

INSTITUTO POLITÉCNICO DE COIMBRA
INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE COIMBRA

Trabalho realizado para a obtenção do grau de Mestre em

Autor

Orientação





Mestrado em Processos Químicos e Biológicos

Determinação de 2,4,6-tricloroanisol na água de cozedura da cortiça por voltametria

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em
Processos Químicos e Biológicos

Autor

Mónica Alexandra Nogueira Salavessa

Orientadores

Professora Doutora Ana Cristina Araújo Veloso

Professora do Departamento de Engenharia Química e Biológica
Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Professor Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro

Professor do Departamento de Engenharia Química e Biológica
Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, Junho, 2017

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King

Agradecimentos

A realização desta dissertação apenas foi possível graças à ajuda de diversas pessoas às quais gostaria de deixar as minhas palavras de agradecimento.

Aos meus orientadores, Doutora Ana Veloso e Doutor Luís Castro por todo o apoio e sugestões ao longo da realização deste trabalho.

Ao Doutor António Peres, pela ajuda e dicas imprescindíveis durante as situações mais complicadas do trabalho.

A todos os professores e funcionários do DEQB, que fizeram parte de toda a minha formação.

Aos meus pais, pela educação, força e oportunidades que me deram ao longo da vida, sem isso nunca seria possível chegar onde cheguei.

À minha irmã Beatriz, que apesar de muito diferentes, sei que posso contar sempre com o apoio dela de uma forma muito especial.

Ao meu namorado Tiago, pelo amor e apoio incondicional, pela paciência nos momentos mais críticos e por nunca me deixar desistir.

À minha avó Joaquina e restante família pelo carinho e compreensão ao longo de toda a minha vida.

À minha melhor amiga Rita por ter sido uma companheira de quarto fantástica e um apoio incansável.

A todos os amigos que fiz ao longo destes anos, tanto a nível de secundário como de ensino superior, em especial às minhas meninas da residência R3, que ficarão para sempre no meu coração.

A todos o meu sincero bem-haja.

Resumo

A cortiça é uma matéria-prima natural com grande importância para a indústria portuguesa. Os grandes aspetos que tornam este material tão atrativo são não só, o facto de este ser renovável e sustentável, mas também devido à sua estrutura alveolar que lhe atribuem características únicas, como a sua leveza. Grande parte da cortiça produzida pela indústria destina-se ao fabrico de vedantes para produtos vinícolas, tendo nos últimos anos vindo a perder popularidade, devido a problemas de contaminação. A situação mais comum e que causa maior prejuízo é o denominado de “gosto a rolha”, estando extremamente associado ao composto 2,4,6-tricloroanisol, mais conhecido por TCA.

O TCA é um metabolito fúngico com odor a mofo que se forma através da biometilação do 2,4,6-triclorofenol (TCP). Este haloanisol é quimicamente estável e não se degrada significativamente no tempo, sendo o seu limite sensorial na ordem dos 1,4-4,6 ppt.

Assim, torna-se de extrema importância conhecer e saber detetar haloanisóis, mais concretamente o TCA. Diversas técnicas têm vindo a ser desenvolvidas nos últimos anos, sendo a mais utilizada a cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa. Embora esta técnica consiga detetar TCA em concentrações bastante baixas, abarca várias desvantagens como a utilização de equipamento dispendioso e não portátil, a necessidade de pessoal técnico qualificado ou o elevado tempo na obtenção de resultados. Estas desvantagens, levaram à colocação da hipótese da voltametria como técnica de análise do TCA, pois permite a análise em pouco minutos, *in-situ* e de uma forma simples sem recorrer a grandes quantidades de solventes.

Este trabalho teve como objetivo validar um método de voltametria de onda quadrada para analisar TCA na água de cozedura da cortiça. Durante a determinação da curva de calibração obtiveram-se coeficientes de correlação satisfatórios (entre 79% e 94%). Os valores dos LD's e LQ's rondaram os $1,6 \times 10^{-5}$ ppt e $4,7 \times 10^{-5}$ ppt, respetivamente. Contudo, os resultados obtidos nos estudos de precisão e de exatidão do método indicam que esses valores não devem ser considerados.

Durante o trabalho de validação foram-se analisando alguns parâmetros que poderiam interferir nas análises ou que se poderiam otimizar. Dentro de vários aspetos, a limpeza dos eléctrodos e a temperatura da solução foram os que mostraram maior importância e que deveriam ser controlados.

Assim, pode-se concluir que a técnica de voltametria de onda quadrada não é a melhor técnica para a determinação de TCA na água de cozedura na forma como o método foi desenvolvido, apesar de segundo a bibliografia ser uma técnica bastante sensível (Souza, et al., 2002).

Palavras-chave: 2,4,6-tricloroanisol; voltametria de onda quadrada; cortiça.

Abstract

Cork is a natural raw material of great importance to the portuguese industry. The biggest aspects that make this raw material so attractive to the industry is not only the fact that its renewable and sustainable, but also because of its alveolar structure that gives unique characteristics to it, such as its lightness. A big part of the cork produced its destined to the production of seals for vinicular products, mostly cork stoppers, but losing popularity in the last years, due to contamination problems. The most common situation and the one that causes more financial loss its the called "Cork taint", being extremely associated with the compount 2,4,6-Trichloroanisole, also known as TCA.

The TCA is a fungal metabolite with a moldy aroma that is produced through the biomethylation of 2,4,6-trichlorophenol (TCP), This haloanisole is chemically stable and does not deteriorate significantly over time, being its sensory threshold in the order of 1,4-4,6 ppt.

So, it becomes of the extremely importance to know and know how to detect haloanisoles, more specifically the TCA. Several techniques have been developed over the last years, being the most used the gas chromatography by mass spectromery detection. Although this technique can detect TCA levels in extremely low concentrations, has several disadvantages such as the use of expensive and non-portable equipment, the need of highly qualified staff or the elevated time for obtaining results. This disadvantages led to the hypothesis of voltammetry as an analysis technique for detecting TCA levels, since it allows the analysis in few minutes, in situ and as a simple way without recurring to large amounts of solvents.

This thesis had as the main goal the validation of a method of square-wave voltammetry for determing TCA levels in the cork boiling water. During the determination of the calibration curve satisfactory correlation coefficients were obtained (between 79% and 94%). The values of DL's and QL's were between $1,6 \times 10^{-5}$ ppt and $4,7 \times 10^{-5}$ ppt. However, the results obtained in the studies of precision and accuracy of the method indicate that these values should not be considered.

During the validation work were analysed some parameters that could interfere in the analysis our that could optimized. In several aspects, electrodes cleaning and solution temperature were the were the most important and what should be controlled.

So, it can be concluded that the use of square-wave volammetry is not the best technique for determing TCA levels in the cork boiling water in the way the method was developed, althought according to the bibliography it is a very sensitive technique (Souza, et al., 2002).

Keywords: 2,4,6-trichloroanisole, square-wave volammetry, cork

Índice

1.	Introdução Geral.....	1
1.1.	Enquadramento do Tema e Motivação.....	1
1.2.	Objetivo.....	1
1.3.	Organização da Tese	2
2.	Enquadramento Teórico	3
2.1.	A cortiça: composição e propriedades	3
2.2.	A indústria corticeira.....	4
2.3.	TCA: o problema e a sua formação.....	5
2.4.	Técnicas de Análise.....	7
2.4.1.	Análise sensorial	7
2.4.2.	Determinação analítica de TCA.....	8
2.4.3.	Voltametria.....	11
2.4.3.1.	Voltametria de Onda Quadrada.....	13
3.	Material e Métodos.....	17
3.1.	Reagentes	17
3.2.	Amostras.....	17
3.3.	Análise por cromatografia gasosa	18
3.4.	Análise por voltametria de onda quadrada.....	18
3.4.1.	Sistema voltamétrico.....	19
3.4.2.	Reprodutibilidade de padrões.....	20
3.4.3.	Limpeza dos elétrodos convencionais.....	20
3.4.4.	Validação do método de SWV.....	21
3.4.4.1.	Repetibilidade do solvente.....	21
3.4.4.2.	Método de calibração, limites de deteção e quantificação	21
3.4.4.3.	Precisão e exatidão da análise	23
3.4.4.4.	Otimização da validação	24
3.5.	Análise qualitativa de outros contaminantes.....	24
4.	Resultados e Discussão	25
4.1.	Reprodutibilidade de padrões.....	25
4.2.	Limpeza dos elétrodos.....	26
4.3.	Validação do método de SWV	29
4.3.1.	Repetibilidade do solvente	29

4.3.2.	Curva de Calibração, Limites de Detecção e Quantificação	30
4.3.3.	Precisão e Exatidão.....	36
4.3.4.	Otimização da validação.....	37
4.4.	Análise qualitativa de outros contaminantes	42
5.	Conclusões.....	45
5.1.	Propostas para trabalhos futuros.....	45
	Referências Bibliográficas	47
6.	Anexos	53
6.1.	Análise detalhada das experiências com diferentes elétrodos de trabalho .	53
6.2.	Análise detalhada das experiências com limpeza com acetona.....	56
6.3.	Voltamogramas de qualificação de contaminantes.....	58

Índice de Figuras

Figura 2-1- Aspeto da cortiça ao nível macroscópico e microscópico.....	3
Figura 2-2- Montado e Descortiçamento.....	4
Figura 2-3- Esquema do processo de transformação desde a casca do sobreiro até à rolha.	5
Figura 2-4- Estrutura química dos diferentes haloanisóis responsáveis pelo gosto a rolha nos vinhos. (Adaptado de Fontana, 2012).....	6
Figura 2-5- Representação das estruturas químicas do TCP e TCA. (Adaptado de Subervin, 2015).....	7
Figura 2-6- Roda dos Aromas. (Adaptado de Subervin, 2015).....	8
Figura 2-7- Célula eletroquímica com três elétrodos.	11
Figura 2-8- Esquema representativo do funcionamento de um potencióstato.....	12
Figura 2-9- Tipos de potenciais aplicados em voltametria. Adaptado de (Crouch, Holler, Skoog, & West, 1992)	13
Figura 2-10- Curva corrente-potencial da SWV. Adaptado de (Souza, Machado, & Avaca, 2002).....	14
Figura 2-11- Voltamogramas típicos onde (A) representa um sistemas redox reversível e (B) um sistema redox irreversível.....	15
Figura 3-1- Sistema voltamétrico com elétrodos auxiliar (a), de trabalho (b) e de referência (c) e potencióstato (d).	19
Figura 3-2- Sistema de aquecimento utilizado na quantificação dos contaminantes. Á esquerda o banho de aquecimento e à direita o reator.	20
Figura 3-3- Representação gráfica da expressão da curva de calibração por adição de padrão.	22
Figura 4-1- Voltamogramas dos ensaios da reprodutibilidade do solvente ACN/Água.	25
Figura 4-2- Voltamogramas de comparação da reprodutibilidade do solvente ACN/Água entre os dois aparelhos.....	26
Figura 4-3- Voltamogramas do ensaio de limpeza com solução ACN/Água com 0,2M de TBAP sem qualquer limpeza ou adição de volume.	26
Figura 4-4- Voltamogramas do ensaio de limpeza com solução ACN/Água com 0,2M de TBAP com limpeza sem adição de volume.	27
Figura 4-5- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/Água com 0,2M de TBAP sem TCA com limpeza.	27
Figura 4-6- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP com TCA com limpeza.	28
Figura 4-7- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/Água com 0,2M de TBAP com TCA com limpeza.	28
Figura 4-8- Voltamogramas dos ensaios da repetibilidade do solvente ACN/Água.	29
Figura 4-9- Voltamogramas dos ensaios da repetibilidade do solvente ACN/AnC.	29
Figura 4-10- Diferença da cor do elétrodo de trabalho antes (A) e depois (B) do experimento.	30
Figura 4-11- Formação do depósito durante o experimento (esquerda) e respetiva quantidade no final (direita).	31

Figura 4-12- Voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,33M de TBAP para construção da curva de calibração.	31
Figura 4-13- Aproximação e identificação das curvas dos voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP para construção da curva de calibração.	32
Figura 4-14- Curva de Calibração do pico A.	32
Figura 4-15- Curva de calibração do pico B.	33
Figura 4-16- Curva de Calibração da soma dos picos A e B.	33
Figura 4-17- Voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP para identificação de algum erro nos ensaios já realizados.	35
Figura 4-18- Representação gráfica das concentrações reais vs. a médias das concentrações obtidas.	37
Figura 4-19- Voltamogramas com escala aumentada das experiências com ACN/Água destilada com 0,2M de TBAP.	38
Figura 4-20- Voltamogramas com escala aumentada das experiências com ACN/Água desionizada com 0,2M de TBAP.	38
Figura 4-21- Diferença entre solução sem aquecimento (A) e com aquecimento (B).	39
Figura 4-22- Voltamogramas dos vários ensaios com o eletrodo de trabalho M295Ag inicial.	39
Figura 4-23- Voltamogramas com escala aproximada dos vários ensaios com o eletrodo de trabalho M295Ag novo.	40
Figura 4-24- Voltamogramas com escala aproximada dos vários ensaios com o eletrodo de trabalho P4011.	40
Figura 4-25- Voltamogramas com escala aumentada da quantificação de TCA sem limpeza de eletrodos com acetona.	42
Figura 4-26- Voltamogramas com escala aumentada da quantificação de TCA com limpeza de eletrodos com acetona.	42
Figura 4-27- Aproximação de curvas de uma adição de cada voltamograma.	43
Figura 6-1- Voltamograma referente à qualificação de TCA.	58
Figura 6-2- Voltamograma referente à qualificação de TBA.	58
Figura 6-3- Voltamograma referente à qualificação de TCP.	59
Figura 6-4- Voltamograma referente à qualificação de DCA.	59
Figura 6-5- Voltamograma referente à qualificação de todos os contaminantes na mesma solução.	60

Índice de Tabelas

Tabela 2-1- Resumo das principais técnicas de quantificação de TCA. (Adaptado de (Freitas, 2014))	10
Tabela 2-2- Continuação do resumo das principais técnicas de quantificação de TCA. (Adaptado de (Freitas, 2014)).....	11
Tabela 4-1- Valores obtidos para o desvio padrão de cada curva de calibração obtida e respectivos limites de detecção e quantificação.....	33
Tabela 4-2- Valores obtidos para a determinação da precisão da SWV.	36
Tabela 4-3- Concentração dos contaminantes na solução padrão individual e conjunta e na 2ª adição da solução padrão conjunta.	43
Tabela 6-1- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eletrodo de trabalho M295Ag inicial.....	53
Tabela 6-2- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eletrodo de trabalho M295Ag novo.....	54
Tabela 6-3- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eletrodo de trabalho P4011.....	55
Tabela 6-4- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios sem limpeza com acetona.	56
Tabela 6-5- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com limpeza com acetona.	57
Tabela 6-6- Concentrações, em ppt, presentes em cada adição na experiência de todos os contaminantes.	60

Abreviaturas

- ACN- Acetonitrilo
- AnC- Amostra não contaminada
- CE- Contra-eléctrodo
- CV- Voltametria Cíclica
- DCA- 4,6-Dicloroanisol
- ER- Eléctrodo de Referencia
- ET- Eléctrodo de Trabalho
- GC- Cromatografia Gasosa
- I- Intensidade de Corrente (μA)
- LD- Limite de Deteção
- LQ- Limite de Quantificação
- MS- Espectrometria de Massa
- NaCl- Cloreto de Sódio
- P- Potencia (V)
- PCA- Pentacloroanisol
- SWV- Voltametria de Onda Quadrada
- TBA- 2,4,6-Tribromoanisol
- TBAP- Perclorato de Tetrabutílamónio
- TCA- 2,4,6-Tricloroanisol
- tcond- Tempo de condicionamento (s)
- TCP- 2,4,6- Triclorofenol
- tdep- Tempo de deposição (s)
- TeCA- 2,3,4,6- Tetracloroanisol
- teq- Tempo de equilíbrio (s)

Símbolos

μA- Microamperes

μm- Micrómetro

h- Hora

L- Litro

mg- Miligramas

min- Minutos

mL- Mililitros

ng- Nanograma

ppt- Partes por trilhão (ng/L)

s- Segundos

V- Volts

1. Introdução Geral

1.1. Enquadramento do Tema e Motivação

O estudo presentemente efetuado consiste na validação de um método de determinação de TCA em amostras provenientes das águas de cozedura da indústria M.A. Silva Cortiças Lda.

Este estudo tem especial importância, pois existe uma grande necessidade de detetar a presença deste composto e quantificá-lo numa fase em que ainda é possível aplicar medidas de controlo e redução sem que haja grandes problemas económicos. O TCA quando presente nas rolhas de cortiça, mesmo em pequenas concentrações, provoca um defeito organolético em vinhos engarrafados denominado de “gosto a rolha” resultando num grande problema económico para a indústria vinícola.

O TCA é um metabolito fúngico derivado do anisol presente na cortiça que pode surgir através da formação de fungos, mas também a partir da poluição antropogénica (Maggi & Mazzoleni, 2006). Este composto é caracterizado pelo gosto/cheiro a mofo e é quimicamente estável não se degradando significativamente com o tempo. Tendo em conta que o seu limite sensorial é bastante baixo (1,4-4,6 ng/L), vários estudos têm sido desenvolvidos, tanto para a sua deteção, como para a sua diminuição (Sefton & Simpson, 2005).

A determinação de TCA tem sido realizada sobretudo recorrendo às técnicas cromatográficas, especialmente cromatografia gasosa com diferentes modos de deteção. Como estas técnicas estão muitas vezes além das capacidades económicas dos produtores de cortiça, estes muitas vezes recorrem apenas à análise sensorial. Este tipo de análise acaba por não ter precisão nenhuma, pois estudos confirmam que a sensibilidade de detetar TCA varia bastante de indivíduo para indivíduo (Anticó, et al., 2004; Maggi & Mazzoleni, 2006).

De modo a ultrapassar esta dificuldade, têm sido estudados nos últimos anos, técnicas alternativas à cromatografia, como por exemplo o recurso a técnicas voltamétricas ou a biossensores.

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica eletroquímica que tem sido estudada como alternativa na deteção e quantificação de TCA, uma vez que é, não só bastante simples como rápida, apresentando ainda elevada sensibilidade e com baixos limites de deteção (Souza, et al., 2002).

1.2. Objetivo

O principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um novo método eletroquímico, voltametria de onda quadrada, para detetar e quantificar TCA presente em amostras reais. Esta metodologia teve como finalidade apresentar uma alternativa aos métodos mais tradicionais presentes nas indústrias, nomeadamente a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Esta última, é não só bastante dispendiosa economicamente como requer bastante tempo. Sendo assim, o desafio deste trabalho foi demonstrar que é possível utilizar um método mais económico e mais simples, SWV, e obter resultados semelhantes aos obtidos por GC-MS.

1.3. Organização da Tese

A presente tese é organizada em seis capítulos onde é descrito o trabalho realizado. O enquadramento e o objetivo são introduzidos neste capítulo.

No segundo capítulo é apresentada a revisão bibliográfica na qual é descrita a constituição e propriedades da cortiça e o respetivo processo industrial. Realça-se, particularmente, o problema da contaminação do vinho por TCA e descreve-se algumas técnicas analíticas já utilizadas bem como o princípio da voltametria de onda quadrada.

Os materiais e métodos utilizados para a realização do trabalho são apresentados no capítulo 3.

O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e discussão dos mesmos.

No quinto capítulo serão apresentadas todas as conclusões retiradas deste estudo bem como propostas de trabalhos futuros.

Por fim, no sexto capítulo, após as referências bibliográficas encontram-se os anexos.

2. Enquadramento Teórico

2.1. A cortiça: composição e propriedades

A cortiça é uma matéria-prima que apresenta uma grande relevância na economia portuguesa. Segundo dados de 2016, existem quase 670 empresas ligadas à indústria corticeira, dando trabalho a aproximadamente 9 mil trabalhadores, correspondendo a maior parte ao fabrico de rolhas seguido pela preparação da cortiça. Estes números contribuem assim para que Portugal seja o maior produtor de cortiça com uma percentagem de 49,6% (100 mil toneladas) e também o líder mundial de exportações, com cerca de 62,7% que valem cerca de 897,2 milhões de euros (APCOR, 2016).

Assim, a cortiça pode ser definida como a “casca” do sobreiro (*Quercus Suber L*) e é um tecido vegetal 100% natural constituído por três camadas, o felema, o felogene e a feloderme que todas juntas formam a periderme (Pereira, et al., 1999). Na Figura 2-1 é apresentado o aspeto da cortiça em diferentes escalas.¹

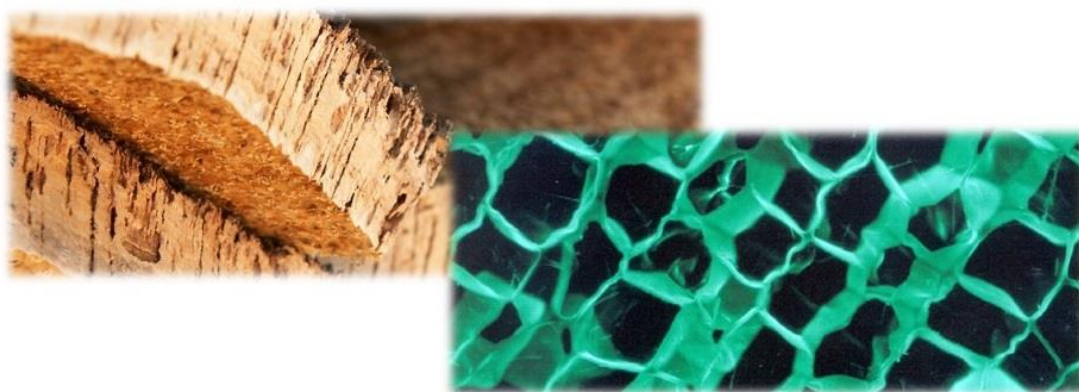


Figura 2-1- Aspeto da cortiça ao nível macroscópico e microscópico.

Uma das particularidades do sobreiro é que este consegue manter a primeira periderme durante todo o seu tempo de vida. Para além disso consegue regenerar a felogene com a mesma longevidade da primeira. É assim, graças a estas características, que a cortiça se torna um produto de bastante interesse comercial (Silva, 2010).

Em termos da composição química da cortiça, Guillemont (1960) conseguiu agrupar os vários componentes químicos em cinco grupos: componentes cerosos, taninos, suberina, celulose e lenhina. Mais tarde, Pereira (1999) apurou, através da comparação de vários trabalhos que a composição da cortiça será aproximadamente: suberina (40%), lenhina (27%), celulose e outros polissacarídeos (18%), taninos e substâncias cerosas (14%) e elementos minerais (1,2%) (Pereira, et al., 1999). Assim, é importante caracterizar tanto a suberina, como a lenhina pois juntas correspondem à maior parte da composição da cortiça. A suberina pode ser definida como uma rede macromolecular insolúvel em vários solventes formada por uma mistura de ácidos gordos e álcoois gordos pesados. Já a lenhina, ou também conhecida por lignina é um polímero irregular constituído por unidades de fenilpropano (Barros, et al., 2015).

¹ Adaptado de <http://www.apcor.pt>

A essência da cortiça está na existência de células agrupadas numa estrutura alveolar característica, onde cerca de 60% de uma prancha é preenchida por gases semelhantes ao ar explicando assim a sua leveza. Outras propriedades físicas de um material como a cortiça é que esta é elástica e compressível, impermeável tanto para líquidos como para gases, suave ao toque, hipoalérgica, excelente isolante (térmico e acústico), resistente ao atrito e com combustão lenta².

2.2. A indústria corticeira

A cortiça passa por diversas etapas e tratamentos até que seja transformada nos produtos final, seja este rolhas ou materiais diversos.

O primeiro passo da indústria corticeira consiste na obtenção da matéria-prima, assim a cortiça é extraída do tronco do sobreiro normalmente no verão e a este processo dá-se o nome de descortiçamento.

Para que este primeiro processo seja possível, são necessários 25 anos, para que o tronco produza cortiça suficiente (70 cm de perímetro e a 1,30 m do solo) para tornar o descortiçamento rentável. Segundo o Decreto de Lei 169/2001 (art. 13º) este processo tem que ter no mínimo, um intervalo de 9 anos, sendo que um sobreiro suporta até 15 descortiçamentos (150 anos) (Anon., 2001). A Figura 2-2 representa várias imagens onde está representado o descortiçamento³.



Figura 2-2- Montado e Descortiçamento.

O primeiro descortiçamento, ou desboia, dá origem a uma cortiça virgem, utilizada em pavimentos, com uma superfície muito irregular e dura. Nos descortiçamentos seguintes, obtém-se uma cortiça mais uniforme, denominada de cortiça de produção. Dentro desta, a primeira é designada de secundeira e só a partir do terceiro descortiçamento se produz uma cortiça com boas propriedades para o fabrico de rolhas, chamada a cortiça amadia (Pereira, et al., 1999).

² <http://www.apcor.pt>

³ <http://www.apcor.pt>

Após a extração da cortiça, as pranchas obtidas passam por um período de repouso de 6 meses, sendo de seguida submetidas a uma cozedura durante cerca de 1h. Esta cozedura tem como objetivo a expansão em volume, a diminuição da porosidade, a solubilização dos taninos alterando assim as propriedades físicas que facilitam posteriormente o corte. De seguida as pranchas são secas durante 3-4 dias. As pranchas são traçadas, isto é, cortadas de maneira a obter peças homogéneas, e são classificadas por classes e qualidade. De seguida, com a finalidade de facilitar a classificação, a prancha é recortada e endireitam-se os lados. Os passos de produção seguintes já dependem do produto final que se pretende obter (Costa & Pereira, 2004).

Como no âmbito do trabalho, recai um especial interesse nas rolhas de cortiça, assim de seguida serão apresentados os restantes passos para o fabrico destas. A Figura 2-3 apresenta um resumo esquemático de todas as etapas, desde da casca do sobreiro até à rolha final.

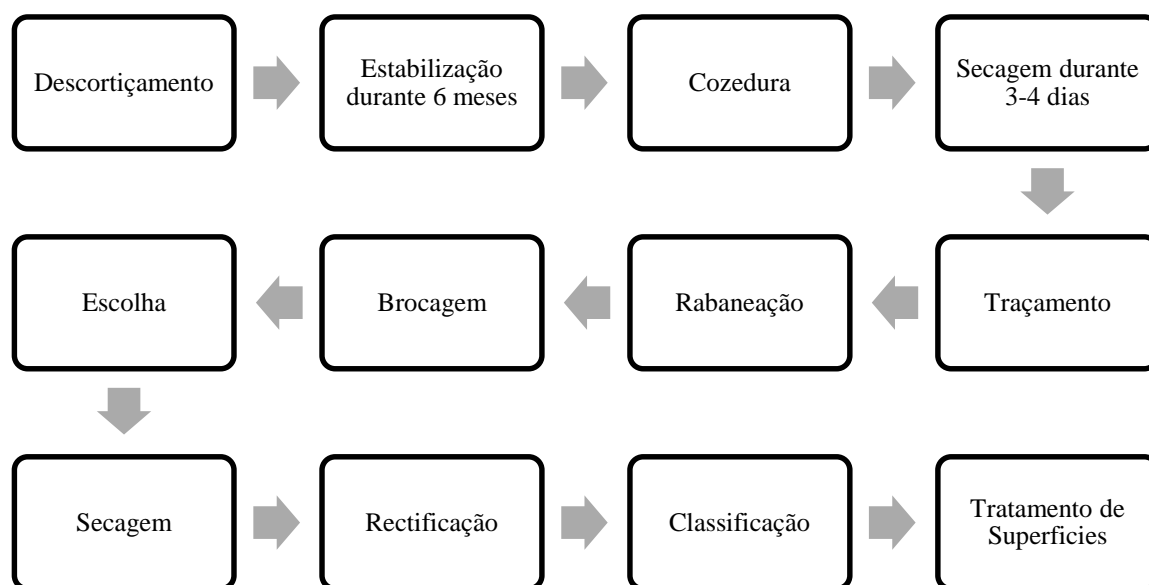


Figura 2-3- Esquema do processo de transformação desde a casca do sobreiro até à rolha.

Em todo o processo de fabrico, a etapa que mais tem interesse para o contexto deste trabalho é a da cozedura. Nesta fase a cortiça é cozida em água limpa e a ferver tendo como objetivos limpar e extrair algumas substâncias (Albuquerque, et al., 2013).

Assim, a análise desta água escura e com elevados níveis de compostos permite avaliar a qualidade da cortiça.

2.3. TCA: o problema e a sua formação

Cerca de 44% da cortiça destina-se ao fabrico de rolhas tornando estas o principal produto (APCOR, 2016).

Durante décadas as rolhas de cortiça correspondiam a 100% do mercado de vedantes de produtos vinícolas, mas no final do século passado esta percentagem foi diminuindo devido ao aparecimento das rolhas sintéticas. Este acontecimento está relacionado com problemas que as rolhas de cortiça possam provocar à indústria vinícola, mais propriamente o problema de contaminação denominado de “gosto a rolha”.

Apesar de vários compostos estarem relacionados com este problema, habitualmente este é relacionado com a presença de um composto 2,4,6-tricloroanisol, sumariamente denominado de TCA. Outros compostos que eventualmente também são dados como responsáveis são o 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (TBA) (Figura 2-4).

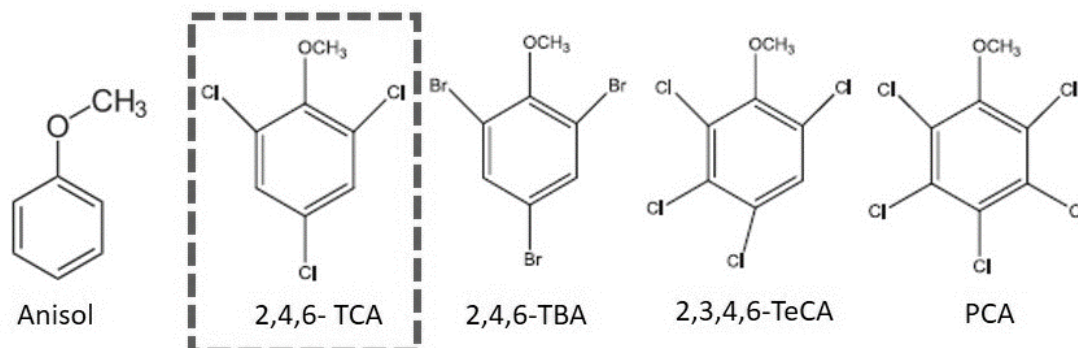


Figura 2-4- Estrutura química dos diferentes haloanisóis responsáveis pelo gosto a rolha nos vinhos. (Adaptado de Fontana, 2012).

O TCA é um metabolito fúngico com um odor semelhante ao mofo derivado do metoxibenzeno (anisol) e é quimicamente estável não tóxico nem perigoso para o ser humano. Não se degrada significativamente com o tempo e o seu limiar sensorial é bastante baixo, na ordem dos 1,4-4,6 ppt, sendo o suficiente para degradar o sabor do vinho (Sefton & Simpson, 2005; Gil & Pereira, 2006).

O seu precursor é o 2,4,6-triclorofenol (TCP) e este pode surgir através da formação de fungos, mas também a partir da poluição antropogénica na cortiça (Maggi & Mazzoleni, 2006).

No processo de fabrico da indústria da cortiça já descrito, existe a etapa de estabilização num ambiente suscetível ao crescimento de fungos e bactérias que causam a deterioração da cortiça. Então, para diminuir este efeito, são adicionados conservantes à base de halofenóis, como os clorofenóis, que ao sofrer biometilação (*O*-metilação) formam os haloanisóis (Fontana, 2012).

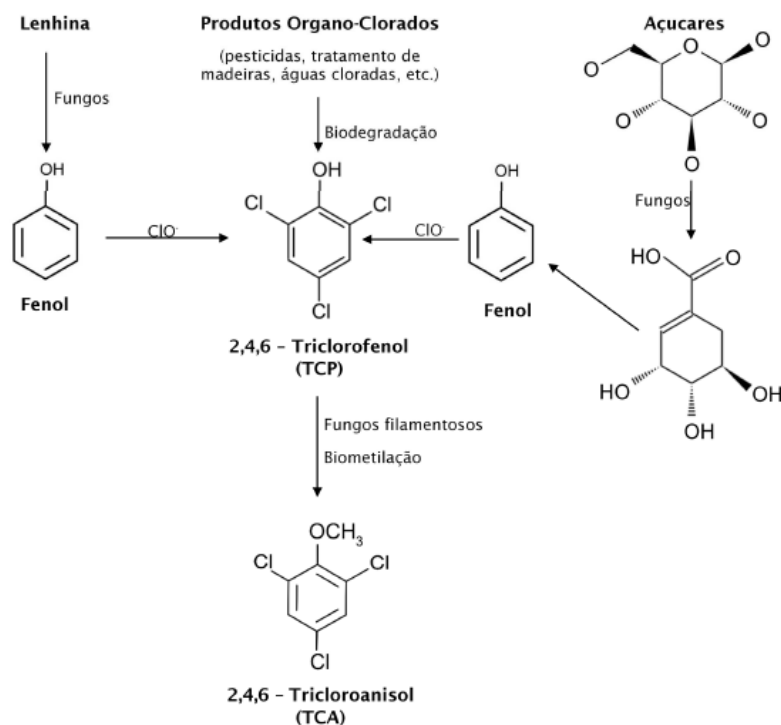


Figura 2-5- Representação das estruturas químicas do TCP e TCA. (Adaptado de Subervin, 2015).

A biometilação é uma reação executada na sua maioria por fungos filamentosos existentes quer nas pranchas de cortiça quer na madeira das caves. Esta é considerada uma reação bioquímica de defesa pois ocorre quando os microrganismos entram em contacto com os halofenóis (utilizados como pesticidas e fungicidas altamente tóxicos), convertendo-os assim em haloanisóis não tóxicos. (Coque, et al., 2006).

2.4. Técnicas de Análise

Com o passar dos anos, o conhecimento sobre os haloanisóis, mais propriamente o TCA, tem levado a um maior controlo durante o processo de fabrico das rolhas de cortiça destinadas ao engarrafamento de vinhos.

Este capítulo destina-se ao resumo dos métodos de controlo e análise para a quantificação de TCA utilizadas atualmente pela indústria corticeira.

2.4.1. Análise sensorial

Devido ao elevado preço das atuais técnicas utilizadas na deteção de TCA (maioritariamente técnicas cromatográficas), ainda existem indústrias a utilizar apenas a análise sensorial como método.

Este tipo de análise apesar de não ser exato pois recorre ao olfato ou paladar (tanto em água como em vinho) já existe regulamentação, através da norma ISO 22308:2005 pois o TCA geralmente é encontrado em concentrações bastante baixas, na ordem dos ng/L (Maggi & Mazzoleni, 2006).

Esta norma foi desenvolvida através do Projeto Quercus realizado pela Confederação europeia da cortiça (CELiège) durante a década de 90 do século passado. Para além desta

norma, fez também parte dos objetivos deste projeto: a elaboração de um Código de Boas Práticas Rolheiras e o desenvolvimento de uma Roda de Aromas (Figura 2-6), ajudando assim, a harmonização do vocabulário utilizado na análise (Subervin, 2015).

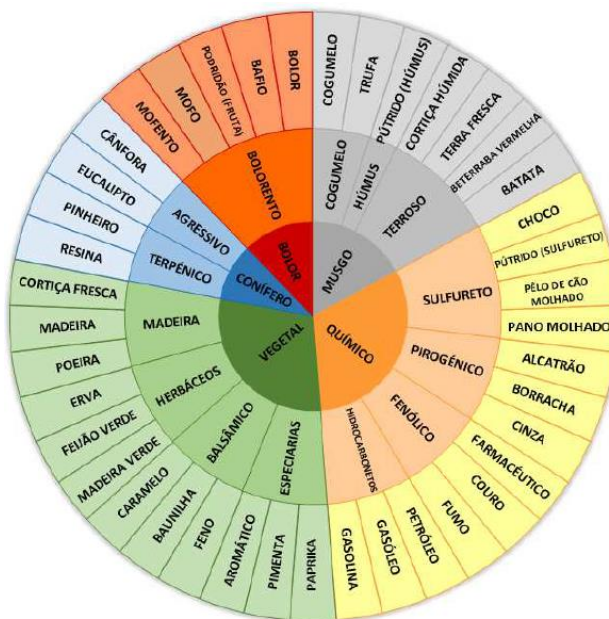


Figura 2-6- Roda dos Aromas. (Adaptado de Subervin, 2015)

Relativamente a outros estudos realizados, vários limites sensoriais foram relatados dependendo da solução em que se encontra o TCA. Inicialmente, Riu *et al.* (2002) apenas concluiu que em vinhos brancos o limite sensorial é inferior ao dos vinhos tintos (10 ng/L e 40 ng/L, respetivamente). No ano seguinte, Guilbault *et al.* (2003) referiu que o limite sensorial poderia ir desde 5 a 20 ng/L, dependendo do tipo de vinho. Seguidamente, Sefton e Simpson (2005) consideraram que este ia de 1,4 a 4,6 ng/L. Varelas et al. (2010) referiram um intervalo de 1,4 a 10 ng/L. Mais recentemente, Fontana (2012), considerou a presença de TCA não só em vinho, mas noutras soluções obtendo um intervalo mais elevado, desde 0,03 a 50 ng/L.

2.4.2. Determinação analítica de TCA

Com os avanços existentes tanto nas áreas da tecnologia como da qualidade torna-se cada vez maior a exigência em produtos de elevada qualidade, como é o caso do vinho. Assim, as indústrias produtoras de rolhas de cortiça têm investido tanto em equipamentos como em investigação. Torna-se óbvio que grande parte destes investimentos foram direcionados para a quantificação de TCA durante todo o processo de fabrico de rolhas, garantindo assim que estas nunca irão causar nenhum defeito organolético no vinho.

O controlo de qualidade pode ser efetuado em vários passos do processo de fabrico desde as águas de cozedura das pranchas, até à análise diretamente no produto final. Contudo não só a rolha deve ser analisada, também o vinho, a madeiras das pipas e o ambiente envolvente devem ser considerados potenciais fontes de TCA.

Existem dois documentos essenciais no controlo de qualidade das rolhas de cortiça no que toca ao TCA: a norma ISO 20752:2007 e o método OIV-MA-AS315-16.

A junção destes dois documentos resulta no modo de como as empresas hoje em dia determinam o TCA libertável, baseando-se no equilíbrio entre a cortiça (matrizes sólidas) e o vinho/simuladores hidroalcoólicos (matrizes líquidas). Ambos se baseiam na maceração das rolhas seguidos de microextração em fase sólida (SPME), seguida da quantificação por cromatografia gasosa e deteção por espectrometria de massa (GC-MS), embora na norma ISO ainda se considere a deteção por captura de eletrões (GC-ECD). Ainda nestes métodos são estimados os limites de deteção e quantificação, sendo inferior a 0,5 ppt e 1 ppt, respetivamente.

Ao longo dos anos, vários métodos têm sido testados e otimizados tanto para a extração de haloanisóis como para deteção.

Soleas *et al.* (2002), realizaram vários ensaios tanto para rolhas como para vinhos, onde testavam a microextração em fase sólida seguida de cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa (SPME/GC-MS). Estas experiências resultaram em LD e LQ aceitáveis para o TCA (0,1 ng/L e 2 ng/L, respetivamente), tornando este método bastante bom sendo ainda nos dias de hoje utilizado nos dois documentos no controlo do TCA.

No ano seguinte, Hayasaka *et al.* (2003), apresentaram uma alternativa de modo a conseguir resultados mais sensíveis utilizando SBE/GC-MS. Embora se tenha obtido realmente resultados melhores não foram suficientes para superar o método anterior.

Um pouco mais tarde, Gómez-Ariza *et al.* (2004), desenvolveram dois métodos baseados em pervaporação (PV) com deteção por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa (GC-MS). A diferença reside no modo como o pervaporador está ligado ao sistema de deteção. No primeiro, o pervaporador está ligado diretamente, enquanto que no segundo existe um sistema de dessorção térmica em fase criogénica sólida (CT-TD) entre o pervaporador e o sistema GC-MS aumentando assim tanto a sensibilidade como a precisão tornando-a assim uma abordagem fiável. Ainda no mesmo ano, Martínez-Uruñuela *et al.* (2004) conseguiu validar o método baseado em HS-SPME (microextração em fase sólida em *headspace*) como método de deteção não só de TCA como de outros cloanisóis.

Campillo *et al.* (2008), voltaram a utilizar o método de extração já estudado, HS-SPME em vinhos, embora desta vez a deteção desenvolvida tenha sido por cromatografia gasosa com detetor por emissão atómica (GC-AED). Neste método, a deteção foi cuidadosamente otimizada de modo a obter os melhores resultados possíveis.

Campilo *et al.* (2010), mantendo o sistema GC-MS como modo de deteção, testaram a extração por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) em clorofenóis e haloanisóis. Sob condições optimizadas (volume de solventes, tempo de extração, etc), o limite de deteção obtido foi entre 0,004-0,108 ng/mL em vinhos. No mesmo ano, ainda surgiram dois estudos que podem ser comparados com o anterior: Pizarro C. *et al.* (2010) mantiveram o método de extração, alterando a deteção para cromatografia gasosa com captura de eletrões (GC-ECD), já Fontana *et al.* (2010) alteraram o método de extração para extração por ultra-sons (US) mantendo a deteção por GC-MS. Ambos os trabalhos mostraram resultados satisfatórios. O primeiro mostrou uma linearidade superior a 99,4%, repetibilidade abaixo dos 9,8%, reprodutibilidade inferior a 9,9% e limites de deteção abaixo dos limites olfactivos. O segundo método, obteve recuperações de cerca 80% indicando a robustez do método.

Sillero-Márquez *et al.* (2011) avaliaram a capacidade da formação de uma única gota de amostra ser analisada por espectrometria de mobilidade iónica associada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS). Com os resultados obteve-se um limite de deteção na ordem dos 0,01 ng/L apenas para 2 mL de vinho.

Um pouco mais tarde, Cacho *et al.* (2013) determinaram simultaneamente catorze clorofenóis e cloroanisóis com extração por SBSE com deteção por desorção térmica acoplada a um sistema GC-MS (TD-GC-MS) e obtiveram-se limites de deteção entre 0,3-1,5 ng/L para os clorofenóis e 0,2-0,5 ng/L para os cloroanisóis, dependendo do composto, com boa precisão e recuperação.

Em 2014, surgiram três artigos relevantes sobre a determinação de haloanisóis em vinhos e/ou cortiça. No início do ano, Pizarro *et al.* (2014) sugeriram uma extração por microextração líquida-líquida assistida por vórtex (VALLME) e deteção por cromatografia gasosa com microdetector de captura de electrões (GC-mECD) para a quantificação de TCA, TeCA, TBA e PCA. O método foi validado mostrando uma linearidade de cerca de 98,3%, repetibilidade e reprodutibilidade abaixo dos 10% e 11,2% respetivamente. Pouco depois, Lichvanová *et al.* (2014) investigaram a aplicação de CD-IMS (*corona discharge-ion mobility spectrometer*) na deteção de TCA com um tempo de aceleração ortogonal no espectômetro, obtendo-se LD's de 100 ppb em gás e 150 ng em fase sólida. Já no final do ano, Camino-Sánchez *et al.* (2014) utilizaram um método baseado na amostragem com desorção térmica em cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa em tandem (TD-GC-MS/MS). Devido aos seus bons resultados, este método mostrou-se uma ferramenta útil da deteção precoce de TCA e do seu precursor TCP.

Ruiz-Delgado, *et al.* (2016), voltou a utilizar a técnica de HS-SPME utilizando fibras de polidimetilsiloxano e como técnica de deteção, utilizou GC-QqQ-MS/MS, onde foram obtidos limites de quantificação inferiores a 0,91 ng/L, isto é, valores abaixo dos limiares sensoriais do ser humano.

Nas Tabela 2-1 e Tabela 2-2 é feito um resumo das principais técnicas desenvolvidas até ao momento para a extração e deteção de TCA.

Tabela 2-1- Resumo das principais técnicas de quantificação de TCA. (Adaptado de (Freitas, 2014))

AUTOR	TÉCNICA		LIMITE DE DETEÇÃO
	Extração	Deteção	
SOLEAS, ET AL. (2002)	SPME	GC-MS	0,1 ng/L
HAYASAKA, ET AL. (2003)	SBE	CG-MS	-
GÓMEZ-ARIZA, ET AL. (2004)	Pervaporação	GC-MS	25,8 ng/L
MARTÍNEZ-URUÑUELA, ET AL. (2004)		CT-TD-GC-MS	4,2 ng/L
INSA, ET AL. (2005)	HS-SPME	GC-ECD	-
PIZARRO, ET AL. (2007)	SPE	CG-MS	0,2 ng/L
CAMPILLO, ET AL. (2008)	MAE	GC-ECD	-
CAMPILO, ET AL. (2010)	HS-SPME	GC-AED	1,2-18,5 ng/L
PIZARRO, ET AL. (2010)	DLLME	GC-MS	0,004-0,108 ng/mL
FONTANA, ET AL. (2010)	DLLME	GC-ECD	-
SILLERO-MÁRQUEZ, ET AL. (2011)	US	GC-MS	0,6-0,7 ng/L
SCHMARR, ET AL. (2011)	-	MCC-IMS	0,01 ng/L
	HS-SPME	GC-MS multidirecional	0,5 ng/L

Tabela 2-2- Continuação do resumo das principais técnicas de quantificação de TCA. (Adaptado de (Freitas, 2014))

AUTOR	TÉCNICA		LIMITE DE DETEÇÃO
	Extração	Deteção	
PIZARRO, ET AL. (2011)	MAE-DLLME	GC-ECD	-
PERES, ET AL. (2013)		CV	0,31 ng/L
CACHO, ET AL. (2013)	SBSE	TD-GC-MS	0,2-0,5 ng/L
PIZARRO, ET AL. (2014)	VELLME	GC-mECD	
LICHVANOVÁ, ET AL. (2014)	-	CD-IMS	100 ppb (gás) 150 ng (sólido)
CAMINO-SÁNCHEZ, ET AL. (2014)	-	TD-GC-MS/MS	-
BAI, ET AL. (2016)	DLLME	GC-ECD	-
CACHO, ET AL. (2016)	DSI	GC-MS	0,006-0,05 ng/L
RUIZ-DELGADO, ET AL. (2016)	HS-SPME	GC-QqQ-MS/MS	-

2.4.3. Voltametria

A voltametria é o ramo da química analítica que estuda as relações entre voltagem, corrente e tempo, desenvolvendo condições que favorecem a polarização de um eléctrodo específico, o eléctrodo de trabalho que será descrito mais adiante. Esta técnica é utilizada para estudar a composição de uma solução através de curvas corrente-voltagem, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de electrões durante um processo redox pode ser relacionado com a quantidade de substância presente na solução (Skoog, et al., 1996).

Normalmente, a célula eletroquímica é constituída por três eléctrodos (Figura 2-7): o eléctrodo de trabalho (ET), o eléctrodo de referência (ER) e o contra-eléctrodo (CE), sendo este último um eléctrodo auxiliar. Estes três eléctrodos estão emersos numa solução que contém a substância de interesse e também um electrólito não reativo chamado electrólito de suporte. Este electrólito de suporte pode ser definido como uma substância que, quando dissolvida num certo solvente, produz uma solução com uma condutividade superior à do solvente (Agostinho, et al., 2004).

Às curvas obtidas em cada experiência, dá-se o nome de voltamogramas.

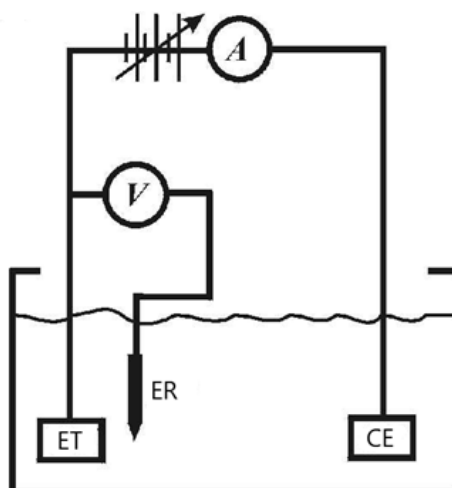


Figura 2-7- Célula eletroquímica com três eléctrodos.

Neste tipo de célula, existe uma diferença de potencial entre o ET e o ER, o que faz com que a resistência entre o ER aumente, acontecendo o contrário com a do CE. Sendo assim, a

corrente irá passar entre o eletrodo de trabalho e o contra-eleto, evitando interferências no eletrodo de referência mantendo o potencial deste constante (Aleixo, 2013).

A voltametria é geralmente realizada utilizando um potenciostato controlado por um computador com elementos funcionais. O computador facilita a interação com o operador, isto é, sintetiza a forma de onda, sequência a amostragem e registo de dados e manipula o relatório dos resultados (graficamente ou por lista de dados) (Bard & Faulkner, 2001).

O sistema de funcionamento encontra-se destacado na Figura 2-8.

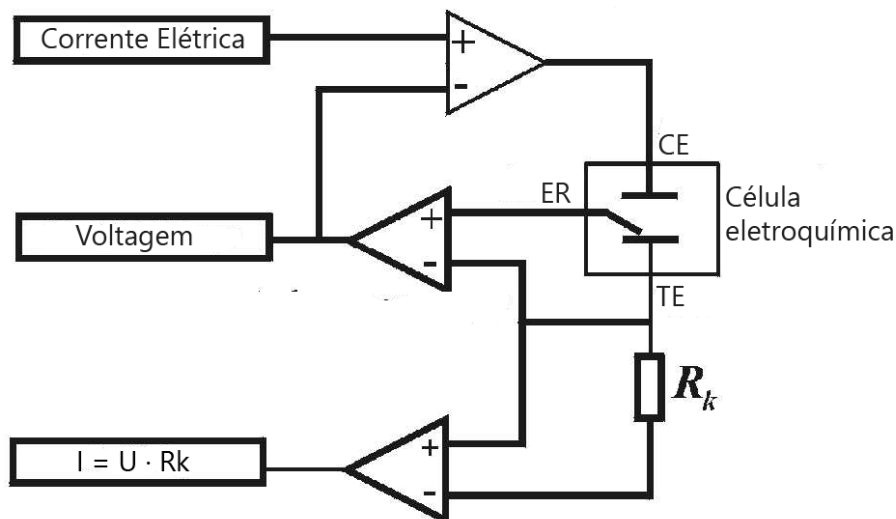


Figura 2-8- Esquema representativo do funcionamento de um potenciostato.

O processo de oxidação-redução ocorrido durante a voltametria, pode ser descrito pela Equação 2.1:



Onde O e R correspondem à forma oxidada e reduzida respetivamente.

Esta reação pode ser composta por duas etapas, sendo a primeira o transporte de espécies até à superfície do eletrodo e a segunda a reação propriamente dita no eletrodo. Assim a sua velocidade vai depender de processos como a transferência de massa e a transferência de carga. Relativamente à transferência de massa, na voltametria, este acontece quase exclusivamente por difusão.

A transferência de carga neste tipo de reação eletrónicas ocorrem na interface eletrodo-solução gerando assim corrente elétrica. A corrente total é constituída por duas componentes, a corrente faradaica e a corrente capacitiva. A primeira corresponde à reação redox da espécie em estudo no eletrodo e a segunda corrente também pode ser conhecida como não-faradaica ou corrente de dupla camada e flui através da célula e é resultante da carga ou descarga da capacitância de uma dupla camada e não envolve qualquer reação química. Assim, a corrente observada na interação do analito e do eletrodo é faradaica e proporcional à concentração do analito no seio da solução.

Para que seja possível quantificar a substância pretendida esta tem que ser eletroatrativa, isto é, ela tem que oxidar ou reduzir na região do potencial aplicado para que seja possível a transferência de eletrões tanto a nível termodinâmico como cinético.

Em voltametria, como o potencial não é uma função linear do tempo, este pode ser aplicado de várias formas afetando assim o sinal adquirido e determinando qual o tipo de técnica. Assim a forma como o potencial é aplicado é refletido na sensibilidade do método e também na seletividade que é observada no formato das curvas nos voltamogramas. Na Figura 2-9 estão resumidos os diferentes tipos de potenciais que podem ser aplicados e as respetivas técnicas voltamétricas.

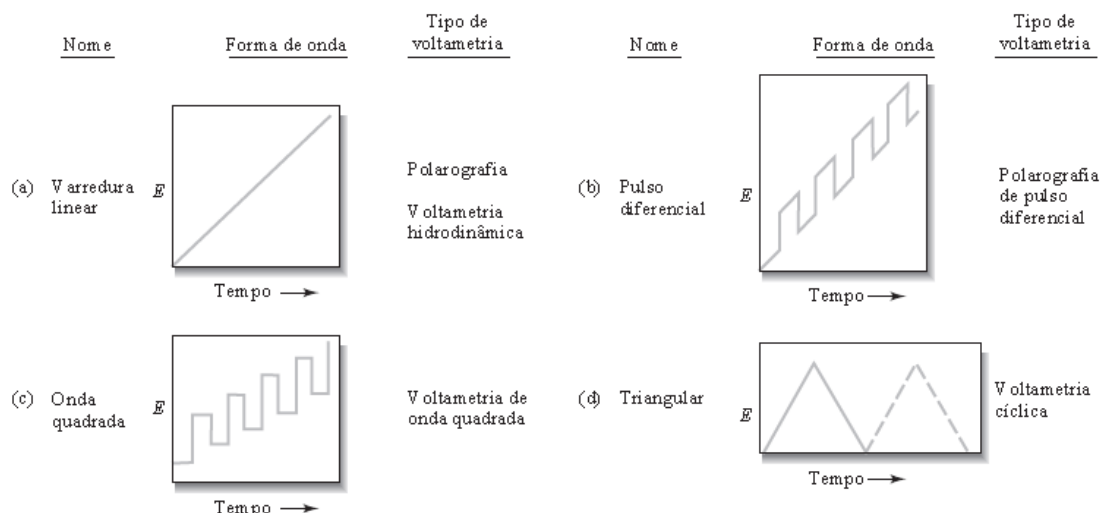


Figura 2-9- Tipos de potenciais aplicados em voltametria. Adaptado de (Crouch, Holler, Skoog, & West, 1992)

2.4.3.1. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “Square Wave Voltammetry”, foi inicialmente desenvolvida por Geoffery Barker (1953) enquanto este estudava uma maneira de compensar a corrente capacitiva residual em análises polarográficas, contudo, esta técnica possuía uma sensibilidade limitada pela reversibilidade do sistema e pelos ruídos de fontes diversas, o que influenciava bastante as respostas da corrente (Souza, et al., 2002).

Mais tarde, Ramaley e Krause (1969), baseando-se no trabalho anterior, desenvolveram uma teoria de voltametria de onda quadrada utilizando elétrodos estacionários com a finalidade de eliminar os ruídos. A partir daí, a SWV começou a ser utilizada com a vantagem de ser possível a substituição dos elétrodos de mercúrio por elétrodos sólidos. Contudo, esta metodologia tinha algumas limitações, por exemplo, como os autores se limitaram a saltos de pequeno incremento de potencial resultava apenas em baixas velocidades de varrimento (Souza, et al., 2002).

Mais recentemente, Osteryoung (1980) liderou diversos estudos que resultaram na voltametria de onda quadrada como é conhecida dos dias de hoje.

Esta técnica pode ver-se como uma conjugação dos melhores aspetos de várias técnicas de pulso. Por exemplo, inclui a anulação do ruído de fundo e a sensibilidade da voltametria diferencial de pulso (Bard & Faulkner, 2001).

A SWV é uma das técnicas mais rápidas e sensíveis atualmente, pois os seus limites de deteção podem ser comparados com técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Como ocorre noutras formas voltamétricas de pulso, o eléctrodo é levado através de vários períodos, porém na SWV, não há remoção da camada de difusão entre estes, o que faz com que seja uma técnica sem um modelo polográfico específico (Bard & Faulkner, 2001).

A Figura 2-10 representa a forma do perfil de escada característico da voltametria de onda quadrada.

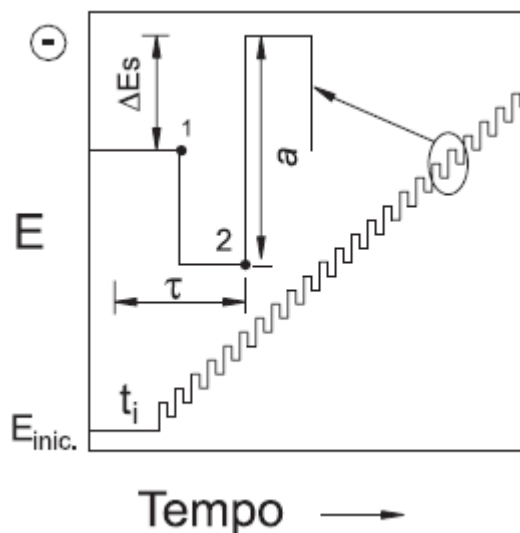


Figura 2-10- Curva corrente-potencial da SWV. Adaptado de (Souza, Machado, & Avaca, 2002).

Nesta técnica, uma onda quadrada de amplitude ΔE_p sobreposta com uma rampa de potencial em forma de escada que é caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura a e período τ que é aplicada ao eléctrodo de trabalho. O varrimento começa com um potencial inicial E_{inic} , que pode ser aplicado por um tempo extipulado para o sistema, t_i . O tempo total para um varrimento completo é determinado pela junção do período e da amplitude ΔE_s . Por fim o sinal é obtido de forma diferencial como uma intensidade da corrente resultante (ΔI), o que faz com que a técnica apresente uma excelente sensibilidade e alta rejeição das correntes capacitivas (Souza, et al., 2002).

O pico voltamétrico resultante desta técnica apresenta posição, largura e altura característicos de um sistema redox (Souza, et al., 2002). A Figura 2-11 apresenta os voltamogramas típicos associados a sistemas reversíveis e irreversíveis com a separação das correntes direta, inversa e resultante.

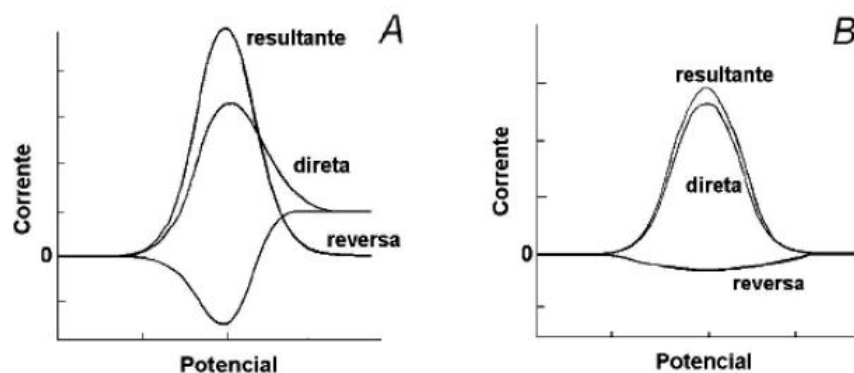


Figura 2-11- Voltamogramas típicos onde (A) representa um sistemas redox reversível e (B) um sistema redox irreversível.

2.4.3.1.1. Modelos teóricos da voltametria de onda quadrada

Os modelos teóricos utilizados no estudo da SWV foram desenvolvidos essencialmente por duas equipas, uma em Nova Iorque e outra na Jugoslávia chefiadas respetivamente por Janet Osteryoung e por Milivoj Lovrić. Foram utilizados programas computacionais onde foi possível simular o comportamento químico para três tipos de sistemas: reversíveis, não reversíveis e quase reversíveis, permitindo assim desenvolver toda a teoria da voltametria de onda quadrada de modo a ser utilizada nos estudos analíticos sob variadas condições.

A adsorção de reagentes em qualquer reação oxidação-redução pode causar um aumento nas respostas da voltametria de onda quadrada quando comparadas com outras técnicas de pulso.

Os resultados de uma avaliação das respostas da SWV mostraram que, se uma reação ocorre a partir de um reagente dissolvido, a corrente faradaica diminui muito mais lentamente que a corrente capacitiva. Assim, estas duas componentes podem ser separadas, se a medida for realizada no final de cada pulso. Caso contrário, se a reação ocorrer num reagente adsorvido, a relação entre a corrente faradaica e o tempo depende do grau de reversibilidade e do potencial do eletrodo de trabalho (Souza, et al., 2002).

Ambas as pesquisas consideraram que a adsorção seguia as leis de *Fick* com uma difusão linear e um coeficiente de massa aproximadamente planar. Consideraram ainda, no tratamento matemático, a lei de Faraday (relaciona a densidade da corrente em função da quantidade de massa transferida para a superfície do ET). Este tratamento levou ainda em consideração a relação entre os parâmetros do sistema (potencial padrão, constante de velocidade, etc.) e os parâmetros volumétricos (altura, largura, posição do pico) (Souza, et al., 2002).

Todos os cálculos teóricos foram simulados para os três tipos de sistemas com um algoritmo COOL possibilitando todo o tratamento da SWV. Toda a teoria foi testada e aplicada a sistemas com comportamento já conhecido (azul de metileno, alguns metais como Cd e Pb, etc.) e sob diversas condições. Através dos cálculos teóricos percebeu-se que as características dos voltamogramas teóricos dependem linearmente de alguns dos parâmetros utilizados e do tipo de sistema redox (Souza, et al., 2002).

Os modelos propostos foram ainda testados para compostos orgânicos com o objetivo de explorar os tratamentos quantitativos possíveis e a aplicação da SWV.

Todos os modelos desenvolvidos apenas têm em consideração a utilização de elétrodos sólidos convencionais ou elétrodos de mercúrio.

Em termos de aspetos positivos esta técnica tem conseguido vários adeptos devido à sua larga lista de vantagens.

Como já foi referido, a sensibilidade da SWV pode ser comparada à das técnicas cromatográficas e espectrométricas. Talvez a sua maior vantagem seja a alta velocidade de aquisição de dados, frequências de 1 a 100 ciclos de onda quadrada por segundo permitem atingir velocidades de varrimento de potenciais na ordem dos 100-1000 mV/s (a voltametria diferencial varia entre 1 a 10 mV/s), diminuindo assim o tempo de análise de 3-5 minutos para meros segundos (3-10 segundos) sem qualquer perda de resolução dos picos. (Skoog, et al., 1996; Souza, et al., 2002)

Apesar da sua lista extensa de vantagens, a voltametria de onda quadrada também apresenta algumas desvantagens, especialmente quando comparada com a voltametria cíclica (CV).

Por norma, a voltametria cíclica é mais intuitivamente interpretável em termos químicos, em ligações entre processos que ocorram em potencialidades separadas, a CV pode destacar-se mais facilmente.

Mas apesar destas desvantagens, numa análise mais prática, a SWV continua a ser a melhor escolha entre todas as técnicas de pulso (Bard & Faulkner, 2001).

3. Material e Métodos

No presente capítulo serão apresentados todos os materiais e métodos de preparação de soluções e amostras utilizados no decorrer do trabalho.

Recorrendo a estudos que já tinham sido realizados ao nível da determinação de TCA utilizando técnicas de voltametria, utilizaram-se alguns aspetos como a a proporção volumétrica do solvente orgânico (acetonitrilo, ACN) na solução aquosa final e o tipo de elétrodos utilizados (Freitas, 2014).

Posto isto, o trabalho foi realização tendo em consideração:

- i. Concentração do eletrólito de suporte (perclorato tetrabutylamónio, TBAP) de 0,2M;
- ii. Que a limpeza dos elétrodos é efetuada de forma a não causar perturbações nos resultados;
- iii. Repetibilidade do sinal do solvente de modo a não influenciar as condições das diversas experiências;
- iv. Estabelecimento de curvas de calibração pelo método da adição de padrão, com soluções padrão (ACN/água) e cálculo dos seus limites de deteção e quantificação (LD e LQ, respetivamente);
- v. Reprodutibilidade do sinal e soluções padrão;
- vi. Estudo da repetibilidade, precisão e exatidão para amostras reais;
- vii. Análise de outros fatores que poderão influenciar os resultados.

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados no trabalho desenvolvido foram o 2,4,6-tricloroanisol (TCA) da *Sigma-Aldrich*, com 99% de pureza, 2,4,6-tribromoanisol (TBA) da *Sigma-Aldrich*, com 99% de pureza, 2,4,6-triclorofenol (TCP) da *Acros Organics*, com 98% de pureza, 2,6-dicloroanisol (DCA) da *Acros Organics*, com 99% de pureza, perclorato tetrabutylamónio (TBAP) da *Acros Organics*, com pureza de 98%, acetonitrilo (ACN) da *Fisher Chemical* com 99,9% de pureza. O material utilizado para preparação das soluções padrão e amostras foi passado por álcool metílico puro da marca *Valente e Ribeiro Lda*. A água utilizada foi destilada num destilador *Destilnorma- L304* da Normax. Para os testes extra utilizou-se para preparação das soluções água desionizada da *VWR-BHD Prolabo* e para limpeza dos elétrodos propanona (acetona) da marca *José Manuel Gomes dos Santos, Lda* com 99,7% de pureza, validade ate 9/2018.

3.2. Amostras

Para a realização dos ensaios de voltametria foram utilizadas amostras de águas de cozedura provenientes da M. A. Silva Lda.

As amostras foram recolhidas das águas de cozedura das pranchas de cortiça segundo o protocolo normal da empresa entre os anos 2015 e 2016, nos meses de Outubro de 2015, Maio e Outubro de 2016 e sujeitas a uma análise de GC-MS no laboratório da empresa.

Até à sua posterior utilização nas análises de voltametria, foram guardadas em frascos escuros e num frigorífico *AEG Santo* a aproximadamente 3°C.

3.3. Análise por cromatografia gasosa

De modo a ser possível comparar os resultados obtidos no âmbito desta dissertação, as amostras foram analisadas em contexto de empresa utilizando cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS) com extração em solução etanólica. O método utilizado foi o descrito pela norma ISO 20752:2014 e a resolução IVO-296/2009 com micro-extração em fase sólida (SPME) utilizando fibra de polidimetilsiloxano com 100µm seguindo-se a cromatografia gasosa.

Inicialmente a amostra passa por um período de 43h de maceração em solução etanólica a 12% à temperatura ambiente. Para a quantificação do TCA libertável são recolhidas 50 mL e guardados em frascos escuros de modo a evitar a degradação do TCA.

Para a realização da cromatografia gasosa foi utilizado como aparelho um *Thermo Trace GC Ultra*, com uma coluna capilar de fenilmetilpolissiloxano a 5%, TG-5MS, com deteção por espectrometria de massa (*Thermo ISQ*).

Para ser possível quantificar o TCA foi necessário recorrer ao método de calibração com padrão interno, onde se preparou uma solução de etanol a 12% contendo TCA deuterado para ser utilizado como padrão interno fazendo variar as concentrações entre 0,5 e 50 ng/L.

Seguidamente foi colocado o mesmo volume das diferentes amostras em vials distintos de modo a ocuparem apenas metade da sua capacidade total, de modo a evitar o contacto entre a fibra do SPME e a fase líquida. Antes dos vials serem fechados e colocados a analisar, adicionou-se NaCl até à saturação, de modo a facilitar o processo de extração, e também o padrão interno (solução de TCA-d5). Depois a fibra adsorve os vapores libertados pela amostra durante 30 minutos a 40±2°C.

Seguidamente a fibra é colocada no injetor do GC para ser realizada a desadsorção durante cerca de 15 minutos a 260°C. O hélio foi utilizado como corrente gasosa de arrastamento no GC com um fluxo constante de 1mL/min.

A deteção foi feita no modo MS/MS, com deteção de três iões e a quantificação do ião mais abundante tendo como ião precursor ião produto, os iões m/z 217 e 199 para o TCA-d5 e os iões m/z 212 e 197 para o TCA.

Por fim, para quantificar o TCA, a área do pico cromatográfico foi corrigida, considerando a área do pico do padrão interno.

3.4. Análise por voltametria de onda quadrada

As análises realizadas no âmbito deste trabalho foram inicialmente efetuadas com aproximadamente 1 minuto de agitação seguido de 30 segundos de repouso antes de iniciar a medição. Verificou-se que ao longo do decorrer dos ensaios ia-se formando uma camada no ET, logo foi necessário efetuar outros testes, como por exemplo de limpeza de maneira a verificar se não havia qualquer influência nos resultados.

3.4.1. Sistema voltamétrico

O sistema voltamétrico utilizado encontra-se representado na Figura 3-1 e consiste num sistema de três elétrodos. O elétrodo auxiliar, identificado na Figura 3-1 (a) é um elétrodo de platina (M241Pt da *Radiometer Copenhagen*) com uma placa de platina. O elétrodo de trabalho, apresenta-se na Figura 3-1 (b) e consiste num elétrodo de prata (M295Ag da *Radiometer Copenhagen* com lote 831-11) com uma barra de prata com 103 mm de altura e 7,5 mm de comprimento. Por fim o elétrodo de referência, Figura 3-1 (c), é um elétrodo de dupla junção Ag/AgCl da *Hanna instruments*.

Todos os elétrodos encontram-se ligado a um instrumento de medição da *Dropsens*, o *μStat 400*. Este dispositivo contém um microprocessador que controla o potencial ou a corrente aplicada nos elétrodos e mede a corrente ou a resposta do potencial. O *software* utilizado para a receção e tratamento de dados foi o *DropView 3.0*.

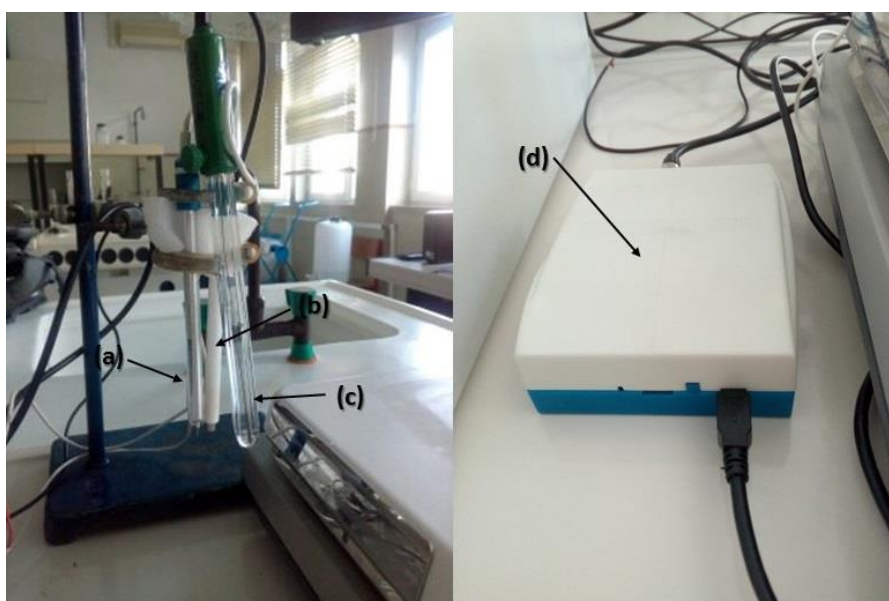


Figura 3-1- Sistema voltamétrico com elétrodos auxiliar (a), de trabalho (b) e de referência (c) e potencióstato (d).

Os voltamogramas foram obtidos com potenciais entre -1,0 e 1,0 V com um alcance de corrente de ± 10 mA. Os dados eram medidos a cada 0,007 V. Utilizou-se ainda um tempo de equilíbrio de 2,0 s, demorando cada análise cerca de 1 minuto.

Para a realização dos testes da reprodutibilidade foi utilizado um dispositivo de medição e um *software* de receção diferentes, embora o sistema de elétrodos se tenha mantido o mesmo.

Neste caso o sistema utilizado tinha como dispositivo um *Potentiostat-Galvanostat* (PG580, da Uniscan), e a aquisição de dados era realizada com o *software* UiEChem v.1.34 (*Unisan Instruments Ltd*). Neste caso os voltamogramas foram obtidos tanto com o mesmo intervalo de alcance como o mesmo alcance de corrente.

Durante as experiências, com o intuito de verificar possíveis alterações com a temperatura e uma vez que o TBAP, na concentração utilizada (0,2M) a temperaturas baixas é difícil de dissolver alterou-se ligeiramente o sistema.

Assim, utilizou-se um pequeno reator com camisa de aquecimento onde iria circular água quente proveniente de um banho.



Figura 3-2- Sistema de aquecimento utilizado na quantificação dos contaminantes. À esquerda o banho de aquecimento e à direita o reator.

Posto isto, optou-se por fazer circular água a cerca de 30°C proveniente de um banho *Sotell-Haake E12*. Esta temperatura será suficiente para manter o TBAP dissolvido, corresponde à temperatura ótima de funcionamento do ER e não é suficientemente alta para o ACN evaporar.

Para as experiências em que se alterou o eléctrodo de trabalho utilizam-se dois eléctrodos de prata, um da *Radiometer Copenhagen* do mesmo tipo que o inicial (M295Ag), mas de um lote diferente 789-11. O outro utilizado era a *Radiometer Electrodes* do tipo P4011.

3.4.2.Reprodutibilidade de padrões

De modo a ser possível identificar a reprodutibilidade da resposta, analisaram-se as mesmas amostras contendo TCA em ACN/água (1,5:1, v:v) com 0,2M de TBAP, em aparelhos diferentes. Este teste serviu também para ser possível regularizar e otimizar alguns parâmetros no *software Dropview*, uma vez que o sistema anterior estava totalmente configurado para os trabalhos anteriores.

3.4.3.Limpeza dos eléctrodos convencionais

De modo a diminuir qualquer efeito indesejado causado pela eletrodeposição, foi necessário avaliar o efeito da limpeza dos eléctrodos durante as experiências. Assim foram realizados os seguintes ensaios.

- i. Numa solução de ACN/água com 0,2M de TBAP foram realizados ensaios com intervalos de 10 minutos durante 30 minutos sem qualquer tipo de limpeza ou adição de volume.

- ii. Numa solução de ACN/água com 0,2M de TBAP foram realizados ensaios com intervalos de 10 minutos durante 30 minutos sem adição de volume, mas com limpeza entre ensaios.
- iii. Realização de uma curva de calibração por adição de padrão, com adição de solução ACN/água com 0,2M de TBAP sem TCA com limpeza dos elétrodos (apenas com papel) entre ensaios.
- iv. Realização de uma curva de calibração por adição de padrão, com adição de solução ACN/AnC (amostra não contaminada) com 0,2M de TBAP com limpeza dos elétrodos (apenas com papel) entre ensaios.
- v. Realização de uma curva de calibração por adição de padrão, com adição de solução ACN/água com 0,2M de TBAP com TCA com limpeza dos elétrodos (apenas com papel) entre ensaios.

3.4.4. Validação do método de SWV

3.4.4.1. Repetibilidade do solvente

De modo a verificar que a resposta do solvente não influenciaria os resultados, avaliou-se a repetibilidade deste. Assim, preparam-se três soluções de ACN/água (1,5:1; v:v) com 0,2 M de TBAP em três dias diferentes e analisam-se duas vezes por dia. Posto isto, através da sobreposição dos voltamogramas avaliou-se a variabilidade da resposta.

3.4.4.2. Método de calibração, limites de deteção e quantificação

O método de calibração utilizado foi o método por adição de padrão, isto é, todas as adições são feitas diretamente na amostra.

Este método é utilizado quando é difícil reproduzir um branco da matriz sem o componente com interesse em estudar. Este método consiste na adição de quantidades conhecidas da substância em diferentes níveis numa matriz da amostra (Bottoli, et al., 2004).

De uma forma geral, este método pode ser descrito pela seguinte fórmula (Harris, 1998):

$$\frac{\text{Concentração do analito na amostra}}{\text{Concentração do analito+padrão na mistura}} = \frac{\text{senal da amostra}}{\text{senal da mistura}} \quad (3.1)$$

Após transformações algébricas e considerando que adição padrão é feita numa amostra com concentração inicial desconhecida, C_a , com uma intensidade de corrente S_a , onde S é a área do pico. Então uma concentração conhecida do padrão com o analito, C_p é adicionada em pequenos volumes à amostra obtendo-se um sinal S_{a+p} . a curva de calibração pode ser obtida graficamente através da equação:

$$S_{a+p}V_f = m \times (C_aV_a + C_pV_p) \quad (3.2)$$

Onde V_f é o volume final da diluição, V_a é o volume pipetado da amostra, V_p é o volume pipetado da solução padrão e m é o valor do declive. A curva pode ser representada graficamente como representado na Figura 3-3.

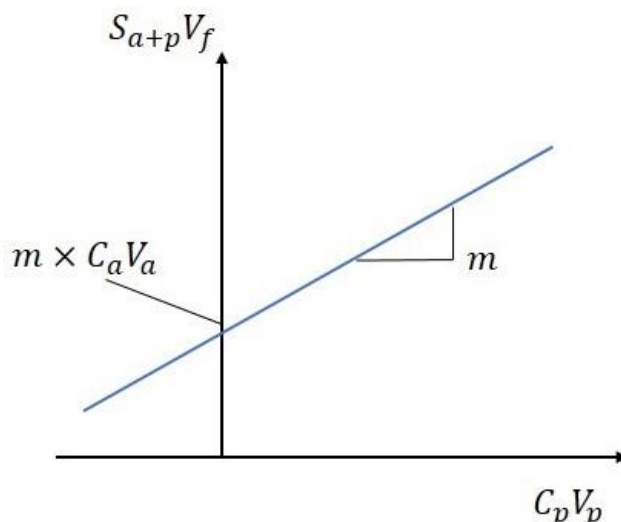


Figura 3-3- Representação gráfica da expressão da curva de calibração por adição de padrão.

De modo a ser possível estudar a linearidade e calcular os respetivos limites do método (limite de deteção e limite de quantificação) utilizou-se uma solução padrão composta por ACN e água destilada com uma proporção 1,5:1 (v/v) e 0,2M de TBAP com concentrações a variar entre os 160 e 200 ppt de TCA.

A esta solução for adicionada volumes de 300 μ L a uma solução de 20 mL contendo ACN e amostra não contaminada também numa proporção de 1,5:1 (v/v) e 0,2M de TBAP, fazendo com que em cada ensaio as concentrações variassem entre si. A utilização de amostra não contaminada no lugar de água destilada deveu-se ao facto de, através das experiencias relativas à limpeza dos elétrodos, se ter verificado que a água não teria um comportamento estável o suficiente para tornar a calibração suficientemente confiável.

Calculada a curva de calibração com um nível de regressão satisfatório, procedeu-se ao cálculo do limite de deteção (LD) e do limite de quantificação (LQ).

Existem três formas diferentes para ser possível calcular estes dois limites: em branco, por estudo de linearidade ou por abordagem gráfica com base no ruído. Uma vez que a linearidade tem que ser estudada para validação do método, será a segunda forma a ser aplicada neste trabalho (International Organisation of Vine and Wine, 2005).

O LD pode ser definido como o teor mínimo a partir do qual é possível determinar, com uma certa certeza, a presença de uma substância. Isto é, em termos práticos é a concentração mínima que é possível distinguir do branco e pode ser calculado da seguinte forma.

$$LD = \frac{3,3 \times s_{y/x}}{b} \quad (3.3)$$

Onde $s_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e é obtido pela Equação (3.4) (Associação de laboratórios acreditados de Portugal, 2013).

$$s_{y/x} = \frac{\sum (y_i - (b + (m x_i)))^2}{N - 2} \quad (3.4)$$

Sendo N o número de pontos considerados na curva.

O LQ é a menor concentração obtida, a partir da qual é possível quantificar o composto com um certo nível de exatidão e precisão. A nível prático é o padrão de calibração, excluindo o branco, com menor concentração. Este limite pode ser calculado através da Equação (3.5) (Associação de laboratórios acreditados de Portugal, 2013).

$$LQ = \frac{10 \times s_y / x}{b} \quad (3.5)$$

Por fim e na prática, o LQ é bem mais relevante que o LD, sendo por convicção o último $\frac{1}{3}$ do primeiro (International Organisation of Vine and Wine, 2005).

3.4.4.3. Precisão e exatidão da análise

A precisão e exatidão são dois aspetos bastante importantes para a validação de métodos.

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra. Existem três parâmetros que podem definir a precisão: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

No âmbito deste trabalho optou-se por estudar a precisão através da repetibilidade. Assim, efetuaram-se uma série de medições sob várias amostras, com vários níveis de concentrações, em condições de repetibilidade. De seguida, a repetibilidade pode ser expressa como desvio-padrão, variância ou coeficiente de repetibilidade, sendo este último expresso em percentagem e dado como:

$$cv_r(\%) = \frac{Sr_i}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.5)$$

Onde Sr_i é o desvio padrão da repetibilidade e \bar{x} é a média dos valores considerados. (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000)

Para interpretação dos resultados expressos segundo o coeficiente de repetibilidade (também conhecido por desvio padrão relativo, %DRP), uma baixa percentagem indica que a dispersão dos resultados é pequena, logo existe uma elevada repetibilidade, caso contrário, um grande valor indica uma variação significativa com os resultados.

Por outro lado, a exatidão é a concordância entre o valor médio dos vários ensaios e o valor dado como verdadeiro do composto de interesse, sendo a análise estatística feita através de testes estatísticos realizados através do software SPSS.

Para analisar a exatidão, analisaram-se várias amostras reais da água de cozedura da cortiça contaminada com diferentes níveis de TCA (valores entre 1 e 11 ppt), já analisadas na empresa, sendo este o valor dado como verdadeiro.

As amostras, uma vez que contêm componentes orgânicos, foram diluídas em ACN com 0,33M de TBAP para ser possível obter a proporção desejada de ACN/Amostra (1,5:1; v:v) com 0,2M de TBAP.

Assim, sempre que possível, realizaram-se três ensaios de voltametria de onda quadrada para cada amostra de modo a minimizar qualquer erro.

3.4.4.4. Otimização da validação

Durante a validação realizaram-se uma gama de diversas análises onde se alteravam pequenos aspetos, de modo a descartar várias situações que podiam interferir com os resultados, entre os quais:

- A água utilizada, uma vez que a água destilada poderia ter iões a interferir na estabilidade das análises. Para este efeito, analisaram-se diversos brancos, uns com água destilada e outros com água desionizada.
- O eléctrodo de trabalho, pois este já podia estar danificado após inúmeras utilizações. Para isto, testaram-se dois eléctrodos de prata diferentes para avaliar a sua estabilidade.
- A limpeza dos eléctrodos com acetona, entre medições.

Todas as análises foram feitas com o sistema de aquecimento descrito anteriormente. No despiste da água, analisaram-se três brancos com cada uma das águas, sendo que a água destilada teria acabado de ser destilada para descartar qualquer alteração. Nas análises do eléctrodo, realizaram-se adições de padrão inicialmente com TCA e posteriormente com os outros contaminantes. Na situação da limpeza apenas se utilizou adição de padrão com TCA, nestas ultimas duas situações utilizou-se água desionizada. Como já foi referido, a proporção utilizada foi sempre de ACN/Água seria de 1,5:1 (v/v) com 0,2 M de TBAP.

3.5. Análise qualitativa de outros contaminantes

Para ser possível verificar a forma e a avaliar a diversidade do método, bem como a sua especificidade, realizaram-se ensaios de adições de padrão para outros componentes diferentes do TCA, nomeadamente o DCA, TCP e TBA.

Para a análise do TCP e do TBA as soluções padrão continham aproximadamente a mesma concentração que as soluções de TCA (cerca de 200 ppt) e 0,2M de TBAP. Já para o DCA, utilizou-se uma concentração um pouco mais elevada (500 ppt) também com 0,2M de TBAP. Por fim, preparou-se uma solução padrão com todos os contaminantes, incluindo o TCA, de maneira a ser possível comparar com os resultados individuais.

4. Resultados e Discussão

4.1. Reprodutibilidade de padrões

Como inicialmente foi necessário, mudar tanto o potenciostato como o *software* de aquisição de dados, foi necessário realizar algumas experiências de reprodutibilidade, de modo a que os valores de aquisição de dados fossem o mais semelhantes possível.

Apesar de haver parâmetros semelhantes, o *software* DropView tinha um parâmetro de tempo que não era considerado no UiEChem, sendo assim necessário realizar uma experiência para ver qual é que se adaptava mais.

Após o ensaio com o aparelho antigo, notou-se que o software entre o início da aquisição de dados e a aquisição do primeiro dado, passavam dois segundos, sendo esse então o tempo que se iria utilizar para testar todos os outros tempos.

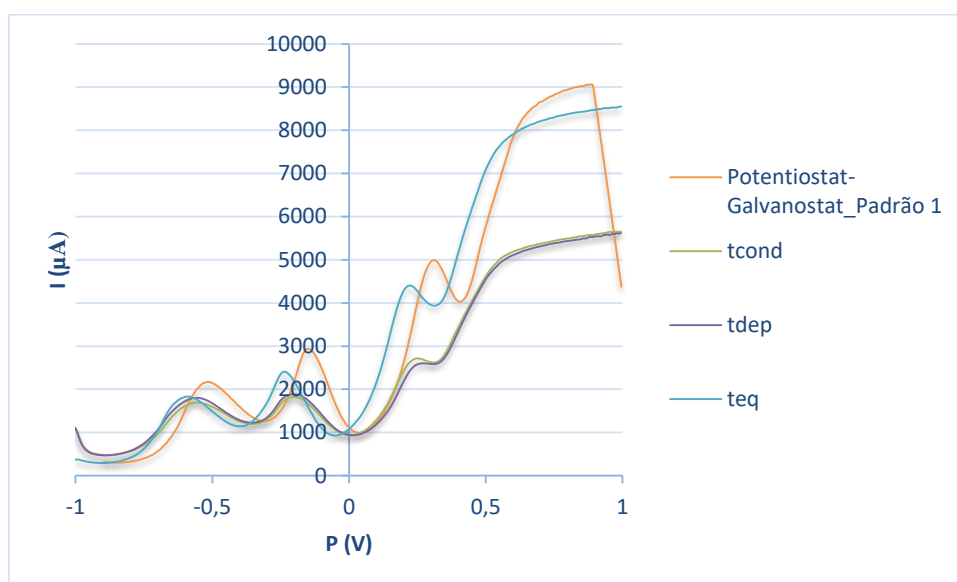


Figura 4-1- Voltamogramas dos ensaios da reprodutibilidade do solvente ACN/Água.

Pela análise da Figura 4-1, percebe-se que nenhum dos tempos se adequa totalmente ao aparelho anterior, portanto concluiu-se que o que se adaptava melhor era o tempo de equilíbrio (teq).

Outro ponto também analisado foi a reprodutibilidade entre aparelhos e de dois padrões no mesmo aparelho, todos apenas só de solvente ACN/Água com 0,2M de TBAP.

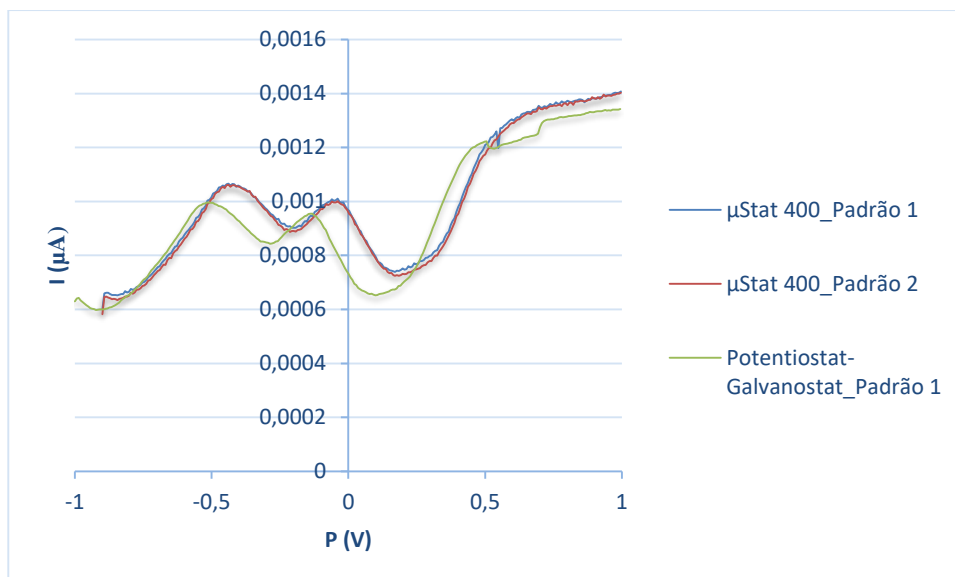


Figura 4-2- Voltamogramas de comparação da reprodutibilidade do solvente ACN/Água entre os dois aparelhos.

Pela Figura 4-2 nota-se que existe uma boa reprodutibilidade entre padrões diferentes no aparelho μ Stat 400, mas quando comparado com o Potentiostat-Galvanostat existe um ligeiro deslocamento das curvas.

4.2. Limpeza dos elétrodos

Durante as análises iniciais houve a necessidade de verificar qual a importância da camada acumulada nos elétrodos entre ensaios e qual a sua interferência nos resultados. Para isso foram realizadas uma serie de experiências de modo a tentar testar todos os cenários possíveis, tanto utilizando como solvente o ACN com água ou com amostra não contaminada.

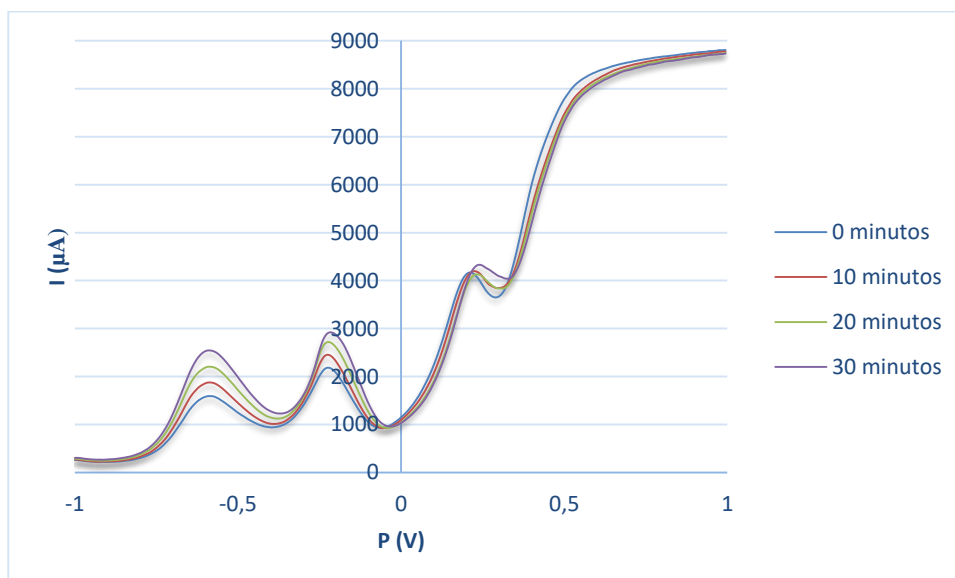


Figura 4-3-Voltamogramas do ensaio de limpeza com solução ACN/Água com 0,2M de TBAP sem qualquer limpeza ou adição de volume.

A primeira experiência, representada na Figura 4-3, verifica-se que quando não existe qualquer limpeza de elétrodos, a área dos picos vai aumentando mesmo sem qualquer tipo de adição de TCA. Isto deve-se ao facto de no elétrodo de trabalho ocorrer uma deposição que

dificulta assim a transferência de eletrões entre a solução e a superfície do elétrodo, dando a ilusão que está a ocorrer uma adição de volume com aumento de concentração.

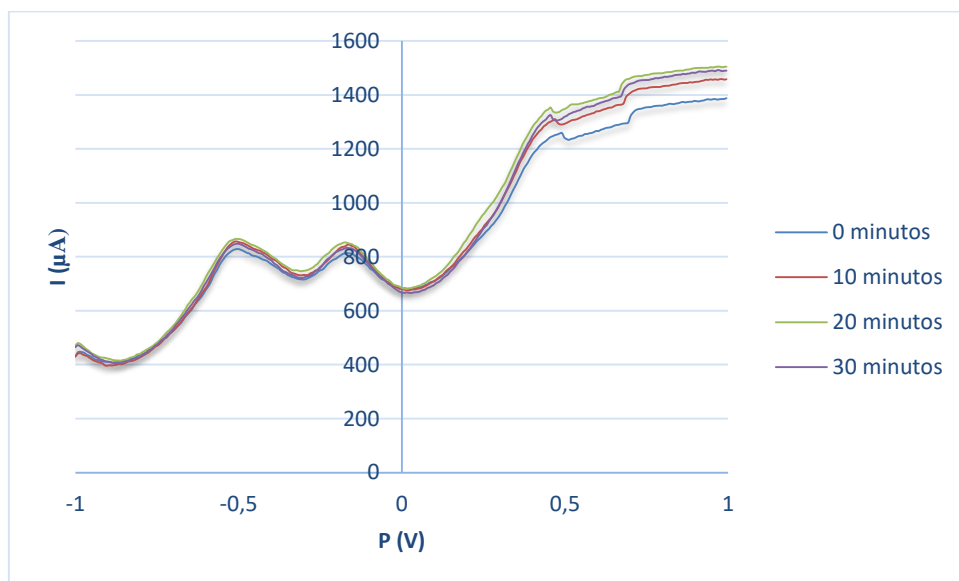


Figura 4-4- Voltamogramas do ensaio de limpeza com solução ACN/Água com 0,2M de TBAP com limpeza sem adição de volume.

A segunda experiência consistiu na repetição da primeira, só que desta vez limpando os elétrodos. Assim, pela Figura 4-4, verificou-se que já não ocorre o aumento de área, demonstrando que a limpeza pode ser definitivamente um fator importante.

De seguida, avaliou-se esta teoria com adições de volume, com e sem TCA.

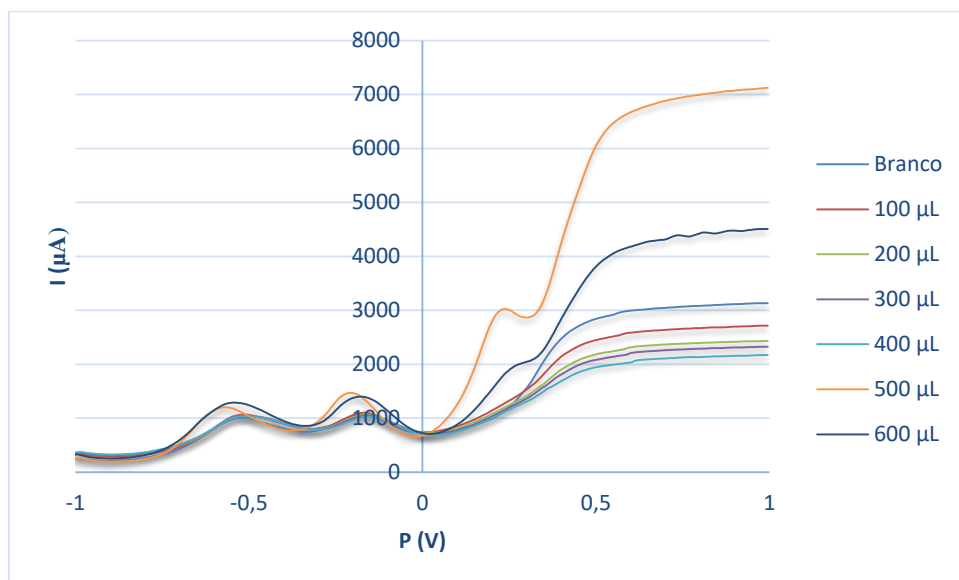


Figura 4-5- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/Água com 0,2M de TBAP sem TCA com limpeza.

Na Figura 4-5, verificam-se os resultados referentes à adição de padrão sem qualquer concentração de TCA, isto é, foi adicionado apenas o solvente com 0,2M de TBAP. Através da análise verifica-se que inicialmente não se verifica um aumento de área substancial embora nos últimos dois ensaios tenha existido uma deslocação e um aumento dos picos. Este fenómeno pode ocorrer possivelmente devido a dois fatores: ou a acetone nitrilo foi evaporando ao longo da

experiência alterando assim o solvente base, ou a água sendo água destilada e não desionizada, alguns iões poderão interferir tornando o seu comportamento um pouco imprevisível.

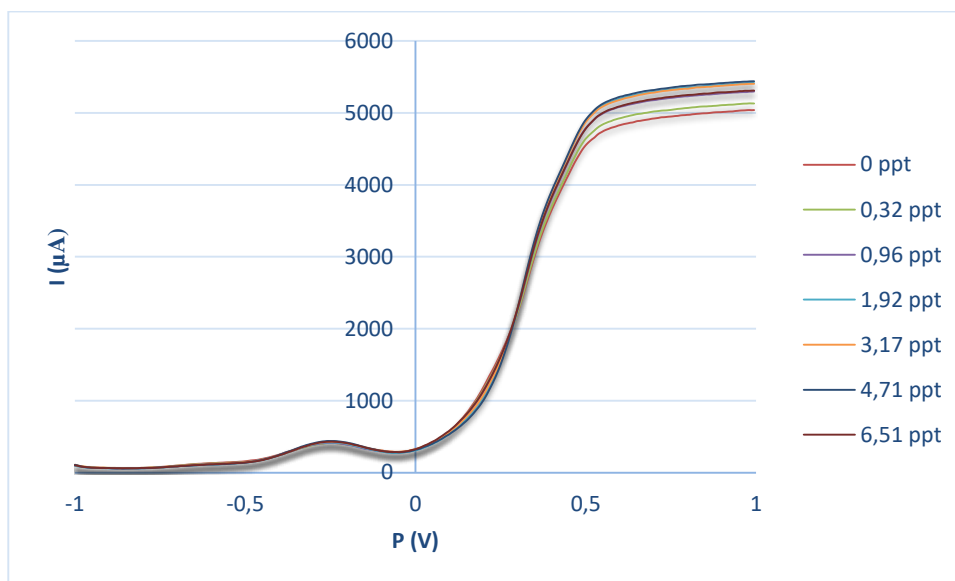


Figura 4-6- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP com TCA com limpeza.

Por fim, realizaram-se as duas adições de padrão com TCA como as utilizadas para cálculo dos limites de detecção e quantificação, realizando sempre a limpeza entre ensaios. Na Figura 4-6, está representada a experiência com amostra não contaminada. Pela análise dá para verificar que não existe um aumento significativo da área como seria de esperar (inicialmente maior que depois iria diminuindo), embora este ainda ocorra. É importante ainda referir que dever-se-ia ter utilizado 0,33M de TBAP e não 0,2M quando se trata de amostras com componentes orgânicos de modo a corrigir a proporção relativa na solução final (Freitas, 2014).

Na Figura 4-7, está a experiência análoga, mas desta vez com água

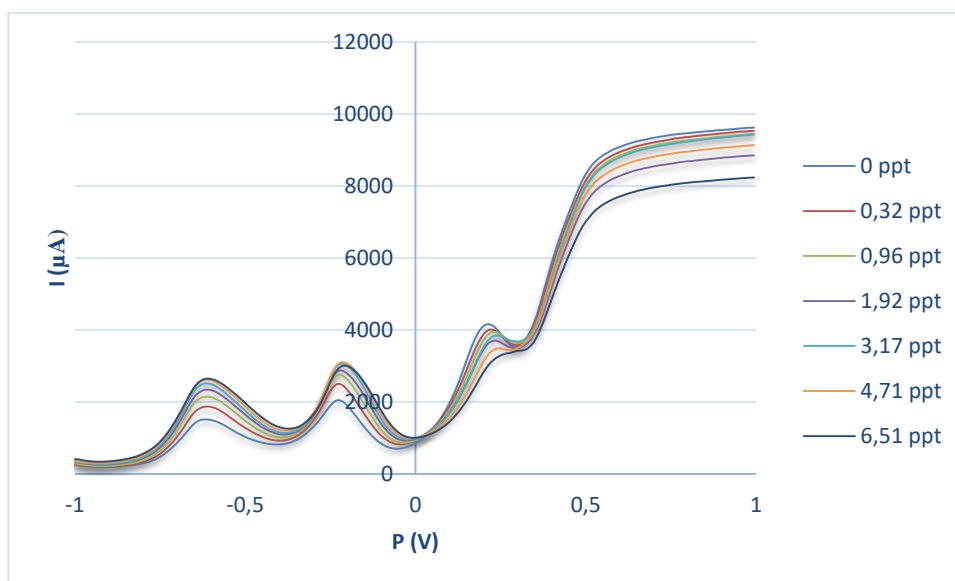


Figura 4-7- Voltamogramas do ensaio de limpeza com adição de padrão de uma solução ACN/Água com 0,2M de TBAP com TCA com limpeza.

4.3. Validação do método de SWV

4.3.1. Repetibilidade do solvente

Um aspeto importante para a validação de um método, é a repetibilidade do solvente, pois é necessário garantir que este não interfere de qualquer maneira com os resultados, permitindo assim uma comparação mais simples.

Assim, realizaram-se dois conjuntos de experiências com diferentes ensaios cada, um com ACN/Água e outro com ACN/AnC, com 0,2M e 0,33M de TBAP respetivamente, embora nas experiências com amostra não contaminada tenha existido uma correção de TBAP.

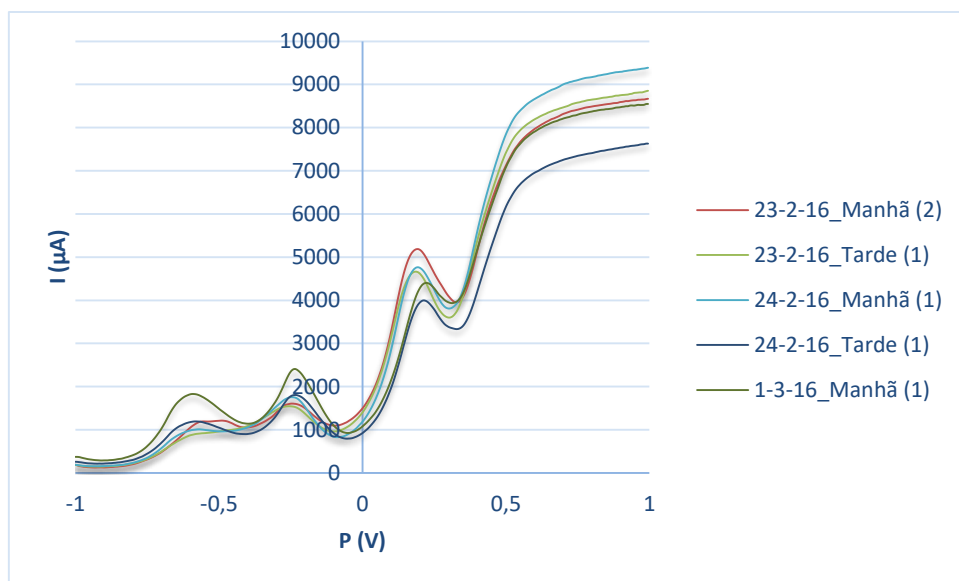


Figura 4-8- Voltamogramas dos ensaios da repetibilidade do solvente ACN/Água.

Pela análise da Figura 4-8 é possível verificar que o comportamento do solvente em água não é estável o suficiente para ser seguro confiar, enquanto que através da Figura 4-9 é perceptível que com amostra não contaminada já demonstra ser um pouco mais repetível embora não seja constante.

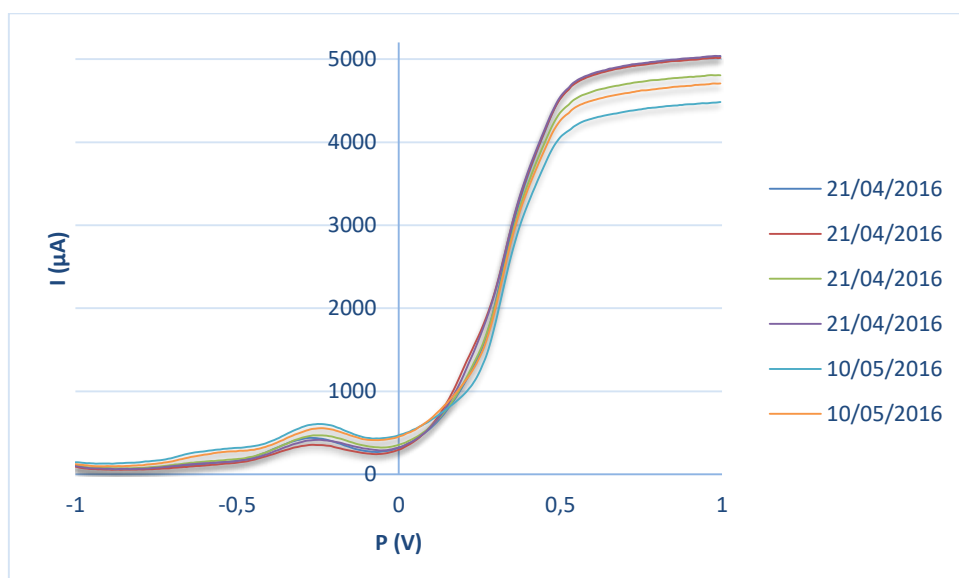


Figura 4-9- Voltamogramas dos ensaios da repetibilidade do solvente ACN/AnC.

4.3.2. Curva de Calibração, Limites de Detecção e Quantificação

Para os estudos de calibração por adição de padrão optou-se por utilizar amostras não contaminadas com TCA da água de cozedura em vez de água, uma vez que, como já foi referido anteriormente a água apresentava um comportamento pouco constante.

Assim, inicialmente utilizaram-se soluções contendo ACN/AnC (1,5:1; v:v) com 0,2M de TBAP (com correção por ser uma substância orgânica) e foram-se adicionando volumes de solução padrão de TCA preparada com ANC/Água (1,5:1; v:v) com 0,33M de TBAP. Contudo com o decorrer das experiências, verificou-se que os resultados não eram os esperados. Tal era notório tanto durante os ensaios como quando se realizavam os cálculos.

Durante as experiências, verificava-se que a cada adição o eléctrodo de trabalho ia ficando mais escuro, mesmo efetuando a limpeza deste entre as adições, e que existia um depósito na solução que o eléctrodo ia soltando. Estes acontecimentos são perceptíveis na Figura 4-10 e Figura 4-11, respetivamente.

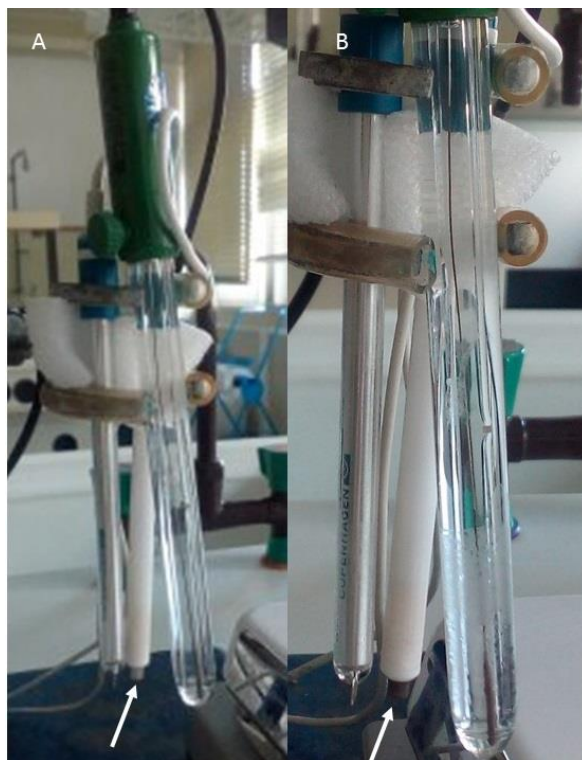


Figura 4-10- Diferença da cor do eléctrodo de trabalho antes (A) e depois (B) do experimento.

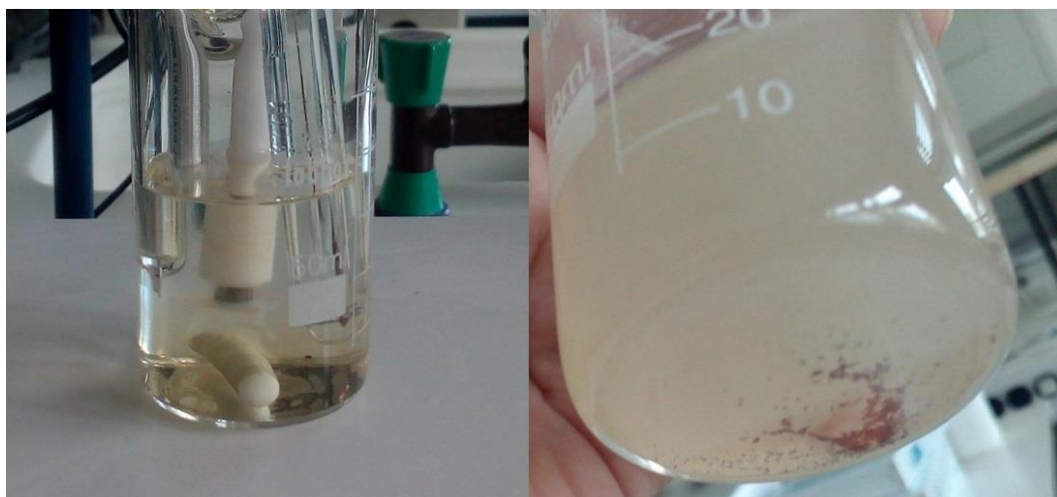


Figura 4-11- Formação do depósito durante o experimento (esquerda) e respetiva quantidade no final (direita).

Segundo Zoski, no *Handbook of electrochemistry*, existe uma característica na voltametria de substâncias orgânicas que consiste na formação de uma camada iônica na superfície do eletrodo de trabalho. Esta camada pode ter alguns efeitos no decorrer do experimento, como a mudança das concentrações relativas ou em mudanças fortes na viscosidade da solução (afetando a transferência de massa). Normalmente estas camadas apresentam comportamentos estáveis, mas em situações extremas podem interferir com a formação dos picos ou até com o alcance do estado estacionário (Zoski, 2007).

No caso deste trabalho, pode ser uma explicação para a interpretação dos resultados finais.

Após todos os cálculos necessários para o método da adição padrão, notou-se as concentrações não se aproximavam de zero como era de esperar numa amostra não contaminada.

Assim, apenas a título de exemplo, a Figura 4-12 mostra os voltamogramas obtidos para um dos ensaios para a realização da calibração por adição de padrão.

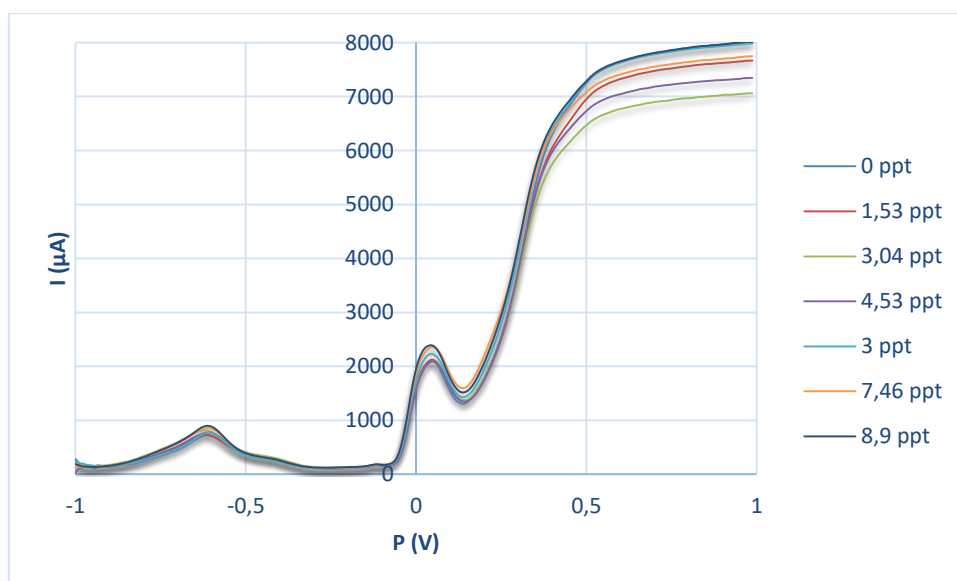


Figura 4-12- Voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,33M de TBAP para construção da curva de calibração.

Como é possível verificar pelos voltamogramas, existem dois picos definíveis. Assim para uma análise mais cuidada é necessário efetuar não só uma curva de calibração para cada pico, mas também uma para a soma dos dois.

Assim, na Figura 4-13, através de uma aproximação da escala do voltamograma, identifica-se os picos A e B.

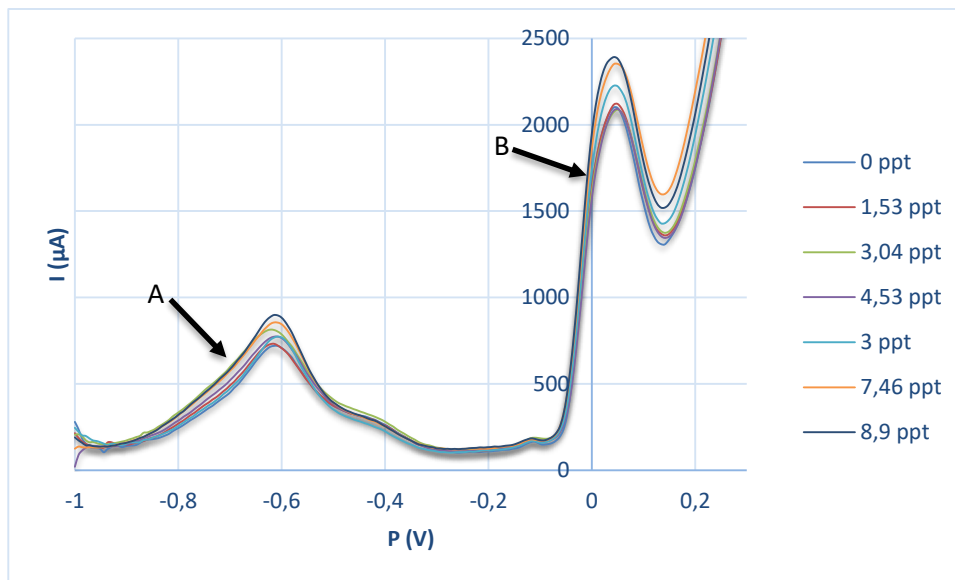


Figura 4-13- Aproximação e identificação das curvas dos voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP para construção da curva de calibração.

Após a integração dos picos através do software Dropview e a realização de todos os cálculos necessários do método, obtiveram-se as três curvas de calibração presentes nas Figura 4-14 a Figura 4-16.

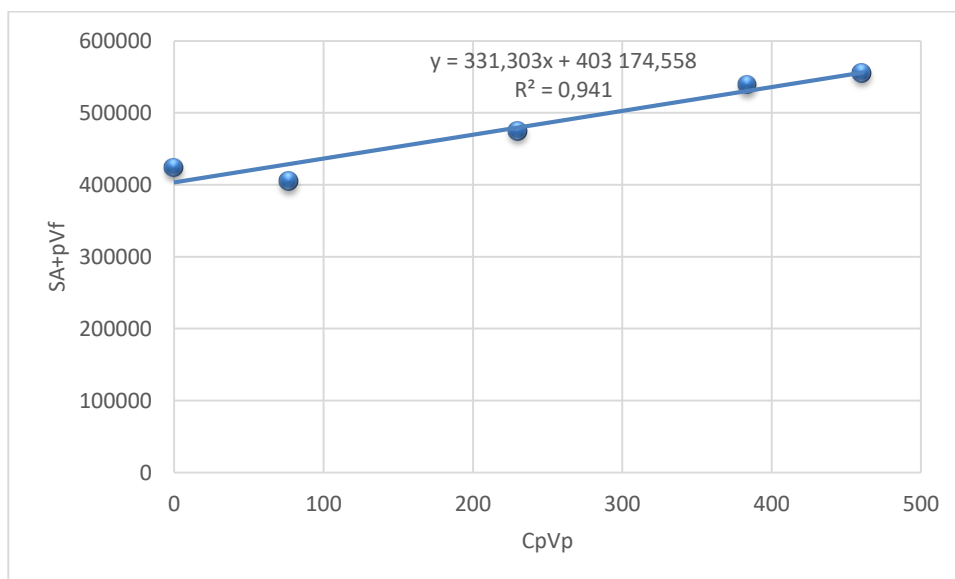


Figura 4-14- Curva de Calibração do pico A.

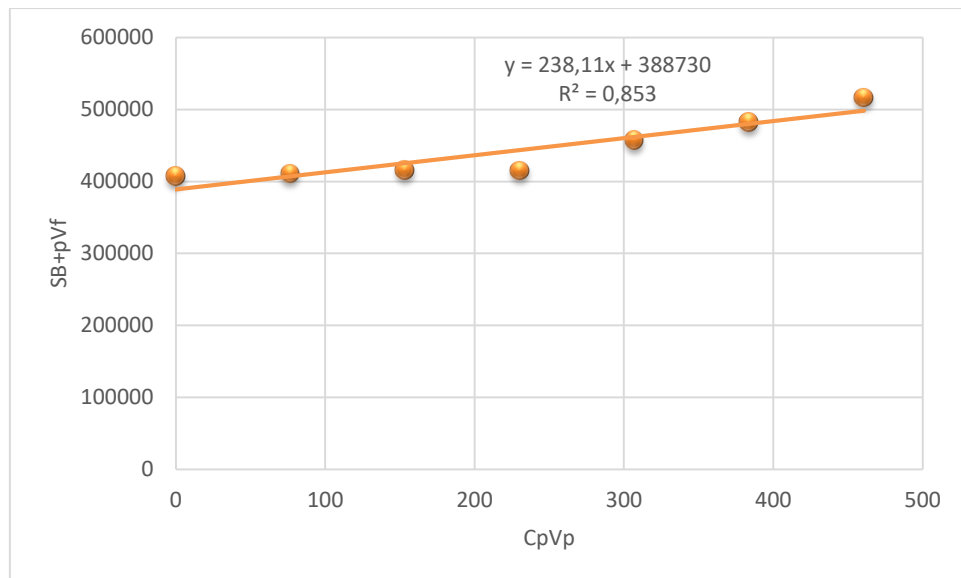


Figura 4-15- Curva de calibração do pico B.

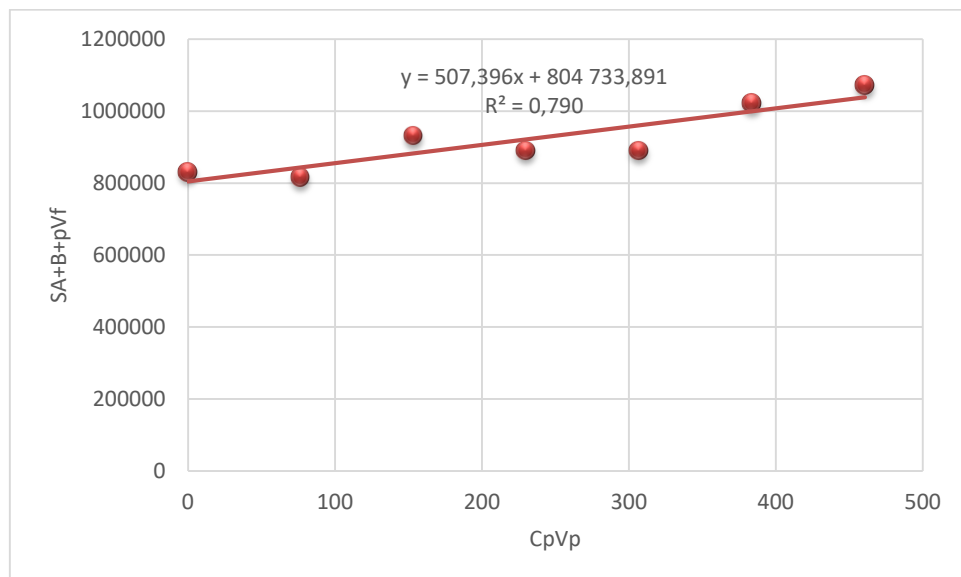


Figura 4-16- Curva de Calibração da soma dos picos A e B.

A Tabela 4-1, mostra de uma maneira resumida os valores obtidos do declive, da ordenada na origem, o coeficiente de correlação, a concentração obtida, o desvio padrão da curva, os limites de detecção e de quantificação, de cada uma das curvas

Tabela 4-1- Valores obtidos para o desvio padrão de cada curva de calibração obtida e respectivos limites de detecção e quantificação.

Pico Considerado	Declive	Ordenada	r ²	C _{obtida} (ppt)	S _{y/x}	LD (ppt)	LQ (ppt)
A	331,303	403175	0,941	60,847	1,898	1,554x10 ⁻⁵	4,708x10 ⁻⁵
A+B	507,396	804734	0,790	79,299	10,355	3,860x10 ⁻⁵	1,290x10 ⁻⁴
B	238,110	388730	0,853	81,628	2,055	1,586x10 ⁻⁵	5,286x10 ⁻⁵

Pela análise dos valores verifica-se em primeiro lugar que apesar de todas apresentarem bons coeficientes de correlação, as concentrações obtidas são bastante superiores às esperadas inicialmente (aproximadamente 0 ppt). Quanto aos limites de detecção e quantificação, apesar

de demonstrar valores bastante baixos (o que seria positivo), com base nos resultados das concentrações, não podem ser considerados válidos por não serem confiáveis.

Como já foi referido, os resultados fugiram um pouco do que seria de esperar. De maneira a perceber se seria alguma coisa durante o desenrolar das experiências realizou-se uma última experiência separadas em 6 ensaios cada um com 4 medições.

De modo a garantir que as condições eram iguais para todos os ensaios, preparou-se 300 mL de ACN/AnC (1,5:1; v:v) com 0,2M de TBAP e para cada ensaio utilizou-se 40 mL, sendo que entre ensaios, o recipiente mantinha-se fechado para o solvente não evaporar. Nos primeiros três ensaios não houve qualquer adição de padrão, existiu apenas limpeza dos elétrodos entre medições. Nos ensaios 4, 5 e 6 adicionou-se em cada medição um volume de 400µL, 500µL e 600µL respetivamente, sempre efetuando a respetiva limpeza. Na Figura 4-17 estão representados os voltamogramas obtidos.

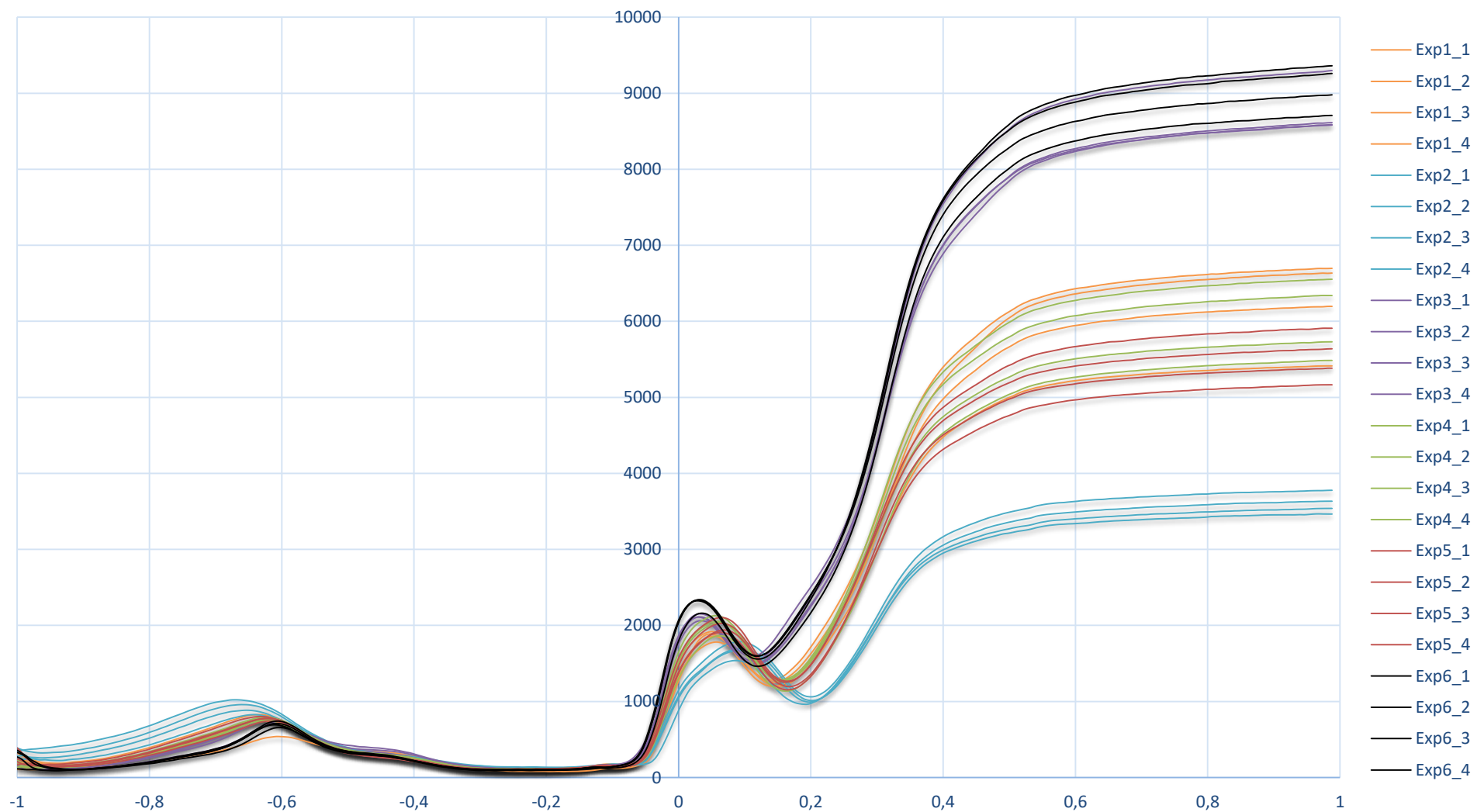


Figura 4-17- Voltamogramas do ensaio com adição de padrão de uma solução ACN/AnC com 0,2M de TBAP para identificação de algum erro nos ensaios já realizados.

Através da análise da figura acima, pode-se concluir que não é possível distinguir os ensaios com adição de padrão e sem adição de padrão. Visto que as amostras foram todas preparadas de igual maneira e a solução padrão utilizada foi a mesma para todas as adições, pode-se concluir que não existe qualquer problema no procedimento de preparação de soluções.

4.3.3. Precisão e Exatidão

Como já foi referido várias vezes ao longo deste trabalho, a concentração de TCA que se encontra na água de cozedura da cortiça, foi analisada através da técnica de GC-MS, utilizada atualmente na empresa em questão. Analisaram-se ao todo doze amostras reais com concentrações compreendidas entre os 0 ppt (amostras não contaminadas) e os 11,84 ppt.

Não foram analisadas mais amostras pois, como se irá verificar mais à frente, os resultados não justificavam o gasto de material.

A precisão do método foi determinada recorrendo ao cálculo do coeficiente de repetibilidade, expresso em percentagem. Na Tabela 4-2, estão representados todos os dados utilizados para o cálculo do respetivo coeficiente (cv_r): concentrações obtidas e suas médias (\bar{x}) e desvios padrão (Sr_i). Estão ainda representadas as concentrações reais de cada amostra.

Todas as amostras deveriam ter sido analisadas pelo método da adição padrão em triplicado, mas existiram algumas amostras em que, ou o volume da amostra não era suficiente para os três ensaios, ou havia curvas de calibração não possíveis de traçar. Assim, apenas foram contabilizadas as amostras em que se realizaram entre 2 a 3 ensaios. Como também já foi explicado anteriormente (Secção 4.3.2), existiram amostras em que foram efetuadas três curvas de calibração devido aos picos existentes nos voltamogramas, nesses casos foi considerada a menor concentração obtida.

Tabela 4-2- Valores obtidos para a determinação da precisão da SWV.

Concentração Real (ppt)	Concentração obtida (ppt)			\bar{x} (ppt)	Sr_i	cv_r (%)
0,000	84,512	60,847	42,959	62,773	20,843	33,204
1,483	13,938	28,296	18,355	20,196	7,354	36,412
1,879	98,936	24,521	-	61,729	52,619	85,243
2,187	45,632	10,52	-	28,076	24,828	88,431
3,375	80,868	11,558	21,114	37,847	37,563	99,250
11,840	21,765	9,465	19,622	16,951	6,571	38,764

Como é possível verificar pelos dados acima apresentados, o coeficiente de repetibilidade nunca é inferior a 30%, sendo que a média dos seis valores é de 63,551%, o que significa que o método tem uma precisão bastante baixa.

Para os cálculos da exatidão, os valores obtidos pelo método de voltametria de onda quadrada foram comparados com os obtidos por GC-MS. Na Secção 3.4.4.3 foi referenciado um método que tinha como base o testes estatísticos, mais precisamente o Teste *T-Student*. Contudo, depois de realizar todos os cálculos verificou-se que o resultado não seria possível se

calcular devido à discrepância dos valores obtidos pela voltametria. Posto isto, optou-se por uma simples visualização gráfica, presente na Figura 4-18.

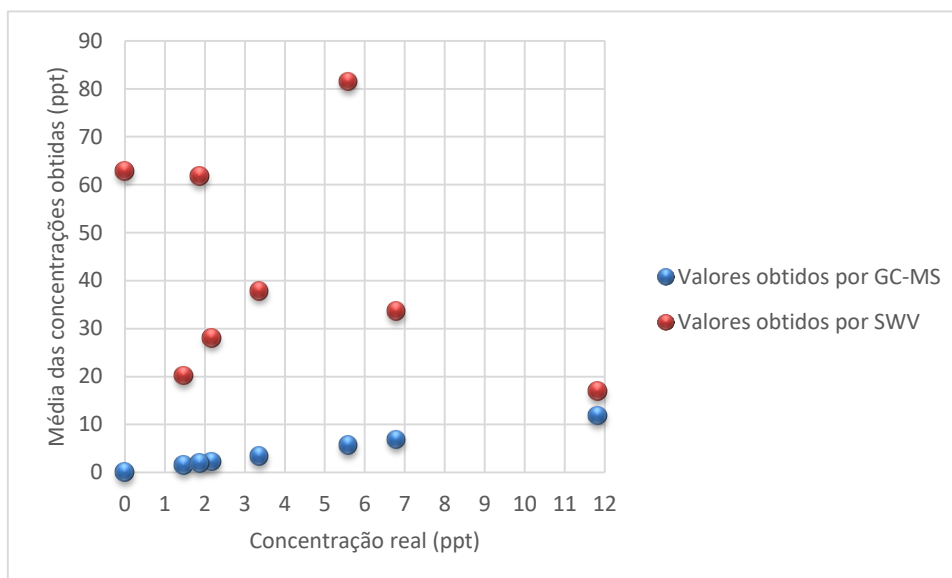


Figura 4-18- Representação gráfica das concentrações reais vs. a médias das concentrações obtidas.

Como é possível analisar, as concentrações obtidas são bastante superiores às reais, apenas a amostra de concentração mais elevada (11,84 ppt) tem resultados que se podem considerar semelhantes. Isto leva a concluir, que o método de voltametria de onda quadrada, nas condições experimentais utilizadas, tem uma exatidão bastante mais fraca que a esperada.

4.3.4.Otimização da validação

Durante o processo de validação foram alterados e testados alguns aspetos que poderiam estar a interferir com os resultados.

A primeira alteração foi realizada de modo a se tentar perceber se na realidade o solvente contendo água destilada estaria mesmo a interferir com o resultado.

Para isso, realizou-se mais um conjunto de experiências, uma com água destilada e outra com água desionizada. Para cada uma prepararam-se três brancos distintos aos quais se adicionaram 0,2M de TBAP. Para os brancos de água destilada, como já se tinha concluído que a resposta era instável, apenas se analisaram duas vezes com o intuito de verificar apenas se a água acabada de destilar variava. No caso da água desionizada, como nunca se tinha analisado a resposta obtida, em cada branco analisou-se três vezes limpando sempre os eléctrodos com papel, entre análises.

Os voltamogramas com escala aumentada da água destilada encontram-se na Figura 4-19 e os da água desionizada na Figura 4-20.

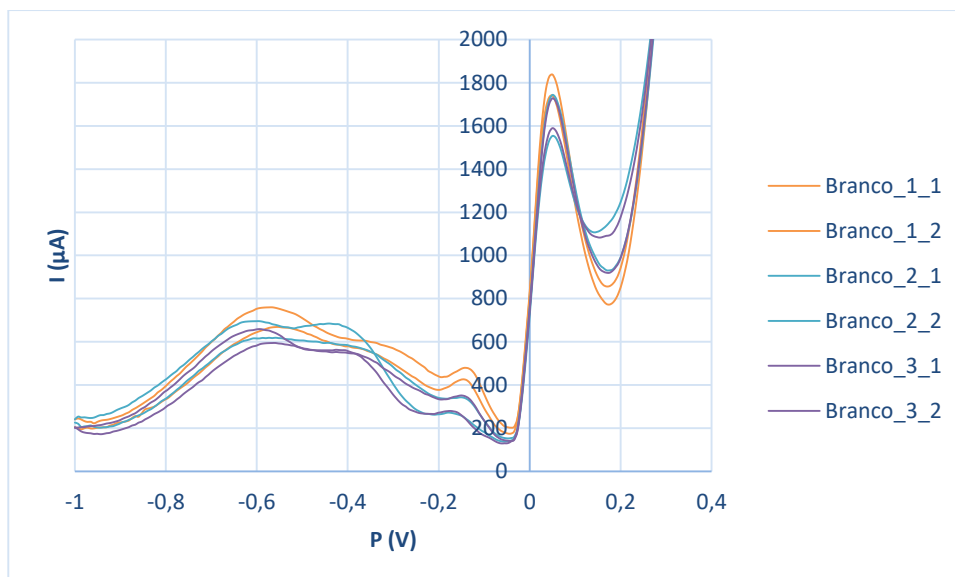


Figura 4-19- Voltamogramas com escala aumentada das experiências com ACN/Água destilada com 0,2M de TBAP.

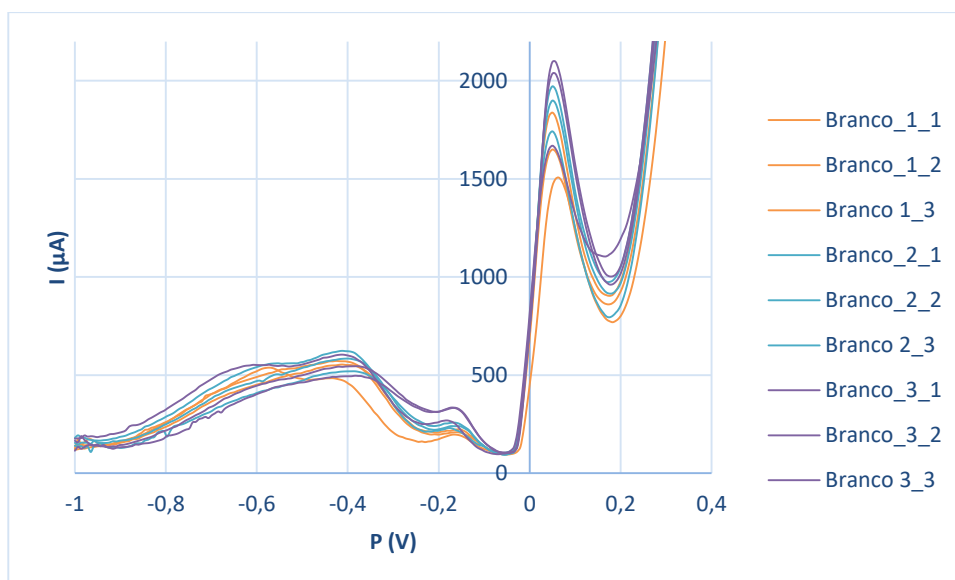


Figura 4-20- Voltamogramas com escala aumentada das experiências com ACN/Água desionizada com 0,2M de TBAP.

Pela análise dos dados em cima representados verifica-se que nenhum dos solventes apresenta um comportamento perfeitamente estável, mesmo quando se considera a análise do mesmo branco.

Assim, pode-se concluir que, apesar de poder existir alguma interferência por causa dos iões existentes na água destilada não será suficiente para contribuir para a falta de consistência dos brancos, uma vez que esta também existe na água desionizada.

Poderão existir várias explicações para o facto de nem o branco se conseguir estabilizar, como por exemplo o tipo de eléctrodos não se adaptar ao método, ou estes precisarem de uma lavagem mais consistente. Esta ultima hipótese poderia ser possível com uma lavagem com ácido, embora para, após isso seria necessária uma análise para obter um voltamograma padrão, o que para o eléctrodo de trabalho de prata não existe qualquer referência bibliográfica, apesar de mais a frente ser analisada uma alternativa.

Estes estudos complementares ainda serviram para analisar o impacto que a temperatura poderia ter nos resultados finais, pois foram realizadas com aquecimento de modo a manter a solução a cerca de 30°C.

Como conclusão verificou-se que a grande alteração visível foi o facto do TBAP se manter dissolvido durante toda a experiência, isto é, a solução mantinha-se sempre translúcida o que não acontecia sem o aquecimento, como se pode verificar na Figura 4-21.

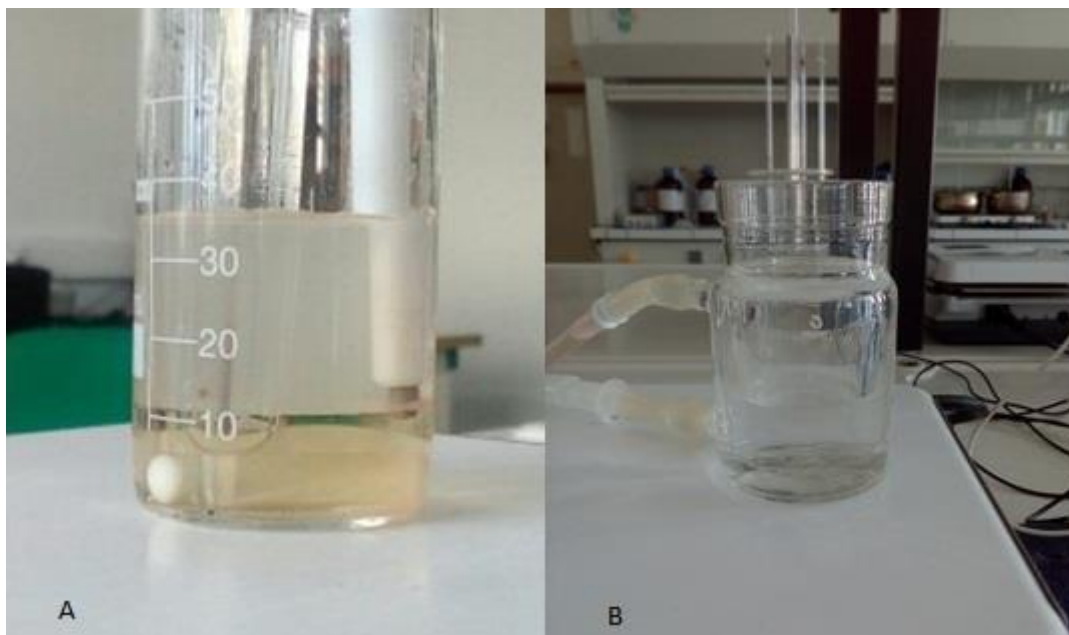


Figura 4-21- Diferença entre solução sem aquecimento (A) e com aquecimento (B).

Como já foi referido o problema de não se conseguir validar o método pode-se encontrar no eléctrodo de trabalho. Para isso, realizaram-se experiências nas mesmas condições laboratoriais (branco contendo ACN/Água desionizada (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP a 30°C) alterando apenas o eléctrodo de trabalho, para os já descritos na Secção 3.4.3.

A Figura 4-22 representa os voltamogramas obtidos para o ET inicial.

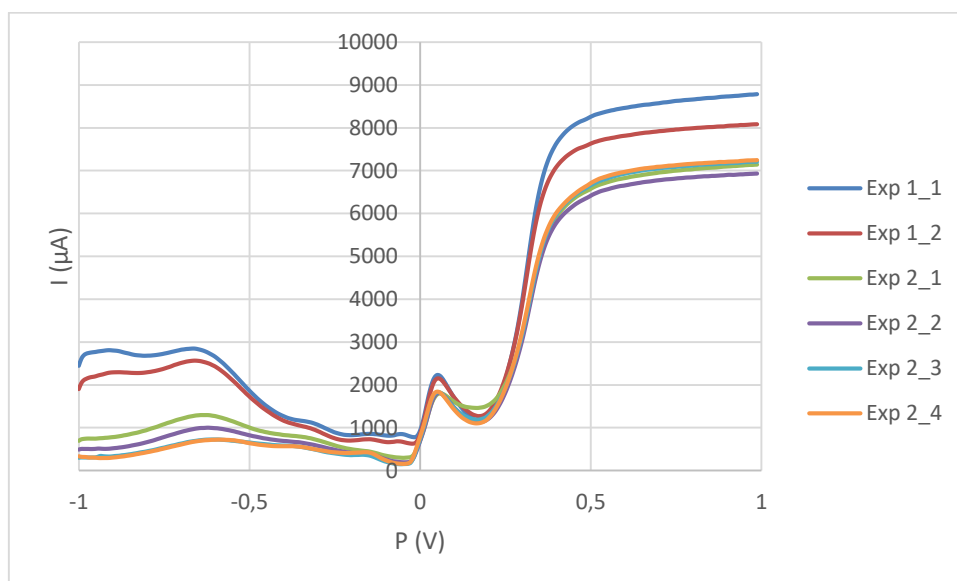


Figura 4-22- Voltamogramas dos vários ensaios com o eléctrodo de trabalho M295Ag inicial.

Como se pode ver pela análise dos resultados, o eléctrodo inicialmente utilizado já não apresenta qualquer estabilidade na linha de base dos voltamogramas, isto porque após alguma análise visual cuidada notou-se que o eléctrodo já continha alguma corrosão relativa à utilização.

Posto isto, optou-se por analisar um eléctrodo de prata do mesmo fabricante e do mesmo tipo, com alteração apenas do lote e sendo totalmente novo. Os voltamogramas obtidos encontram-se na Figura 4-23.

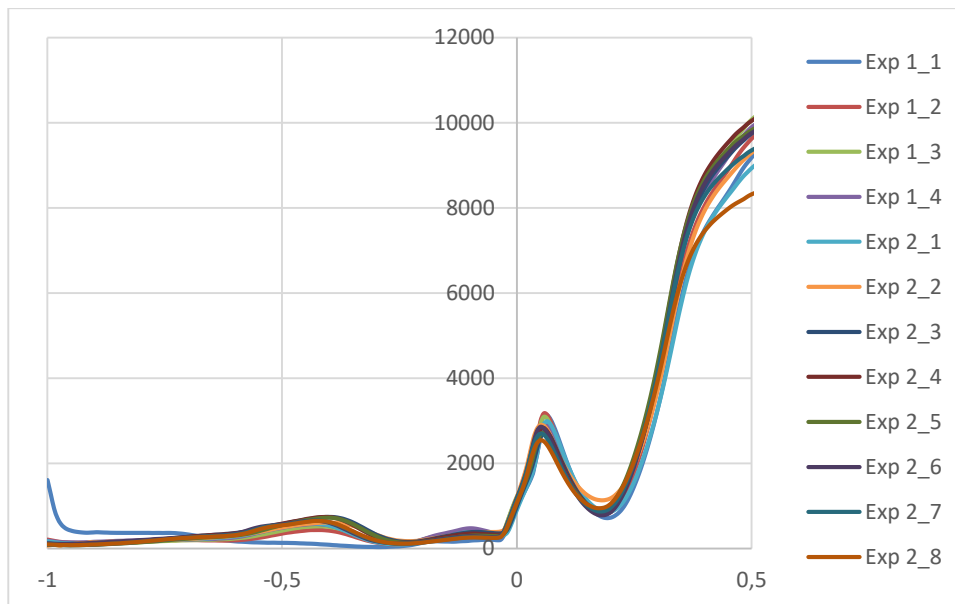


Figura 4-23- Voltamogramas com escala aproximada dos vários ensaios com o eléctrodo de trabalho M295Ag novo.

Com a análise dos resultados, percebe-se que apesar do primeiro branco não estabilizar, os restantes demonstram resultados bastante satisfatórios.

Por fim, analisaram-se as amostras com o eléctrodo de prata de um fabricante diferente. Este ao contrário do anterior já não era totalmente novo. Os resultados encontram-se na Figura 4-24.

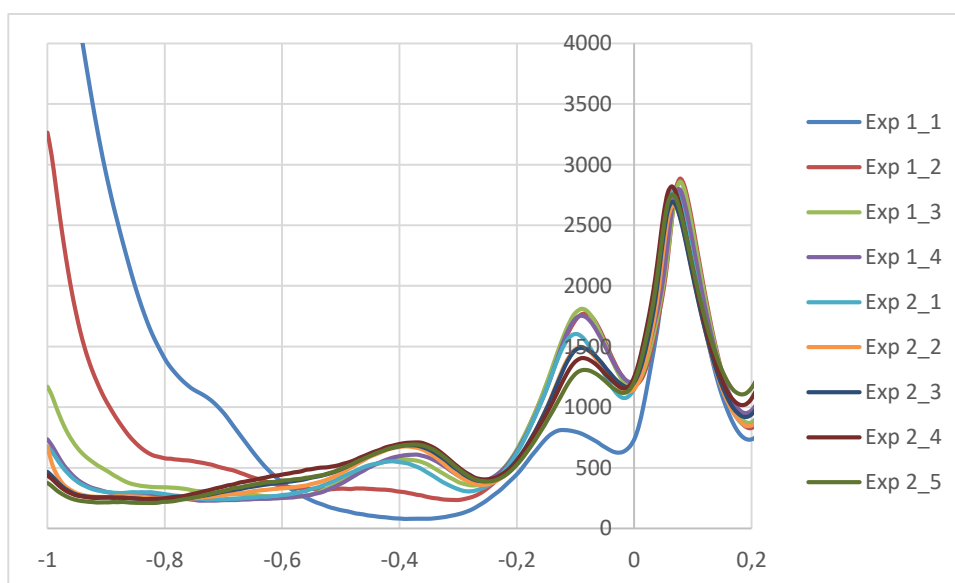


Figura 4-24- Voltamogramas com escala aproximada dos vários ensaios com o eléctrodo de trabalho P4011.

Com a avaliação dos voltamogramas, percebe-se que não serem tão instáveis como os do eletrodo inicial, também não demonstram resultados tão positivos como o anterior.

Todas estas experiências com os diferentes ET's foram ainda sujeitas a uma análise mais detalhada, isto é, todas os picos foram integrados de modo a verificar realmente não haveria um aumento de área que não fosse perceptível visualmente. Todos os valores obtidos através no software de aquisição de dados encontram-se no Anexo 6.1. Assim concluiu-se que realmente os voltamogramas não apresentam picos com nenhuma tendência.

Assim, após se concluir que realmente o eletrodo de trabalho utilizado até aqui já estaria um pouco danificado e que um eletrodo do mesmo fornecedor seria o que proporcionava a melhores resultados, realizou-se uma adição de padrão com uma amostra real para perceber se os resultados também seriam influenciados. Para isso, realizou-se uma adição de padrão como as descritas na validação do método, de uma solução padrão contendo 200 ppt de TCA, ACN/Água desionizada (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP, que foi adicionada a uma solução com 2,3 ppt de TCA. Após a realização dos cálculos obteve-se uma concentração de 58,46 ppt, o que é bastante superior à detetada pelo GC-MS. Assim, conclui-se que apesar de a mudança do ET ter melhorado a estabilidade da linha de base dos picos, este ainda não consegue obter resultados concordantes com os dados como reais, podendo demonstrar que provavelmente o eletrodo de prata não será o mais adequado à voltametria de onda quadrada.

Por fim, voltou-se uma última vez ao aspeto da limpeza dos eletrodos e testou-se a utilização da acetona para limpeza dos eletrodos aquando uma adição de padrão com TCA. Optou-se por testar esta hipótese, porque a limpeza apenas com papel entre adições poderia não estar a limpar ao nível necessário para não interferir com a adição seguinte. A escolha da acetona deveu-se ao facto de Hassam, et al. (2010) no Egipto, terem realizado algumas experiências com eletrodos de prata em que o método de limpeza consistia numa lavagem com acetona seguida de água destilada.

Utilizando a mesma solução padrão, realizaram-se duas adições padrão, uma com limpeza sem acetona e outra com, de modo a ser uma comparação o mais próxima possível.

Na Figura 4-25, encontra-se os voltamogramas com uma escala aproximada da experiência sem limpeza com acetona (apenas com papel), e na Figura 4-26 os voltamogramas com uma escala aproximada da experiência com limpeza com acetona (acetona, água e depois secagem com papel).

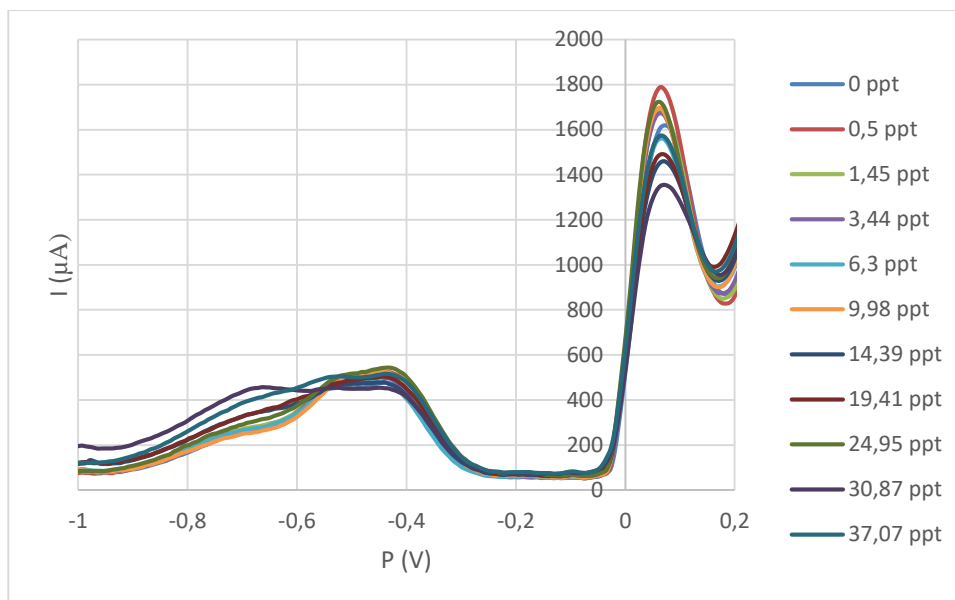


Figura 4-25- Voltamogramas com escala aumentada da quantificação de TCA sem limpeza de elétrodos com acetona.

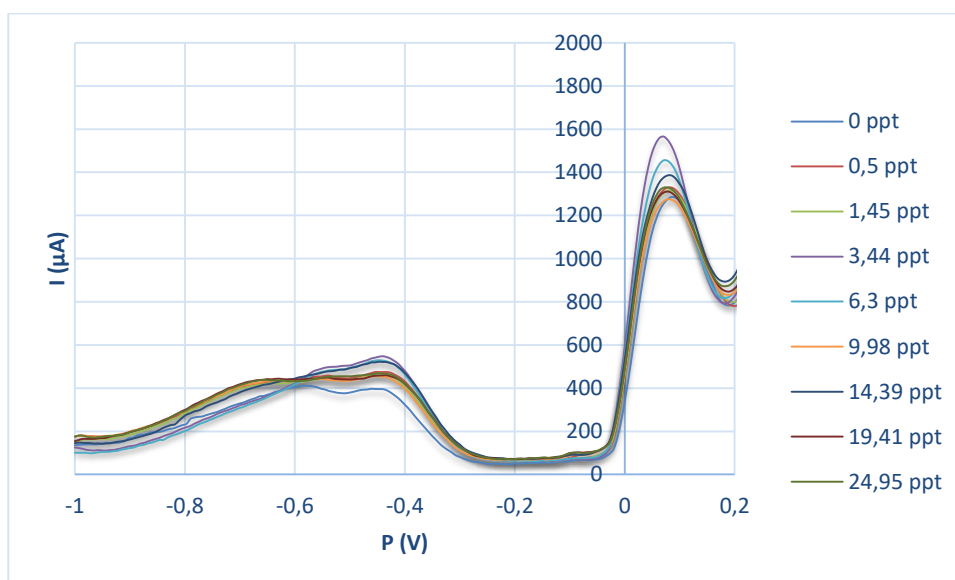


Figura 4-26- Voltamogramas com escala aumentada da quantificação de TCA com limpeza de elétrodos com acetona.

Como se pode concluir com a análise dos resultados, a acetona não proporciona resultados mais coerentes quando comparados com uma limpeza mais simples.

Tal como foi feito nas análises dos elétrodos de trabalho, no caso da limpeza com acetona, também foi realizada uma análise detalhada dos picos, o que comprovou a conclusão anterior. Os dados completos, encontram-se no Anexo 6.2.

4.4. Análise qualitativa de outros contaminantes

Após se tentar quantificar, sem sucesso, TCA em amostras reais de água de cozedura da cortiça com a técnica de voltametria de onda quadrada, optou-se por realizar algumas experiências extra para determinar eventuais interferências.

Numa primeira fase averiguou-se se a técnica seria capaz de qualificar alguns dos outros contaminantes presentes na cortiça como o TBA, DCA e TCP, distinguindo-os do TCA. Esta análise seria realizada quer em soluções individuais que com uma solução em conjunto.

Todas as soluções foram preparadas e analisadas conteúdo ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP. Embora já tenha sido concluído que a água destilada não tem um comportamento estável como solvente, para esta qualificação não seria seguro utilizar a amostra não contaminada, pois apenas se teria a certeza que não estaria contaminada com TCA.

Na Tabela 4-3 estão representadas as concentrações de cada contaminante em ppt presentes nas soluções padrão para análise individual e na solução padrão conjunta. Encontra-se ainda a concentração de cada substância aquando a segunda adição, 300 μ L, na análise de todas juntas que será analisada mais a frente.

Tabela 4-3- Concentração dos contaminantes na solução padrão individual e conjunta e na 2ª adição da solução padrão conjunta.

Contaminante	Concentração na solução padrão individual (ppt)	Concentração na solução padrão conjunta (ppt)	Concentração na 2ª adição de Todos os contaminantes (ppt)
TCA	200	284	5,57
TBA	240	228	4,47
TCP	220	344	6,75
DCA	517,2	517,2	10,14

De modo a facilitar a análise, os voltamogramas individuais encontram-se no Anexo 6.3 sendo que na Figura 4-27 está representada uma curva de cada voltamograma com aproximação de escala. Optaram-se por curvas com concentrações entre os 5 ppt e os 7 ppt de maneira a que não existisse a probabilidade de o método não detetar. Na solução que continha todos os contaminantes escolheu-se a segunda adição pois era a que correspondia de uma forma mais próxima às concentrações pretendidas.

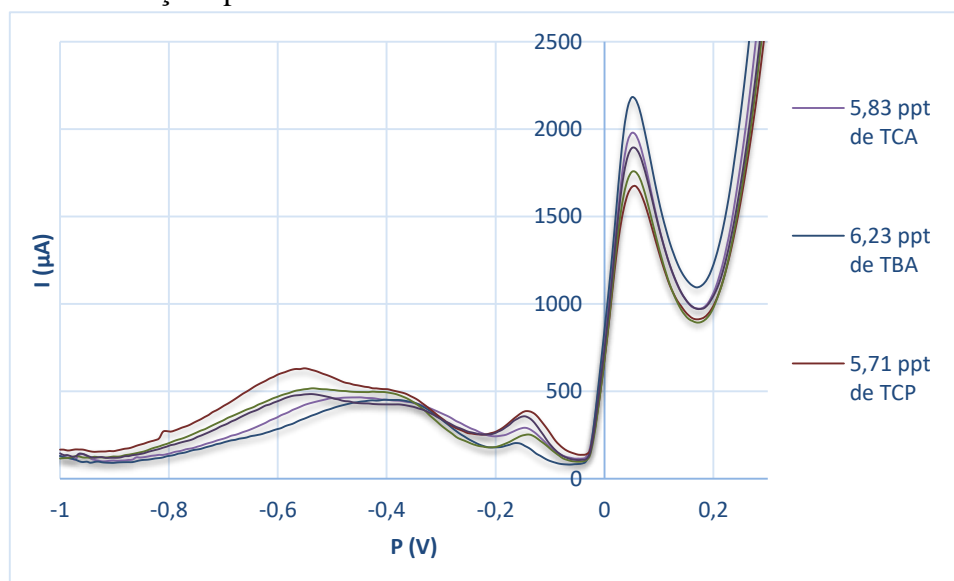


Figura 4-27- Aproximação de curvas de uma adição de cada voltamograma.

Através da análise verifica-se que não é possível definir quais os picos característicos de cada contaminante, ou seja, não é possível qualificar os diversos contaminantes pela técnica de voltametria de onda quadrada, nas condições estabelecidas.

5. Conclusões

O presente estudo teve como objetivo a validação de um método analítico de quantificação de TCA, denominado voltametria de onda quadrada (SWV) em amostras reais de água de cozedura de cortiça provenientes de uma indústria corticeira portuguesa.

Através de algumas experiências iniciais, verificou-se que a limpeza dos elétrodos era um passo extremamente importante em qualquer ensaio de SWV pois a camada presente no eletrodo no fim da análise dificulta a transferências de massa entre a solução eletrólita e o eletrodo podendo dar “falsas” áreas de picos e consequentemente falsos resultados.

Depois passou-se para o verdadeiro tema deste estudo, a validação do método por SWV o que não foi possível devido aos resultados não concordantes. Primeiramente, aquando a realização da curva de calibração, esta foi realizada com amostra não contaminada (a água destilada não estabilizava as linhas de bases dos voltamogramas, nem as áreas destes), o que levaria a esperar concentrações próximas dos 0 ppt, o que não aconteceu, chegando a ter valores até 84,5 ppt após os cálculos. Apesar destes resultados, ainda se calculou os limites de deteção e quantificação, que apesar de serem valores bastante baixos não podem ser considerados reais devido aos resultados pouco fiáveis. No que toca a precisão, este método apresenta um coeficiente de repetibilidade de 63,551% o que corresponde a uma precisão bastante baixa. Já a exatidão nem foi possível calcular devido à grande discrepância dos valores obtidos.

Ao longo do processo de validação, foram analisados alguns aspetos extra de modo a otimizar o método. Assim foram analisados quatro pontos. Dois dos aspetos que não demonstraram nenhuma alteração foram, em primeiro lugar, a substituição de água destilada por água desionizada (demonstrando que os iões da água não afetavam os resultados) e em segundo a limpeza dos elétrodos com acetona (provando que não é necessária uma limpeza mais consistente). Por fim, as últimas experiências basearam-se na utilização de temperatura de modo a manter o TBAP uniformemente dissolvido na solução devido à sua elevada concentração e a substituição do eletrodo de trabalho inicial, pois este já se encontrava danificado com a utilização, por um igual e novo, o que proporcionou alguma estabilidade nos voltamogramas, mas sem sucesso ao nível da quantificação de TCA.

Por fim, realizou-se uma tentativa de qualificar contaminantes em vez de os quantificar. Assim, utilizando vários contaminantes (TCA, TBA, TCP e DCA) separadamente e numa solução em conjunto concluiu-se que os picos não ocorriam em zonas distintas do voltamograma de modo a distinguiram-se as substâncias.

Assim, conclui-se que o método como se encontra desenvolvido não é capaz de quantificar TCA em amostras reais de água de cozedura da cortiça, nem qualificar nenhum dos possíveis contaminantes.

5.1. Propostas para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, propõe-se a tentativa de vários aspetos do método de modo a averiguar todos os testes possíveis de modo a descartar o método de vez.

Um dos aspetos passíveis a alteração, é o sistema voltamétrico, uma vez que o elétrodo de prata poderá não ser o melhor para a voltametria de onda quadrada.

Referências Bibliográficas

Agostinho, S. M. L., Villamil, R. F. V., Neto, A. A. & Aranha, H., 2004. O eletrólito suporte e as suas múltiplas funções em processos de eletrodo. 17 Junho, 27(5), pp. 813-817.

Albuquerque, A. et al., 2013. Biodegradability enhancement and detoxification of cork processing wastewater molecular size fractions by ozone.. 2013 Agosto, Volume 147, pp. 143-151.

Aleixo, L. M., 2013. Voltametria: conceitos e técnicas. 4 Março.

Anon., 2001. *Decreto de Lei nº 161 de 21 de Maio de 2001 do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas*, s.l.: s.n.

Anticó, E. et al., 2004. Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. 1 Fevereiro, 513(2004), pp. 291-297.

APCOR, 2016. *Anuário 2016*. [Online] Available at: <http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2016/09/Boletim-estatistico-2016.pdf>[Acedido em 9 Março 2017].

APCOR, s.d. *APCOR- Associação Portuguesa de Cortiça*. [Online] Available at: <http://www.apcor.pt/>[Acedido em Novembro 2015].

Apostolou, T. et al., 2014. Extraction-less, rapid assay for the direct detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in cork samples. 20 Março, Volume 125, pp. 336-340.

Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000. *Guia RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química*.. RELACRE ed. s.l.:s.n.

Associação de laboratórios acreditados de Portugal, 2013. *Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análises químicas*, Lisboa: s.n.

Bai, X., Zhang, T., Li, H. & Yang, Z., 2016. Simultaneous dispersive liquid–liquid microextraction based on a low-density solvent and derivatization followed by gas chromatography for the simultaneous. 18 Março, Issue 29, pp. 2146-2155.

Bard, A. J. & Faulkner, L. R., 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2ª ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, INC..

Barnes, J. D., Denney, R. C., Mendham, J. & Thomas, M. J. K., 2002. *Análise Química Quantitativa*. s.l.:Vogel.

Barros, R. B., Garcia, A. R., Ilharco, L. M. & Lopes, L. F., 2015. The Problem of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Planks Studied by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy: Proof of Concept. Volume 63, pp. 128-135.

Bottoli, C. B. G. et al., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. 17 Junho, 27(5), pp. 771-780.

Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P. & Hernández-Córdoba, M., 2016. Cloud point extraction and gas chromatography with direct microvial insert thermal desorption for the determination of haloanisoles in alcoholic beverages. 12 Julho, Volume 160, pp. 282-288.

Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P. & Hernández-Córdoba, M., 2013. Stir bar sortive extraction polar coatings for the determination of chlorophenols and chloroanisoles in wines using gas chromatography and mass spectrometry. 4 Outubro, Volume 118, pp. 30-36.

Cacho, J. I. et al., 2016. Control of halophenol and haloanisole concentration in wine cellar environments, wines, corks and wood staves using gas chromatography with mass spectrometry.

Cacho, J. I. et al., 2016. Direct sample introduction-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of haloanisole compounds in cork stoppers. 4 Novembro, Volume 1475, pp. 74-79.

Callejón, R. M. et al., 2015. Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. 5 Setembro, Volume 1426, pp. 72-85.

Camino-Sánchez, F. J. et al., 2014. Determination of thricloroanisole and trichlorophenol in wineries ambient air by passive sampling and thermal chromatography coupled to tandem mass spectrometry. 30 Dezembro, Issue 1380, pp. 11-16.

Campillo, N., Peñalver, R. & Hernández-Córdoba, M., 2008. Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas chromatography and atomic emission detection. 2 Outubro, Volume 1210, pp. 222-228.

Campilo, N. et al., 2010. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chromatography-mass spectrometry. 29 Setembro, Issue 1217, pp. 7323-7330.

Carvalho, J. R., 2008. *Otimização da metodologia da determinação de molibdênio em solos e plantas por voltametria de onda quadrada com redissolução catódica adsortiva*, Minas Gerais: s.n.

Castro, L. M. et al., 2012. Determination of 2,4,6-trichloroanisole by cyclic voltammetry. 9 Setembro, 47(2012), pp. 1125-1128.

Coque, J. J. R. et al., 2006. Contaminação do vinho por haloanisóis: Desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para prevenir a contaminação de rolhas de cortiça por cloroanisóis. pp. 1-158.

Costa, A. & Pereira, H., 2004. Caracterização e Análise de Rendimento da Operação de Traçamento na Preparação de Pranchas de Cortiça para a Produção de Rolhas. 12(1), pp. 51-66.

Crouch, S. R., Holler, F. J., Skoog, D. A. & West, D. M., 1992. *Fundamentos da Química Analítica*. Nova Iorque: Thomson.

Daniel, S. M., 2013. *Mapeamento do teor de chumbo em aquíferos da Mina de Neves Corvo por técnicas voltamétricas*, Évora: s.n.

DropSens, s.d. *DropSens*. [Online]Available at: http://www.dropsens.com/en/spectroelectrochemical_instruments.html[Acedido em 22 Novembro 2016].

Duro, P. N., 2013. *Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para quantificação de pesticidas neonicotinóides em amostras de água contaminada*, Évora: s.n.

Faber, M., Fertoni, F. L., Yamanaka, H. & Benedetti, A. V., 2010. Microeletrodos: III. Arranjos de microeletrodos, construção e caracterização. Volume 25.

Fernández, E. et al., 2013. Screen-printed electrode-based electrochemical detector coupled with in-situ ionic-liquid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of 2,4,6-trinitrotoluene. 19 Novembro, pp. 2197-2204.

Fonseca, M. F. P., 2013. *2,4,6 – Tricloroanisol: validação do método de análise e estudos de adsorção e dessorção em rolhas de cortiça*, Vila Real: s.n.

- Fontana, A. R., 2012. Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine. Volume 37, pp. 135-147.
- Fontana, A. R., Patil, S. H., Banerjee, K. & Altamirano, J. C., 2010. Ultrasound-assisted emulsification microextraction for determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine samples by gas chromatography tandem mass spectrometry. 03 Novembro, Issue 58, pp. 4576-4581.
- Freitas, A. P. A., 2014. *Desenvolvimento de um sistema de quantificação de TCA em solução aquosa por voltametria*, Coimbra: s.n.
- Garrido, E. M. P. d. J., 2000. *Estudo da oxidação electroquímica de herbicidas usados nas culturas de arroz. Doseamento em produtos fitofarmacêuticos.*, Porto: s.n.
- Gil, L. & Pereira, C., 2006. O problema do odor a mofo nas rolhas de cortiça e processos para a sua redução/eliminação. 14(1), pp. 101-111.
- Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T. & Lorenzo, F., 2004. Analysis of anisoles in wines using pervaporation coupled to gas chromatography-mass spectrometry. 9 Agosto, Volume 1049, pp. 147-153.
- Gonçalves, M. d. L. S. S., 2001. *Métodos Instrumentais Para Análise de Soluções: Análise Quantitativa*. Lisboa: Fundação Gulbenkian.
- Grupo Amorim, s.d. [Online] Available at: <http://www.amorim.com/>
- Guilbault, G. G., Moore, E. & Pravda, M., 2003. Development of a biosensor for the quantitative detection of 2,4,6-trichloroanisole using screen printed electrodes. 10 Março, 484(2003), pp. 15-24.
- Harris, D. C., 1998. *Quantitative Chemical Analysis*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Hassam, H. H., Ibrahim, M. A. M., Rehim, S. S. A. E. & Amin, M. A., 2010. Comparative Studies of the Electrochemical Behavior of Silver Electrode in Chloride, Bromide and Iodide Aqueous Solutions. 1 Fevereiro, Volume 5, pp. 278 - 294.
- Hayasaka, Y. et al., 2003. Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. 15 Março, Volume 375, pp. 948-955.
- Insa, S., Anticó, E. & Ferreira, V., 2005. Highly selective solid-phase extraction and large volume for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines. 11 Julho, Volume 1089, pp. 235-242.
- International Organisation of Vine and Wine, 2005. *Compendium of international analysis of methods: Guide for the validation – quality control*, s.l.: s.n.
- Kadara, R. O., Jenkinson, N. & Banks, C. E., 2009. Screen printed recessed microelectrode arrays. 12 Agosto, Volume 142, p. 342–346.
- Kintzios, S., Marco, M. P., Sanvicens, N. & Varelas, V., 2011. Development of a cellular biosensor for the detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA). 24 Fevereiro, 84(2011), pp. 936-940.
- Kroger, S., Turner, A. P. F., Mosbach, K. & Haupt, K., 1999. Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes. 1 Setembro, 71(17), pp. 3698-3702.
- Lichvanová, Z. et al., 2014. Using corona discharge-ion mobility spectrometry for detection of 2,4,6-trichloroanisole. 24 Abril, Issue 127, pp. 239-243.

Li, M., Li, Y.-T., Li, D.-W. & Long, Y.-T., 2012. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays- A review. 20 Maio, Volume 734, pp. 31-44.

Maggi, L. & Mazzoleni, V., 2006. Effect of wine style on the perception of 2,4,6-trichloroanisole, a compound related to cork taint in wine. 25 Novembro, 40(2007), pp. 694-699.

Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M. & Pizarro, C., 2004. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. 20 Agosto, Volume 1056, pp. 49-56.

Medeiros, R. A., Carvalho, A. E., Rocha-Filho, R. C. & Fatibello-Filho, O., 2008. Determinação voltamétrica de ciclamato de sódio em produtos dietéticos empregando um eletrodo de diamante dopado com boro. 13 Agosto, 31(6), pp. 1405-1409.

Mistry, K. K., Deepthy, S., Chaudhuri, C. R. & Saha, H., 2015. Electrochemical characterization of some commercial screen-printed electrodes in different redox substrates. 25 Outubro, 109(8), pp. 1427-1436.

Mohanty, S. P. & Kougianos, E., 2006. Biosensors: A Tutorial Review. Abril.

Montês, V., 2015. *Desenvolvimento e otimização de sensores eletroquímicos impressos*, Porto: s.n.

Moore, E., Pravda, M. & Guilbault, G. G., 2003. Development of a biosensor for the quantitative detection of 2,4,6-trichloroanisole using screen printed electrodes. 10 Março, Volume 484, pp. 15-24.

Navrátil, T. & Kopanica, M., 2002. Analytical Application of Silver Composite Electrode. 32(2), pp. 153-166.

Pacheco, W. F., 2004. *Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina*, Rio de Janeiro: s.n.

Patil, S. H. et al., 2010. Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by GC-MS. 29 Julho, Issue 124, pp. 1734-1740.

Pereira, C. S., Danesh, P., Marques, J. J. F. & Romão, M. V. S., 1999. O gosto de rolha em vinhos- estado actual dos conhecimentos. 14(2), pp. 79-99.

Peres, A. M. et al., 2013. Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process. Setembro 25, Volume 117, pp. 438-444.

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N. & González-Sáiz, J., 2007. Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. 19 Março, Volume 1149, pp. 138-144.

Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., Sáenz-Mateo, A. & González-Sáiz, J. M., 2014. A simple and sensitive vortex assisted liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in wines. 13 Abril, Volume 128, pp. 1-8.

Pizarro, C., Sáenz-González, C., Perez-del-Notario, N. & González-Sáiz, J. M., 2010. Optimisation of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines. 13 Outubro, Issue 1217, pp. 7630-7637.

Pizarro, C., Sáenz-González, C., Pérez-del-Notario, N. & González-Sáiz, J. M., 2011. Microwave assisted extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive sample preparation method for the determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers and oak barrel sawdust. 30 Dezembro, Issue 132, pp. 2202-2210.

- Riu, M., Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J., 2002. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection. 14 Agosto, 977(2002), pp. 1-8.
- Ruiz-Delgado, A. et al., 2016. Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of haloanisoles in sparkling (cava and cider) and non-sparkling (wine) alcoholic beverages. 16 Setembro, 33(10), pp. 1535-1544.
- Schmarr, H.-G., Koschinski, S., Sang, W. & Slabizki, P., 2011. Trace level analysis of corky off-flavor compounds: Development of a new analytical method based on solid phase extraction and analysis by multidimensional gas chromatography with mass spectrometric detection. 19 Outubro, Issue 1226, pp. 96-102.
- 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. Volume 11, pp. 226-240.
- Sillero-Márquez, I., Cárdenas, S. & Valcárcel, M., 2011. Direct determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by single-drop ionic liquid microextraction coupled with multicapillary column separation and ion mobility spectrometry detection. 11 Junho, Issue 1218, pp. 7574-7580.
- Silva, M. E. C. M. d., 2010. *Apontamentos de tecnologia dos produtos florestais: A cortiça- suas características e propriedades*, Vila Real: s.n.
- Skoog, D. A., West, D. M. & Holler, F. J., 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. s.l.:Thomson Learning, Inc.
- Soleas, J. G., Yan, J., Seaver, T. & Goldber, D. M., 2002. Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potencial cause of cork taint. 30 Janeiro, Volume 50, pp. 1032-1039.
- Souza, D. et al., 2004. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. 17 Junho, 27(5), pp. 790-797.
- Souza, D., Machado, S. A. S. & Avaca, L. A., 2002. Voltametria de Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. 22 Julho, 26(1), pp. 81-89.
- Subervin, 2015. *Análise sensorial- rolhas de cortiça*. [Online] Available at: http://www.subervin.eu/uploads/pub/Manual-Analise-Sensorial_PT.pdf[Acedido em 13 Abril 2016].
- Vestner, J., Fritsch, S. & Rauhut, D., 2009. Deveelopment of microwave assisted extraction method for the analysis of 2,4,6-trichloroanisole in cork stoppers by SIDA-SBSE-GC-MS. 3 Dezembro, Issue 660, pp. 76-80.
- Wang, J., 2001. Electrochemical detection of microscale analytical systems: a review. 22 Maio, Volume 56, pp. 223-231.
- Wang, J., Zeng, B., Fang, C. & Zhou, X., 2000. The influence of surfactants on the electron-transfer reaction at self-assembled thiol monolayers modifying a gold electrode. 7 Janeiro, Volume 484, p. 88–92.
- Zeng, A. et al., 2001. Cyclic Voltammetry Studies of Sputtered Nitrogen Doped Diamond-Like Carbon Film Electrodes. 28 Novembro, 14(1516), pp. 1110-1115.
- Zoski, C. G., 2007. *Handbook of eletrochemistry*. Las Cruces(New Mexico): Elsevier.

6. Anexos

6.1. Análise detalhada das experiências com diferentes elétrodos de trabalho

Nas tabelas abaixo representadas, encontram-se os valores obtidos através do *software Dropview* após a integração dos picos de cada voltamograma obtido para o respectivo eletrodo se trabalho utilizado.

Tabela 6-1- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eletrodo de trabalho M295Ag inicial.

Experiência	Pico	Largura (V)	Área (uC)	Altura (uA)	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)
1_1	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-
	C	0,091	16385,765	1319,675	-0,0153	0,1784
1_2	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-
	C	0,102	16532,010	1293,183	-0,0177	0,1808
2_1	A	0,247	18038,170	495,654	-0,9110	-0,3881
	B	-	-	-	-	-
	C	-	13869,823	1007,098	-0,0298	0,1735
2_2	A	0,247	13594,740	381,682	-0,8844	-0,2259
	B	-	-	-	-	-
	C	0,118	16242,410	1193,747	-0,0347	0,1711
2_3	A	0,408	19657,393	370,033	-0,8868	-0,2259
	B	-	722,165	69,305	-0,2090	-0,0783
	C	0,138	16956,431	1247,324	-0,0274	0,1759
2_4	A	0,404	18896,608	371,029	-0,8989	-0,2041
	B	-	939,174	94,697	-0,2041	-0,0758
	C	0,114	17384,500	1285,330	-0,0371	0,1687

Tabela 6-2- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eléctrodo de trabalho M295Ag novo.

Experiência	Pico	Largura (V)	Área (uC)	Altura (uA)	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)
1_1	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-
	C	0,081	36180,496	2708,682	-0,0342	0,1967
1_2	A	0,183	7538,000	289,036	-0,6153	-0,2579
	B	0,085	2671,765	159,731	-0,2503	-0,0402
	C	0,082	34715,563	2647,882	-0,0351	0,1893
1_3	A	0,189	9367,673	360,849	-0,6161	-0,2563
	B	0,084	2379,038	140,525	-0,2355	-0,0407
	C	0,081	32811,993	2535,155	-0,0349	0,1864
1_4	A	0,194	10310,323	398,389	-0,6076	-0,2550
	B	0,094	3258,255	205,497	-0,2375	-0,0339
	C	0,081	30296,57	2351,15	-0,0339	0,1848
2_1	A	0,188	10134,624	404,372	-0,6078	-0,2583
	B	0,095	2102,732	142,749	-0,2323	-0,0349
	C	0,084	32008,763	2452,551	-0,0273	0,1994
2_2	A	0,222	12723,665	410,768	-0,6618	-0,2354
	B	-	-	-	-	-
	C	0,091	29379,427	2209,923	-0,0278	0,1862
2_3	A	0,214	15000,668	520,302	-0,6521	-0,2346
	B	-	1315,286	86,060	-0,2214	-0,0327
	C	0,089	28649,942	2152,249	-0,0275	0,186
2_4	A	0,202	13047,377	505,721	-0,5963	-0,2457
	B	-	1189,52	76,527	-0,2165	-0,0419
	C	0,088	29860,732	2254,031	-0,0285	0,183
2_5	A	0,198	13415,875	508,538	-0,6011	-0,2532
	B	-	728,649	50,982	-0,2136	-0,0345
	C	0,087	27846,795	2130,078	-0,0275	0,1801
2_6	A	0,207	11178,259	429,458	-0,6148	-0,2878
	B	-	886,154	65,783	-0,2229	-0,0478
	C	0,091	32051,932	2365,817	-0,0338	0,1847
2_7	A	0,204	11923,576	452,704	-0,6244	-0,2549
	B	-	762,063	58,825	-0,2153	-0,0415
	C	0,093	30047,568	2186,129	-0,0348	0,1826
2_8	A	0,203	11731,097	444,686	-0,6143	-0,2641
	B	-	628,558	42,355	-0,2252	-0,0412
	C	0,093	27100,374	2003,433	-0,0346	0,1807

Tabela 6-3- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com o eletrodo de trabalho P4011.

Experiência	Pico	Largura (V)	Área (uC)	Altura (uA)	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)
1_1	A	-	-	-	-	-
	B		6639,124	373,734	-0,2750	-0,0195
	C	0,076	25145,945	2108,464	-0,0098	0,1992
1_2	A	-	-	-	-	-
	B	0,107	14778,985	873,189	-0,2680	-0,0021
	C	0,069	20054,574	1821,307	0,0068	0,1930
1_3	A	0,157	5666,481	252,147	-0,5590	-0,2714
	B	0,103	14204,489	910,926	-0,2405	-0,0032
	C	0,070	19981,956	1801,133	0,0016	0,1977
1_4	A	0,146	5687,600	258,627	-0,5479	-0,2695
	B	0,103	12655,802	827,219	-0,2308	-0,0080
	C	0,070	18539,784	1683,887	0,0041	0,1856
2_1	A	0,156	5616,521	252,783	-0,5697	-0,2768
	B	0,101	12017,358	780,839	-0,2429	-0,0129
	C	0,075	21301,272	1787,765	-0,0219	0,1905
2_2	A	0,152	6461,347	303,181	-0,5334	-0,2695
	B	0,105	9212,881	621,186	-0,2332	-0,0105
	C	0,073	18884,949	1623,146	-0,0056	0,2001
2_3	A	0,160	6537,046	288,794	-0,5624	-0,2550
	B	0,109	8726,097	592,812	-0,5380	-0,0080
	C	0,073	18483,492	1610,578	0,0080	0,1929
2_4	A	0,152	5144,643	259,230	-0,5164	-0,2550
	B	0,106	6854,032	488,618	-0,2308	-0,0177
	C	0,075	19950,178	1717,959	-0,0105	0,1808
2_5	A	0,160	6328,148	286,884	-0,5455	-0,2501
	B	-	6203,505	414,884	-0,2259	-0,0129
	C	0,075	18942,874	1633,898	-0,0105	0,1905

6.2. Análise detalhada das experiências com limpeza com acetona.

Na Tabela 6-4 e na Tabela 6-5 encontram-se os valores da análise mais detalhada do resultados obtido para as experiências sobre a limpeza dos elétrodos com e sem acetona.

Tabela 6-4- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios sem limpeza com acetona.

[TCA] (ppt)	Pico	Largura (V)	Área (uC)	Altura (uA)	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)
0,00	A	0,323	19043,638	402,824	-0,9062	-0,2380
	B	0,121	18481,892	1158,212	-0,0371	0,1832
0,50	A	0,270	19511,396	444,246	-0,9038	-0,2526
	B	0,115	21646,968	1383,604	-0,0371	0,1880
1,45	A	0,292	19433,652	433,558	-0,8965	-0,2380
	B	0,118	19792,685	1254,660	-0,0444	0,1880
3,44	A	0,284	19135,603	425,244	-0,8965	-0,2383
	B	0,117	19179,897	1229,743	-0,0371	0,1832
6,30	A	0,305	19169,928	410,770	-0,9352	-0,2550
	B	0,119	16722,213	1084,864	-0,0371	0,1784
9,98	A	0,261	18582,971	443,119	-0,8771	-0,2332
	B	0,113	18723,504	1231,750	-0,0371	0,1759
14,39	A	0,394	20106,131	392,817	-0,9231	-0,2380
	B	0,126	15118,983	938,893	-0,0395	0,1759
19,41	A	0,381	20898,672	415,709	-0,9231	-0,2332
	B	0,124	14361,743	914,129	-0,0444	0,1687
24,95	A	0,316	21558,718	457,303	-0,9183	-0,2453
	B	0,113	18680,590	1231,975	-0,0347	0,1735
30,87	A	0,445	20667,058	312,630	-0,9377	-0,2430
	B	-	13505,730	817,590	-0,0444	0,1808
37,07	A	0,419	23523,591	421,936	-0,9449	-0,2405
	B	0,119	15418,232	1025,834	-0,0492	0,1687

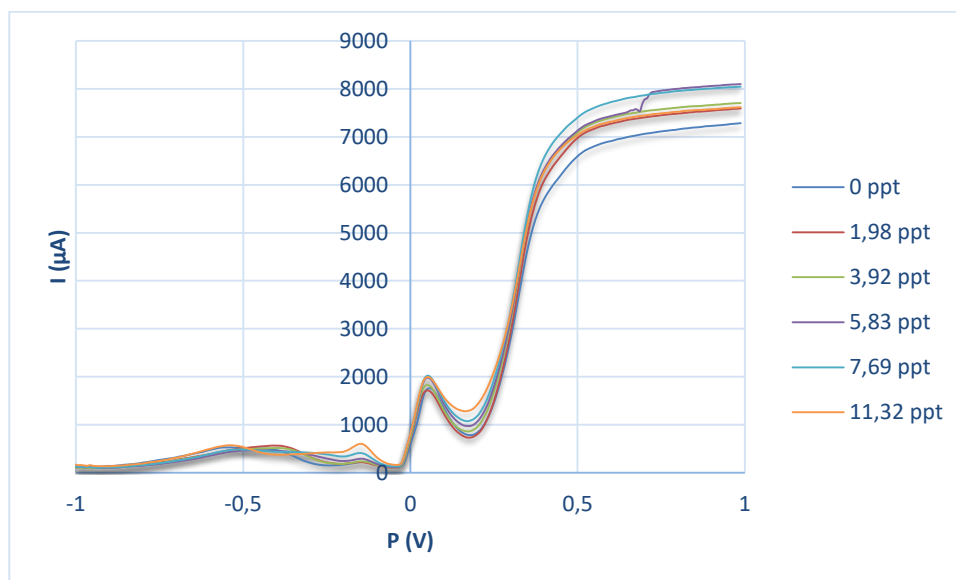
Tabela 6-5- Valores retirados dos voltamogramas dos ensaios com limpeza com acetona.

[TCA] (ppt)	Pico	Largura (V)	Área (uC)	Altura (uA)	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)
0,00	A	0,413	17234,610	310,658	-0,9231	-0,2622
	B	0,131	14241,578	833,602	-0,0250	0,1905
0,50	A	0,444	20694,508	369,222	-0,9425	-0,2598
	B	0,141	16232,624	877,996	-0,0274	0,1977
1,45	A	0,438	19887,864	366,361	-0,9256	-0,2526
	B	0,144	15756,876	872,140	-0,0371	0,2001
3,44	A	0,343	21634,638	457,315	-0,9256	-0,2647
	B	0,121	18541,404	1130,767	-0,0347	0,1832
6,30	A	0,341	20920,485	442,584	-0,9183	-0,2574
	B	0,125	16354,760	999,144	-0,0419	0,1832
9,98	A	0,450	19596,211	350,087	-0,9256	-0,2526
	B	0,144	14062,902	793,684	-0,0371	0,1929
14,39	A	0,407	21392,342	418,900	-0,9013	-0,2429
	B	0,134	14709,500	856,033	-0,0419	0,1832
19,41	A	0,458	20294,459	353,480	-0,9231	-0,2574
	B	0,141	14116,444	807,969	-0,0347	0,1856
24,95	A	0,450	20486,837	360,718	-0,9256	-0,2574
	B	0,137	14028,408	816,323	-0,0371	0,1856

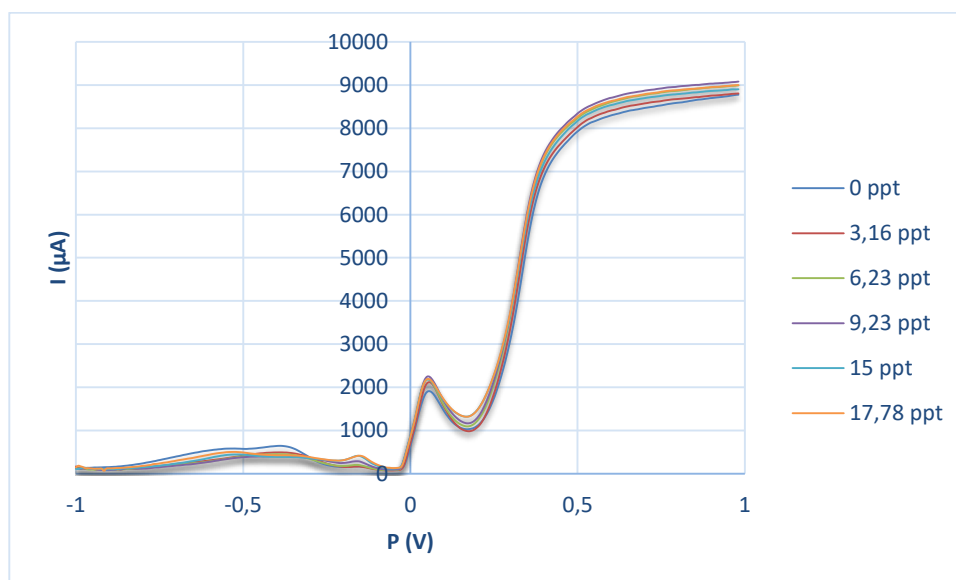
6.3. Voltamogramas de qualificação de contaminantes

De modo a não se tornar o corpo da discussão dos resultados da qualificação dos contaminantes, este anexo apresenta os voltamogramas da adição de padrão de cada contaminante.

Na Figura 6-1 está representado os voltamogramas da adição de padrão do TCA em ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP e com uma solução padrão com concentração de 200 ppt.



A Figura 6-2 representa os voltamogramas da adição de padrão do TBA em ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP e com uma solução padrão com concentração de 240 ppt.



Na Figura 6-3 está representado os voltamogramas da adição de padrão do TCP em ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP e com uma solução padrão com concentração de 220 ppt.

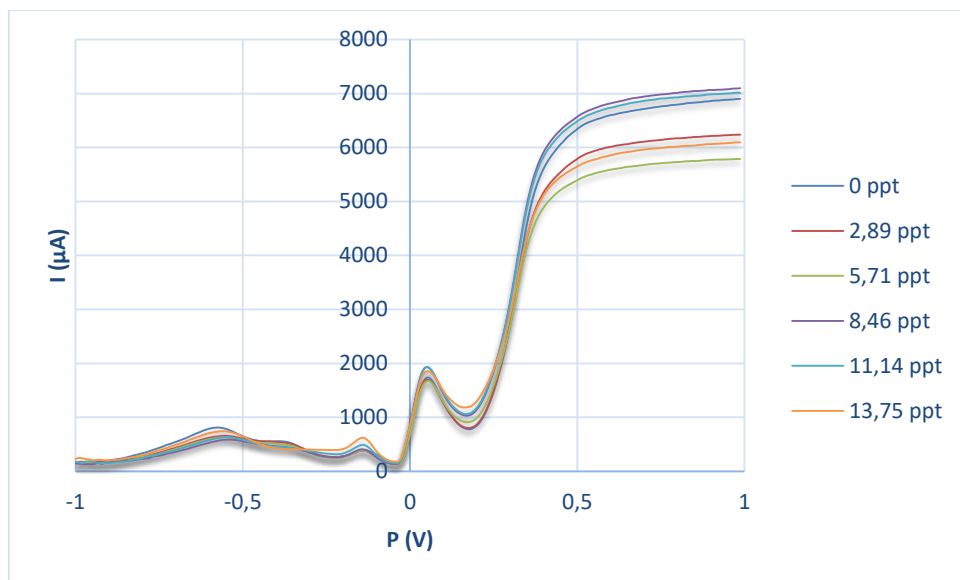


Figura 6-3- Voltamograma referente à qualificação de TCP.

A Figura 6-4 representa os voltamogramas da adição de padrão do DCA em ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP e com uma solução padrão com concentração de 517,2 ppt.

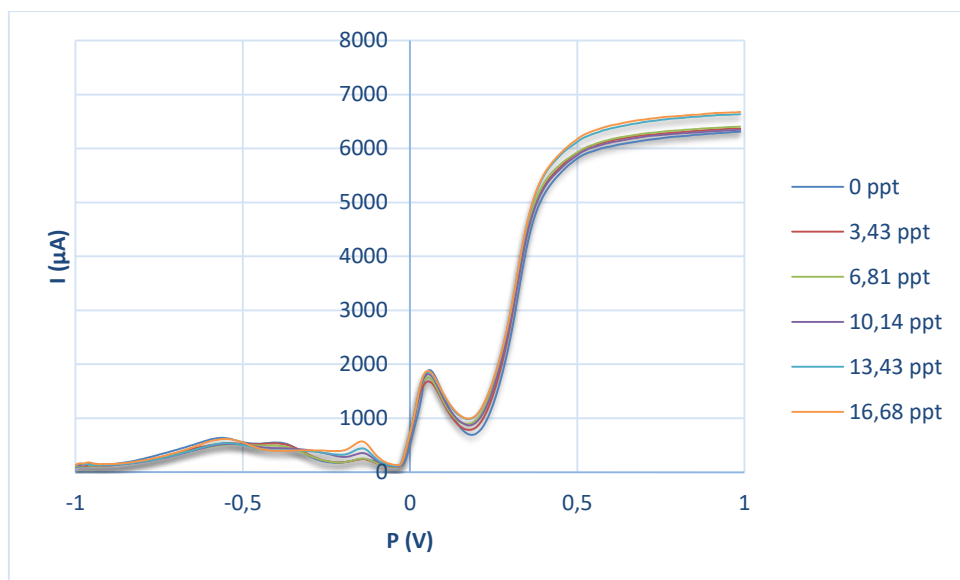


Figura 6-4- Voltamograma referente à qualificação de DCA.

Na Figura 6-5 está representado os voltamogramas da adição de padrão de uma solução padrão contendo todos os contaminantes em ACN/Água (1,5:1; v/v) com 0,2M de TBAP em que em cada adição foram adicionados 300 µL.

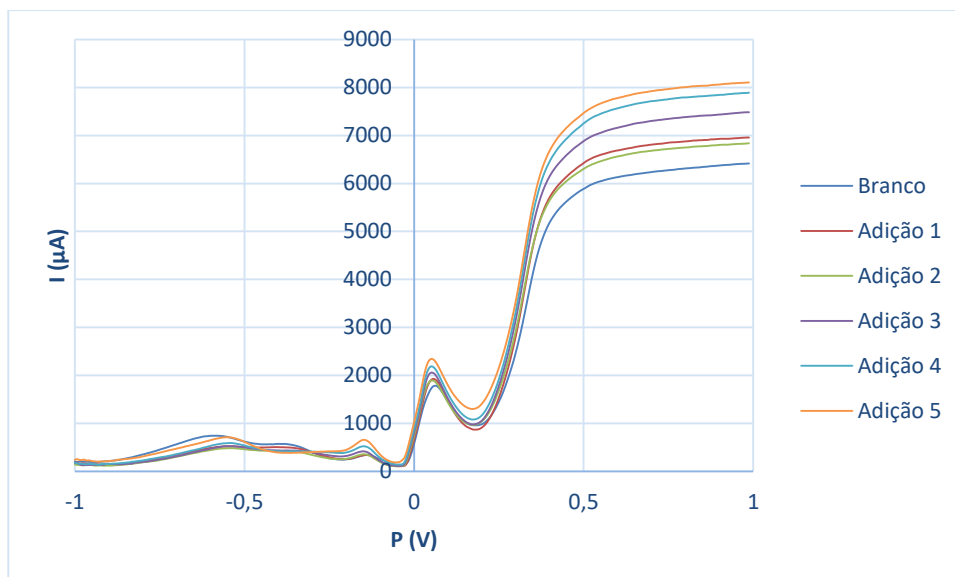


Figura 6-5- Voltamograma referente à qualificação de todos os contaminantes na mesma solução.

As concentrações presentes em cada adição encontram-se na

Tabela 6-6- Concentrações, em ppt, presentes em cada adição na experiência de todos os contaminantes.

Contaminante	Adição 1 (ppt)	Adição 2 (ppt)	Adição 3 (ppt)	Adição 4 (ppt)	Adição 5 (ppt)
TCA	2,81	5,57	8,27	10,92	13,52
TBA	2,26	4,47	6,64	8,77	10,86
TCP	3,41	6,75	10,02	13,23	16,38
DCA	5,12	10,14	15,06	29,89	24,63