 – MICROFOTOGRAFIA DE CORTIÇA NATURAL OBTIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO: A) CORTE RADIAL; B) CORTE TANGENCIAL (FONTE: SILVA <i>ET AL.</i> , 2005).	3
FIGURA 2.3 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DO 2,4,6-TCA, QUE EXEMPLIFICA A PRINCIPAL VIA DE FORMAÇÃO DOS CLOROANISÓIS.	8
FIGURA 3.1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE 2,4,6-TCA NAS ROLHAS DE CORTIÇA MICROAGLOMERADAS ANTES DO ENGARRAFAMENTO.....	13
FIGURA 3.2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE 2,4,6-TCA NOS VINHOS BRANCOS UTILIZADOS NO ENGARRAFAMENTO.	14
FIGURA 3.3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE 2,4,6-TCA NAS ROLHAS DE CORTIÇA MICROAGLOMERADAS DOS DIFERENTES LOTES, APÓS 1 E 3 MESES DE CONSERVAÇÃO.....	15
FIGURA 3.4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCEDIMENTO DE ANÁLISE DE 2,4,6-TCA NO VINHO BRANCO, VEDADO COM ROLHAS DE CORTIÇA MICROAGLOMERADAS DOS DIFERENTES LOTES, APÓS 1 E 3 MESES DE CONSERVAÇÃO.....	16
FIGURA 4.1 – EVOLUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 2,4,6-TCA NO VINHO AO LONGO DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO.....	22
FIGURA 4.2 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NO VINHO E ROLHA PARCIAL APÓS 1 MÊS DE ENGARRAFAMENTO.....	23
FIGURA 4.3 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NO VINHO E ROLHA PARCIAL APÓS 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.....	23
FIGURA 4.4 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NO VINHO E ROLHA TOTAL APÓS 1 MÊS DE ENGARRAFAMENTO.....	24
FIGURA 4.5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NO VINHO E ROLHA TOTAL APÓS 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.....	24
FIGURA 4.6 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NA ROLHA TOTAL E ROLHA PARCIAL APÓS 1 MÊS DE ENGARRAFAMENTO.	25
FIGURA 4.7 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NA ROLHA TOTAL E ROLHA PARCIAL APÓS 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.	25

FIGURA 4.8 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO MDMP, EM SOLUÇÃO ETANÓLICA (6% ETANOL V/V), PARA UMA GAMA DE CONCENTRAÇÕES DE 0 A 20 NG/L.....	27
FIGURA 4.9 – PICO CROMATOGRÁFICO REFERENTE: A) MDMP-D ₃ EM NA ₂ CO ₃ COMUM, B) MDMP-D ₃ EM NA ₂ CO ₃ PA, C) MDMP EM NA ₂ CO ₃ COMUM, D) MDMP EM NA ₂ CO ₃ PA.	28
FIGURA 9.1 – PROGRAMA DE TEMPERATURAS PARA A SEPARAÇÃO DO 2,4,6-TCA.....	39
FIGURA 9.2 – PROGRAMA DE TEMPERATURAS PARA A SEPARAÇÃO DO MDMP.	43

LISTA DE QUADROS

QUADRO 2.1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA MÉDIA DA CORTIÇA VIRGEM E DA CORTIÇA AMADIA (FONTE: FORTES ET AL, 2004).	4
QUADRO 2.2 – APRESENTAÇÃO E DESCRIÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE ROLHAS DE CORTIÇA.....	6
QUADRO 2.3 – LIMIARES DE PERCEPÇÃO SENSORIAL DE ALGUNS DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS RESPONSÁVEIS PELA CONTAMINAÇÃO DO VINHO COM AROMAS FÚNGICOS..	7
QUADRO 3.1 – VALORES DE 2,4,6-TCA POR LOTE DE ROLHA DE CORTIÇA.....	13
QUADRO 4.1 – CONCENTRAÇÃO DE 2,4,6-TCA NO VINHO APÓS 1 E 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.	19
QUADRO 4.2 – RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NA ROLHA PARCIAL APÓS 1 E 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.	20
QUADRO 4.3 – RESULTADOS DE 2,4,6-TCA NA ROLHA TOTAL APÓS 1 E 3 MESES DE ENGARRAFAMENTO.	21
QUADRO 4.4 – PARÂMETROS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO MDMP.....	29
QUADRO 9.1 – PARÂMETROS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO 2,4,6-TCA..	40
QUADRO 9.2 – PROCESSO DE EXECUÇÃO DOS ENSAIOS INTERLABORATORIAIS: INTERNO E EXTERNO.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

2,3,4,6-TeCA	2,3,4,6-tetracloroanisol
2,4,6-TBA	2,4,6-tribromoanisol
2,4,6-TCA	2,4,6-tricloroanisol
3,5-d₂-TCP	3,5-d ₂ -triclorofenol
A&I	Amorim & Irmãos SGPS SA
ANOVA	Análise de Variância
AWRI	Australian Wine Research Institute
CA	Corticeira amorim SGPS SA
CAR	Carboxano
CPOMT	Clorofenol O-metiltransferase
d₅-TCA	d ₅ -tricloroanisol
DVB	Divinilbenzeno
ECD	Detecção por Captura de Electrões
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
GC	Cromatografia em fase Gasosa
I&D	Investigação & Desenvolvimento
IPMP-d₃	2-Isopropil-3-metoxipirazina-d ₃
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MDMP	2-metoxi-3,5-dimetilpirazina
MDMP-d₃	2-metoxi-3,5-dimetilpirazina-d ₃
MS	Espectrometria de Massa
NaCl	Cloreto de sódio
PA	Pró-Análise
PCA	Pentacloroanisol
PDMS	Polidimetilsiloxano
PI	Padrão Interno
PIB	Produto Interno Bruto
ROSA	Rate of Optimal Steam Application
SIM	Monitorização Selectiva de Iões
SPME	Micro-Extração em Fase Sólida

1. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Corticeira Amorim SGPS SA (CA) iniciou a sua actividade em 1870 e é a maior empresa mundial de produtos de cortiça e uma das mais internacionais de todas as empresas portuguesas, com operações em 75 de países, de todos os continentes. Actualmente, as aplicações de cortiça incluem não apenas produtos tradicionais de alto valor acrescentado, como é o caso da rolha, mas também produtos que incorporam avançada tecnologia de fabrico e elevados padrões de Investigação & Desenvolvimento (I&D), tais como, painéis para pavimentos e revestimentos, toda a espécie de artigos decorativos para o lar e escritório, peças de arte e *design*, solas para sapatos, aplicações no sector automóvel, aplicações nas indústrias militar e aeroespacial, produtos químicos para fins farmacêuticos, entre muitos outros. Face à grande diversidade de aplicações da cortiça, a CA está organizada nas seguintes unidades de negócios: matérias-primas; rolhas; revestimentos; aglomerados compósitos; isolamentos; sob as quais se organizam várias unidades industriais e/ou comerciais.

A Amorim & Irmãos SGPS SA (A&I), é a unidade de negócio que produz e comercializa rolhas, e é constituída por 8 unidades industriais. Esta empresa é a maior produtora e fornecedora de rolhas de cortiça a nível mundial, registando uma produção média anual de 3 mil milhões de unidades, o que lhe confere 30% da quota do mercado global da cortiça. Assim, acreditando nas vantagens de uma relação directa com os principais produtores, foram criadas 17 subsidiárias da A&I nos principais países produtores de vinho, desde a Europa aos novos mercados da África do Sul, Austrália e América do Sul.

Em meados dos anos 90 a utilização da rolha de cortiça foi colocada em causa, devido a problemas associados com a migração de um composto químico da cortiça para o vinho. Desta forma, aproveitando as debilidades associadas às rolhas de cortiça apareceram os vedantes alternativos. A A&I consciente desta problemática, no ano de 2000 criou o departamento de I&D, o qual é liderado pelo Prof. Doutor Miguel Cabral, sendo composto por mais 6 pessoas, incluindo técnicos de laboratório e técnicos de I&D. Com vista a melhorar o desempenho técnico e sensorial das rolhas de cortiça, o departamento de I&D definiu orientações estratégicas para as suas actividades, tais como, remover e controlar contaminantes, melhorar a performance do produto, aumentar o conhecimento dos produtos, otimizar os processos produtivos e desenvolver novos tipos de rolhas de cortiça (Amorim, 2012). Portanto, foi no âmbito das actividades do departamento de I&D que surgiu o estágio curricular.

Em suma, o estágio curricular teve uma duração de aproximadamente cinco meses, com início no dia 12 de Setembro de 2011 e fim no dia 3 de Fevereiro de 2012, tendo sido realizado no departamento de I&D da empresa A&I, localizado em Mozelos – Santa Maria da Feira.



2. INTRODUÇÃO

A embalagem desempenha um papel muito importante na protecção e na conservação de um produto alimentar, contribuindo assim para a sua segurança e do seu consumidor. No entanto, a embalagem não deve ser ela própria uma fonte de risco para a qualidade do produto, na medida em que se tratam de materiais de natureza diversa, que em contacto directo com os alimentos, podem originar a sua contaminação física, química e até mesmo microbiológica (Poças e Moreira, 2003).

O vinho, como qualquer outro género alimentício, necessita de ser acondicionado numa embalagem que conserve as suas características físicas, químicas, microbiológicas e organolépticas por um determinado período de tempo (Robertson, 2009). A tradicional garrafa de vidro é a embalagem mais utilizada no acondicionamento de vinho, representando 87% do total de unidades utilizadas em 2011, os restantes 13% estão repartidos por outros tipos de embalagem, tais como garrafas PET, *bag-in-box*, estruturas laminadas e latas de alumínio (Lopes *et al.*, 2011). Outro elemento importante no acondicionamento de um vinho é o vedante utilizado no fecho da garrafa. Estima-se que sejam utilizados 18 mil milhões de vedantes por ano, dos quais cerca de 70% são rolhas de cortiça (Bates, 2010). Contudo, a utilização da rolha de cortiça foi colocada em causa em meados dos anos 90, devido aos problemas associados com a migração de um composto químico, 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), da cortiça para o vinho que causa desvios sensoriais relacionados com o aroma/gosto a mofo. Assim, aproveitando estes problemas das rolhas de cortiça, os vedantes alternativos, sintéticos e as cápsulas de rosca (*screw-cap*) puderam penetrar o mercado de vinho e ganhar cerca de 30% de mercado às rolhas de cortiça (Bates, 2010).

2.1. A cortiça

A cortiça é produzida pelo sobreiro (*Quercus suber L.*), constituindo o revestimento exterior do seu tronco e ramos. É retirada do tronco periodicamente, normalmente com intervalos de nove anos, sob a forma de pranchas com espessura adequada ao processamento industrial, principalmente para a produção de rolhas (Fortes *et al.*, 2004). O sobreiro é cultivado na bacia mediterrânica em países como Espanha, Argélia, Marrocos, Itália, Tunísia e França e, sobretudo em Portugal, onde existem mais de 730 mil hectares de montado de sobreiro, que representam cerca de 32% da área mundial, e uma indústria corticeira de grande importância económica para o país (APCOR, 2012). O valor gerado pelas exportações portuguesas de cortiça revela-se extremamente significativo, dado representar aproximadamente 0,7% do produto interno bruto (PIB) nacional, 2,2% do valor das exportações totais portuguesas e cerca de 30% do total das exportações portuguesas de produtos florestais (APCOR, 2011).

2.1.1. Estrutura

A cortiça é um material natural formado por células fechadas contendo no seu interior um gás semelhante ao ar que representa 80 a 90% do volume de uma rolha de cortiça. A parte sólida, 15% em volume, constitui a parede das células sendo essencialmente formada por polímeros como a suberina, a lenhina e a celulose (Figura 2.1) (Fortes *et al.*, 2004).

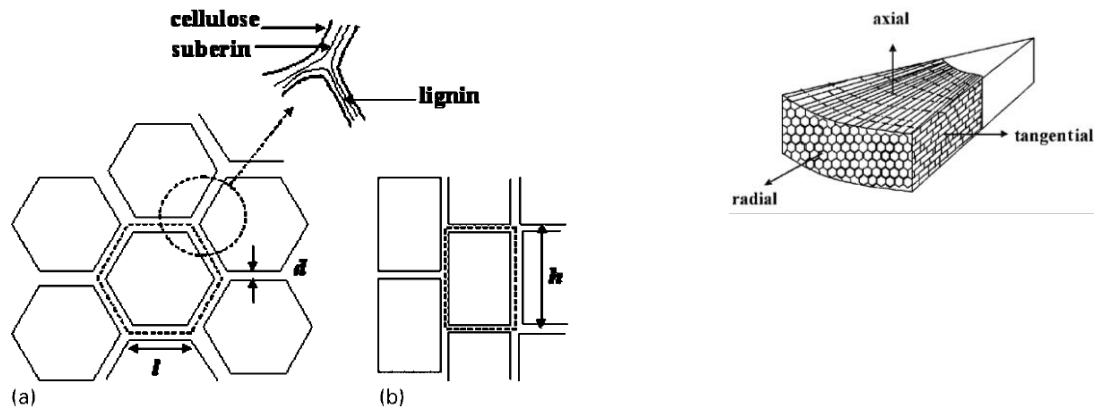


Figura 2.1 – Representações do detalhe da estrutura das paredes celulares da cortiça mostrando os seus principais componentes: a) corte radial: “ l ” limite da base do prisma; “ d ” espessura da parede celular; b) corte tangencial/axial: “ h ” altura do prisma (Fonte: Silva *et al.*, 2005).

A cortiça revela uma estrutura alveolar, análoga à de um favo de mel, sem espaços vazios entre as células contíguas. Uma vez que as paredes celulares laterais (paralelas à direcção radial) são orientadas aleatoriamente, a cortiça pode ser considerada, como um material transversalmente isotrópico, o que implica que todas as direcções perpendiculares à direcção radial são equivalentes. As células podem ser descritas como prismas rectangulares, que estão dispostos em colunas paralelas à direcção radial da árvore (Figura 2.2.a). Cortes axiais e tangenciais mostram uma estrutura que se assemelha a uma parede de tijolos (Figura 2.2.b) (Silva *et al.*, 2005).

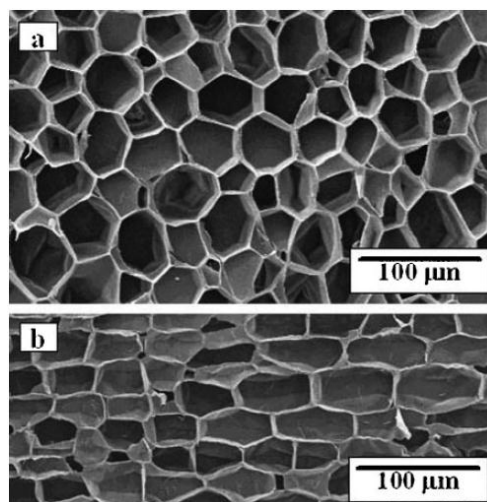


Figura 2.2 – Microfotografia de cortiça natural obtida por microscopia electrónica de varrimento: a) Corte radial; b) Corte tangencial (Fonte: Silva *et al.*, 2005).

2.1.2. Constituição química

A constituição química das paredes celulares da cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes: estruturais e não-estruturais (Quadro 2.1).

Os componentes estruturais são macromoléculas, de natureza polimérica, insolúveis, que estão presentes nas paredes celulares da cortiça e que conferem a estas a sua forma e grande parte das suas propriedades físicas e químicas. A remoção de um componente estrutural da parede celular só é possível através de ataques químicos ou mecânicos com intensidade suficiente para promover a sua despolimerização parcial e solubilização, e altera profundamente as características e propriedades das células. Na cortiça, os componentes estruturais são suberina, a lenhina e os polissacáridos. A suberina é o principal componente das paredes celulares da cortiça; é um biopolímero de carácter lipídico constituído por ácidos gordos, álcoois gordos e glicerol; responsável pela baixa permeabilidade e pelas propriedades mecânicas da cortiça e que se encontra associado à lenhina. A lenhina é um polímero de carácter aromático constituída por monómeros do tipo fenilpropano e é o segundo componente estrutural mais importante nas paredes celulares da cortiça; possui funções de suporte para os outros componentes estruturais na parede celular. Os polissacáridos estruturais são constituídos por celulose e hemiceluloses, polímeros em que as unidades monoméricas são monossacáridos, pentoses e hexoses.

Na cortiça, os componentes não-estruturais são os extractivos e os inorgânicos. Os componentes extractivos são compostos de baixa massa molecular, são solúveis e podem ser retirados das células por solubilização com solventes de polaridade adequada, sem afectar de modo sensível as suas propriedades mecânicas; na cortiça, os extractivos são classificados habitualmente em dois grupos de compostos: as ceras e os compostos fenólicos. Os componentes inorgânicos são englobados no que geralmente se designa como cinzas, ou seja, o resíduo da combustão completa do material; de entre os elementos inorgânicos da cortiça o cálcio é o mais importante (Fortes *et al*, 2004).

Quadro 2.1 – Composição química média da cortiça virgem¹ e da cortiça amadia² (Fonte: Fortes et al, 2004).

COMPONENTE	% EM PESO SECO	
	CORTIÇA VIRGEM	CORTIÇA AMADIA
Inorgânico	0,9 (2,2)	1,2 (0,2)
Extractivos	16,9 (2,5)	14,2 (1,1)
Suberina	35,2 (3,1)	39,4 (1,7)
Lenhina	22,4 (1,1)	24,0 (0,8)
Polissacáridos	21,3 (2,4)	19,9 (2,6)

Entre parêntesis o desvio-padrão

¹ Cortiça obtida do primeiro descortiçamento – utilizada em outras aplicações que não rolhas

² Cortiça obtida do terceiro descortiçamento e seguintes – utilizada para a produção de rolhas de qualidade

2.1.3. Propriedades da cortiça

As propriedades da cortiça estão intimamente relacionadas com a sua estrutura e constituição química, e podem ser sucintamente resumidas:

- *Leveza* – a cortiça possui baixa densidade; apresenta valores na ordem dos 120-280 kg/m³;
- *Impermeabilidade* – devido à suberina e às ceras presentes nas paredes das células da cortiça, esta é praticamente impermeável a líquidos e a gases; o facto das células da cortiça conterem gás no seu interior também ajuda na impermeabilidade da cortiça, uma vez que este faz contra-pressão;
- *Elasticidade e compressibilidade* – a cortiça pode ser comprimida até cerca de metade da sua largura sem perder qualquer flexibilidade e recupera a sua forma e volume assim que deixa de ser pressionada; estas características permitem que as rolhas se adaptem a quaisquer gargalos da garrafa, incluindo gargalos de forma irregular;
- *Isolante* – a cortiça tem uma baixa condutividade térmica, sonora e vibrátil; isto acontece porque os elementos gasosos que a cortiça contém estão fechados em pequenos compartimentos impermeáveis e isolados uns dos outros por um material resistente à humidade;
- *Resistência* – a cortiça é muito resistente ao desgaste e tem um coeficiente de atrito elevado; graças à sua estrutura em favo de mel é menos afectada pelo impacto ou atrito do que outras superfícies duras (Fortes *et al*, 2004).

2.2. Rolhas de cortiça

25%-30% da produção de cortiça (em massa) é usada para a produção de rolhas de cortiça e que corresponde a 70% das mais-valias geradas no sector. O principal sector de destino dos produtos de cortiça é a indústria vinícola que absorve 66% de tudo o que é produzido. A utilização das rolhas de cortiça como vedante de vinho começou em França, no século XVII, através do monge beneditino francês Dom Pierre Pérignon, que as utilizava para vedar as garrafas do espumante que fazia no convento (APCOR, 2012). A indústria da cortiça possui uma gama completa de rolhas, disponíveis em inúmeros calibres e formatos, de forma a adaptarem-se à enorme diversidade de garrafas e a todo o tipo de vinho (Quadro 2.2).

Quadro 2.2 – Apresentação e descrição dos diferentes tipos de rolhas de cortiça.

TIPOS DE ROLHA	
GRUPO	SUBGRUPO
<p>Naturais</p> <p>Fabricadas por brocagem a partir de pranchas de cortiça</p>	<p>Monopeça</p> <p>Fabricadas a partir da brocagem directa de uma prancha de cortiça</p>
	<p>Colmatadas</p> <p>Produzidas a partir de rolhas de cortiça natural de baixa qualidade superficial em que os poros são preenchidos com pó de cortiça e um adesivo alimentar</p>
<p>Técnicas</p> <p>Produzidas a partir da granulação de pranchas de cortiça de baixa qualidade e do subproduto da produção de rolhas de cortiça naturais</p>	<p>Champanhe</p> <p>Corpo formado por grânulos de cortiça natural (2-7 mm) ligados entre si por um adesivo alimentar, ao qual, num dos topos, é colado um ou dois discos de cortiça natural</p>
	<p>Twintop</p> <p>Corpo formado por grânulos de cortiça natural (3-8 mm) ligados entre si por um adesivo alimentar, ao qual, em cada topo, é colado um disco de cortiça natural</p>
	<p>Aglomeradas</p> <p>Formada por grânulos de cortiça natural (2-4mm) ligados entre si por um adesivo alimentar</p>
	<p>Microaglomeradas</p> <p>Formada por grânulos finos de cortiça natural (1-2mm) ligados entre si por um adesivo alimentar</p>

2.3. Contaminação dos vinhos associada às rolhas de cortiça

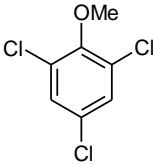
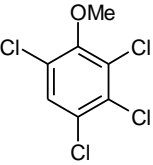
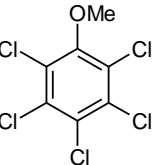
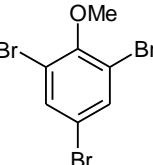
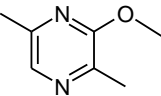
Os defeitos sensoriais do vinho são os principais responsáveis pelas perdas económicas ocorridas na indústria vitivinícola (Sefton *et al.*, 2005). Os principais defeitos sensoriais estão relacionados com problemas microbiológicos e químicos, tais como o "gosto a rolha" ou, mais correctamente, aromas fúngicos (mofo e bafio) (Coque *et al.*, 2006). Este defeito sensorial ocorre quando o vinho contacta com produtos ou atmosferas contaminadas com haloanisóis, mais concretamente cloroanisóis e bromoanisóis. Embora as rolhas de cortiça sejam consideradas como as principais fontes de contaminação do vinho, estudos recentes demonstram que existem outros agentes ou vectores de contaminação, presentes no transporte e durante o armazenamento dos vinhos engarrafados, que também podem ser responsáveis pela contaminação (Barker *et al.*, 2001). Embora seja difícil estabelecer estatísticas fiáveis sobre a contaminação de rolhas de cortiça, aponta-se que 1 a 5 % dos vinhos engarrafados estejam contaminados com 2,4,6-TCA (Simpson *et al.*, 2007).

2.3.1. Contaminantes

Os haloanisóis são os principais compostos responsáveis por destruir os aromas varietais dos vinhos, conferindo-lhes aromas a mofo e bafio. São compostos muito voláteis, facilmente detectados ao olfacto e ao paladar pois têm um limiar de percepção muito baixo, em água e em vinho (Quadro 2.3). Estas características justificam o facto destes compostos serem contaminantes de diversos alimentos, mesmo em concentrações baixas, produzindo sensações fúngicas desagradáveis e tornando o seu consumo desagradável.

Os principais haloanisóis responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos são os cloroanisóis e os bromoanisóis, entre eles: o 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), o 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA) (Marques, 2009).

Quadro 2.3 – Limiares de percepção sensorial de alguns dos principais compostos responsáveis pela contaminação do vinho com aromas fúngicos.

COMPOSTO	ESTRUTURA QUÍMICA	LIMIARES DE PERCEPÇÃO SENSORIAL (Boutou <i>et al.</i> , 2006; Coque <i>et al.</i> , 2006; Sefton e Simpson, 2005)
2,4,6-TCA		- Água: 30-300 pg/L - Solução alcoólica e vinho: 1,5-3 ng/L
2,3,4,6-TeCA		- Água: 4 ng/L - Solução alcoólica e vinho: 5 ng/L (espumantes) 10-15 ng/L (branco e tinto)
PCA		- > 10 µg/L
2,4,6-TBA		- Água: 8-30 pg/L - Solução alcoólica e vinho: 3 ng/L
MDMP		- Vinho branco: 2,0 ng/L

A formação de cloroanisóis ocorre no meio ambiente por biometilação de clorofenóis realizada por diferentes microrganismos, tais como fungos filamentosos (*Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Cephalosporium* sp.) que crescem nas pranchas de cortiça e em elementos de madeira utilizados nas caves (Capone *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 1999; Coque *et al.*, 2006). Esta reacção é realizada por uma enzima, clorofenol O-metiltransferase (CPOMT), que pode metilar uma série de clorofenóis tóxicos, de forma a produzir os cloroanisóis correspondentes que são inofensivos aos microrganismos (Coque *et al.*, 2006).

Os clorofenóis são, por sua vez, formados a partir de uma reacção directa entre os produtos resultantes da degradação da lenhina e de açúcares com fontes de cloro presentes no meio ambiente, e/ou a partir de compostos organo-clorados, que fazem parte da composição química de diferentes produtos (preservantes de madeiras, pesticidas, desinfectantes, etc.). Estes mecanismos de formação dos cloroanisóis estão representados na Figura 2.3.

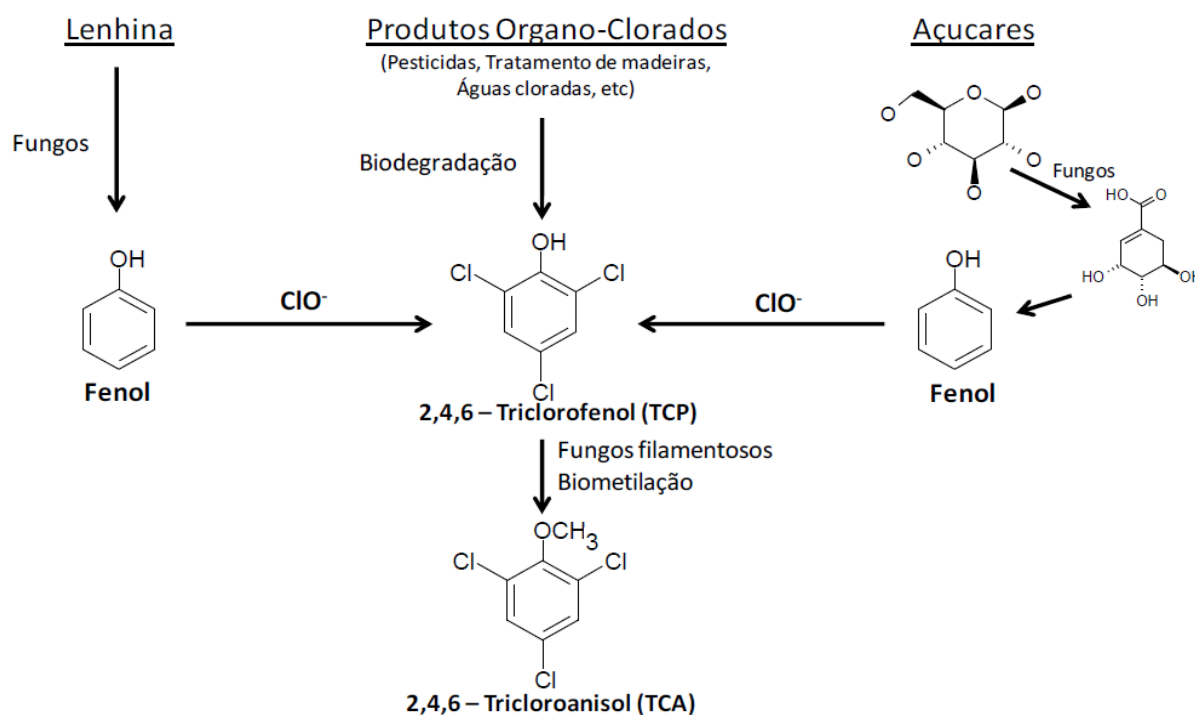


Figura 2.3 – Mecanismo de formação do 2,4,6-TCA, que exemplifica a principal via de formação dos cloroanisóis.

Existem contudo outros compostos contaminantes que não sendo haloanisóis, provocam igualmente desvios sensoriais, entre estes compostos destacam-se o 1-octen-3-ona e a geosmina, ambos identificados em extractos de uva (Darriet *et al.* 2002 e Darriet *et al.* 2000). Para além dos compostos referidos, Simpson *et al.* (2004) detectou a presença da 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) em rolhas de cortiça. Este composto tem origem bacteriana e pensa-se que seja biossintetizado por uma bactéria do género *Rhizobium* (Chatonnet *et al.*, 2010; Bobé *et al.* 2012). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a MDMP e mais investigações são necessárias para a prevenção e controlo deste composto na indústria de cortiça (Quadro 2.3.).

2.3.2. Fontes de contaminação das rolhas de cortiça

A contaminação do vinho por haloanisóis, nomeadamente com 2,4,6-TCA tem sido associada exclusivamente às rolhas de cortiça. Contudo, estudos recentes mostraram que esta contaminação pode advir de outras fontes, nomeadamente do contacto directo com produtos e atmosferas de conservação contaminados (Chatonnet *et al.* 2004, Capone *et al.* 1999). No caso da contaminação do vinho pela rolha de cortiça duas situações distintas podem acontecer:

- A rolha de cortiça pode chegar à cave com níveis de haloanisóis elevados, resultantes da contaminação durante o crescimento da cortiça na árvore. A casca da árvore absorve halofenóis que foram transportados através da atmosfera ou pela água da chuva e/ou estão presentes no solo (Coque *et al.*, 2006). Pode ocorrer também uma contaminação durante o processo produtivo de rolhas, principalmente durante as fases de conservação da cortiça, onde se observa uma forte colonização com fungos e bactérias (Buser *et al.*, 1982; Saxby *et al.*, 1982).
- Por outro lado, as rolhas assim como a madeira e outros materiais (plásticos, silicone, cartão e papel, borracha, etc.) podem chegar à cave completamente isentos de haloanisóis. No entanto, quando armazenados sob atmosferas contaminadas, estes materiais tem a capacidade de sorver haloanisóis por via aérea, mesmo sem um contacto físico directo com a fonte primária de contaminação e depois transmiti-los ao vinho (Barker *et al.*, 2001). Por conseguinte, a rolha de cortiça actuará como veículo transmissor da contaminação, mas a origem desta encontra-se na própria cave.

2.3.3. Estratégia de prevenção, remoção e controlo dos contaminantes

Nos últimos anos e uma vez que o 2,4,6-TCA tem sido o composto contaminante mais problemático, as empresas corticeiras têm desenvolvido acções de combate ao composto referido assentes em três pilares: prevenção, descontaminação e controlo de qualidade.

Relativamente à prevenção, Duncan *et al.* (1997) demonstraram que a incidência de 2,4,6-TCA é superior na base do tronco dos sobreiros. Como tal, quando se faz a extracção da cortiça do sobreiro, é retirada cerca de 10 a 20 cm desde a sua base como medida preventiva. Outros cuidados a ter após o processo de descortiçamento até à produção das rolhas passam pela implementação das seguintes medidas: evitar que as pranchas de cortiça estejam em contacto directo com o solo; proceder a uma selecção mais restrita da matéria-prima a utilizar; aumentar o tempo de estabilização; arejar e escoar as águas durante a armazenagem; não utilizar paletes cujas madeiras tenham sido tratadas com clorofenóis; substituir o hipoclorito de sódio por peróxido de hidrogénio usado na “lavação” de rolhas; entre outros.

Em relação às técnicas de descontaminação, irão ser destacadas as que foram desenvolvidas pela A&I. A A&I desenvolveu a tecnologia ROSA (Rate of Optimal Steam Application) (Cabral, 2006), a qual consiste numa destilação de vapor controlada que remove cerca de 90% do 2,4,6-TCA e outros compostos voláteis, em diferentes produtos de cortiça. Inicialmente, e uma vez que esta

técnica afectava as propriedades físico-mecânicas das rolhas de cortiça natural e por consequência a sua elasticidade, resiliência e capacidade de vedação ao gás e ao líquido, esta foi apenas utilizada para o tratamento de grânulos de cortiça. Posteriormente, com os mesmos níveis de eficácia na remoção dos contaminantes, a técnica ROSA foi otimizada para o tratamento de rolhas de cortiça natural, designando-se por ROSA Evolution (Dahl *et al.*, 2007). Para além das técnicas referidas, a A&I desenvolveu técnicas de descontaminação para serem aplicadas às pranchas de cortiça e aos discos de cortiça natural. Assim sendo, para as pranchas de cortiça foi desenvolvida a técnica de Vaporização, que também recorre ao princípio da destilação de vapor controlada; e para os discos de cortiça natural foi desenvolvida a técnica INOS II (Ferreira, 2000), que consiste em lavar os mesmos num banho de água quente (cerca de 40°C), sob ciclos de pressão e depressão, de forma a limpar e a retirar alguns dos contaminantes.

No que diz respeito ao controlo da qualidade, este era feito até ao final dos anos 90, apenas por análise sensorial aleatória de lotes de rolhas de cortiça. Uma vez que a detecção de defeitos organolépticos com a técnica referida é muito difícil, assim como a identificação e quantificação dos contaminantes responsáveis por tais defeitos, houve a necessidade da criação de uma nova técnica para detecção e quantificação de 2,4,6-TCA, que passou a ser realizada por equipamentos de cromatografia em fase gasosa para a detecção de 2,4,6-TCA em todos os lotes. Portanto, hoje, para além de ser realizada a análise sensorial a amostras de rolhas e discos de cortiça naturais, seguindo a metodologia da ISO 22308-2005, também são usados métodos químicos que recorrem à combinação de micro-extração em fase sólida (SPME) e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS) e/ou captura de electrões (GC/ECD) de acordo com a norma ISO 20752-2007. Neste âmbito, o departamento de I&D da A&I já tem implementado no seu laboratório o método analítico para o controlo de qualidade relativo ao 2,4,6-TCA e a outros haloanisóis. O método consiste na análise do 2,4,6-TCA extraível da solução resultante da maceração composta de 10 ou 50 rolhas de cortiça (retiradas de lotes de 100 mil rolhas), discos ou grânulos, numa solução etanólica ou vinho (10, 12 ou 14% de álcool) durante 24 horas a temperatura ambiente. Neste seguimento, o departamento de I&D tem vindo a desenvolver esforços para implementar o método analítico para controlo de qualidade do composto MDMP em rolhas, discos e grânulos de cortiça (Pereira, 2012).

2.3.4. Mecanismos de contaminação do vinho pelas rolhas de cortiça

Uma grande parte das rolhas de cortiça natural está contaminada com algum 2,4,6-TCA (Pollnitz *et al.*, 1996; Howland *et al.*, 1997; Capone *et al.*, 1999) mas, na maioria dos casos, este 2,4,6-TCA não chega a contaminar o vinho engarrafado. Presumivelmente, só quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto directo com o vinho (ou com a câmara de ar acima do vinho), se dá a transferência de 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça para o vinho (Amon e Simpson 1986, Capone et al. 1999). Consequentemente, a localização do 2,4,6-TCA na rolha e a orientação da rolha durante o engarrafamento são parâmetros fundamentais que contribuem para a contaminação ou não do vinho (Pollnitz et al. 1996; Capone et al. 1999 e 2002). Estes resultados foram confirmados recentemente, em estudos realizados pelo departamento de I&D em colaboração

com a FEUP (Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto) que mostraram que o 2,4,6-TCA presente no interior de rolhas de cortiça natural não é susceptível de migrar para o vinho. Também em parceria com a FEUP, foi demonstrado que as rolhas de cortiça, naturais e técnicas, mostraram ser barreiras efectivas à migração de 2,4,6-TCA atmosférico para o vinho, resultados que confirmam aqueles obtidos por Capone *et al.* (2002) e Lopes *et al.* (2011).

O grande desafio que as indústrias corticeiras enfrentam é o de encontrar uma ferramenta que estime com precisão o risco de contaminação que cada rolha de cortiça pode representar para o vinho. De forma a dar resposta a esse desafio, tem sido estabelecida a ligação entre o que já se conhece sobre a migração de 2,4,6-TCA e a metodologia de controlo de 2,4,6-TCA por GC. Em 1999 o Laboratório ETS estudou, para rolhas de cortiça naturais, a correlação entre o 2,4,6-TCA presente no macerado individual e o 2,4,6-TCA presente no vinho engarrafado. O estudo consistiu em macerar, individualmente, 400 rolhas provindas de lotes de rolhas de cortiça naturais (os quais apresentavam um nível de contaminação com 2,4,6-TCA elevado) e posteriormente engarrafar 400 garrafas de vinho com essas mesmas rolhas. O Laboratório ETS chegou à conclusão que a correlação obtida era bastante elevada (após 4 meses de engarrafamento, $R^2=0,8$) e concluiu com esta correlação que o 2,4,6-TCA presente nos macerados individuais pode ser usado para estimar o 2,4,6-TCA presente no vinho engarrafado e que a determinação do 2,4,6-TCA presente nos macerados individuais tinha futuro como ferramenta de controlo da qualidade da cortiça (Hervé *et al.*, 1999). No entanto, este estudo suscita algumas dúvidas pois as rolhas de cortiça que foram utilizadas são de cortiça natural e foram sujeitas, individualmente, ao processo de maceração em toda a sua superfície. As rolhas de cortiça naturais não estão contaminadas com 2,4,6-TCA de forma homogénea em toda a sua superfície, portanto ao realizar-se esta maceração o 2,4,6-TCA localizado em determinado local irá distribuir-se por toda a superfície da rolha, inclusive pelos topos das rolhas, tornando desta forma uma rolha virtualmente sem potencial de contaminação do vinho numa rolha passível de contamina-lo. Isto quer dizer que a metodologia utilizada por Hervé *et al.*, 1999 poderá ter causado o enviesamento dos resultados finais. O estudo referido foi apenas realizado para rolhas de cortiça naturais, não tendo sido realizado para rolhas de cortiça técnicas, as quais, devido ao processo industrial que sofrem, possuem uma contaminação com 2,4,6-TCA homogénea em todas as partes da rolha. Neste sentido, o laboratório de I&D da A&I pensou em realizar um estudo que verificasse a relação existente entre os níveis de contaminação das rolhas de cortiça técnicas de vários lotes (medido em termos de análise de grupo) e o nível de contaminação (medido em termos de análise individual) encontrado em vinhos vedados com rolhas dos mesmos lotes.

2.4. Objectivos

No âmbito das actividades do departamento de I&D da empresa A&I os objectivos do estágio foram: acompanhar a rotina do laboratório de controlo da qualidade para dar início ao estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir de rolhas de cortiça (técnicas) microaglomeradas, e também ao estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descreve-se o protocolo experimental que foi utilizado para se proceder ao estudo dos dois temas mencionados nos objectivos, nomeadamente, ao estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir de rolhas de cortiça microaglomeradas e ao estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS.

3.1. Estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça microaglomerada

O estudo foi planeado para 12 meses, com o intuito de serem realizadas análises ao fim de 1, 3, 6 e 12 meses de armazenamento, de forma a quantificar o 2,4,6-TCA presente no vinho e nas rolhas de cortiça após o engarrafamento. No entanto, o estágio teve a duração de aproximadamente 5 meses e por isso foram apenas realizadas as análises correspondentes aos pontos de análise 1 e 3 meses.

3.1.1. Materiais

✓ Rolhas

As rolhas de cortiça microaglomeradas (de marca comercial: “NeutroCork”) utilizadas no ensaio tinham as seguintes especificações: dimensões 44x24mm e não sujeitas ao processo de lavagem (Apêndice I). As rolhas foram cedidas pela unidade industrial De Sousa - Amorim & Irmãos S.A. (Santa Maria de Lamas, Portugal) e foram obtidas a partir de três lotes de cortiça diferentes, nomeadamente:

- *Lote A* onde as rolhas foram produzidas a partir de granulado que não foi submetido a qualquer tipo de tratamento para remoção de 2,4,6-TCA;

- *Lote B* onde as rolhas foram produzidas a partir de granulado que foi submetido a um tratamento para remoção de 2,4,6-TCA (tratamento ROSA);

- *Lote C* onde as rolhas foram produzidas a partir de granulado que foi submetido a um tratamento para remoção de 2,4,6-TCA (tratamento ROSA), sendo que posteriormente também foram tratadas com um processo para redução adicional de 2,4,6-TCA (processo confidencial).

As rolhas dos lotes acima descritos foram caracterizadas em termos de contaminação de 2,4,6-TCA através da realização de cinco *macerações compostas* (Apêndice II) por lote antes do engarrafamento. Posteriormente foram recolhidas amostras dos macerados efectuados para análise de 2,4,6-TCA por SPME-GC/MS, seguindo a metodologia de análise descrita no Apêndice II (Figura 3.1).

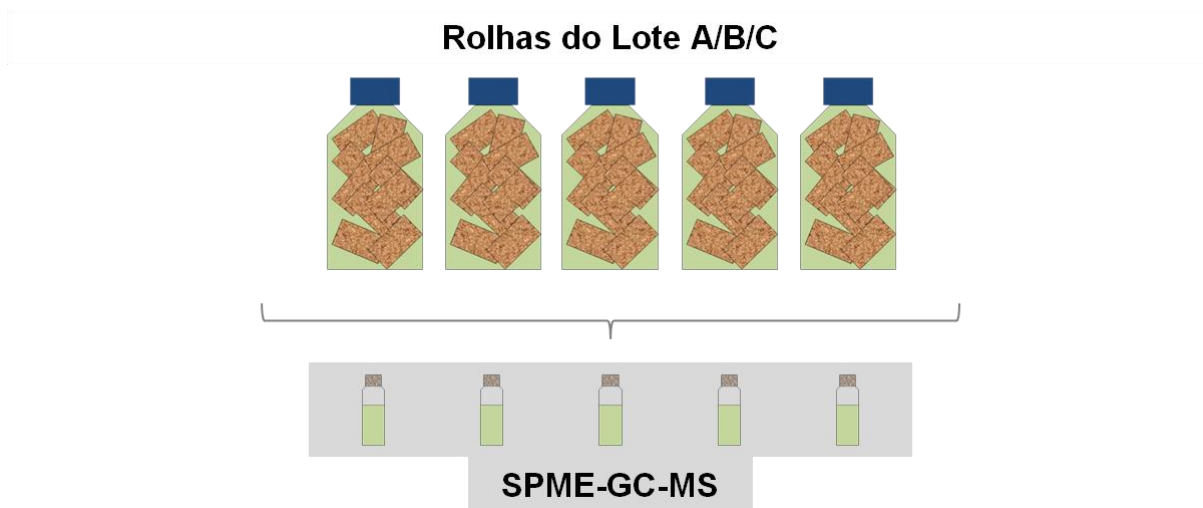


Figura 3.1 – Representação esquemática do procedimento de análise de 2,4,6-TCA nas rolhas de cortiça microaglomeradas antes do engarrafamento.

As análises mostraram que o lote A apresentava três amostras com concentrações de 2,4,6-TCA entre os 0,5 e os 1,2 ng/L; o lote B apresentava apenas uma amostra com concentração de 2,4,6-TCA de 1,1 ng/L e o lote C não possuía amostras com concentrações de 2,4,6-TCA iguais ou acima dos 0,5 ng/L (Quadro 3.1).

Quadro 1.1 – Valores de 2,4,6-TCA por lote de rolha de cortiça.

LOTE	[2,4,6-TCA] (ng/L)				
	MACERAÇÃO 1	MACERAÇÃO 2	MACERAÇÃO 3	MACERAÇÃO 4	MACERAÇÃO 5
A	1,2	n.q	1,1	n.q	0,5
B	n.q	n.q	n.q	n.q	1,1
C	n.q	n.q	n.q	n.q	n.q

n.q. = os resultados estão abaixo do limite de quantificação do método (0,5 ng/L)

Posteriormente seleccionaram-se 80 rolhas de cada lote (240 rolhas) e identificaram-se as mesmas com um código sequencial. Em seguida estas rolhas foram tratadas superficialmente com um elastómero de silicone da Bopsil® para facilitar a sua inserção nas garrafas no momento do engarrafamento e a sua extracção no momento da abertura.

✓ Vinho

O vinho utilizado foi um vinho branco com 12% de teor alcoólico (10L por cada *bag-in-box*), adquirido na empresa Ferreira Malaquias, Lda (Ovar, Portugal). Antes da sua utilização, o vinho das 10 embalagens *bag-in-box* adquiridas foi submetido a análises de 2,4,6-TCA por SPME-GC/MS, seguindo a metodologia de análise descrita no Apêndice II (Figura 3.2). As análises mostraram que o vinho estava em condições de ser utilizado nos ensaios pois nenhuma das amostras analisada se encontrava contaminada com 2,4,6-TCA.

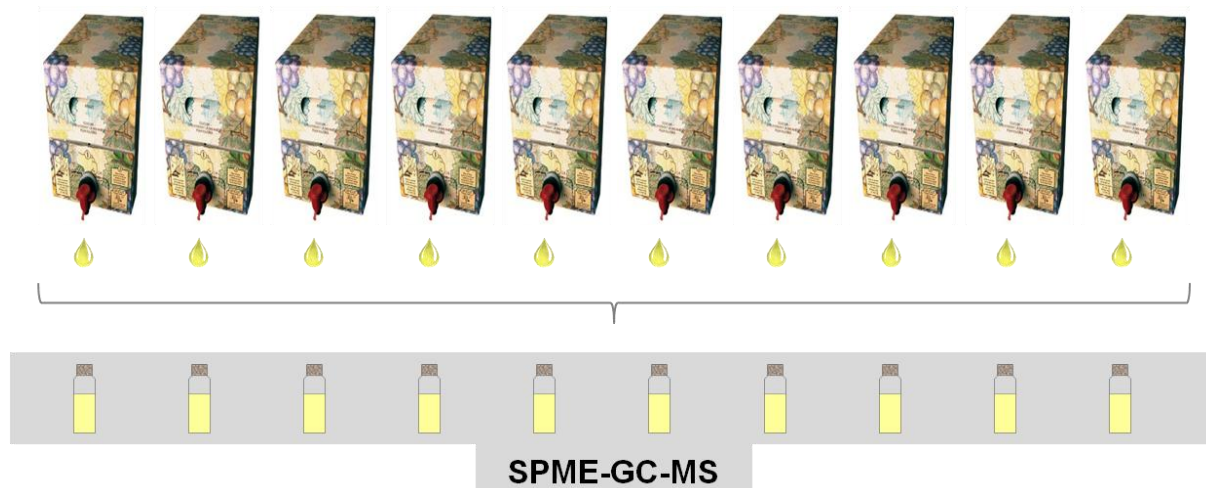


Figura 3.2 – Representação esquemática do procedimento de análise de 2,4,6-TCA nos vinhos brancos utilizados no engarrafamento.

✓ Garrafas

As garrafas utilizadas foram do tipo bordalesa clássica (375 ml), incolores, apropriadas para vedantes cilíndricos e com as seguintes especificações ao nível do gargalo: diâmetro de 18-19 mm e de 20-21 mm a uma profundidade de 3 e 45 mm a partir da entrada do gargalo, respectivamente. As garrafas foram adquiridas à empresa Saint-Gobain Emballage (Cognac, França).

3.1.2. Engarrafamento e conservação

O engarrafamento decorreu no dia 29 de Novembro de 2011, nas instalações da Amorim Distribuição (Santa Maria de Lamas, Portugal). As garrafas foram, previamente, submetidas a uma operação de exclusão de oxigénio do seu interior através da utilização de um fluxo de azoto de 0,4 bar durante 1 minuto. Em seguida, as garrafas foram enchidas a 60 mm do topo da garrafa com cerca de 370 ml de vinho e posteriormente vedadas com as diferentes rolhas microaglomeradas. Esta operação foi efectuada sob vácuo (-0,4 a -0,6 bar no gargalo) utilizando uma máquina de arrolhamento Bertolazo Epsilon R/S.

No total foram engarrafadas 20 garrafas por lote de rolha microaglomerada (“lote A”, “lote B” e “lote C”) e por tempo de análise previsto (1, 3, 6 e 12 meses), perfazendo um total de 240 garrafas. Finalmente as garrafas foram armazenadas na posição horizontal em caixas de cartão sob condições de temperatura e humidade atmosféricas (parâmetros não medidos durante o período de ensaio).

3.1.3. Análises de 2,4,6-TCA

Após 1 e 3 meses de engarrafamento, foram efectuadas análises de 2,4,6-TCA às rolhas e aos vinhos. Por cada período de tempo, foram analisadas 20 garrafas por lote de rolha, perfazendo um total de 60 amostras de vinhos e 60 amostras de rolhas.

✓ Rolhas

Cada uma das 60 rolhas foi sujeita a duas análises, numa primeira fase as rolhas foram submetidas a *macerações individuais parciais* (Apêndice II) referentes à parte da rolha que esteve em contacto com o vinho. Em seguida estas rolhas foram secas ao ar durante 24h, período após o qual as rolhas foram submetidas a *macerações individuais totais* (Apêndice II) referentes a toda a superfície da rolha. De ambos os macerados efectuados foram recolhidas amostras para análise de 2,4,6-TCA por SPME-GC/MS seguindo o procedimento descrito no apêndice II (Figura 3.3).

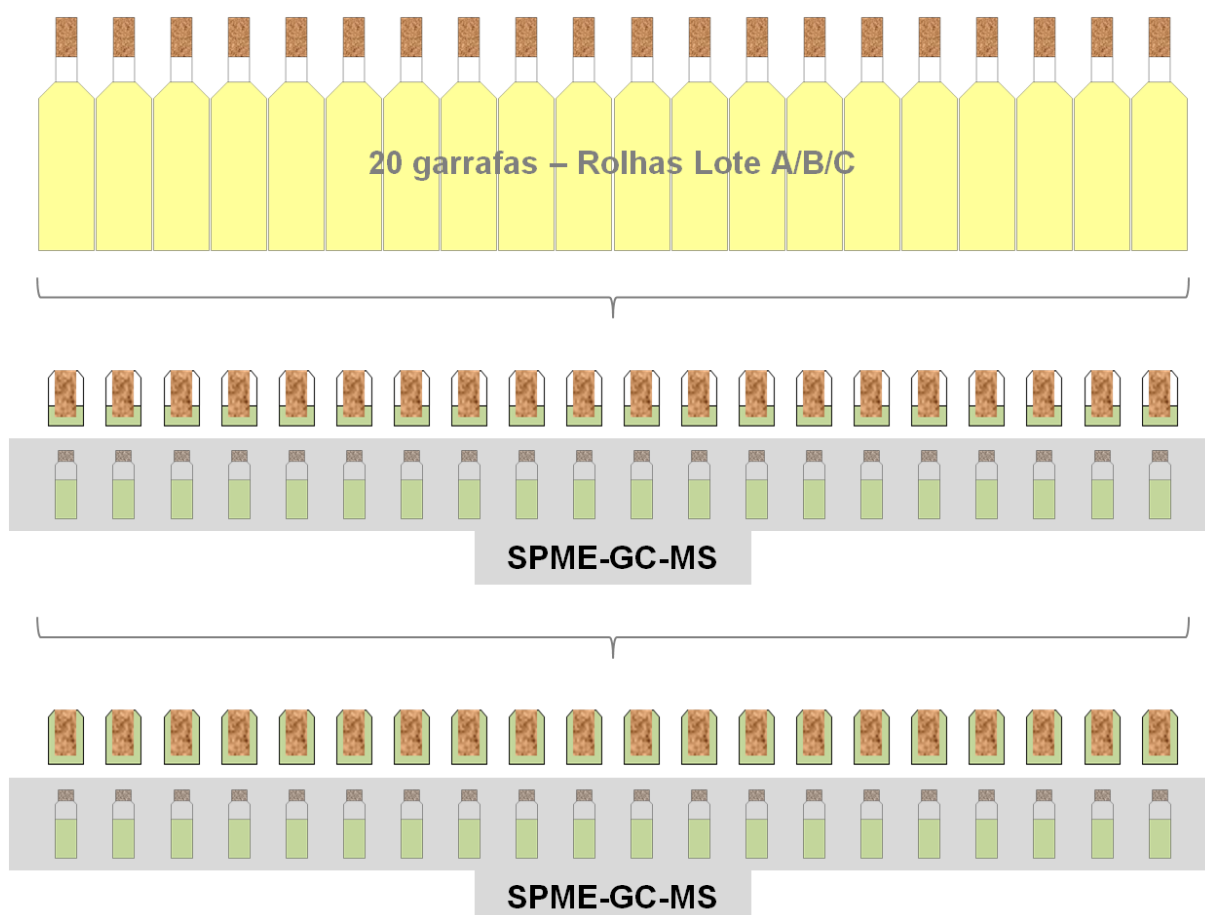


Figura 3.3 – Representação esquemática do procedimento de análise de 2,4,6-TCA nas rolhas de cortiça microaglomeradas dos diferentes lotes, após 1 e 3 meses de conservação.

✓ Vinho

A contaminação com 2,4,6-TCA foi analisada nas 60 amostras de vinho através de SPME-GC/MS seguindo o procedimento descrito no apêndice II (Figura 3.4).

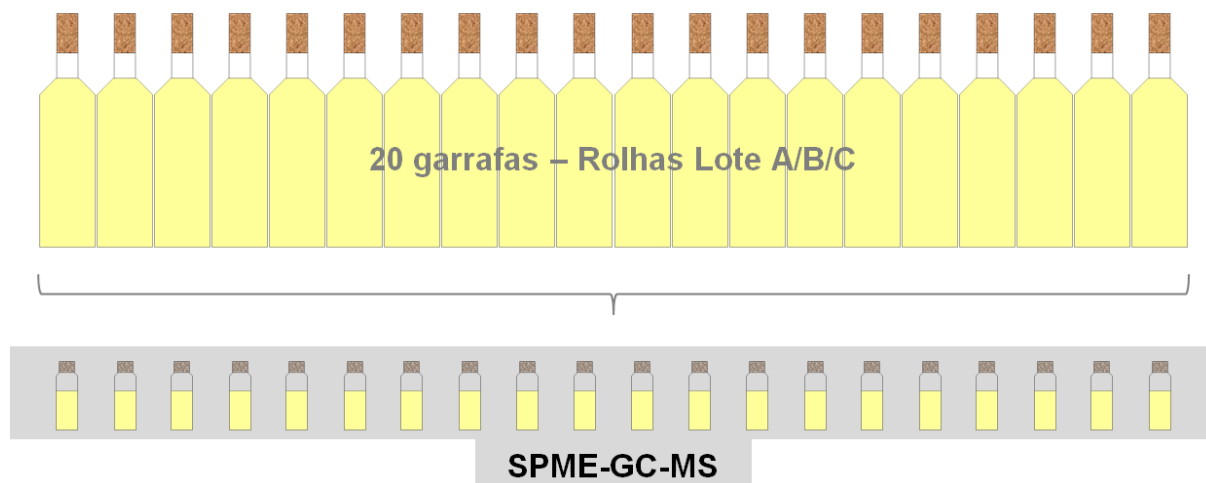


Figura 3.4 – Representação esquemática do procedimento de análise de 2,4,6-TCA no vinho branco, vedado com rolhas de cortiça microaglomeradas dos diferentes lotes, após 1 e 3 meses de conservação.

3.1.4. Tratamento dos resultados

Os resultados foram sujeitos a análise estatística, usando uma aplicação informática baseada no *Microsoft Office Excel*, o *XLSTAT – Statistical Software*. Neste programa realizaram-se testes de correlação e a análise de variância (ANOVA).

3.2. Estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS

3.2.1. Condições operatórias gerais

O desenvolvimento do método de análise de MDMP foi baseado no trabalho de Boutou e Chatonnet de 2006. As condições utilizadas foram um GC/MS (QP2010 Plus Shimadzu) equipado com um Auto-Sampler Multipurpose (MPS2) da Gerstel a operar em modo SPME com uma fibra de Divinilbenzeno /Carboxeno/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 50/30 μm . As amostras foram incubadas durante 3 min e extraídas durante 60 min, a 45 °C e 250 rpm de agitação. A dessorção da fibra no injetor foi realizada a 270 °C durante 5 min em modo splitless passando depois para modo split com uma razão de 15. Os compostos foram separados numa coluna capilar da Restek RTX®-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). O gás de arraste foi o hélio, a uma velocidade linear de 45 cm/s

(fluxo 1,5 mL/min). O programa de temperaturas começou a 50 °C durante 2 min. A temperatura foi depois aumentada para 190 °C, a 3 °C/min, e finalmente para 320 °C a, 50 °C/min, temperatura na qual se manteve durante mais 1 min. O GC/MS funciona no modo de ionização electrónica com monitorização selectiva de iões (SIM). As temperaturas da interface e da fonte iónica foram 280 e 230 °C, respectivamente. No apêndice III encontra-se a descrição do método com mais detalhe.

Os iões característicos do MDMP são o 138, 137, 120 e 109 m/z. Como padrão interno (PI) foi, inicialmente, utilizado 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina-d₃ (MDMP-d₃) (sintetizado pelo Australian Wine Research Institute (AWRI)) que tem os seguintes iões característicos: 141, 112, 123 e 140 m/z. Numa fase posterior, passou-se a utilizar 2-Isopropil-3-metoxipirazina-d₃ (IPMP-d₃) que tem os seguintes iões característicos: 140, 155, 127, 141, 112 m/z. Independentemente de cada análise, a cada tubo de cromatografia de 20 mL com ±3 g de cloreto de sódio (NaCl), adiciona-se 5 mL de água; 5 mL de solução etanólica 6% (v/v); 100 µL de PI (MDMP-d₃ de concentração 2 µg/L ou IPMP-d₃ de concentração 5 µg/L) e a concentração de MDMP a analisar. Para além disso, utilizaram-se padrões de controlo de concentração conhecida de MDMP (5 ng/L).

3.2.2. Fases de implementação

• 1ª Fase

Inicialmente para implementação do método referido, foi necessário verificar se o equipamento conseguia detectar MDMP e verificar qual o seu tempo de retenção e ião de quantificação. Para isso, foram analisadas quantidades elevadas de MDMP (500 e 1000 ng/L), usando como PI MDMP-d₃. Posteriormente, de forma a quantificar devidamente o MDMP foi necessário realizar rectas de calibração para a gama de trabalho seleccionada (0 a 20 ng/L), a qual foi escolhida com base na literatura existente sobre a contaminação de vinhos através de rolhas de cortiça com MDMP e sobre métodos de análise desse composto, tendo em consideração o limite de detecção sensorial do mesmo no vinho (2,1 ng/L) (Boutou e Chatonnet (2006)).

• 2ª Fase

Em função dos resultados obtidos com o procedimento anterior, numa segunda fase, foi necessário testar algumas alterações ao método, tais como:

- Procurar novos iões de quantificação para MDMP;
- Aumentar a gama de trabalho de MDMP de 0 a 20 ng/L para 0 a 50 ng/L;
- Testar a utilização de NaCl pró-análise (PA), em vez do NaCl comum.

• 3ª Fase

Com os resultados obtidos através das alterações ao método e após uma pesquisa mais alargada, passou-se a utilizar o IPMP-d₃ como PI e uma gama de trabalho mais alargada (0 a 50 ng/L). Com a realização das rectas de calibração, foram calculados os limites de quantificação e detecção de MDMP com base na Guia Relacre 13 – Validação de Métodos Analíticos Internos em Análise Química (Relacre, 2000).

• 4ª Fase

Através dos resultados obtidos com o procedimento anteriormente referido, tentou-se ajustar a matriz utilizada (solução etanólica 6 % (v/v)), a um pH neutro e básico, respectivamente, 7 e 12. Posteriormente, voltou-se a calibrar e a calcular os limites de detecção e quantificação de MDMP, seguindo o procedimento anterior referido.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados e respectiva discussão, dos dois temas que foram alvo de estudo, ou seja, estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir de rolhas de cortiça microaglomeradas e estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS.

4.1. Estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça microaglomerada

Neste ponto estão apresentados os resultados e respectiva discussão das análises relativas à quantificação do 2,4,6-TCA presente no vinho e nas rolhas de cortiça, após 1 e 3 meses do engarrafamento.

4.1.1. Concentração de 2,4,6-TCA presente no vinho e nas rolhas de cortiça

• Vinho

Após o 1º mês de engarrafamento, verificou-se que 60% dos vinhos vedados com rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L e que os restantes 40% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável, isto é abaixo de 0,5 ng/L. Relativamente aos vinhos vedados com rolhas do lote B, apenas 10% apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, sendo que os restantes 90% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. No que diz respeito aos vinhos vedados com rolhas do lote C, todos estes apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Concentração de 2,4,6-TCA no vinho após 1 e 3 meses de engarrafamento.

[TCA] (ng/L)	ROLHAS LOTE A				ROLHAS LOTE B				ROLHAS LOTE C			
	1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS	
	Nº Vinhos	%	Nº Vinhos	%	Nº Vinhos	%	Nº Vinhos	%	Nº Vinhos	%	Nº Vinhos	%
< 0,5	8	40	13	65	18	90	20	100	20	100	20	100
0,5 – 0,9	12	60	7	35	2	10	0	0	0	0	0	0
1,0 – 1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
≥ 1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após o 3º mês de engarrafamento, observou-se que 35% dos vinhos vedados com rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L e que os restantes 65% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Quanto aos vinhos vedados com rolhas dos lotes B e C, apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável (Quadro 4.1).

Pode dizer-se que os graus de contaminação dos vinhos engarrafados no final do primeiro e terceiro mês são relativamente proporcionais aos graus de contaminação dos lotes de rolhas utilizados no ensaio, os quais foram avaliados quanto ao nível de 2,4,6-TCA antes do engarrafamento (ver quadro 3.1.); ou seja os vinhos engarrafados com as rolhas do lote A apresentaram valores de 2,4,6-TCA mais elevados em relação aos valores de 2,4,6-TCA dos vinhos engarrafados com as rolhas do lote B e lote C. No entanto, este tipo de relação não se verificou para os vinhos engarrafados com as rolhas do lote B, após 3 meses de engarrafamento.

• **Rolha parcial (topo da rolha em contacto com o vinho)**

Após o 1º mês de engarrafamento, verificou-se que 100% das rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L. Relativamente às rolhas do lote B, observou-se que apenas 10% das rolhas apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, sendo que os restantes 90% de rolhas apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Quanto às rolhas do lote C, apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável (Quadro 4.2).

Quadro 4.2 – Resultados de 2,4,6-TCA na rolha parcial após 1 e 3 meses de engarrafamento.

[TCA] (ng/L)	ROLHAS LOTE A				ROLHAS LOTE B				ROLHAS LOTE C			
	1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS	
	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%
< 0,5	0	0	4	20	18	90	18	90	20	100	20	100
0,5 – 0,9	20	100	13	65	2	10	2	10	0	0	0	0
1,0 – 1,4	0	0	3	15	0	0	0	0	0	0	0	0
≥ 1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após o 3º mês de engarrafamento, verificou-se que 65% das rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, que 15% apresentaram 2,4,6-TCA entre 1,0 e 1,5 ng/L e que os restantes 20% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Relativamente às rolhas do lote B, apenas 10% apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, sendo que os restantes 90% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Quanto às rolhas do lote C, apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável (Quadro 4.2).

Pode dizer-se que os graus de contaminação relativos ao topo da rolha que esteve em contacto com o vinho no final do primeiro e no terceiro mês são relativamente proporcionais aos graus de contaminação dos lotes de rolhas utilizados no ensaio, os quais foram avaliados quanto ao nível de 2,4,6-TCA antes do engarrafamento (ver quadro 3.1.); ou seja os macerados das rolhas do lote A apresentaram valores de 2,4,6-TCA mais elevados em relação aos valores de 2,4,6-TCA dos macerados das rolhas do lote B e lote C.

• **Rolha total (toda a superfície da rolha)**

Após o 1º mês de engarrafamento, verificou-se que 60% das rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L e que os restantes 40% de rolhas apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Relativamente às rolhas do lote B, apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. No que diz respeito às rolhas do lote C, apenas 5% apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, sendo que os restantes 95% de rolhas apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável (Quadro 4.3).

Quadro 4.3 – Resultados de 2,4,6-TCA na rolha total após 1 e 3 meses de engarrafamento.

[TCA] (ng/L)	ROLHAS LOTE A				ROLHAS LOTE B				ROLHAS LOTE C			
	1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS		1º MÊS		3º MÊS	
	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%	Nº Rolhas	%
< 0,5	8	40	13	65	20	100	16	80	19	95	20	100
0,5 – 0,9	12	60	7	35	0	0	4	20	1	5	0	0
1,0 – 1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
≥ 1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após o 3º mês de engarrafamento, verificou-se que 35% das rolhas do lote A apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L e que os restantes 65% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Relativamente às rolhas do lote B, apenas 20% apresentaram 2,4,6-TCA entre 0,5 e 1,0 ng/L, sendo que os restantes 80% apresentaram 2,4,6-TCA não quantificável. Quanto às rolhas do lote C, não apresentaram 2,4,6-TCA (Quadro 4.3).

O grau de contaminação relativo a toda a superfície das rolhas em contacto com o vinho é relativamente proporcional ao grau de contaminação dos lotes de rolhas utilizados no ensaio, os quais foram avaliados quanto ao nível de 2,4,6-TCA antes do engarrafamento (ver quadro 3.1.); ou seja os macerados das rolhas do lote A apresentaram valores de 2,4,6-TCA mais elevados em relação aos valores de 2,4,6-TCA dos macerados das rolhas do lote B e lote C. No entanto, este tipo de relação não se verificou para as rolhas do lote B, após 1 mês de engarrafamento.

4.1.2. Cinética de migração de 2,4,6-TCA

Através da cinética de migração é possível verificar que a contaminação do vinho acontece de forma relativamente rápida até atingir um mês de engarrafamento. A contaminação a partir do primeiro mês de engarrafamento tende a diminuir/estabilizar ao longo do tempo (Figura 4.1). Tal situação pode ocorrer devido ao facto de o 2,4,6-TCA libertável atingir o equilíbrio com o vinho. É de salientar que estes resultados correspondem à cinética de migração de 2,4,6-TCA até aos 3 meses de engarrafamento, e que o ensaio vai continuar até 12 meses de engarrafamento.

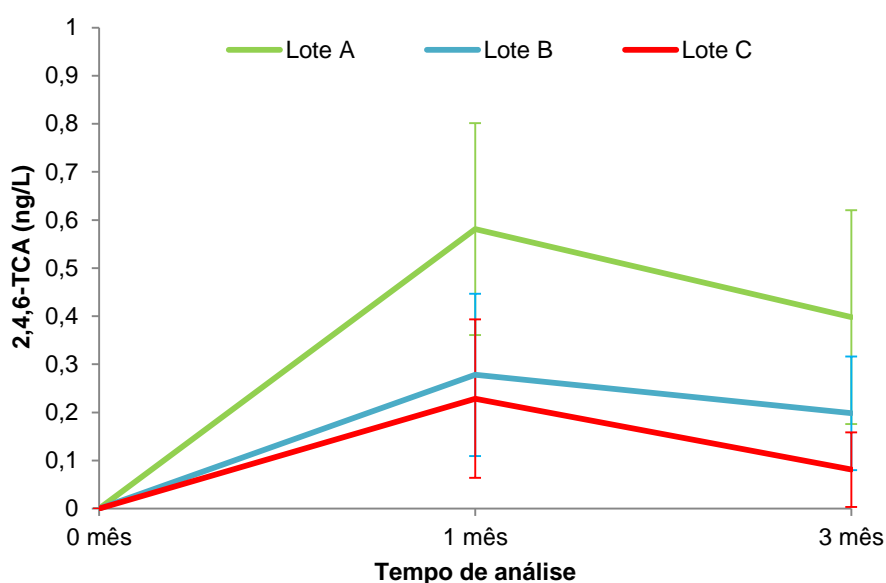


Figura 4.1 – Evolução da concentração de 2,4,6-TCA no vinho ao longo do tempo de conservação.

4.1.3. Estudo estatístico

Considerando a correlação global, os resultados obtidos mostraram que existe uma correlação linear significativa entre o 2,4,6-TCA analisado no vinho e na parte das rolhas que estiveram em contacto com o vinho (rolha parcial), tanto para o primeiro ($R^2 = 0,4210$) como para o terceiro ($R^2 = 0,5967$) mês de engarrafamento (Figura 4.2 e 4.3).

Relativamente às correlações globais entre rolha total e o vinho (Figuras 4.4 e 4.5) e entre rolha parcial e a total (Figuras 4.6 e 4.7), estas são bastante inferiores tanto para o primeiro mês ($R^2=0,3177$; $R^2=0,2005$, respectivamente), como para o terceiro mês ($R^2 = 0,3517$; $R^2 = 0,2565$, respectivamente) de engarrafamento.

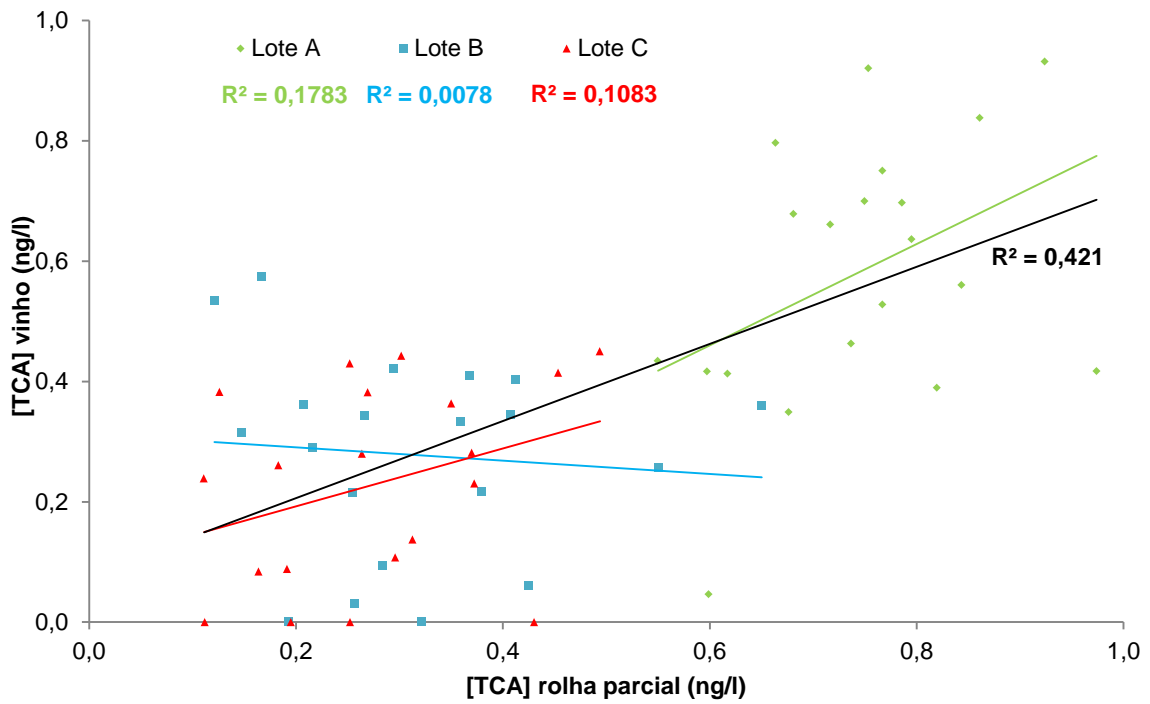


Figura 4.2 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA no vinho e rolha parcial após 1 mês de engarrafamento.

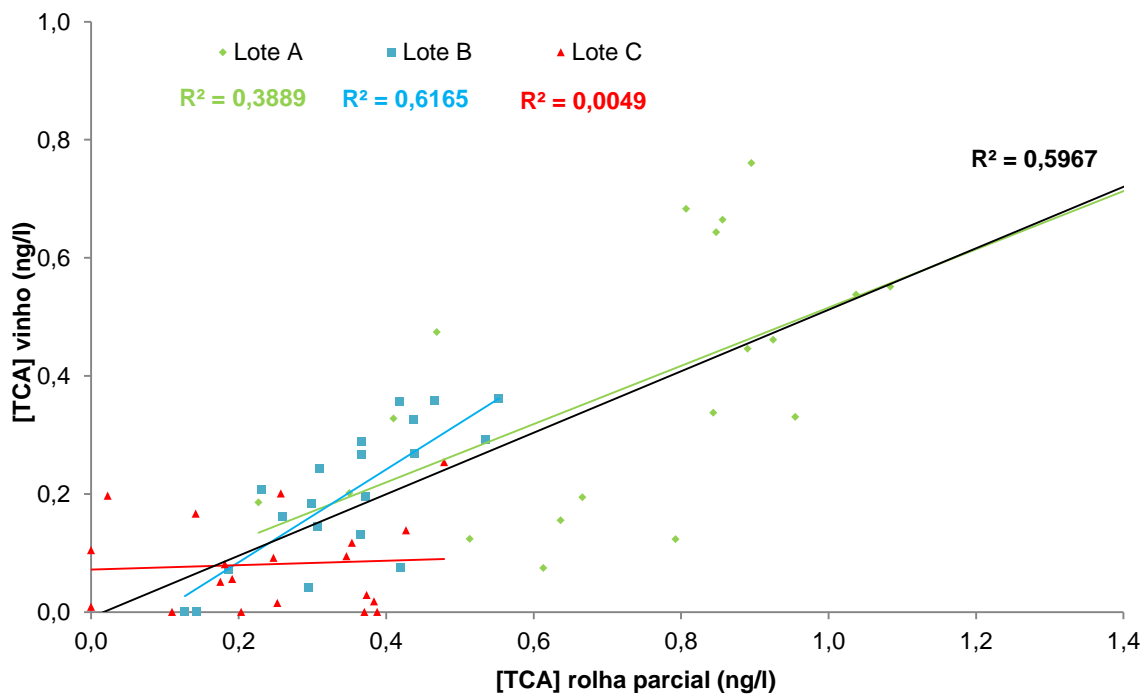


Figura 4.3 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA no vinho e rolha parcial após 3 meses de engarrafamento.

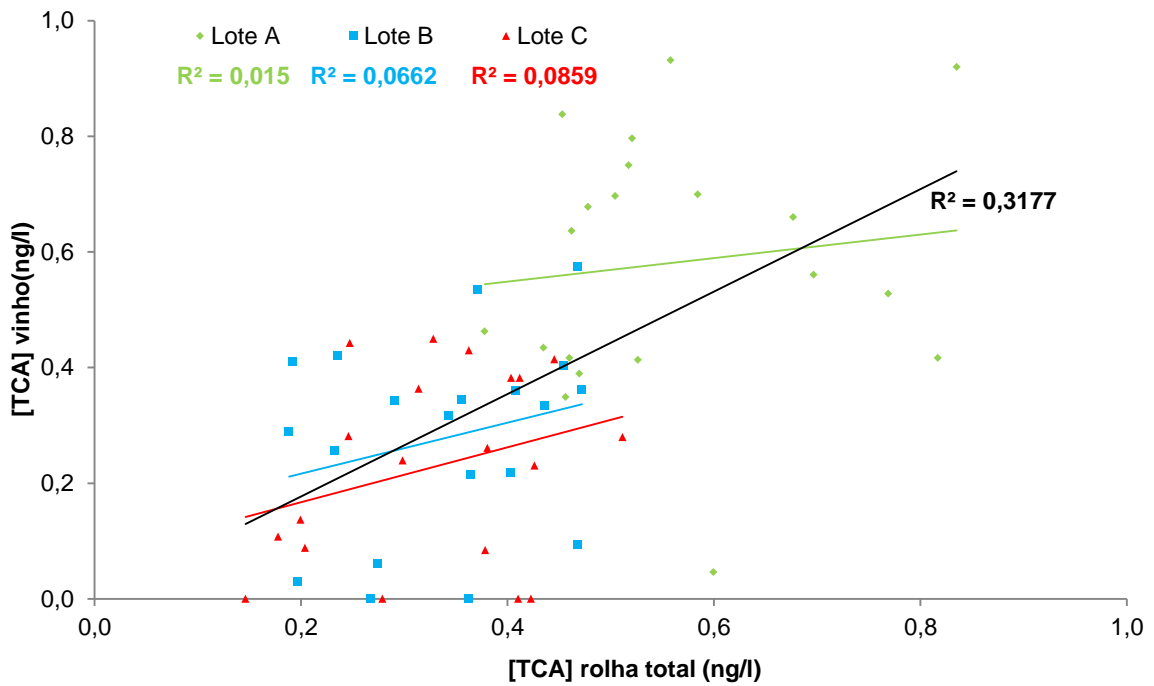


Figura 4.4 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA no vinho e rolha total após 1 mês de engarrafamento.

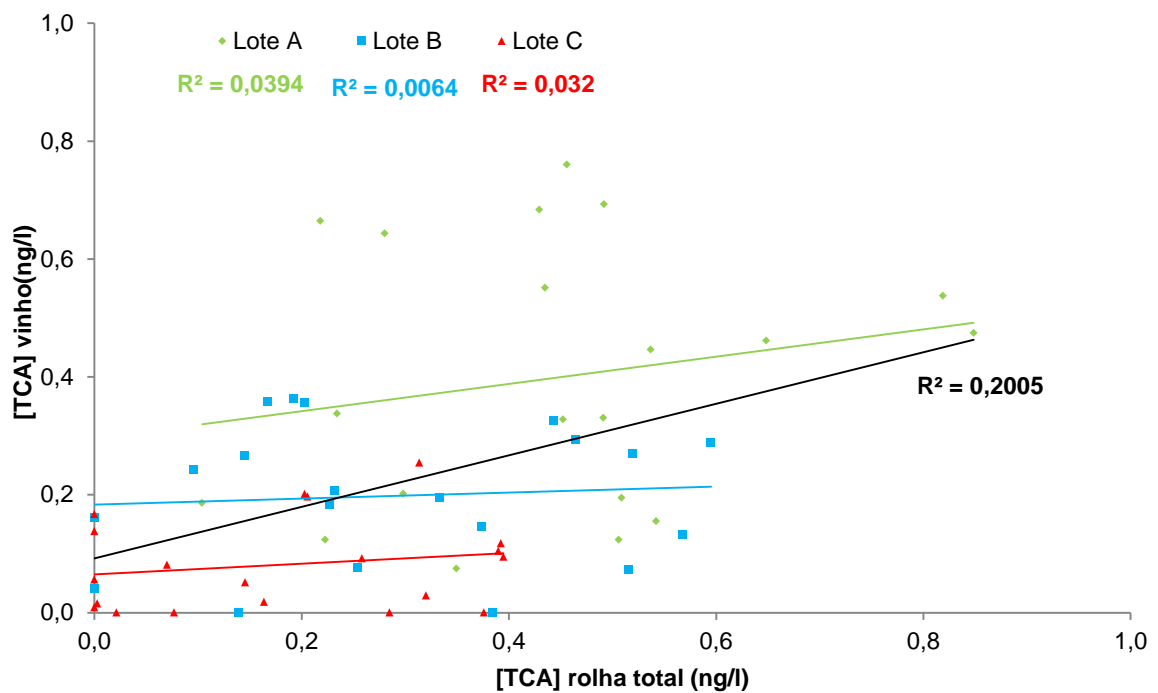


Figura 4.5 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA no vinho e rolha total após 3 meses de engarrafamento.

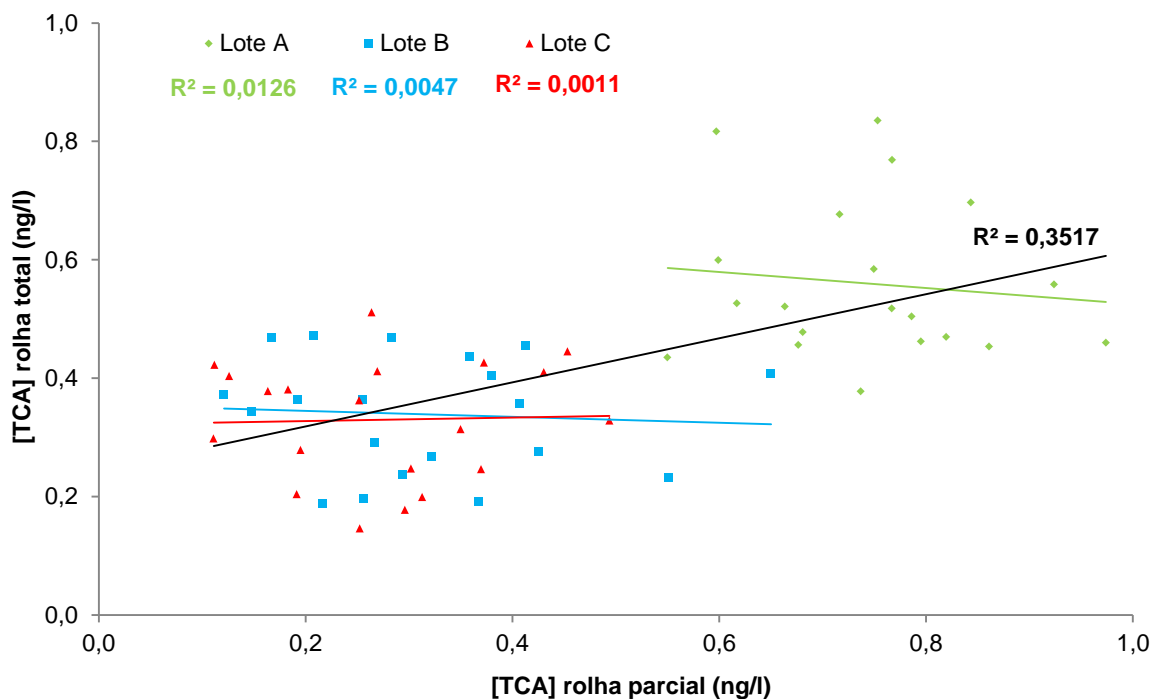


Figura 4.6 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA na rolha total e rolha parcial após 1 mês de engarrafamento.

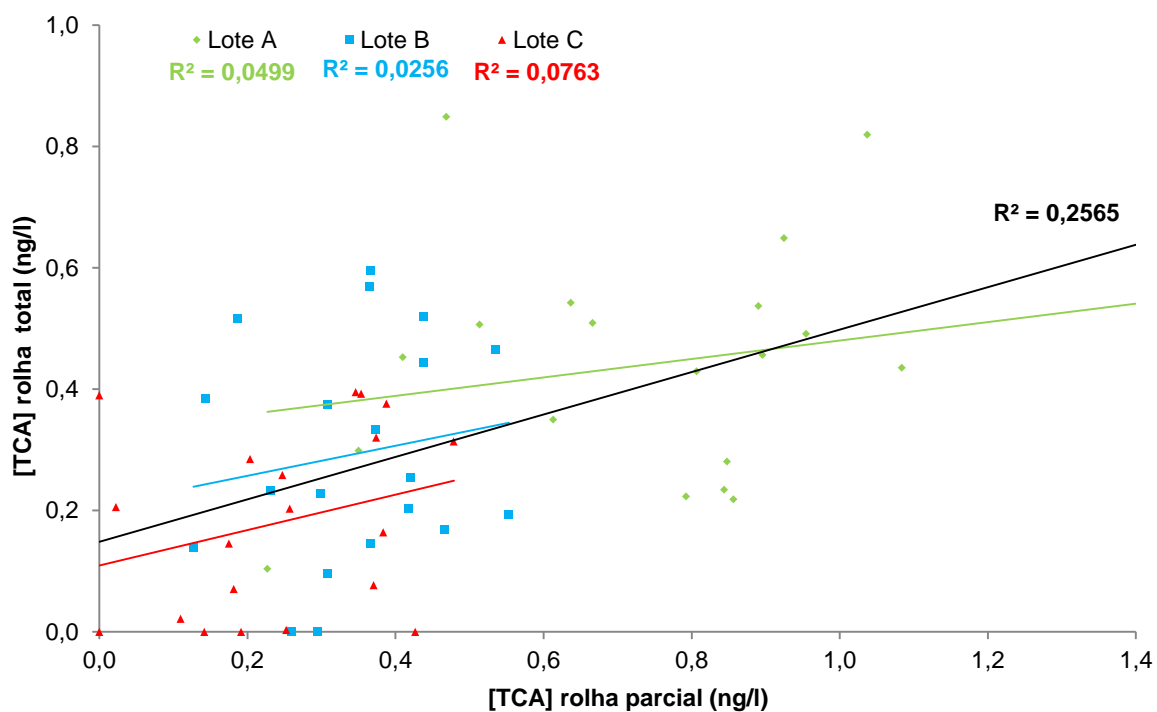


Figura 4.7 – Correlação entre os resultados de 2,4,6-TCA na rolha total e rolha parcial após 3 meses de engarrafamento.

A ANOVA realizada aos resultados obtidos mostrou que para um nível de significância de 0,05 existem diferenças significativas entre os diferentes lotes (A,B e C); contudo, as diferenças entre o primeiro e o terceiro mês não são significativas.

De forma a confirmar os resultados obtidos pelo Laboratório ETS, no estudo do I&D optou-se por utilizar rolhas de cortiça técnicas, as quais, devido ao processo industrial que sofrem, possuem uma contaminação com 2,4,6-TCA homogénea em toda a parte da rolha; e uma vez que a contaminação do vinho pela rolha de cortiça só acontece quando a superfície da rolha está contaminada, optou-se por fazer, também, a maceração somente dessa parte.

Através dos resultados obtidos, pode dizer-se que a correlação é mais significativa quando se considera a correlação global para cada situação, em vez das correlações obtidas por lote de rolha. Pode verificar-se também que a correlação mais elevada foi observada entre o 2,4,6-TCA no vinho e o 2,4,6-TCA na parte da rolha que esteve em contacto com o vinho (rolha parcial). Este resultado vai de encontro à bibliografia existente, a qual refere que só quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto directo com o vinho (ou com a câmara de ar acima do vinho), se dá a transferência de 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça para o vinho (Amon e Simpson 1986, Capone et al. 1999).

A correlação global obtida entre o 2,4,6-TCA analisado no vinho e na maceração total da rolha total, não está de acordo com os resultados obtidos através do estudo efectuado pelo Laboratório ETS, o qual obteve um coeficiente de correlação muito significativo entre o 2,4,6-TCA analisado no vinho e na rolha total. As rolhas que foram utilizadas no estudo do Laboratório ETS são de cortiça natural e foram sujeitas, individualmente, ao processo de maceração em toda a sua superfície. As rolhas de cortiça naturais não estão contaminadas com 2,4,6-TCA de forma homogénea em toda a sua superfície, portanto ao realizar-se esta maceração o 2,4,6-TCA localizado em determinado local irá distribuir-se por toda a superfície da rolha, inclusive pelos topos das rolhas, tornando desta forma uma rolha virtualmente sem potencial de contaminação do vinho numa rolha passível de contamina-lo. Isto quer dizer que a metodologia utilizada por Hervé *et al.*, 1999 poderá ter causado o enviesamento dos resultados finais. Ora, ao utilizarem-se rolhas técnicas (em vez de rolhas naturais), a probabilidade de haver enviesamento dos resultados é quase nula, uma vez que devido ao processo industrial que sofrem, possuem uma contaminação com 2,4,6-TCA homogénea em todas as partes. Portanto ao realizar-se a maceração neste tipo de rolha, a probabilidade de a tornar numa rolha virtualmente sem potencial de contaminação do vinho numa rolha passível de contamina-lo é quase nula.

4.2. Estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS

Neste ponto estão apresentados, de uma forma muito sucinta, os resultados e respectiva discussão das fases de implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC/MS.

• 1ª Fase

O MDMP, bem como o PI inicialmente utilizado (MDMP-d₃), foram detectados pelo GC/MS utilizando o método implementado. Os iões seleccionados para quantificação foram o 138 m/z e o 112 m/z para MDMP e MDMP-d₃, respectivamente. Os tempos de retenção foram 11,30 min e 11,10 min para MDMP e MDMP-d₃, respectivamente.

Foram encontradas algumas dificuldades para obter a curva de na gama de trabalho seleccionada (0 a 20 ng/L) (Figura 4.8). A utilização do padrão interno MDMP-d₃, com características semelhantes ao composto, interferiu negativamente no desenvolvimento do método, uma vez que os pontos iniciais das rectas de calibração apresentavam uma área de MDMP bastante elevada. Uma vez que o PI (MDMP-d₃) foi sintetizado a partir do MDMP, suspeitou-se que possivelmente não teria sido consumido totalmente durante a síntese. Outra hipótese é que o MDMP-d₃ ao longo do tempo pode-se ir degradando porque se trata de um composto relativamente instável.

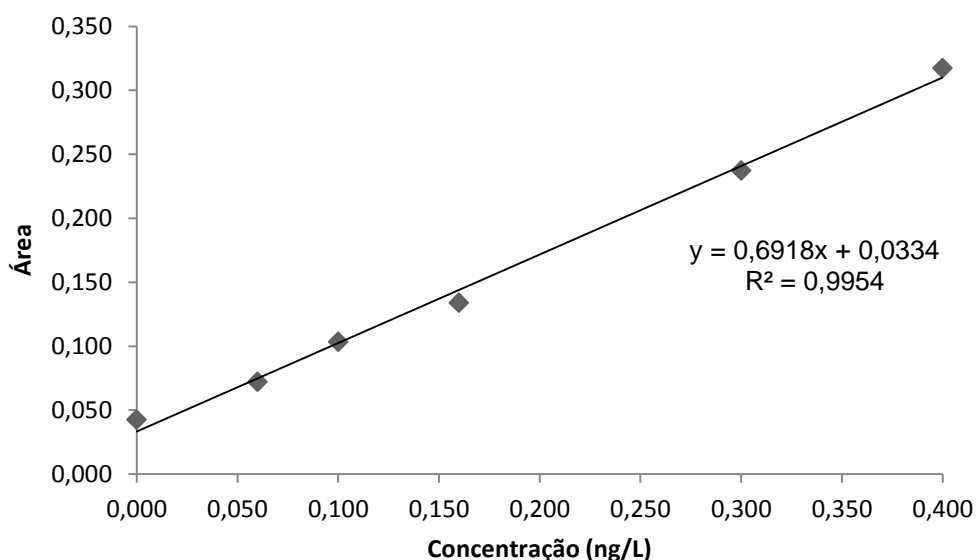


Figura 4.8 – Curva de calibração do MDMP, em solução etanólica (6% etanol v/v), para uma gama de concentrações de 0 a 20 ng/L.

• 2ª Fase

Após várias tentativas de calibração, com as alterações realizadas ao método, estas não foram suficientes para calibrar corretamente o método. Isto é, não foram encontrados novos iões de quantificação de MDMP; a calibração do método com a gama de trabalho do composto MDMP de 0 a 50 ng/L não foi conseguida; e também não foi conseguida a calibração do método com a utilização de NaCl PA. Ao analisar o NaCl comum e o PA quanto ao teor de MDMP e MDMP-d₃, verificou-se que ambos apresentavam estes compostos na sua constituição (Figura 4.9), o que também prejudica a calibração do método de análise para o MDMP.

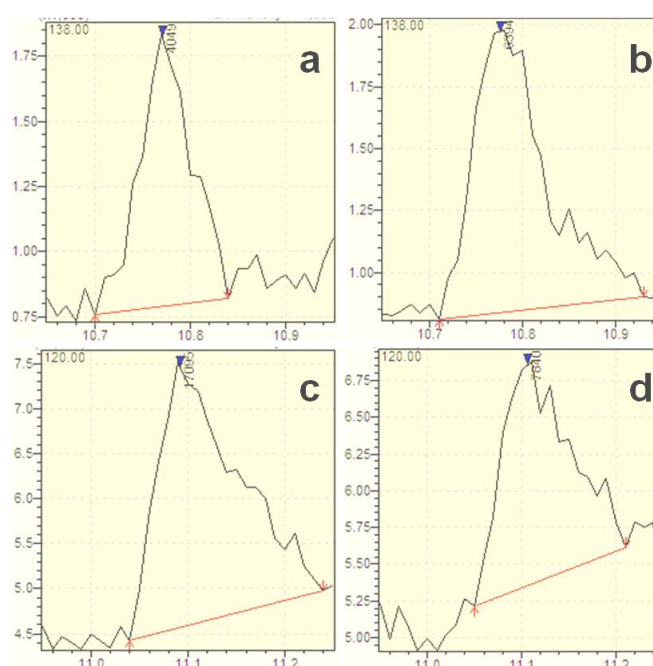


Figura 4.9 – Pico cromatográfico referente: a) MDMP-d₃ em NaCl comum, b) MDMP-d₃ em NaCl PA, c) MDMP em NaCl comum, d) MDMP em NaCl PA.

• 3ª Fase

Utilizando IPMP-d₃ como novo PI e utilizando uma gama de trabalho mais alargada (0 a 50 ng/L) foi possível fazer um curva de calibração para a MDMP ($R^2 > 0,995$). Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) de MDMP calculados foram de 10 e 3 ng/L, respectivamente.

Assim, durante a duração do estágio, as condições possíveis para a análise do composto MDMP foram as seguintes (Quadro 4.4):

Quadro 4.4 – Parâmetros da análise cromatográfica do MDMP.

Composto	PI	Calibração	Íão Quantificação (m/z)	Tempo Retenção (min.)	LQ (ng/L)	LD (ng/L)	NaCL
MDMP	IPMP-d ₃	Gama de 0 a 50 ng/L $y = 0,5910x + 0,0022$ em que, $y = \text{Área MDMP} / \text{Área IPMP-d}_3$ $x = [\text{MDMP}] / [\text{IPMP-d}_3]$	138 140 (PI)	11,6 13,2 (PI)	10	3	Comum

• **4ª Fase**

As rectas de calibração que resultaram da alteração do pH da matriz de análise para 7 e 12, foram rectas consistentes ($R^2 > 0,995$), para ambos os pH. No entanto o LQ e LD não reduziram de valor (10 e 3 ng/L, respectivamente).

Pode dizer-se que as condições para análise de MDMP foram optimizadas. No entanto, o método não é suficiente sensível para atingir limites de quantificação próximos dos níveis de detecção sensorial deste composto em vinhos (2,1 ng/L). De forma a dar continuidade ao estudo de viabilidade da implementação e optimização da análise de MDMP por SPME-GC-MS será necessário sintetizar um PI idêntico à MDMP; aumentar a sensibilidade do método (alteração do sistema de detecção e/ou detector), uma vez que os picos apresentaram uma forma pouco consistente; modificar algumas das condições propostas por Boutou e Chatonnet (2006), uma vez que os resultados obtidos, não foram apropriados.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Ao longo do estágio procedeu-se ao estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir de rolhas de cortiça microaglomeradas. Ao fim de 3 meses, observou-se que os níveis de contaminação com 2,4,6-TCA dos vinhos eram idênticos aos encontrados na superfície da rolha em contacto com o vinho; esta contaminação ocorreu de forma relativamente rápida e não pareceu aumentar ao longo do tempo. Os níveis de contaminação com 2,4,6-TCA encontrados no vinho engarrafado são relativamente proporcionais aos níveis de contaminação com 2,4,6-TCA dos lotes de rolhas utilizados no ensaio, os quais foram avaliados antes do engarrafamento através de macerações de 10 rolhas.

No decorrer do estágio procedeu-se, também, ao estudo de viabilidade da implementação da análise de MDMP por SPME-GC/MS. O método de análise cromatográfico do composto referido foi otimizado; contudo, o limite de quantificação do composto é muito superior ao seu limite de deteção sensorial em vinho.

6. TRABALHO FUTURO

No que diz respeito ao estudo do mecanismo de contaminação do vinho com 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça microaglomerada, este foi projectado para 12 meses, contudo, dada a duração do estágio, não foi possível concluí-lo, sendo apenas possível realizar o primeiro e segundo ponto de análise. No entanto, reuniram-se todas as condições de modo a assegurar a continuidade do projecto por parte da empresa. A cinética de migração de 2,4,6-TCA no vinho foi realizada com níveis de contaminação muito baixos, pois os lotes de rolhas utilizados para este estudo apresentavam níveis de contaminação com 2,4,6-TCA muito baixos. Posteriormente, de forma a melhorar a cinética de migração de 2,4,6-TCA, poder-se-á repetir o estudo utilizando lotes de rolhas com níveis de contaminação mais elevados e bem acima dos limites de quantificação do método para este composto.

Quanto ao estudo de viabilidade da implementação do método de análise de MDMP por SPME-GC-MS, será necessário sintetizar um PI idêntico à MDMP; aumentar a sensibilidade do método (alteração do sistema de detecção e/ou detector), uma vez que os picos apresentaram uma forma pouco consistente; modificar algumas das condições propostas por Boutou e Chatonnet (2006), uma vez que os resultados obtidos, não foram apropriados.

7. OUTRAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Além da execução de trabalhos relativos ao relatório de estágio, participou-se igualmente em outras actividades, nomeadamente: nas análises de controlo de 2,4,6-TCA em produtos de cortiça; em testes para a optimização do método de análise de 2,4,6-TCA; no projecto de investigação relativo à absorção de cloroanisóis e clorofenóis por sobreiros através do solo.

7.1. Análises de controlo de 2,4,6-TCA em produtos de cortiça

O laboratório de I&D da A&I, para além de prestar apoio a projectos do departamento de I&D, recebe diariamente cerca de 600 amostras de macerados de produtos de cortiça de diferentes unidades industriais para serem analisadas para a detecção de 2,4,6-TCA. Estes macerados correspondem a lotes de rolhas naturais e técnicas, assim como, a granulados, discos, aparas e a corpos de rolha. Além disso, o laboratório de I&D da A&I efectua a análise de reclamações de 2,4,6-TCA em vinhos e rolhas, provenientes do mercado. Nestas actividades, prestou-se auxílio na preparação de todas as amostras para posterior análise por SPME-GC-MS; SPME-GC-MSMS e SPME-GC-ECD.

7.2. Testes para optimização do método de análise de 2,4,6-TCA

7.2.1. Análise de 2,4,6-TCA com solução etanólica e vinho a 6 e 12 %

Objectivo: verificar o efeito da solução de maceração (vinho ou solução etanólica a 12 %) e da diluição do teor alcoólico, 12 para 6 %, na concentração de 2,4,6-TCA.

Metodologia: inicialmente foram realizadas quatro rectas de calibração de 2,4,6-TCA para as soluções etanólicas a 6 e 12 % e para o vinho a 6 e 12 %. Posteriormente, seleccionaram-se 100 rolhas microaglomeradas com 2,4,6-TCA não detectável. Foram maceradas individualmente 50 rolhas com solução etanólica a 12 % e 50 rolhas com vinho. As soluções resultantes das macerações foram então analisadas directamente ou com diluição prévia, relativamente ao teor de 2,4,6-TCA por SPME-GC-MS, utilizando as quatro rectas de calibração realizadas anteriormente.

Principais resultados e conclusão: a solução de maceração não influencia significativamente os resultados de 2,4,6-TCA; isto é, macerar rolhas com vinho ou com solução etanólica a 12% é idêntico.

7.2.2. Análise de 2,4,6-TCA com soluções etanólicas a 12 ou 14 %

Objectivo: estudar o efeito do álcool, 12 ou 14 %, nas análises de 2,4,6-TCA.

Metodologia: inicialmente foram realizadas duas rectas de calibração de 2,4,6-TCA, uma recta para solução etanólica a 12 % e outra a 14 %. Posteriormente, seleccionaram-se rolhas naturais e microaglomeradas de diferentes lotes. Foram realizadas 20 macerações compostas de cada lote de rolhas com solução etanólica a 12 e a 14 %. As soluções resultantes das macerações foram analisadas por SPME-GC-MS, relativamente ao teor de 2,4,6-TCA, com utilização das duas rectas de calibração realizadas anteriormente.

Principais resultados e conclusão: as concentrações de 2,4,6-TCA nas rolhas cortiça são idênticas em ambas as soluções. Embora exista uma maior extracção de 2,4,6-TCA das rolhas com 14% durante a maceração, este aumento relativo é perdido em seguida durante a análise de SPME devido à menor volatilidade do 2,4,6-TCA que possui maior afinidade para o álcool comparativamente à fibra.

7.3. Projecto de investigação relativo à absorção de cloroanisóis e clorofenóis por sobreiros através do solo

Objectivo: estudar a absorção de d_5 -tricloroanisol (d_5 -TCA) e 3,5- d_2 -triclorofenol (3,5- d_2 -TCP) por sobreiros jovens através do solo.

Metodologia: foram contaminadas 41 plantas, adicionando à raiz 10 mL de d_5 -TCA e de 3,5- d_2 -TCP com concentrações de 0,1 mg/L. As restantes 9 plantas foram utilizadas como controlo e, como tal, não foram contaminadas com d_5 -TCA e 3,5- d_2 -TCP. Em cada período de tempo foram analisadas as quantidades de d_5 -TCA e 3,5- d_2 -TCP presentes na terra, na raiz, no tronco e na parte aérea das plantas (caule e folhas). Para analisar as diferentes partes das plantas utilizou-se o método de análise de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo optimizado por Malheiro (2010). Analisar em cada período de tempo 5 vasos pré-contaminados e 1 vaso referência.

Principais resultados e conclusão: o projecto tem a duração de 9 anos e apenas as análises a 1 e a 2 anos foram realizadas. Embora existam algumas evidências de migração de cloroanisóis e clorofenóis do solo para a planta, estas ainda não são conclusivas.

8. BIBLIOGRAFIA

- Amorim. 2003. "Processo Produtivo - Neutrocork®". Disponível: <http://www.amorimcork.com/> [data da consulta: 12/01/2012];
- Amorim. 2012. "Corticeira Amorim". Disponível: <http://www.amorim.pt/home.php> [data da consulta: 26/03/2012];
- APCOR. 2011. "Anuário 2011 APCOR". Disponível: <http://www.realcork.org/userfiles/File/Publicacoes/anuario2011.pdf> [data da consulta: 27/2/2012].
- APCOR. 2012. "A Cortiça". Disponível: <http://apcor.pt/artigo/o-que-e-cortica.htm> [data da consulta: 22/02/2012];
- Barker, D.A; Capone, D.L; Pollnitz, A.P; et al. 2001. "Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 40-46;
- Bates, J. 2010. A corking argument. *The IWSR Drinks Record*. June: 27-29;
- Bobé, A.; Carrère, M.; Balbusquier, C.; et al. 2012. Extraction de la MDMP par le CO₂ supercritique – Application au liege. *Revue des Cœnologues*. Janvier 2012 n° 142;
- Boutou, S.; Chatonnet, P. 2006. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141 (2007) 1-9;
- Buser, H.R.; Zanier, C. e Tanner, H. 1982. Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agr. Food Chem.*, 30, 359;
- Cabral, M.F. 2006. Cork product treatment system and apparatuses by extraction of compounds dragged in water vapour. Patente DE60306404;
- Capone, D.L.; Skouroumounis, G. K. ; Barker, D. A. ; et al. 1999. *Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5, 91-98;
- Capone, D.L.; Skouroumounis, G.K.; Sefton, M.A. 2002. Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 196-199;
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S.; et al. 2004. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1255-1262;
- Chatonnet, P.; Fleury, A.; Boutou, S. 2010. Origin and Incidence of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Compound with a "Fungal" and "Corky" Aroma Found in cork stoppers and oak chips in contact with wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;

- Coque, J.R.; Pérez, E.P.; Goswami, M.; et al. 2006. Contaminação do vinho por Haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis. APCOR – Associação Portuguesa de Cortiça. 1-60;
- Dahl, S.; Roseira, I.M.; Cabral, M.F. 2007. Dispositivo para a extracção de compostos voláteis por vaporização de água em rolhas de cortiça e/ou em peças de cortiça utilizadas na produção de rolhas. Patente PT103910;
- Darriet, P.; Pons, M; Henry, R.; et al. 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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3277-3282;
- Darriet, P; Pons, M; Lamy, S; et al. 2000. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4835-4838.
- Duncan, B.C.; Gibson, R.L; Obradovic, D. 1997. 2,4,6 - Trichloroanisole and Cork Production. *Wine Ind. J.*, 12, 180-184;
- Ferreira, J.M. 2000. Método de extracção sólido-líquido aplicado a produtos de cortiça. Patente EP1108507;
- Fortes, M.A.; Rosa, M.E.; Pereira, H. 2004. *A Cortiça*. 2ª Edição. Instituto Superior Técnico. Lisboa-Portugal;
- Hervé, E; Price, S; Burns, G; et al. 1999. "Chemical Analysis of TCA As a Quality Control Tool For Natural Corks". Disponível: <http://www.corkqc.com/currentresearch/CorkTaint/ETS%20CQC-SPME.pdf> [data da consulta: 13/03/2012];
- Howland, P.R., Pollnitz, A.P., Liacopoulos, D., et al. 1997. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 141-145.
- ISO 20752 (2007). Rolhas de cortiça - Determinação do 2, 4, 6-tricloroanisole (TCA) libertável. 1ª Edição;
- ISO 22308 (2005). Rolhas de cortiça - Análise sensorial. 1ª Edição;
- Lopes, P.; Marques, J.; Cabral, M.; et al. 2011. Permeation of d₅-2,4,6-trichloroanisol via vapor phase through different Closures into Wine Bottles. *Am. J. Enol. Vitic.* 62:2;
- Malheiro, A.I. 2011. [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]. 58. Disponível: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto;
- Marques, J.I. 2009. [Desenvolvimento de um método para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo]. 43. Disponível: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto;

- Pereira, C.S., Danesh, P., Marques, J.J.F., et al. 1999. O gosto a rolha em vinhos – estado actual dos conhecimentos. *Ciência Téc. Vitiv.*, 14 (2), 79-99;
- Pereira, P. 2012. [Novos métodos rápidos para a quantificação de 2,4,6 – Tricloroanisol]. 35. Disponível: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto;
- Poças, M. F.; Moreira, R. 2003. “Segurança Alimentar e Embalagem”. Disponível: http://www2.esb.ucp.pt/twt/embalagem/MyFiles/biblioteca/publicacoes/seg_alimentar.pdf [data da consulta: 24/03/2012];
- Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Liacopoulos, D., et al. 1996. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks., *Australian Journal of grape and wine Research*, 2, 184-190;
- RELACRE. 2000. Guia Relacre 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Portugal;
- Robertson, G. L. 2009. *Food packaging and shelf life: a practical guide*, 1ª Edição. CRC Press, Estados Unidos da América, 404;
- Saxby, M.J.; Reid, W.J. e Wragg, G.S. 1982. *Index of chemical taints*. Leatherhead Food.
- Sefton, M.A.; Simpson, R.F. 2005. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 226-240;
- Silva, S.P; Sabino, M.A; Fernandes, E.M; et al. 2005. Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews [OnLine]*, 50 (6) 345-365. Disponível: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/4005/1/0105.pdf> [data da consulta: 25/03/2012];
- Simpson, R.F.; Capone, D.L.; Sefton, M.A. 2004. Isolation and Identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (17) 5425-5430;
- Simpson, R.F.; Sefton, M.A. 2007. Origin and fate of 2,4,6-Trochloroanisole in cork bark and wine corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 106-116.

9. APÊNDICES

9.1. APÊNDICE I – Fluxograma de produção de rolhas microaglomeradas

Input: as aparas de cortiça utilizadas para a produção de rolhas microaglomeradas, provêm 100% da rabaneação e brocagem de lotes de cortiça.

Trituração: as aparas de cortiça são transformadas em grânulos de dimensão ~1 a 2 mm, que são utilizados na produção de rolhas microaglomeradas.

Sistema ROSA: sistema de eliminação de 2,4,6-TCA em grânulos de cortiça, baseado no princípio da destilação controlada de vapor.

Mistura: os grânulos de cortiça são misturados com um adesivo alimentar.

Moldação: os grânulos revestidos com o adesivo são compactados em moldes individuais sob temperaturas superiores a 100°C para a polimerização do adesivo e assim formar os corpos microaglomerados utilizados na produção de rolhas microaglomeradas.

Acabamentos mecânicos: as rolhas provenientes da moldagem são submetidas a uma operação que lhes confere a forma e dimensão finais.

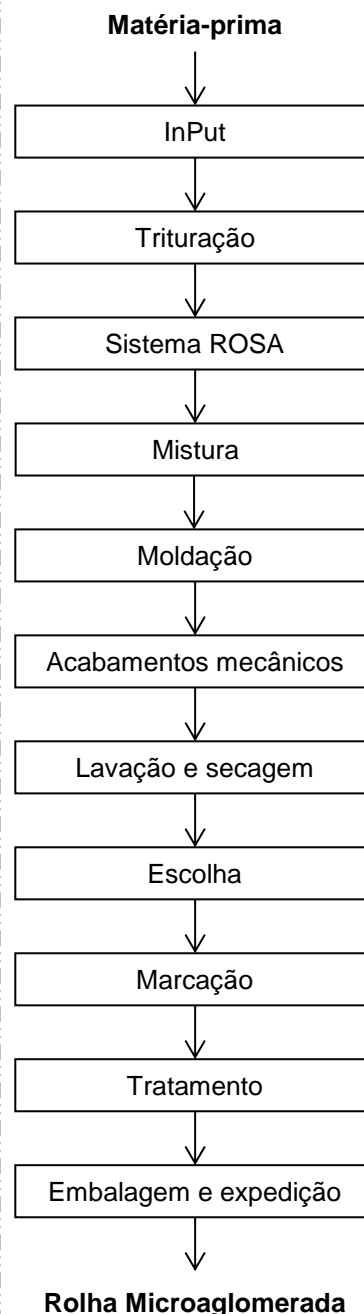
Lavação e secagem: as rolhas são lavadas com peróxido de hidrogénio (a diferentes concentrações) que desinfecta as rolhas e homogeneiza a sua superfície. É um procedimento fundamental na produção de rolhas para vinhos, porque é nesta fase que se alcança a estabilização química da cortiça. A secagem em estufas industriais, reduz o teor de humidade para valores especificados.

Escolha: operação de selecção visual, realizada por um operador, que retira os produtos que apresentem defeitos de aglomeração.

Marcação: é colocado, de acordo com a solicitação de cada cliente, gravuras e caracteres, marcados a tinta ou a fogo.

Tratamento: para dotar as rolhas de características que facilitem o seu engarrafamento e extracção, é realizado um revestimento de superfície. Neste processo são utilizados produtos aprovados para contacto com alimentos, de acordo com as normas internacionais.

Embalagem e expedição: terminado o processo de transformação da cortiça, as rolhas são acondicionadas em sacos fechados em vácuo onde é injectado dióxido de enxofre, que conserva o produto final e previne o aparecimento de fungos. Estes sacos são acondicionados em caixas e agrupados em armazém até à expedição (Amorim, 2003).



Rolha Microaglomerada

Esta rolha está posicionada como uma solução económica para assegurar uma vedação de vinhos para um consumo até 24 meses.

9.2. APÊNDICE II – Quantificação de 2,4,6-TCA por SPME-GC-MS em macerados de rolhas de cortiça ou em vinho

- **Equipamentos**

Amostrador automático com SPME (MPS2 Gerstel);

GC-MS (QP2010 Plus Shimadzu).

- **Modo operativo**

1) *Maceração das rolhas de cortiça*

Maceração composta: colocar num frasco de vidro, com capacidade para 500 mL, 10 rolhas de cortiça microaglomerada; perfazer o volume do mesmo com solução etanólica 12 % (v/v); cobrir o topo do frasco com papel de alumínio; fechar o frasco com a respectiva tampa e deixar a macerar durante 24 h à temperatura ambiente.

Maceração individual parcial (parte da rolha que esteve em contacto com o vinho): colocar num frasco de vidro, com capacidade para 60 mL, 20 mL de solução etanólica 12 % (v/v); preencher o interior da tampa do frasco com papel de alumínio; perfurar o centro da tampa com um pionés; prender a rolha à tampa através do pionés; fechar o frasco com a respectiva tampa e deixar a macerar durante 24 h à temperatura ambiente.

Maceração individual total (de toda a superfície da rolha): colocar num frasco de vidro, com capacidade para 60 mL, a rolha que se pretende analisar; perfazer o volume do mesmo com solução etanólica 12 % (v/v); cobrir o topo do frasco com papel de alumínio; fechar o frasco com a respectiva tampa e deixar a macerar durante 24 h à temperatura ambiente.

2) *Preparação da amostra a analisar*

Num tubo de cromatografia de 20 mL com ± 3 g de NaCl, adicionar 10 mL de amostra (solução da maceração ou vinho) e 100 μ L de padrão interno (d_5 -TCA de concentração 5 μ g/L); fechar o tubo de cromatografia com a respectiva rosca e agitar o mesmo para promover a mistura. Uma vez preparada a amostra, esta é colocada no suporte de amostras do amostrador automático.

3) *Incubação da amostra*

O tubo de cromatografia é colocado através do amostrador automático numa incubadora com uma velocidade de rotação de 250 rpm e uma temperatura de 55 °C, durante 3 min.

4) *Extracção da amostra*

A extracção (adsorção) dos contaminantes é realizada na zona do *headspace* do tubo de cromatografia com recurso a uma fibra de PDMS da Supelco (referência 57301) durante 8 min sob condições de temperatura e agitação idênticas ao processo de incubação.

5) *Injecção da amostra*

Após a extracção é realizada a injecção da fibra no injector, onde os compostos são desorvidos, durante 4 min, sendo transportados em seguida com um gás de arraste, hélio, a uma velocidade linear de 47 cm/s e fluxo de 1,61 mL/min. O injector encontra-se a uma temperatura de 270 °C e funciona em modo *splitless* durante 2 min passando depois a modo *split* com uma razão de 20.

6) *Separação dos compostos injectados*

Posteriormente, a separação cromatográfica dos compostos injectados é efectuada na coluna capilar da Bruker (referência BR86377; 30m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada no GC. O programa de temperaturas para a separação do composto 2,4,6-TCA encontra-se descrito na Figura 9.1.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0,00	90
11,50	205
14,00	280

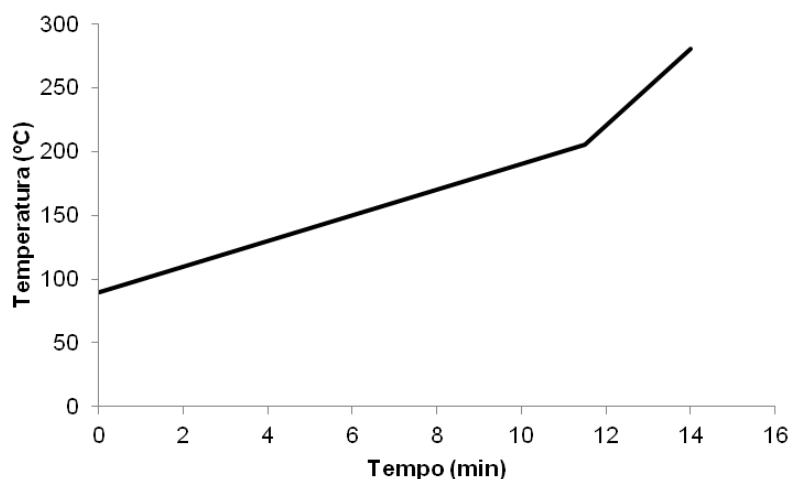


Figura 9.1 – Programa de temperaturas para a separação do 2,4,6-TCA.

7) Detecção dos compostos

A detecção dos compostos é realizada por uma fonte iónica a funcionar em modo de ionização electrónica com SIM. As temperaturas da fonte iónica e da interface coluna/fonte iónica são 230 e 280 °C, respectivamente. A quantificação dos compostos baseia-se na relação entre a área do analito e do padrão interno utilizando a curva de calibração do composto. As condições de detecção para o composto 2,4,6-TCA encontram-se no Quadro 9.1.

Quadro 9.1 – Parâmetros da análise cromatográfica do 2,4,6-TCA.

Composto	PI	Calibração	Ião Quantificação (m/z)	Tempo Retenção (min)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)
2,4,6-TCA	d ₅ -TCA	Gama de 0 a 20 ng/L $y = 0,8866x + 0,0056$ em que, $y = \text{Área } 2,4,6\text{-TCA} / \text{Área } d_5\text{-TCA}$ $x = [2,4,6\text{-TCA}] / [d_5\text{-TCA}]$	210 215 (PI)	5,8 5,8 (PI)	0,5	0,2

• Controlo de qualidade da análise

O laboratório de I&D da A&I, recebe diariamente cerca de 600 amostras de macerados de produtos de cortiça de diferentes unidades industriais para serem analisadas quanto à contaminação de 2,4,6-TCA, por SPME-GC-MS; SPME-GC-MSMS e SPME-GC-ECD. A análise de 2,4,6-TCA é acompanhada por um controlo da qualidade rigoroso. Este consiste em controlar a análise com padrões de controlo e comparar estes com os limites da carta de controlo. Adicionalmente realizam-se ensaios interlaboratoriais (externos e internos).

A utilização de padrões de controlo, consiste, numa primeira fase, em iniciar a análise de amostras em série com um padrão de concentração conhecida (2 ng/L) de 2,4,6-TCA, e comparar o resultado da leitura do mesmo com os limites da carta de controlo do equipamento a ser utilizado. Estando o resultado dentro dos limites, a análise em série de amostras prossegue. Caso o resultado não esteja dentro desses limites, faz-se a manutenção do equipamento, e repete-se o procedimento anteriormente referido. Se o resultado mesmo assim não estiver dentro dos limites da carta de controlo, procede-se à execução de uma nova recta de calibração para o 2,4,6-TCA e repete-se o procedimento mencionado anteriormente. Numa segunda fase, de forma a controlar o decorrer do processo de análise de amostras em série, também se recorre aos padrões de controlo, colocando um padrão de controlo de 10 em 10 amostras. Este tipo de controlo permite a identificação do

momento em que a análise deixa de ser efectuada de forma correcta, permitindo somente a repetição da análise das amostras que foram lidas incorrectamente.

A A&I participa em 2 tipos de ensaios interlaboratoriais: 2 externos e 1 interno. O ensaio interno realiza-se quinzenalmente e consiste na preparação de macerados, realizada pelo laboratório de I&D da A&I, os quais são enviados para diferentes laboratórios para posterior análise ao 2,4,6-TCA. O ensaio externo, realiza-se bimensalmente e consiste na análise de 2,4,6-TCA, no I&D, de amostras de macerados preparadas por um laboratório externo. Os ensaios interlaboratoriais são realizados com o intuito de posteriormente se proceder à comparação estatística dos resultados obtidos entre laboratórios e dessa forma, verificar se há concordância dos mesmos. No quadro 9.2 encontra-se de forma esquemática o modo processual dos ensaios interlaboratoriais.

Quadro 9.2 – Processo de execução dos ensaios interlaboratoriais: interno e externo.

ENSAIO INTERNO	ENSAIO EXTERNO
I&D efectua três réplicas da amostra de macerado	Laboratório X efectua três réplicas da amostra de macerado
I&D envia o restante da amostra para o laboratório Y	Laboratório X envia o restante da amostra para o I&D
Laboratório Y efectua três réplicas da amostra	I&D efectua três réplicas da amostra
Cada laboratório analisa, quanto ao teor de 2,4,6-TCA, as suas três réplicas	Cada laboratório analisa, quanto ao teor de 2,4,6-TCA, as suas três réplicas
Laboratório Y envia o resultado das suas análises para o I&D	I&D envia o resultado das suas análises para o Laboratório X
I&D executa o tratamento estatístico (cálculo do z-score) de todos os resultados z-score < 2 = resultado satisfatório 2 > z-score > 3 = resultado satisfatório questionável z-score > 3 = resultado insatisfatório	Laboratório X executa o tratamento estatístico (cálculo do z-score) de todos os resultados z-score < 2 = resultado satisfatório 2 > z-score > 3 = resultado satisfatório questionável z-score > 3 = resultado insatisfatório
I&D envia um relatório para o laboratório Y	Laboratório X envia um relatório e síntese dos resultados para o I&D

9.3. APÊNDICE III – Quantificação de MDMP por SPME-GC-MS

- **Equipamentos**

Amostrador automático com SPME (MPS2 Gerstel);

GC-MS (QP2010 Plus Shimadzu).

- **Modo operatório**

- 1) *Incubação da amostra*

O tubo de cromatografia é colocado através do amostrador automático numa incubadora com uma velocidade de rotação de 250 rpm e uma temperatura de 45 °C, durante 3 min.

- 2) *Extracção da amostra*

A extracção (adsorção) dos contaminantes é realizada na zona do *headspace* do tubo de cromatografia com recurso a uma fibra de DVB/CAR/PDMS da Supelco (referência 57298-U) durante 60 min sob condições de temperatura e agitação idênticas ao processo de incubação.

- 3) *Injecção da amostra*

Após a extracção é realizada a injecção da fibra no injector, onde os compostos são desorvidos, durante 4 min, sendo transportados em seguida pelo hélio (gás de arraste), a uma velocidade linear de 45 cm/s e fluxo de 1,5 mL/min. O injector encontra-se a uma temperatura de 270 °C e funciona em modo *splitless* durante 5,9 min passando depois a modo *split* com uma razão de 15.

- 4) *Separação dos compostos injectados*

Posteriormente, a separação cromatográfica dos compostos injectados é efectuada na coluna capilar da Restek RTX-5MS (referência 12623; 30m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada no GC. O programa de temperaturas para a separação de MDMP encontra-se descrito na Figura 9.2.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
0,00	50
2,00	50
48,67	190
51,27	320
52,27	320

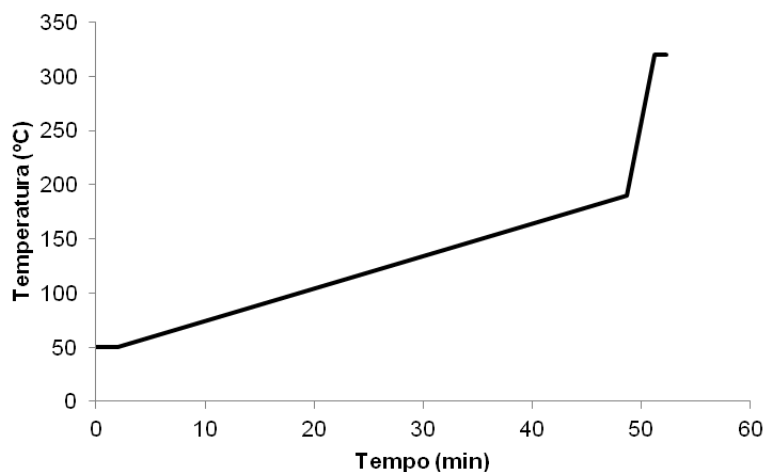


Figura 9.2 – Programa de temperaturas para a separação do MDMP.

5) *Detecção dos compostos*

A detecção dos compostos é realizada por uma fonte iónica a funcionar em modo de ionização electrónica com SIM. As temperaturas da fonte iónica e da interface coluna/fonte iónica são 230 e 280 °C, respectivamente. De forma a otimizar a detecção de MDMP é reforçada a voltagem com mais 200 V, 1 min antes e após a saída do composto. A quantificação dos compostos baseia-se na relação entre a área do analito e do padrão interno utilizando a curva de calibração do composto.