



Inês Alexandra da Silva Barbosa

Licenciatura em Engenharia do Ambiente

Compostos voláteis e fenólicos de pranchas de cortiça na árvore: efeito do pastoreio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Dra. Augusta Costa Sousa,
Investigadora, “Center for Environmental and Sustainability Research” (CENSE) , FCT-UNL.
Investigadora, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV,I.P.).

Co-orientador: Prof. Dra. Maria do Rosário Bronze,
Professora- Associada, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FF-UL).
Responsável de Unidade de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FF-UL).
Investigadora, Laboratório de Química Analítica do ITQB/IBET.

Júri

Presidente: Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Arguente: Professor Doutor José Afonso Rodrigues Graça

Vogal: Doutora Maria Augusta Fernandes Pereira da Costa de Sousa



Outubro, 2016





Inês Alexandra da Silva Barbosa

Licenciatura em Engenharia do Ambiente

Compostos voláteis e fenólicos de pranchas de cortiça na árvore: efeito do pastoreio

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Dra. Augusta Costa Sousa,
Investigadora, “Center for Environmental and Sustainability Research” (CENSE), FCT-UNL.
Investigadora, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV, I.P.).

Co-orientador: Prof. Dra. Maria do Rosário Bronze,
Professora- Associada, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FF-UL).
Responsável de Unidade de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FF-UL).
Investigadora, Laboratório de Química Analítica do ITQB/IBET.

Compostos voláteis e fenólicos de pranchas de cortiça na árvore: efeito do pastoreio

Copyright © Inês Alexandra da Silva Barbosa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedico ao meu pai e ao Bruno.

Agradecimentos

À Doutora Augusta Costa pela sua orientação, disponibilidade, atenção, contribuição imprescindível, sugestões e apoio durante o trabalho. Foi um período muito complicado que sem o seu incentivo não teria este resultado.

À Professora Doutora Maria do Rosário Bronze pela orientação, paciência, encorajamento, disponibilidade, apoio, conhecimentos científicos, dedicação e valiosas críticas construtivas e sugestões para realização deste trabalho.

A todas as pessoas do laboratório de Química Analítica do ITQB/IBET um muito obrigado por serem a minha família ao longo deste tempo todo e por todos os momentos partilhados. Um especial e grande obrigado à Elsa Mecha e à Andreia Bento da Silva pelo companheirismo, troca de saberes e especialmente pela sua extrema e incansável colaboração, dedicação e disponibilidade na realização deste trabalho.

Ao Professor Luís Villas Boas, pela sua disponibilidade, sabedoria, dedicação e contribuição para realização deste trabalho.

À Sandra Silva e ao Engenheiro António Ferreira pela sua disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho.

À Companhia das Lezírias, S.A., em particular ao Engenheiro Rui Alves por toda a disponibilidade e material cedido na elaboração deste trabalho.

Ao ITQB/IBET pela utilização das instalações, equipamentos e material necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, principalmente o meu namorado, pelo seu apoio incondicional, carinho, amor, confiança, incentivo, por sempre acreditar nas minhas

capacidades. Muito obrigada, por todos os valores que me transmitiram, por ser o meu pilar e por ter feito de mim aquilo que sou hoje.

Obrigada Pai. Apesar de não estar entre nós sempre foi e será a minha força para continuar a ultrapassar estes momentos, sei que estarias muito feliz ao me veres concluir mais uma fase.

Aos meus tios e primas, que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim.

A todos os Professores da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, docentes das cadeiras que frequentei, pelo conhecimento, formação e espírito crítico que me transmitiram. Obrigado ao Professor Ricardo Franco por ter acreditado que eu era capaz e aceitou a minha inscrição.

Aos meus colegas de mestrado, obrigado por todos os momentos partilhados.

A todos o meu muito obrigado.

Resumo

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma espécie arbórea que ocupa uma área restrita de cerca de 2,5 milhões de hectares na Bacia do Mediterrâneo ocidental. Em Portugal esta espécie ocupa mais de 720 mil hectares, cerca de 21% da área florestal, e é explorada pela sua casca, a cortiça, retirada do tronco e ramos periodicamente ao longo da vida da árvore. Portugal é responsável por 50% da cortiça consumida em todo o mundo. A composição química da cortiça tem vindo a ser amplamente estudada e especificamente tem vindo a ser desenvolvida muita pesquisa da presença de fenóis e compostos voláteis em pranchas ou rolhas de cortiça na indústria (por vezes, em cortiça cozida), no entanto ainda existe pouca informação relativamente à sua composição na árvore, em verde, quando é extraída da árvore, durante o descortiçamento.

Pretendeu-se com este estudo caracterizar a presença de fenóis e compostos voláteis em amostras de cortiça na árvore (em verde), recolhidas durante o seu descortiçamento e estabelecer algum tipo de (cor)relação entre os compostos identificados e; i) o sistema de uso múltiplo (em áreas com e sem pastoreio com gado bovino); ii) o tipo de árvore (árvores virgens e árvores com cortiça amadia) e; iii) ao nível da árvore individual, estabelecer um perfil de variação

com a altura de descortiçamento no tronco (amostras a 0,30 m do solos e amostras a 1,30 m do solo).

A avaliação da presença dos diversos compostos é realizada recorrendo a técnicas de cromatografia gasosa, cromatografia líquida, métodos colorimétricos e espectroscopia de infra vermelho com transformada de Fourier.

Os resultados encontrados constituem os primeiros resultados que relacionam a composição química da cortiça com a gestão do sistema montado de sobros, sendo possível observar alterações ao nível da composição fenólica e volátil da cortiça.

Os diversos perfis cromatográficos obtidos indicam mostram que as amostras de cortiça estudadas apresentam na sua composição volátil um número elevado de compostos alquibenzénicos e terpenóides, tal como descrito previamente na bibliografia consultada. Relativamente à identificação de compostos voláteis e compostos fenólicos, foi possível não só a identificação de compostos comuns nas áreas pastoreada e não pastoreada mas também a identificação de compostos singulares em cada uma destas áreas. Estas diferenças foram encontradas nas amostras de cortiça, quando comparadas no mesmo nível da altura de descortiçamento no fuste (a 0,30 m ou a 1,30 m do solo) e em relação ao mesmo tipo de exploração (virgem ou amadia).

Note-se ainda que a quantificação dos compostos fenólicos efetuada pelo método de Folin-Ciocalteu e por cromatografia, apresentou resultados distintos. Pelo primeiro método, as amostras de cortiça provenientes de árvores na área não pastoreada apresentaram um teor fenólico superior ao das amostras de cortiça da área pastoreada. Por cromatografia, verificou-se o contrário, e nas amostras de cortiça de árvores da área não pastoreada o teor fenólico era mais baixo do que nas áreas pastoreadas.

Palavras-chave: Composição química, Montado de sobro, Infra-Red Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), Extrativos, Encabeçamento, Cortiça, Sobreiro.

Abstract

The cork oak (*Quercus Suber* L.) is a tree species that occupies a restricted area of about 2.5 million hectares in the western Mediterranean basin. In Portugal occupies more than 720 thousand hectares, around of 21% of the forest area and it's explored because of bark, cork, stripping during tree life. Portugal is responsible for 50% of the cork consumed throughout the world. The chemical composition of cork is already widely studied in various ways over the years and have been developed for the presence of phenols and volatile compounds in cork stoppers or planks are stored in industries (in boiled cork), however there is still little information relating to its composition at the moment it is extracted from the tree.

It was intended with this study, characterize the presence of phenolic and volatile compounds in green cork, collected during the bark remove and establish the type of relationship between the compounds identified and: i) the multiple use of system (with or without overstocking with cattle); ii) type of tree (virgin or amadia) and; iii) the height of cork, establish a trend with relation with height.

The evaluation of the presence of the different compounds is study using gas chromatographic techniques, liquid chromatography, colorimetric methods and infra-red spectroscopy with Fourier transform.

The results are the first results relating the chemical composition of cork with the management of “montado” system, being possible to observe changes at the level of phenolic and volatile composition cork.

The various chromatographic profiles obtained show that the studied cork samples present in its composition a high volatile alkylbenzene compounds and terpenoids, such as previously described in the bibliography. Concerning the identification of phenolic and volatile phenolic compounds, it was possible to not only the common identifying compounds in overstocking with cattle areas or not overstocking with cattle but also the identification of natural compounds in each of these areas. These differences were found in cork samples when compared on the same level of stripping height (0,30 m or 1,30 m above the ground) and in the same type of operation (virgin or amadia) .

It should be noted that the quantification of the phenolic compounds made by the Folin-Ciocalteu method and chromatography results are distinct. The first method, the cork samples from trees in the area had not overstocking with cattle a higher phenolic content of the cork samples than overstocking with cattle area. Chromatography, it is the opposite, and the cork tree samples of not overstocking with cattle area show a phenolic content lower than the overstocking with cattle area.

Keywords: Chemical composition, Cork Oak land, Infra-Red Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), extractives, overstocking with cattle, cork, cork oak.

Conteúdo

Introdução	25
1. O sobreiro e a cortiça	25
1.1. A exploração da cortiça no montado	27
1.2. Composição química da cortiça	30
1.2.1. Compostos voláteis da cortiça	30
1.2.1.1. Análise de compostos voláteis	32
1.2.2. Compostos fenólicos da cortiça	33
1.2.2.1. Análise de compostos fenólicos	35
1.2.3. Caracterização da cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)	36
1.2.3.1. Análise da composição química da cortiça por FTIR	37
2. Objetivos do trabalho	39
Parte experimental	41
3. Área de estudo	41
4. Amostragem e preparação de amostras	43
5. Análise de Compostos Voláteis por SPME-GC/MS	45
5.1. Preparação das amostras de cortiça para análise	45
5.2. Materiais	45
5.3. Análise	45
5.4. Condições de análise utilizadas	46
5.5. Tratamento de dados	47

6. Análise de Compostos Fenólicos por espectrofotometria e cromatografia líquida	48
6.1. Preparação das amostras de cortiça para análise	48
6.1.1. Reagentes	50
6.2. Determinação do teor em compostos fenólicos totais	50
6.2.1. Reagentes	50
6.2.2. Preparação das soluções stock	50
6.2.3. Preparação das soluções padrão de ácido gálgico	51
6.2.4. Análise das amostras de cortiça e reta de calibração	51
6.2.5. Equipamento.....	51
6.2.6. Tratamento de Resultados	52
6.3. Análise dos compostos fenólicos por HPLC – DAD- ED.....	52
6.3.1. Preparação das amostras de cortiça	52
6.3.2. Reagentes	52
6.3.3. Equipamento.....	52
6.3.4. Condições de análise	53
6.3.5. Tratamento de Resultados	55
6.4. Análise das amostras de cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)	55
6.4.1. Preparação das amostras de cortiça para análise	55
6.4.2. Equipamento.....	55
6.4.3. Condições de análise utilizadas.....	56
6.4.4. Tratamento de dados.....	56
Resultados e discussão	58
7. Resultados e Discussão	58
7.1. Análise de compostos voláteis nas amostras de cortiça.....	58
7.2. Análise de compostos fenólicos nas amostras de cortiça.....	63
7.2.1. Otimização do processo de extração e quantificação de compostos fenólicos totais	64
7.2.2. Análise das amostras de cortiça.....	66
7.2.2.1. Quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD.....	70
7.2.2.2. Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD.....	73

7.3. Caracterização da cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)	77
7.3.1. Otimização do processo de análise da cortiça	77
7.3.2. Análise das amostras de cortiça.....	78
Bibliografia	84
Anexos	93

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Zonas do espectro usadas na identificação de constituintes da cortiça (adaptado de Pintor, A. <i>et al</i> , 2012).....	38
Tabela 2.1 – Identificação das amostras da área pastoreada.	44
Tabela 2.2 - Identificação das amostras da área não pastoreada.....	44
Tabela 2.3 - Condições de extração utilizadas nos equipamentos.....	47
Tabela 2.4 - Volumes de solução-mãe de ácido gálgico a pipetar para a construção da reta de calibração.....	51
Tabela 3.1 - Compostos identificados em mais que uma árvore nas amostras recolhidas na área pastoreada.....	60

Lista de Figuras

Figura 1.1- População de bovinos em pastoreio no montado da Companhia das Lezírias.	26
Figura 1.2 - Extração de cortiça virgem.	28
Figura 1.3 - Extração de cortiça amadia.	29
Figura 1.4 - Compostos fenólicos identificados frequentemente.	35
Figura 2.1 - Planta de localização da charneca (adaptado de Companhia das Lezírias, S.A.	42
Figura 2.2 - Mapa de distribuição das áreas florestais da Companhia das Lezírias, S.A (adaptado de Companhia das Lezírias, S.A).	42
Figura 2.3 – Cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus Shimadzu usado no estudo (adaptado de Belo, M., 2012).	46
Figura 2.4 a,b,c,d,e e f – Diferente aspeto das amostras ao longo do processo de preparação (moenda).....	Erro! Marcador não definido.
Figura 2.5 – Equipamento de HPLC (adaptado de Belo, M., 2012).	53
Figura 2.6 – Programas de eluição testados nos diferentes métodos testados....	54
Figura 2.7- Amostras de cortiça para análise FTIR.	55
Figura 2.8- Equipamento utilizados nas análises FTIR.	56
Figura 3.1 – cromatograma obtido na análise da solução padrão de alcanos C8-C20.....	59
Figura 3.2 – Cromatograma obtido para a mesma amostra usando colunas de diferente polaridade.	60
Figura 3.3 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra recolhida da área pastoreada.....	62
Figura 3.4 - Cromatograma obtido na análise de uma amostra recolhida da área não pastoreada.	62
Figura 3.5 - Resultados obtidos na otimização da granulometria da cortiça.	65
Figura 3.6 - Resultados obtidos na otimização da concentração do extratante. .	65
Figura 3.7 - Resultados obtidos com a utilização do método I.....	67
Figura 3.8 – Resultados obtidos com a utilização do método II.....	68
Figura 3.9 - Resultados obtidos com a utilização do método III.....	69
Figura 3.10 – Retas de calibração de ácido gálico utilizadas para a quantificação de fenóis totais pelo método de Folin -Ciocalteu, traçadas em datas diferentes.	70

Figura 3.11 – Correlação dos teores de fenóis totais obtidos pelas técnicas de quantificação utilizadas.	71
Figura 3.12 -Teores médios de fenóis totais obtidos por espectrofotometria (Folin Ciocalteu para cada amostra (n=3).	72
Figura 3.13 – Teores médios de fenóis totais obtidos por HPLC-DAD para cada amostra (n=3).....	72
Figura 3.14 – Cromatogramas das mistura de padrões usados na identificação.	74
Figura 3.15 – Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça amadia recolhidas na área pastoreada.....	75
Figura 3.16 - Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça virgem recolhidas na área não pastoreada.	76
Figura 3.17- Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça virgem recolhidas na área pastoreada.....	76
Figura 3.18 – Espectro de comparação entre a utilização de farinha solta e pastilha de cortiça.	78
Figura 3.19 – Espetro de amostras de cortiça amadia da zona pastoreada (1) e da zona não pastoreada (91).	79
Figura 3.20 – Espetro de amostras de cortiça virgem da zona pastoreada (49) e da zona não pastoreada (139).....	79
Figura 3.21 – Distribuição das amostras nas duas primeiras componentes (variância total acumulada de 75%) mediante valores médios de absorvância obtidos por FTIR-ATR.....	80

Lista de Abreviaturas

°C – graus Celsius

µL – microlitros

µm – micrómetros

5-HMF - 5- hidroximetilfurfural

Ác. – Ácido

APCOR – Associação Portuguesa de Cortiça

ATR - reflectância total atenuada

CL – Companhia das Lezírias

cm – centímetros

DAD – detetor de díodos

DP – Desvio-padrão

DPr – Desvio-padrão relativo

EtOH – etanol

FIR - infravermelho longínquo

FT – Fenóis totais

FTIR - espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

FTIR- ATR - espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier com reflectância total atenuada

g - grama

GC/MS - cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa

h – hora

H₂O – água

ha – hectares

HPLC-DAD - cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de díodos

IRS – espectroscopia de infravermelho

IS – índice de semelhança

ITQB – Instituto de Tecnologia Química e Biológica

LLE - extração líquido-líquido

LRI – Índices de retenção linear

MetOH - metanol

mg – miligrama

min – minuto

MIR - infravermelho médio

mL – mililitro

mm - milímetros

Na₂CO₃ – Carbonato de sódio

NIR - infravermelho próximo

NIRS - espectroscopia de infravermelho próximo

nm – nanómetros

PIB – Produto interno bruto

ppm – partes por milhão

PTFE – politetrafluoretileno

R² – Índice de correlação linear

RNET - Reserva Natural do Estuário do Tejo

rpm – rotações por minuto

s - segundo

SFE - extração com fluído supercrítico

SPE - extração em fase sólida

SPME - micro extração em fase sólida

T - temperatura

UV - ultravioleta

v/v - Relação volume /volume



Introdução

1. O sobreiro e a cortiça

O sobreiro (*Quercus suber* L.) é uma árvore tradicional mediterrânica com características peculiares em relação à sua casca. A área de ocupação do sobreiro encontra-se estimada em 2,5 milhões de hectares numa faixa costeira da Baía do Mediterrâneo ocidental: Portugal, Espanha, França e Itália (na Europa) e Marrocos, Argélia e Tunísia (no norte de África). Em Portugal, o sobreiro ocupa 21% da área florestal e é responsável por 50% da cortiça produzida em todo o mundo rendendo cerca de 800 milhões de Euros anualmente (APCOR, 2014).

O sobreiro em Portugal pode ser encontrado disperso, em sobreiral ou em montado. O sobreiral é um povoamento de sobreiro de origem espontânea com densidades elevadas, uma estrutura irregular ou jardinada e um abundante sub-coberto e o montado de sobreiro é um sistema de uso múltiplo agro-florestal, típico das regiões planas mediterrânicas-continentais (Costa & Pereira, 2007).

O montado de sobreiro caracteriza-se por uma cobertura de árvores esparsas e vegetação rasteira, que vão desde formações arbustivas a pastagens, suportando altos níveis de biodiversidade. Estes ecossistemas florestais são ecossistemas “artificiais” que requerem uma gestão ativa e só sobrevivem pela intervenção do homem. Para além da produção de vários produtos como a cortiça, a lenha, a bolota, entre outros (cogumelos, mel), o montado de sobreiro fornece também outros bens e serviços como recreio, turismo e usos residenciais (Velo-so, 2014).

Atualmente a gestão económica do montado, como sistema agroflorestal, é assegurada pela produção de cortiça, a principal fonte de rendimento associada aos montados, e por um conjunto de atividades interligadas com uma grande importância socioeconómica quer local, quer nacional. O pastoreio é uma dessas atividades, muito importante economicamente associada ao montado de sobro, contribuindo para a sua gestão e sustentabilidade (Oliveira & Costa, 2012).

O sistema de gestão do pastoreio que mais frequentemente suporta a produção pecuária extensiva é o pastoreio intermitente, rodando os animais pelas várias folhas individualizadas por vedações. Em folhas de grande dimensão pode existir pastoreio contínuo, sendo frequente várias folhas funcionarem como uma única pastagem ao deixar as porteiras abertas. A ocupação das folhas é variável de ano para ano, não obedecendo a um esquema predefinido, mas baseando-se na análise da pastagem, subjetivamente apreciada pelo responsável de exploração (Livro Verde dos Montados, 2013).



Figura 1.1- População de bovinos em pastoreio no montado da Companhia das Lezírias.

Desde o final dos anos 70, a pecuária extensiva nos montados de sobro nacionais sofreu alterações importantes (Costa *et al.*, 2015) e o gado bovino tornou-se o principal tipo de gado, substituindo o porco e a ovelha e cabra (figura 1.1). No entanto, o aumento do encabeçamento de gado bovino e da prática da agricultura mecanizada, podem eliminar comunidades de plantas nativas e provo-

car o declínio de árvores, reduzindo o nível de diversidade estrutural (Plieninger, 2006). Para além disso, a intensificação do pastoreio põe em causa o desenvolvimento do sub-coberto arbustivo e a regeneração de árvores que resulta na perda e fragmentação do habitat, afetando, mais uma vez, a capacidade do montado de suportar níveis elevados de biodiversidade (Fernandes, 2014).

Perante estas tendências que ameaçam a conservação da biodiversidade, mantida pela agricultura tradicional ao longo do tempo no montado, torna-se necessário o aumento do conhecimento sob o modo como a gestão do uso do solo e sua alteração afetam a estrutura e funcionamento do ecossistema e a forma como a biodiversidade responde a essas mesmas alterações (Gonçalves *et al.*, 2011).

1.1. A exploração da cortiça no montado

Portugal é o maior transformador da cortiça em produtos manufaturados, com grande capacidade industrial instalada, com cerca de 600 empresas e 9000 trabalhadores. Para além da utilização da cortiça produzida nacionalmente, a indústria corticeira portuguesa importa cerca de 60 mil toneladas de cortiça, provenientes maioritariamente de Espanha (Livro Verde dos Montados, 2013).

A produção de cortiça dá-se em ciclos com remoção manual ou mecânica da camada protetora dos troncos e ramos das árvores (descortiçamento) não havendo no entanto morte da árvore, mas sim da camada de felogene existente. A primeira cortiça extraída de um sobreiro chama-se “cortiça virgem” (figura 1.2) e é extraída normalmente entre os 18 a 25 anos de idade da árvore (e com um perímetro à altura do peito de 70 cm) (Oliveira & Costa, 2012). É caracterizada por diversas fraturas de crescimento devido à tensão tangencial e ao crescimento radial da árvore (Pereira & Tomé, 2004).

Após a remoção da cortiça virgem, inicia-se um novo ciclo de formação da felogene (traumática) por desdiferenciação as células nos tecidos não condutores de floema (Domingues, 2005). Com a idade da árvore, as tensões de crescimento tendem a desaparecer, no entanto, a segunda cortiça a ser extraída, “segundeira”, produzida pela primeira felogene traumática, ainda apresenta algumas fraturas características e é extraída quando a árvore apresenta entre 27 e 35 anos (Oliveira & Costa, 2012).



Figura 1.2 - Extração de cortiça virgem.

Tanto a cortiça virgem como a cortiça secundária apresenta um valor económico mais baixo que a cortiça tirada a partir do 3º ciclo, sendo utilizadas para aglomerados (quadros de cortiça, isolamentos, solas de sapatos, etc.), após trituração (Oliveira & Costa; 2012, Domingues, 2005; Silva *et al.*, 2005).

As extrações de cortiça em árvores em produção acontecem normalmente em ciclos de 9 a 12 anos, dependendo da região de cultura (Silva *et al.*, 2005; Decreto de Lei n.º 169/2001 de 25 de Maio).

Na terceira extração consecutiva e extrações seguintes, a cortiça é designada de “amadia” (figura 1.3). A amadia apresenta uma estrutura mais compacta e regular, com qualidade suficiente para ser usada para o fabrico de rolha de cortiça natural, tornando-se economicamente mais atrativa (Pintor *et al.*, 2012). As rolhas de cortiça natural têm grande importância relativa nas exportações de cortiça, representando cerca de 40% do valor total.

A indústria dos vinhos é o maior cliente de produtos de cortiça, seguindo-se a construção civil que consome diferentes tipos de aglomerados para revestimento e isolamento. O valor gerado pelas exportações portuguesas de cortiça é substancial, representando aproximadamente 0,7% do PIB, 2,2% do valor das exportações totais portuguesas e cerca de 30% do total das exportações portuguesas de produtos florestais (Livro Verde dos Montados, 2013).

O valor da cortiça na indústria da rolha de cortiça natural depende principalmente de dois aspetos: o calibre das pranchas, que está relacionado com o crescimento anual da cortiça; e a qualidade da cortiça, que inclui a porosidade

dada pelos canais lenticulares e defeitos bióticos ou abióticos (Costa & Pereira, 2010).



Figura 1.3 - Extração de cortiça amadia.

Diversos fatores influenciam o crescimento e a qualidade comercial da cortiça: a diversidade no crescimento é evidente, encontrando-se variabilidade entre árvores no mesmo povoamento, e entre valores médios em diferentes locais (Costa *et al.*, 2016; 2003; Ghalem *et al.*, 2016). No entanto, a disponibilidade de água e a precipitação são importantes para o crescimento da cortiça, assim como o tipo de solo.

Quanto à qualidade comercial da cortiça, esta é determinada pelo número e dimensão dos canais lenticulares, ou seja, pela designada porosidade da cortiça e outros fatores nomeadamente defeitos como a cobrilha, a formiga ou a mancha amarela (Velo, 2014). De facto, durante o processamento industrial da rolha e discos de cortiça natural são excluídos de processamento as pranchas cortiças com mancha amarela uma vez que podem estar contaminados com compostos voláteis responsáveis pelo “gosto a rolha”(triclóroanisole), um dos maiores problemas da indústria rolheira e que estão relacionados com a composição química da cortiça.

1.2. Composição química da cortiça

A cortiça é um tecido que tem origem no felogénio do sobreiro, sendo constituída por células mortas cuja composição química pode-se dividir em dois tipos de componentes: estruturais e não-estruturais: os primeiros são a suberina, a lenhina e os polissacáridos de celulose e hemiceluloses; os componentes não estruturais classificam-se em extrativos (ceras e taninos) e componentes inorgânicos (cinzas) (Pereira, 2007).

Vários estudos têm sido feitos em relação à composição química da cortiça (Silva, 2014; Santos, 2012; Pereira, 2007; Conde, 1998). A suberina é o componente que representa a maior percentagem da cortiça sendo, em média, 30-50% da estrutura da parede celular, a lenhina representa, em média, entre 21-29%, as celulose e hemiceluloses representam em média, 11-26% e os extrativos representam, em média, entre 8% a 19% (Silva, 2014; Santos, 2012; Pereira, 2007; Conde, 1998, Jové *et al.*, 2011). Os extrativos habitualmente classificam-se em dois grupos: um constituído por lípidos e outro constituído por compostos fenólicos. Os lípidos são cerca de um terço do total de extrativos (5-8% da cortiça) e os compostos fenólicos são representados por taninos em mais de 90% (Fortes *et al.*, 2004, Jové *et al.*, 2011).

1.2.1. Compostos voláteis da cortiça

Os principais compostos aromáticos presentes na cortiça são os alquilbenzenos (Ezquerro & Tena, 2005). Estes compostos resultam da degradação da lenhina e da componente polifenólica da suberina. A descarboxilação e oxidação da lenhina produzem ácido vanílico e a sua subsequente degradação leva à formação do guaiacol, com um aroma a fumo.

Outros compostos aromáticos que se podem encontrar na cortiça, destacam-se os terpenóides que são compostos de aroma com a função álcool (unidades isoprénicas, ligadas entre si por ligações cabeça-cauda de acordo com o número de carbonos); os álcoois primários (butan-1-ol, o pentan-1-ol, o hexan-1-ol, o octan-1-ol e o dodecan-1-ol) (Castola *et al.*, 2005) e os ácidos alifáticos (diácidos e hidroxiácidos gordos) (Mazzoleni *et al.*, 1994).

Os furanos como o furfural, o 5-metilfurfural e o álcool furfurílico, foram também identificados na cortiça. A presença destes compostos está normalmen-

te relacionada com a ocorrência de reações de degradação de açúcares (Mazzoleni *et al.*, 1994). Outros compostos aromáticos podem estar presentes na cortiça; contudo, não sendo intrínsecos ao material, alguns são contaminantes associados a desvios organoléticos (Fonseca, 2013).

A presença de compostos voláteis responsáveis por defeitos na cortiça é um problema crítico para a indústria alimentar devido aos cloroanisóis e clorofenóis que estão associados a sabores a “mofo” e outros cheiros, mesmo que em concentrações muito baixas. Como os materiais de cortiça são normalmente usados para selar garrafas, a migração de cloroanisóis da rolha de cortiça para o produto pode originar alguns destes odores e/ou sabores (Garcia *et al.*, 2014) e consequentemente levar à rejeição do produto pelo consumidor.

Os halonisóis são compostos responsáveis por contaminações sendo o mais conhecido e mais importante, por representar um problema de grande relevo na indústria corticeira e vitivinícola, é o 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Existem outros compostos que podem também ser ocasionalmente, responsáveis pela contaminação: o 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA), o pentacloroanisol (PCA) e o 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6TBA). Estes compostos estão associados odores tipo mofo, bolor e bafio que modificam e depreciam qualitativamente o aroma normal do vinho. Estes compostos que provêm da transformação química dos seus precursores, os halofenóis. Nesta família de compostos os mais representativos são os clorofenóis e os bromofenóis. Os clorofenóis têm sido utilizados intensivamente, nas últimas décadas, como pesticidas e fungicidas, devido ao fato de serem substâncias tóxicas para animais e plantas. Consequentemente tornaram-se num dos grupos mais importantes de contaminantes nos diferentes ecossistemas terrestres. Atualmente, a sua utilização é proibida pela UE, uma vez que são considerados compostos prejudiciais com alguma toxicidade para a saúde humana (Fonseca, 2013; Chaudhry *et al.*, 1991).

Ao contrário dos cloroanisóis, alguns bromofenóis são gerados na natureza em elevadas quantidades. Podem ser sintetizados por algas castanhas e estarão presentes em águas residuais provenientes de tratamentos com cloro e na presença de iões brometo. São produzidos em larga escala pelas indústrias químicas como substituto dos clorofenóis (Chatonnet *et al.*, 2004). Os halofenóis podem ainda ser formados a partir de compostos formados da degradação da

lenhina e de açúcares que reagem com átomos de cloro e bromo presentes na natureza.

A contaminação dos produtos resultantes da cortiça pode ser intrínseca, isto é, pode ter ocorrido durante o processo de crescimento na árvore ou mesmo durante os processos de produção, ou pode ser extrínseca ocorrendo fruto da adsorção de TCA do ambiente (Fonseca, 2013).

1.2.1.1. Análise de compostos voláteis

Os processos de amostragem e de preparação de amostra para análise de compostos voláteis são muito importantes pois podem condicionar os resultados obtidos. No caso de uma amostra líquida, esta é introduzida num cromatógrafo gasoso e os seus componentes voláteis são vaporizados e arrastados através da coluna, pelo gás de arraste (fase móvel) (Ettre, 2002). Em amostras sólidas é mais complicado, uma vez que este tipo de amostra não pode ser introduzido diretamente no equipamento e exige um procedimento de extração prévio (Majcher & Jelén, 2009; Akapo & McCrea, 2008; Ettre, 2002). De entre as técnicas de extração normalmente usadas destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração com fluído supercrítico (SFE), a extração em fase sólida (SPE) e a micro extração em fase sólida (SPME) (Majcher & Jelén, 2009; Akapo & McCrea, 2008; Barrionuevo & Lanças, 2001).

A popularidade atual da SPME prende-se com o fato de: (i) ser uma técnica rápida (toda a operação é reduzida a duas etapas simples, de extração e desorção), (ii) não usa solventes, (iii) permite a extração de compostos voláteis do "headspace" e (iv) existe disponibilidade de diferentes revestimentos para a fibra, adequados para a polaridade do composto de interesse (Kaseleht *et al.*, 2010). Apresenta as mesmas vantagens da SPE, tais como simplicidade, baixo custo, fácil manuseamento e ao mesmo tempo elimina desvantagens da SPE, como a colmatação de cartuchos e o uso de solventes orgânicos (Barrionuevo & Lanças, 2001).

A cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC/MS) é amplamente utilizada na separação e quantificação de compostos voláteis (Kaseleht *et al.*, 2010; Ettre, 2002; Bredie *et al.*, 1998; Buttery *et al.*, 1997). Combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação)

com as vantagens da espectrometria de massa (obtenção de informação estrutural, massa molar e maior seletividade) (Vékey, 2001).

A maior desvantagem da técnica de SPME é o custo das fibras e a dependência de condições operacionais como temperatura e tempo de extração (Majcher & Jelén, 2009; Akapo & McCrea, 2008). A operação de extração em SPME pode ser feita no modo direto ou de headspace. Para extrações diretas, a fibra é imersa em amostras líquidas (aquosa) ou gasosas. Já no segundo caso, mais adequado para extração de analitos de volatilidade moderada a alta e para amostras sólidas, suspensões ou materiais de origem biológica, a fibra é exposta ao headspace da amostra. Independentemente do modo operacional, as espécies químicas presentes na amostra são retidas pela fibra até ser atingido o equilíbrio de partição entre as fases, quando idealmente a concentração das espécies sorvidas pela fibra é proporcional à sua concentração original na amostra (Ettre, 2002; Barrionuevo & Lanças, 2001; Pires Valente & Augusto, 2000). Terminado o tempo de extração, a fibra é retraída e levada para inserção no injetor de um cromatógrafo de fase gasosa aquecido a temperatura elevada. Os analitos são desorvidos pelo efeito da temperatura elevada e são arrastados através coluna onde ocorre a sua separação e posteriormente a sua deteção.

A extração em headspace apresenta vantagens relativamente à proteção da fase estacionária de efeitos adversos causados por compostos não voláteis existentes na amostra, de elevado peso molecular. Confere maior durabilidade na utilização, bem como a possibilidade de se proceder ao ajuste das condições de extração da amostra sem danificar a fase estacionária. A sua seleção deverá ser efetuada de forma a haver uma forte afinidade com os analitos (Faria, 2012). A fibra de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) surge descrita, maioritariamente, para a análise de compostos voláteis, devido à sua polaridade mista (Ezquerro & Tena, 2005, Neto, 2005).

1.2.2. Compostos fenólicos da cortiça

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos mais extensos de metabolitos secundários das plantas. Estes metabolitos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, promovendo um mecanismos de defesa contra infeções e lesões. A presença de compostos fenólicos tem tam-

bém uma função importante na estabilidade oxidativa e na segurança microbiana (Balasundram *et al.*, 2006; Kefeli *et al.*, 2003; Bennett & Wallsgrove, 1994). Estes compostos apresentam uma base molecular comum: um anel benzênico hidroxilado (fenol) e a estrutura destes pode variar entre moléculas fenólicas simples até compostos poliméricos complexos. Podem ser classificados em diferentes subgrupos, dependendo do grupo funcional anexado à unidade fenólica (Santos, 2012).

Nos últimos anos têm sido realizados muitos estudos com o objetivo de estudar a presença de compostos fenólicos em rolhas de cortiça e a sua interação com o vinho, no entanto poucos são os que estudam a cortiça na sua origem, a árvore. Conde *et al.* (1997) realizou diversos estudos na composição polifenólica de cortiças de diversas proveniências bem como na identificação de diversos polifenóis de baixo peso molecular. Em geral, os ácidos cinâmicos e benzoicos livres não contribuem para o odor característico ou defeitos da cortiça. No entanto estes são precursores de compostos como a vanilina, que oferece um odor de fácil deteção, logo com baixo limiar de percepção olfativa (Maga & Puech, 2005).

Os ácidos fenólicos (ácido elágico, ácido protocatechuico e ácido vanílico) (figura 1.4) são os que têm sido mais identificados na cortiça do sobreiro, no entanto têm sido reportada a presença de elagitaninos, em particular castalagina (Silva *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 1998). Também foram identificadas várias estruturas fenólicas oligoméricas com uma variedade de derivados de ácido elágico e gálico (Santos, 2012; Silva *et al.*, 2005). A abundância relativa de cada composto fenólico identificado demonstra ser variável mediante a origem geográfica da cortiça (Conde *et al.*, 1998).

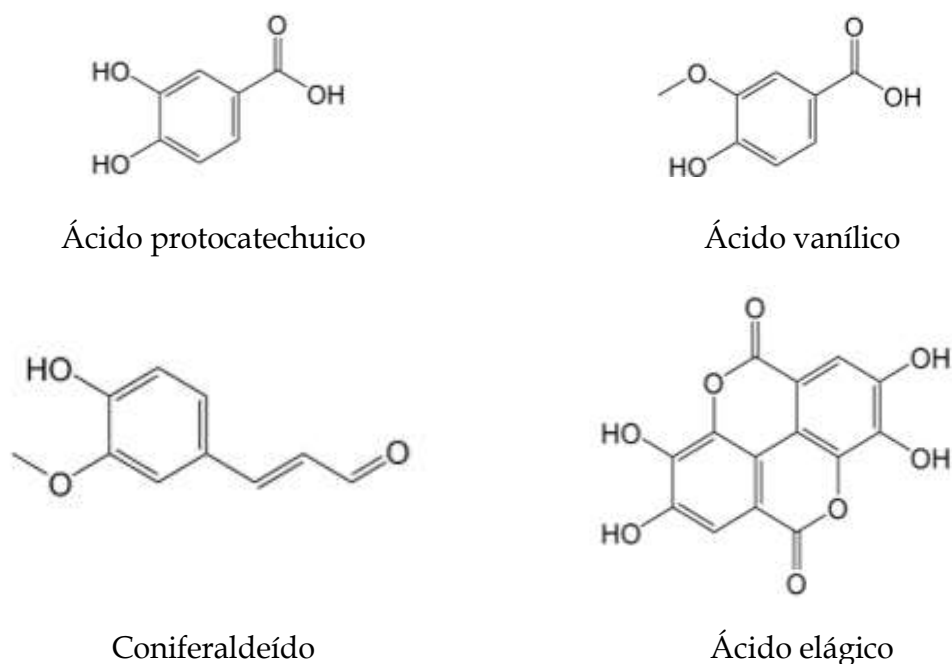


Figura 1.4 - Compostos fenólicos identificados frequentemente na cortiça do *Quercus suber* L.

1.2.2.1. Análise de compostos fenólicos

Vários compostos fenólicos que têm vindo a ser identificados na cortiça são extraídos frequentemente em soluções alcoólicas, podendo também ser extraídos com solventes polares e apolares (Fernandes *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2005; Conde *et al.*, 1998; Mazzoleni *et al.*, 1998). A solubilidade dos compostos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos compostos fenólicos, as suas interações com outros constituintes e a formação de complexos insolúveis. Assim, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração, relação solvente: amostra, tratamento da amostra, entre outros têm influência significativa na eficácia de extração, refletindo-se na maior ou menor recuperação desses compostos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo, propanol, dimetilformaldeído e combinações (Silva *et al.*, 2005; Naczk & Shahidi, 2004).

Após a extração, a análise de compostos fenólicos pode ser feita por métodos colorimétricos ou separação cromatográfica.

A técnica de Folin-Denis descrita por Swain & Hillis (1959) baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelos grupos hidroxilo dos fenóis, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 725nm. A reação ocorre em meio alcalino em que se utiliza uma solução saturada de carbonato de sódio. Esta técnica no entanto não é uma técnica específica, pois determina todos os compostos fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionais ou naturalmente presentes que podem interferir com os resultados (Angelo & Jorge, 2007) e ainda proteínas e reduz substâncias como o ácido ascórbico (Naczki & Shahidi, 2004). O reagente de Folin-Denis é muitas vezes substituído pelo reagente de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), sendo este mais sensível à redução pelos fenóis o que diminui a tendência à precipitação.

A cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD), com uma coluna de fase reversa C18, é uma das técnicas amplamente utilizadas na separação e quantificação de compostos fenólicos (Naczki & Shahidi, 2004; Escarpa & Gonzales, 2000). O detetor de díodos (DAD) é uma ferramenta importante para a identificação destes compostos, dado que, através da comparação dos espectros de absorção dos compostos, é possível a identificação do tipo de família a que pertencem (Escarpa & Gonzales, 2000).

1.2.3. Caracterização da cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de Infravermelho (IV) consiste no estudo da interação da radiação infravermelha com a matéria. Esta interação é representada num gráfico que relaciona a intensidade da radiação absorvida pela matéria com o comprimento de onda dessa radiação – o espectro de IV. O equipamento que permite obter estes espectros é denominado espectrómetro de infravermelho, e o tipo de espectrómetro mais utilizado atualmente é o FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectrometer ou Espectrometria de Infravermelho de Transformada de Fourier (Monteiro, 2007).

Trata-se de uma técnica rápida e não destrutiva e permite uma caracterização quantitativa e qualitativa de amostras orgânicas e inorgânicas, identificando as ligações químicas das moléculas e produzindo um espectro de absor-

ção na zona do infravermelho. Este representa a identificação de uma amostra: os picos de absorção correspondem às frequências de vibração dos átomos quando recebem radiação, sendo que para cada composto existe uma combinação única de átomos, não havendo dois compostos que produzam o mesmo espectro de infravermelho. Portanto a espectroscopia de infravermelho pode resultar na identificação (análise qualitativa) e, por outro lado, o tamanho dos picos no espectro é um indicador quantitativo direto (ThermoScientific, 2016).

A reflectância total atenuada (ATR) é amplamente usada na medição de FTIR com biomassa, o que simplifica a preparação da amostra. O ruído de fundo de alta absorvância de água é um obstáculo quando o FTIR é utilizado na análise da biomassa sólida húmida, mas com o FTIR- ATR, este permite a atenuação da radiação incidente e fornece espectros de infravermelho sem a absorvância do ruído de fundo da água (Xu *et al.*, 2013). Devido à necessidade de uma escala relativa para a intensidade de absorção, mede-se um espectro de fundo que permite a comparação com a medição do feixe da amostra, possibilitando a determinação da percentagem de transmitância (Leite, 2008).

Este tipo de técnica espectroscópica é versátil e bem estabelecida no campo da ciência de conservação do património cultural. É uma técnica usada frequentemente quando é requerida uma preparação mínima, ou até mesmo nenhuma preparação de amostra, permitindo a realização de estudos de superfícies (Falcão & Araújo, 2014).

Com recurso à técnica de FTIR, é possível a análise de um número maior de amostras num curto espaço de tempo, quando relacionado com os métodos convencionais de degradação química (Lopes *et al.*, 2001).

1.2.3.1. Análise da composição química da cortiça por FTIR

A utilização da espectroscopia de infravermelho tem vindo a ser utilizada para determinação do teor de humidade ou de contaminações na superfície de rolhas de cortiça (Garcia *et al.*, 2014; Prades *et al.*, 2010; Ortega-Fernández *et al.*, 2006), bem como a relação entre qualidade da cortiça e a sua composição química. O FTIR tem sido usado como ferramenta de controlo de modificações químicas durante o processo de manipulação da cortiça, determinando a pureza de

componentes isolados e caracterizando os tratamentos de superfície das rolhas de cortiça (Prades *et al.*, 2010).

Em espectros obtidos para cortiça pura (sem realização de nenhum tipo de tratamento) foram já identificadas algumas bandas que podem ser usadas como marcadores para a suberina (2919, 2854, e 1749 cm^{-1}), a lenhina (1513, 858, e 818 cm^{-1}), os polissacarídeos (1101 e 1036 cm^{-1}) e os extrativos (1607 e 1460-1300 cm^{-1}) (Tabela 1.1) (Pintor *et al.*, 2012).

Recorrendo ao FTIR é possível uma caracterização simples e rápida da composição química da cortiça com uma preparação mínima das amostras em estudo (Ortega-Fernández *et al.*, 2006), vindo a facilitar a identificação de alguns constituintes da cortiça.

Tabela 1.1 - Zonas do espectro usadas na identificação de constituintes da cortiça. Adaptado de Pintor *et al.*(2012).

Banda	Constituinte
3425 cm^{-1}	Água, hemicelulose, celulose
2919, 2854 e 2849 cm^{-1}	Suberina
1749, 1747 e 1719 cm^{-1}	Suberina, hemicelulose, celulose
1635, 1607 e 1513 cm^{-1}	Suberina, lenhina, extrativos
1466 cm^{-1}	Lenhina, extrativos
1366 cm^{-1}	Extrativos
1267 cm^{-1}	Suberina, hemicelulose, celulose, lenhina
1164 cm^{-1}	Suberina, hemicelulose, celulose, lenhina
1101, 1036 cm^{-1}	Hemicelulose, celulose

Este tipo de técnica tem vindo a ser utilizada na indústria agroflorestral para determinar a origem de aparas de madeira (Prades *et al.*, 2010) e na indústria corticeira tem vindo a ser utilizado para estimar variáveis de interesse para a sua caracterização, como a porosidade e o teor de humidade. O potencial desta

tecnologia é a rapidez e precisão, associado a outros instrumentos, o que permite um melhor controlo de qualidade da cortiça e previsão da origem das pranchas da mesma (Prades *et al.*, 2014).

Recorrendo ao FTIR é possível uma caracterização simples e rápida da composição química da cortiça com uma preparação mínima das amostras em estudo (Ortega-Fernández *et al.*, 2006), vindo a facilitar a identificação de alguns constituintes da cortiça.

2. **Objetivos do trabalho**

Num contexto de valorização da qualidade da cortiça na árvore e na atual tendência de gestão do montado de sobro, pretende-se com o presente trabalho, determinar a influência do pastoreio intensivo com gado bovino na composição química da cortiça, nomeadamente ao nível dos compostos fenólicos e voláteis.

A contaminação das pranchas de cortiça por compostos deste grupo pode ser intrínseca, isto é, pode ter ocorrido durante o processo de crescimento na árvore ou pode ser extrínseca, ocorrendo fruto da adsorção de compostos do ambiente. Assume-se neste estudo que deverão existir diferenças significativas na composição química da cortiça produzida por árvores em áreas não pastoreadas e áreas pastoreadas, com encabeçamentos elevados.

Assim, este estudo incidiu sobre três vertentes de análise:

- Diferenças entre as áreas de estudo (pastoreada e não pastoreada);
- Diferenças entre cortiça virgem e cortiça amadia em cada uma das áreas;
- Diferenças entre cortiça amadia recolhida a diferentes níveis de altura no tronco (ao nível do solo, a 0,30 cm de altura e a 1,30 cm de altura do solo).

Os resultados encontrados constituem os primeiros resultados que relacionam a composição química da cortiça com a gestão do sistema montado de sobro. Podem ter uma importância vital na medida em que podem demonstrar que apenas com uma gestão racional do montado de sobro e de técnicas adequadas de descortiçamento se pode obter uma matéria prima com uma qualidade superior.

Este trabalho encontra-se estruturado em 4 capítulos: o primeiro fornece um introdução geral e contextualização para o presente trabalho, o segundo capítulo descreve a amostragem, material e métodos usados para a obtenção dos resultados que se encontram apresentados e discutidos no terceiro capítulo. O quarto capítulo apresenta-nos as conclusões retiradas do estudo e sugestões para futuros trabalhos.



Parte experimental

3. Área de estudo

O Montado de sobreiro da Companhia das Lezírias está situado no concelho de Benavente e tem como principais áreas a Charneca do Infantado (figura 2.1). Tem uma área de 12.000 ha, pelo que esta área está dividida por várias folhas de acordo com a tiragem de cortiça. Parte da área tem o estatuto de reserva natural fazendo parte do RNET (Reserva Natural do Estuário do Tejo) e Zona de Proteção Especial e no Sítio de Importância Comunitária, integrado na Rede Natura 2000.

A floresta representa grande parte da área da Charneca, com cerca de 8 680 hectares e apresenta povoamentos das quatro principais espécies de árvores da floresta nacional, o sobreiro (*Quercus suber* L.), povoamento florestal dominante ocupando cerca de 6 725 hectares, o pinheiro bravo (*Pinus pinaster* Aiton), o pinheiro manso (*Pinus pinea* L.) e o eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), com extensões de 971 hectares, 508 hectares e 476 hectares, respetivamente (“Companhia das Lezírias” n.d.) (figuras 2.1 e 2.2).

Quanto à produção animal, a Companhia das Lezírias embarga um efetivo bovino de aproximadamente 3500 animais (Pinto, 2012). O gado permanece no pasto durante grande parte do ano. Apesar dos encabeçamentos serem relativamente baixos (máximo de 1 cabeça normal por hectare) e dentro do que está preconizado como ótimo para o potencial produtivo de pastagens em sequeiro, entre 0.4 e 2 cabeças por hectare, existem já várias zonas que foram vedadas ao gado durante grandes períodos de tempo para poderem ser recuperados para atividade produtiva.

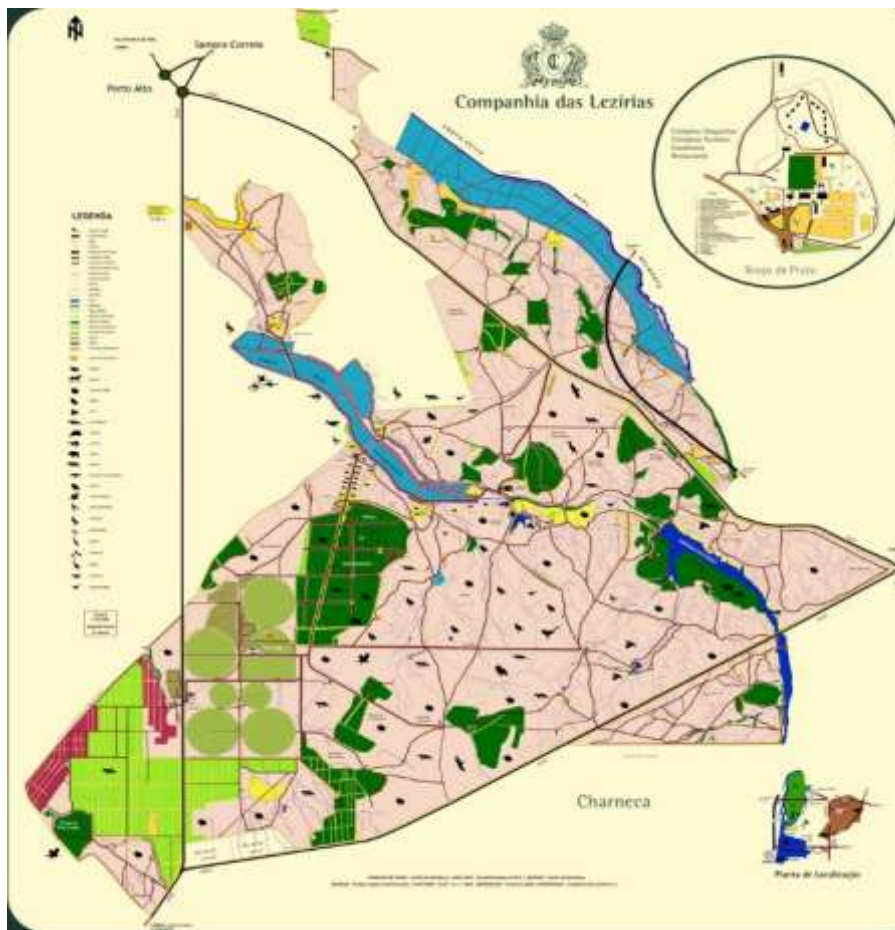


Figura 2.1 - Planta de localização da charneca (adaptado de Companhia das Lezírias, S.A).

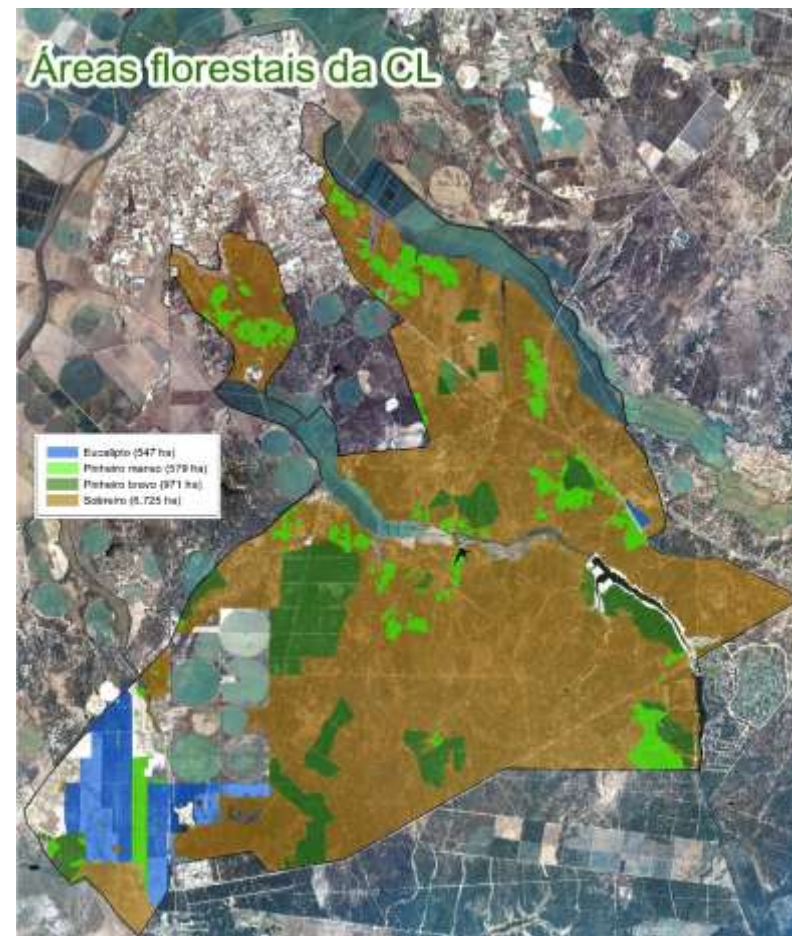


Figura 2.2 - Mapa de distribuição das áreas florestais da Companhia das Lezírias, S.A (adaptado de Companhia das Lezírias, S.A).

4. Amostragem e preparação de amostras

Para os ensaios de otimização de métodos analíticos foram utilizadas amostras de cortiça recolhidas no montado da Companhia das Lezírias, durante a campanha de descortiçamentos de 2014.

A amostragem para o estudo foi feita em seis árvores com cortiça virgem e em seis árvores com cortiça amadia, distribuídas por dois povoamentos distintos: (i) com sobrepastoreio de gado bovino e (ii) sem pastoreio, sempre a dois níveis das árvores, 0,30 cm e 1,30 cm medidos a partir do solo (tabelas 2.1 e 2.2). Em cada área em estudo, de uma árvore amadia e ao nível 0,30 retirou-se também triplicados de amostra de cortiça sem costa (parte mais exposta da cortiça) de forma a poder-se determinar diferenças na composição volátil da cortiça da parte externa e da parte interna da prancha descortificada.

As amostras que foram usadas para estudo dos compostos fenólicos (24 amostras em triplicado, num total de 72 amostras) foram acondicionadas em frascos de plástico com capacidade de 50 mL e as amostras destinadas a realização de análises por cromatografia em fase gasosa (52 amostras em triplicado, num total de 156 amostras) foram acondicionadas em frascos de vidro (*vials*) de 20mL e encapsulados com rolhas de metal com septo de politetrafluoretileno (PTFE).

As amostras de cortiça foram usadas para análise, com e sem costa da cortiça, por se saber que a presença da costa pode influenciar a composição química da cortiça (Pereira, 2007). Por definição, a costa, na cortiça amadia é constituída pelos restos dos tecidos lenhosos do entrecasco, exteriores à nova felogene traumática. A costa tem uma cor acastanhada e permanece como revestimento exterior das novas camadas de cortiça.

Tabela 2.1 – Identificação das amostras da área pastoreada.

Área em estudo	em	Tipo de cortiça	Nível da árvore	Análise a realizar	Número da amostra
Pastoreada	Amadia	0,30 cm		Teor de compostos fenólicos e FTIR	1; 21; 35
				Teor de compostos voláteis	2-7; 22-27; 36-41
		0,30 cm sem costa		Teor de compostos voláteis	8-13
		1,30		Teor de compostos fenólicos e FTIR	14; 28; 42
	Virgem	0,30		Teor de compostos fenólicos e FTIR	15-20; 29-34; 43-48
				Teor de compostos voláteis	49; 63; 77
		1,30 cm		Teor de compostos voláteis	50-55; 64-69; 78-83
				Teor de compostos fenólicos e FTIR	56; 70; 84
		Teor de compostos voláteis	57-62; 71-76; 85-90		

Tabela 2.2 - Identificação das amostras da área não pastoreada.

Área em estudo	Tipo de cortiça	Nível da árvore	Análise a realizar	Número da amostra
Não pastoreada	Amadia	0,30 cm	Teor de compostos fenólicos e FTIR	91; 111; 125
			Teor de compostos voláteis	92-97; 112-117; 126-131
		0,30 cm sem costa	Teor de compostos voláteis	98-103
		1,30	Teor de compostos fenólicos e FTIR	104; 118; 132
	Virgem	0,30	Teor de compostos voláteis	105-110; 119-124; 133-138
			Teor de compostos fenólicos e FTIR	139; 153; 1167
		1,30 cm	Teor de compostos voláteis	140-145; 154-159; 168-173
			Teor de compostos fenólicos e FTIR	146; 160; 174
		Teor de compostos voláteis	147-152; 161-166; 175-180	

5. Análise de Compostos Voláteis por SPME-GC/MS

Para a análise destes compostos recorreu-se à cromatografia gasosa associada à espetrometria de massa (GC/MS), tendo-se procedido à preparação da amostra através da técnica de micro-extração em fase sólida (SPME).

5.1. Preparação das amostras de cortiça para análise

No momento do descortiçamento foram cortados pedaços com dimensões inferiores as 5×5×5 mm e colocados em vials de vidro com capacidade de 20mL até atingir metade da capacidade do vial. Foram imediatamente selados com capsulas de metal com septo de politetrafluoretileno (PTFE), pesados e conservados a 4°C até à realização da análise.

5.2. Materiais

Utilizou-se uma mistura padrão de hidrocarbonetos C8-C20 (contem C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20; 40 mg/L cada, em hexano) da Fluka, para identificação de compostos voláteis pelos índices de retenção.

5.3. Análise

As análises dos compostos voláteis foram executadas em dois cromatógrafos acoplados com espetrómetro de massa (GCMS-QP2010 Plus Shimadzu) e equipados com duas colunas diferentes: o cromatógrafo 1 possuía uma coluna Sapiens-WAX MS da Teknokroma (60m x 0,25µm x 0,25µm) e o cromatógrafo 2 possuía uma coluna capilar Varian Factor Four, DB - 5MS da J & W Scientific (30m x 0,25µm x 0,25µm) (Figura 2.3), ambos equipados com fibras de SPME (Gray-notched), 50/30 recoberta a divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com 2 cm da Sulpeco.



Figura 2.3 – Cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus Shimadzu usado no estudo. Adaptado de Belo (2012).

Estes equipamentos têm acoplados um amostrador automático AOC-5000 (Shimadzu). O sistema de aquisição de dados usado foi o programa GCMSsolution.

5.4. Condições de análise utilizadas

Tendo em conta os diversos trabalhos já realizados anteriormente no laboratório com este tipo de amostra, foi utilizado um método já otimizado para a realização das análises.

Procedeu-se à análise das amostras nos dois cromatógrafos de fase gasosa com recurso a duas colunas de polaridade diferentes (DB-5MS e DB-WAX) com as seguintes condições de análise (tabela 2.3): injetor a 250°C, no modo “*splitless*”, os compostos foram dessorvidos e analisados com o seguinte programa de temperaturas: 40°C durante 5 minutos, seguindo-se um aumento de 5°C/min até uma temperatura de 170°C seguindo-se de outro aumento de 30°C/min até uma temperatura final de 230°C. A interface e a fonte de iões no equipamento de MS estavam a 250°C. Os espetros de massa no modo de impacto de eletrões (EI) foram gerados a 70eV e foram recolhidos na gama de m/z de 29 a 299, com uma velocidade de varrimento de 588 scans s^{-1} . O gás transportador era o hélio e o fluxo era de 3mLmin⁻¹.

Tabela 2.3 - Condições de extração utilizadas nos equipamentos

Condições	Cromatógrafo 1 (coluna DB-WAX)	Cromatógrafo 2 (coluna DB- 5MS)
Tempo de Pré-incubação (min)	10	10
Temperatura de incubação (°C)	40	40
Velocidade de agitação de pré-incubação (rpm)	250	100
Tempo de agitação (s)	60	60
Penetração de agulha (mm)	12	12
Penetração da fibra (mm)	20	27
Tempo de extração (s)	2400	2400
Penetração no injetor (mm)	32	45
Tempo de dessorção (s)	180	180

5.5. Tratamento de dados

O *software* LabSolutions GCMSsolution Release 2.53SU1 foi usado para a análise das áreas dos compostos presentes nos cromatogramas das diferentes amostras.

A identificação dos compostos voláteis nas amostras foi efetuada por comparação dos espectros de massa dos compostos da biblioteca de espectros do *software* (WILEY 229 e NIST 27 e 147) com os espectros de massa obtidos experimentalmente. A identificação dos picos nos cromatogramas foi feita com base numa lista de possíveis compostos em que é dado o índice de semelhança (IS) que é atribuída a esse pico, pela própria biblioteca de espectros. Por vezes é detetado mais do que um composto com o mesmo índice de semelhança, o que implica a confirmação da identificação, utilizando misturas padrão para comparação de tempos de retenção e o cálculo dos fatores de retenção linear (índice de Kovats). Estes fatores foram calculados a partir de uma equação (1) e sempre

que possível foram comparados com os referenciados na bibliografia (The Phe-robases, 2016).

(1)

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

onde: LRI - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior.

6. Análise de Compostos Fenólicos por espectrofotometria e cromatografia líquida

Procedeu-se à otimização das condições de preparação de extratos de cortiça, nomeadamente no que se refere à granulometria da cortiça, quantidade de amostra e melhor solução extratante.

Para quantificação dos compostos fenólicos totais utilizaram-se duas técnicas: a técnica de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria e efetuou-se a determinação da área total do cromatograma obtido por HPLC-DAD a 280nm.

6.1. Preparação das amostras de cortiça para análise

As amostras de cortiça foram cortadas em pedaços de dimensões reduzidas (aproximadamente 2mm*2mm*2mm. Procedeu-se à moagem da amostrateste, à qual foi adicionado azoto líquido e foi triturada com recurso a um almofariz e pilão. Posteriormente foi moída num moinho RETCHZ com o uso de um crivo de 1,5mm obtendo-se uma farinha de cortiça (figura 2.4 a,b,c,d,e e f).

A extração dos compostos fenólicos foi efetuada a partir de um procedimento interno implementado e que sofreu algumas alterações ao longo do processo de otimização, nomeadamente na quantidade de farinha de cortiça utilizada e no solvente extratante. Para extração dos compostos das amostras testaram-se vários solventes (25mL) para 1,5mg de farinha, de forma a verificar qual o solvente que permitia uma melhor extração: EtOH/H₂O (0:100 v/v), EtOH/H₂O (25:75 v/v), EtOH/H₂O (50:50 v/v), EtOH/H₂O (75:25 v/v) e EtOH/H₂O (100:0 v/v).

Foram preparadas diferentes diluições do extrato escolhido (1/250; 1/500; 1/750 e 1/1000), de forma a obter leituras espectrofotométricas adequados à reta de calibração utilizada (ver 6.2.3).

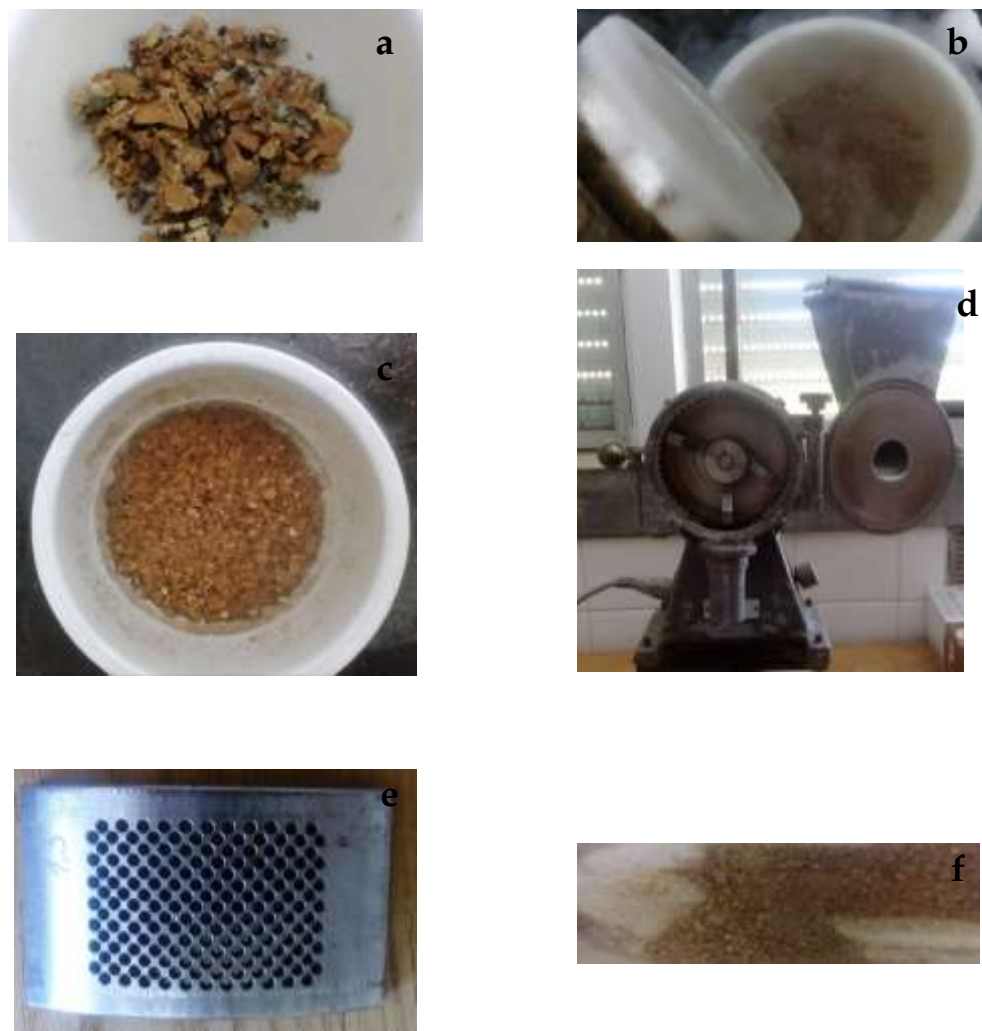


Figura 2.4 - Diferentes aspetos da amostra ao longo do processo de preparação (moenda: a) Amostra recolhida no campo; b) Adição de azoto líquido; c) Aspeto da amostra após moenda no almofariz com azoto líquido; d) Moinho elétrico utilizado para moenda ; e) Crivo de 1,5 mm utilizado no moinho elétrico e; f) Aspeto final da amostra moída.

Inicialmente pesaram-se 1,5 g de farinha que foram extraídas com 25 mL uma solução EtOH/H₂O (50:50 v/v). No decorrer do processo de otimização verificou-se que a quantidade de farinha não era adequada para as análises: os resultados obtidos encontravam-se aquém dos resultados de fenóis totais reportados por Santos, S., *et al.*, (2010). e passou-se a utilizar 2 g de farinha que era

extraída com 25 mL de uma solução de EtOH/H₂O (50:50 v/v) durante 2 minutos por homogeneização no *vortex*. Após o período de agitação as amostras foram submetidas a um banho de ultrassons durante 30 minutos, posteriormente foram filtradas a vácuo e em seguida centrifugadas durante 10 minutos a uma velocidade de 7000 g. O sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa de acetato de celulose de 0,45 µm. O filtrado foi guardado em frascos devidamente rotulados e rolhados, que foram congelados a – 20°C até posterior análise. Para cada amostra procedeu-se à preparação de extratos em triplicado.

6.1.1.Reagentes

A água ultra pura (18.2 MΩcm) usada foi obtida a partir de um equipamento de Millipore-Direct Q3 UV system (Millipore, USA) e o EtOH (99,9%) era da Carlo Erba Reagents.

6.2. Determinação do teor em compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) baseado na leitura espectrofotométrica a 725nm.

6.2.1.Reagentes

Na quantificação do teor de fenóis totais e retas- padrão usou-se: reagente Folin – Ciocalteu (2,0 N) da Sigma e uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 35%, Ácido gálgico da Fluka, MetOH absoluto da Carlo Erba Reagents e Na₂CO₃ (99%) da Sigma Aldrich.

6.2.2.Preparação das soluções stock

Preparou-se uma solução *stock* de ácido gálgico a 1000ppm em H₂O/MetOH (20:80 v/v). Para preparação da solução *stock* de ácido gálgico pesou-se 5mg de ácido gálgico e dissolveu-se em solução H₂O/MetOH (20:80 v/v) num balão volumétrico de 5mL. Desta solução pipetaram-se 500 µL para um balão volumétrico de 5mL e perfez-se o volume com solução H₂O/MetOH (20:80 v/v) para obter uma solução de ácido gálgico de 100ppm. A solução *stock* foi guardada num frasco rolhado e rotulado e armazenada no congelador (T= - 20°C) até posterior utilização.

6.2.3.Preparação das soluções padrão de ácido gálgico

A solução *stock* de 100 ppm foi utilizada na preparação das soluções padrão na gama de concentração 1 a 6 ppm (tabela 2.4)

Tabela 2.4 - Volumes de solução-mãe de ácido gálgico a pipetar para a construção da reta de calibração.

Concentração (ppm)	Volume a pipetar da solução <i>stock</i> (µL)
1	50
2	100
3	150
4	200
5	250
6	300

6.2.4.Análise das amostras de cortiça e reta de calibração

Mediante as diluições testadas (1/250; 1/500; 1/750 e 1/1000) prepararam-se as soluções dos extratos de cortiça. Desta solução fez-se uma toma de 3,5mL e adicionou-se 100µL de reagente Folin-Ciocalteu e após 3 minutos 400µL de solução de Na₂CO₃ (35%), agitou-se a solução em vortex e deixou-se em repouso durante 1h. Mediu-se a absorvância a 725nm em célula de vidro de 1cm e utilizando como branco água ultra pura.

Relativamente à análise de padrões de cada solução preparada fez-se uma toma de 3,5mL e procedeu-se à reação de coloração da mesma forma que se descreveu para as amostras.

6.2.5.Equipamento

Na análise do teor de fenóis totais foi utilizado um espectrofotómetro Beckman DU-70 da Beckman Instruments (Fullerton, USA) e células de vidro de 1cm de percurso ótico.

6.2.6. Tratamento de Resultados

Recorrendo à equação da reta de calibração, obtida através do *software Excel*, determinou-se a concentração dos extratos preparados em EtOH/H₂O (50:50 v/v) e calcularam-se as concentrações médias, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPr) dos triplicados.

6.3. Análise dos compostos fenólicos por HPLC – DAD- ED

6.3.1. Preparação das amostras de cortiça

Os extratos que foram preparados em 6.1 foram filtrados com filtro de seringa de acetato de celulose de 0,45 µm para os vials e procedeu-se à sua análise por HPLC.

6.3.2. Reagentes

O ácido gálgico e o ácido *p*-cumárico foram adquiridos na Fluka, o ácido ferúlico, seringaldeído, ácido cafeico, 5-HMF, ácido protocatechuico, ácido *p*-hidroxibenzóico, catequina, vanilina, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido cinâmico e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico foram todos adquiridos na Sigma Aldrich. O acetonitrilo HPLC gradient grade foi adquirido na VWR e o ácido fórmico na Panreac®.

6.3.3. Equipamento

Na análise por HPLC, utilizou-se um equipamento da marca Thermo Finnigan (modelo Surveyor, equipado com amostrador automático, bomba e detector de díodos (DAD)) (figura 2.5). Utilizou-se uma coluna RP-18 (5 µm) 250 × 4 – Lichrocart® com uma pré-coluna RP-18 (5 µm) em forno termostaticado a 35°C, tendo sido o volume de injeção de 20µL.



Figura 2.5 – Equipamento de HPLC. Adaptado de Belo (2012).

6.3.4. Condições de análise

Quando do processo de otimização das condições de análise testaram-se três métodos de análise por HPLC de forma a verificar o mais adequado para a amostra em estudo. Em todos os métodos (figura 2.6) os eluentes usados foram os mesmos: A – Solução de ácido fórmico 0,5% (5mL ácido fórmico *p.a* + 995mL água ultra pura) e B – Solução de ácido fórmico (0,5%) + 90% ACN + 9,5% H₂O (5mL de ácido fórmico *p.a* + 707g de acetonitrilo HPLC *gradient grade* + 95g de água Milli-Q®).

O detetor de díodos usado fez varrimento de 200 a 798nm a uma velocidade de 1Hz e uma largura de banda de 5nm, 3 canais individuais (254, 280 e 360nm) com uma velocidade de 10Hz e uma largura de banda de 11nm.

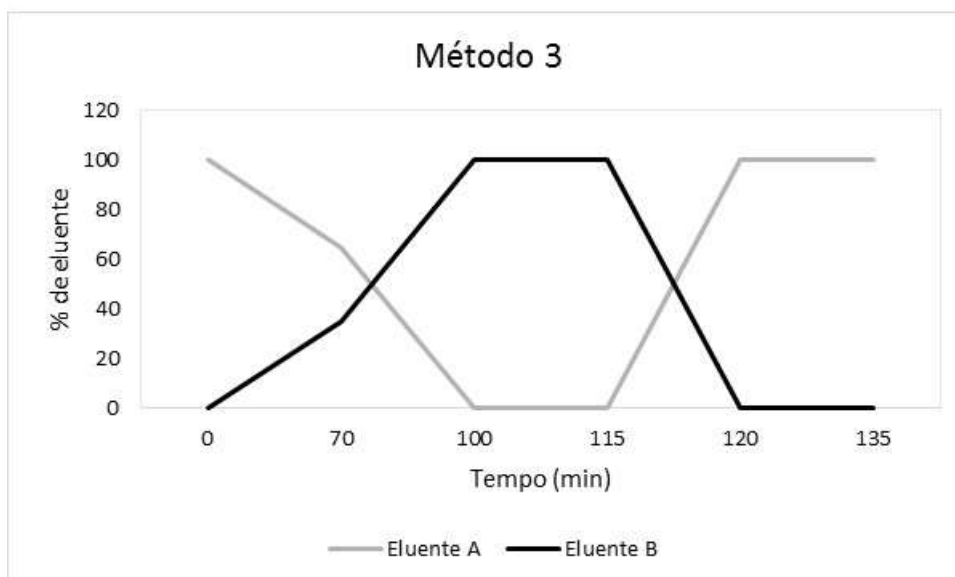
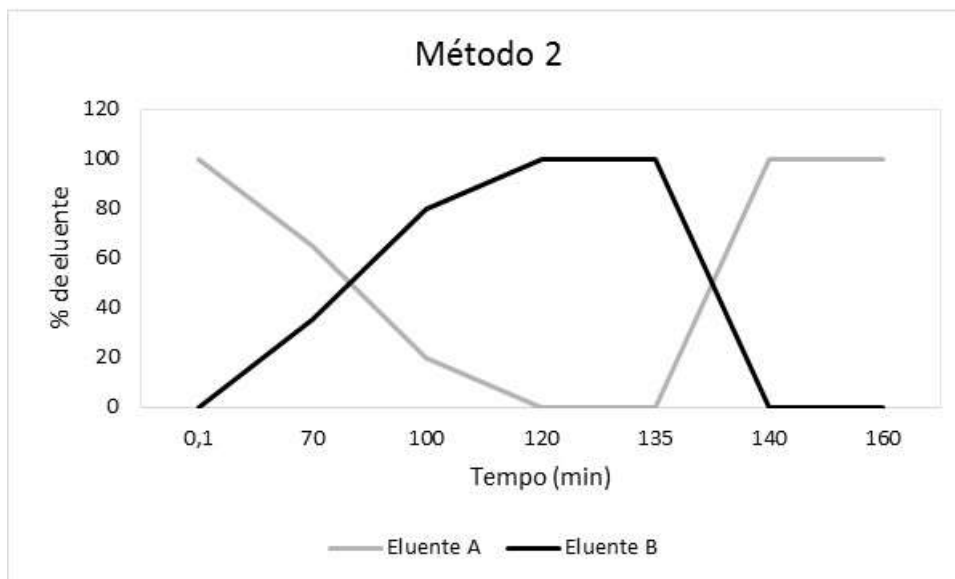
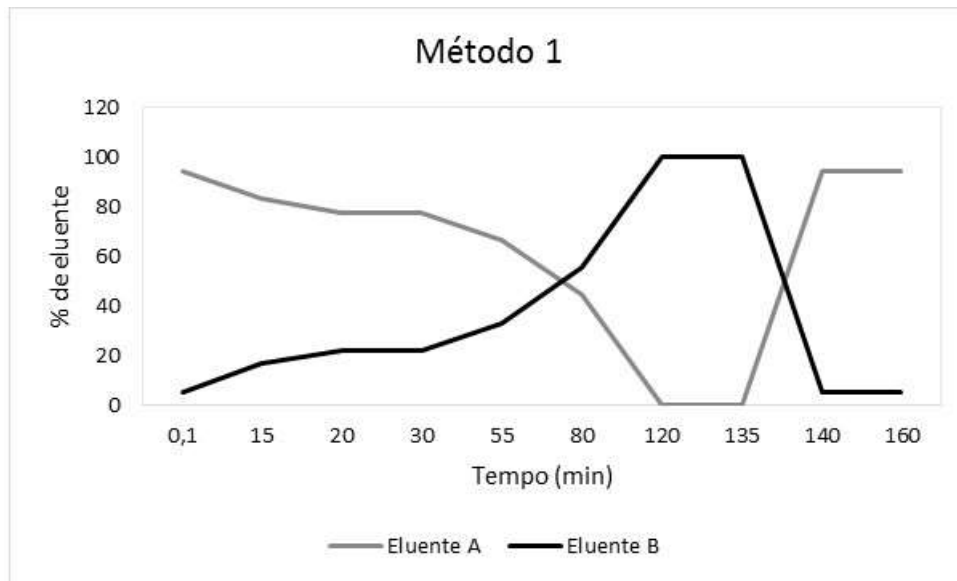


Figura 2.6 – Programas de eluição testados nos diferentes métodos testados

6.3.5. Tratamento de Resultados

Recorrendo à equação da reta de calibração de ácido gálgico a diferentes concentrações, obtida através do *software* Excel, determinou-se a concentração dos extratos preparados e calcularam-se as concentrações médias, desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPr) dos triplicados.

Procedeu-se à identificação de compostos através de semelhança de espectros com os espectros de padrões analisados.

6.4. Análise das amostras de cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)

6.4.1. Preparação das amostras de cortiça para análise

A farinha de cortiça preparada em 6.1 foi utilizada na preparação de pastilhas de cortiça (figura 2.7).

Utilizando uma prensa com capacidade de pressão de 10 toneladas, fizeram-se pastilhas com 2 mm de espessura, de forma a que, quando analisadas no equipamento de FTIR, as mesmas não se desfizessem com a pressão do acessório.



Figura 2.7- Amostras de cortiça para análise FTIR.

6.4.2. Equipamento

Foi usado um espectrofotómetro Thermo Scientific FTIR (San Jose, EUA), Laser Class 1. Nicolet 6100 (figura 2.8). O equipamento incluiu um acessório com um cristal de ZnSe ATR, possuindo um ângulo de incidência de 45 °. O *software* utilizado para a aquisição de dados FTIR foi Omnic versão 7.3 (Thermo Electron Corporation).



Figura 2.8 - Equipamento utilizados nas análises FTIR.

6.4.3. Condições de análise utilizadas

Antes da aquisição do espectro de cada uma das amostras era adquirido o espectro de ar. Procedia-se de seguida à aquisição do espectro da pastilha de cortiça moída colocada no suporte. Depois de cada amostra, o suporte era lavado com acetona e seco com um tecido macio. Os espectros foram adquiridos com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varrimentos entre $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram adquiridas em sextuplicado, cada um precedido sempre pela análise do espectro de ar.

6.4.4. Tratamento de dados

Nos espectros obtidos foi medida a absorvância à frequência de cada banda selecionada. Os dados obtidos foram analisados com recurso ao *software* "The Unscrambler X 10.3" para conversão de dados. Os dados recolhidos foram analisados mediante a análise estatística de componentes principais.

Resultados e discussão



7. Resultados e Discussão

7.1. Análise de compostos voláteis nas amostras de cortiça

Para a análise de compostos voláteis nas amostras recorreu-se a um método de análise existente no laboratório e com base em procedimentos e condições já utilizadas e descrita na bibliografia (Márquez-Sillero *et al.* 2012; Barreto *et al.*, 2011; Ezquerro & Tena, 2005). Foram realizadas análises de teste com amostras recolhidas em 2014 de forma a verificar se o método implementado era adequado.

As análises das amostras foram sempre precedidas de um “branco” (*vial* com amostra de ar recolhida no campo) que foi analisado nas mesmas condições de análise das amostras. Estes passos eram realizados de dez em dez amostras de forma a identificar possíveis contaminantes que estivessem na fibra.

Analisaram-se 156 amostras de cortiça (Anexo I) por GC/MS com a fibra de DVB/CAR/PDMS de acordo com as condições previamente descritas.

Este estudo incidiu numa análise qualitativa de forma a identificar os principais compostos presentes e estabelecer uma comparação entre amostras. Os compostos foram identificados através de comparação do seu espectro de massa com os espectros da biblioteca NIST (21 e 147) e WILEY229 instaladas no equipamento, no entanto a identificação de compostos pela biblioteca de espectros não é suficiente para garantir a correta identificação do composto (Mondello *et al.*, 2005). Assim, de forma a confirmar a identificação dos compostos, analisou-se uma solução padrão de alcanos C8-C20 (figura 3.1) nas mesmas condições de análise das amostras e procedeu-se à leitura dos tempos de retenção destes compostos, bem como o cálculo dos índices de retenção linear (LRI).

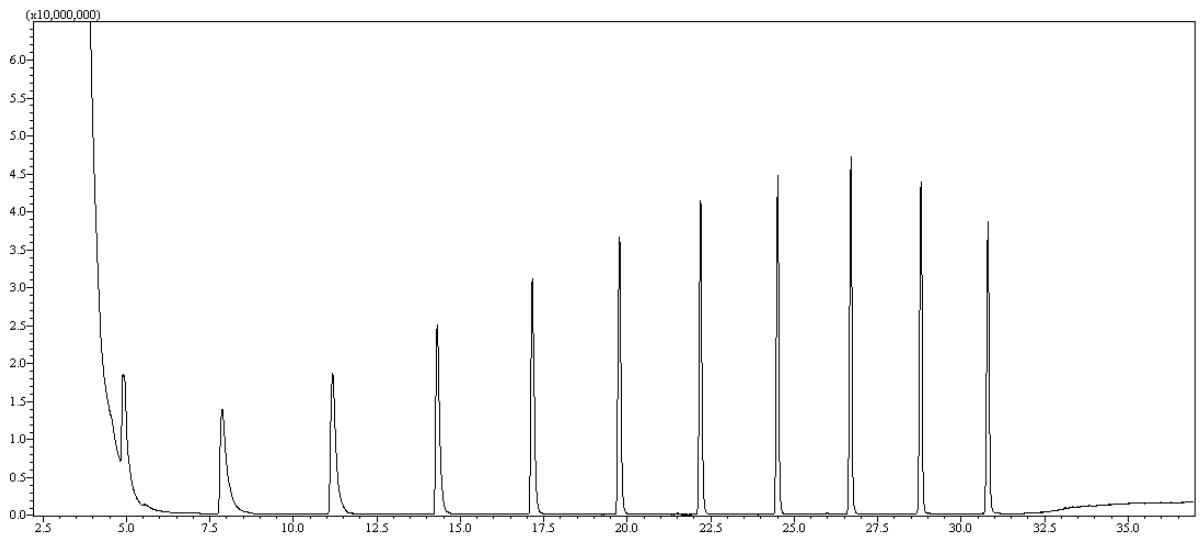


Figura 3.1 – Cromatograma obtido na análise da solução padrão de alcanos C8-C20.

A partir da equação descrita em 5.5 foi possível o cálculo do LRI de cada um dos compostos identificados nas amostras e os valores determinados foram comparados com os referidos em literatura consultada (*www.pherobase.com*, Babushoket *al.*, 2011) para colunas da mesma polaridade usadas nos cromatógrafos 1 e 2 (Anexo II).

No presente estudo foram usadas dois tipos de colunas (figura 3.2), com polaridade diferente. Isto permitiu-nos a identificação de compostos com afinidades diferentes, logo uma possível identificação de um maior número de compostos.

É possível observar que com a coluna DB-5MS é possível a ocorrência de mais compostos (figura 3.2). Isto deve-se ao facto de esta coluna possuir uma polaridade mais baixa e uma composição diferente (5% Fenil, 95% Dimetilpolisiloxano) da outra coluna utilizada (Polietileno Glicol), com uma polaridade mais elevada.

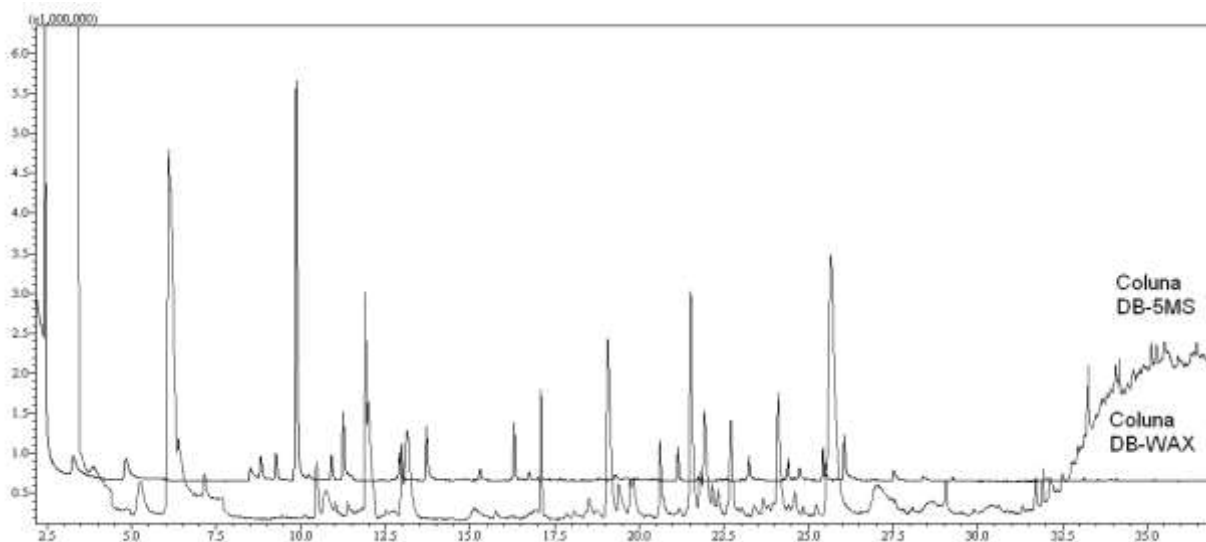


Figura 3.2 – Cromatograma obtido para a mesma amostra usando colunas de diferente polaridade.

Os diversos perfis cromatográficos obtidos mostram que as amostras apresentam na sua composição um número elevado de compostos alquibenzênicos e terpenóides, tal como descrito previamente em amostras de cortiça (Barreto *et al.*, 2011; Caldentey *et al.*, 1998), sendo possível não só, a identificação de compostos comuns entre a área pastoreada e não pastoreada, mas também identificar compostos singulares a cada uma das áreas, restritos à altura em estudo ou pelo tipo de exploração (virgem ou amadia).

Na área pastoreada foi possível identificar 140 compostos, no entanto a sua ocorrência dá-se de uma forma isolada, não sendo comum entre árvores. Os compostos que foram possíveis identificar em mais que uma árvore nas amostras recolhidas encontram-se descritos na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Compostos identificados em mais que uma árvore nas amostras recolhidas na área pastoreada.

Composto	Tempo de Retenção	LRI Calculado	LRI Bibliografia
1,4-Cineole	12,35	1110	1171
2-Clorobornano	17,32	1262	1116
4-Terpinenol	21,75	1416	1593

Composto	Tempo de Retenção	LRI Calculado	LRI Bibliografia
6-etenildihidro-2,2,6-trimetil-2H-Piran-3(4H)-one	15,40	1201	1238
7-Isopropenil-1-metil-4-metilenodecahidroazuleno	23,19	1472	1456
Acetato de Fenchil	18,84	1311	1226
Canforquinona	20,40	1367	1292
Sulcatona	14,94	1188	985
α-Bergamoteno	24,74	1533	1559
α-Cubebeno	23,24	1473	1472
α-felandreno	10,52	1052	1032

Dos compostos identificados alguns foram detetados somente em árvores amadias, tais como: Bornileno (1), Hidrato de canfeno (2), 2-Clorobornano (3), (1R) - (-) –Canforquinona (4), α -Cubebeno (5), α -bergamoteno (6), β -cadineno (7) e α -muuroleno (8) (figura 3.3). Os compostos 2-metileno-5- (1-metilvinil) -8-metil-Biciclo [5.3.0] decano e 1,3,7-Isopropenil-1-metil-4-metilenodecahidroazuleno só foram possíveis de detetar em árvores com cortiça virgem.

Na área não pastoreada foi possível identificar 110 compostos sendo que grande parte ocorria em amostras isoladas (não se verificava a sua deteção nas restantes árvores com as mesmas características), no entanto o 4,6-Dimetil-dodecano, o 5-Butilnonano, o 5-Metilundecano, o 1,3-bis (1,1-dimetiletil) - Benzeno, o 1,3-Ditertiaributilbenzeno, o 2,3,6,7-Tetrametiloctano, o 2-butil-1-Octanol, o 2-Isopropil-5-metil-1-heptanol, o 3,7-Dimetildecano e o 5- (2-metilpropil) –Nonano foram os compostos detetados em mais que uma amostra. A identificação dos compostos 5- (2-metilpropil) –Nonano (9), Linderol (10),

Docosano (11), β -Cariofileno (12) (figura 3.4) foi possível utilizando a coluna de polaridade baixa enquanto que os compostos tert-Butildimetilsilanol e 4-Caranol foram identificados usando a coluna de polaridade mais elevada. A sua identificação só foi possível em árvores com cortiça amadia. Os compostos Metil 2-etilpentanoato, Bis [2- (trimetilsilil) etil] malonato, α -Himachaleno, (-) – Tujopseno, e o Torreiol só foram possíveis detetar em cortiça virgem retirada na área não pastoreada.

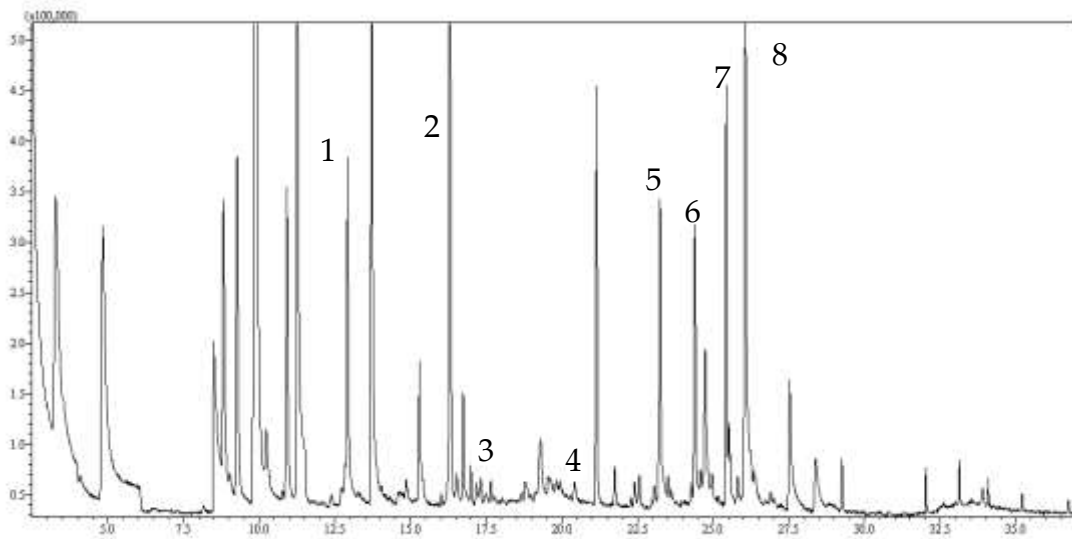


Figura 3.3 – Cromatograma obtido na análise de uma amostra recolhida da área pastoreada.

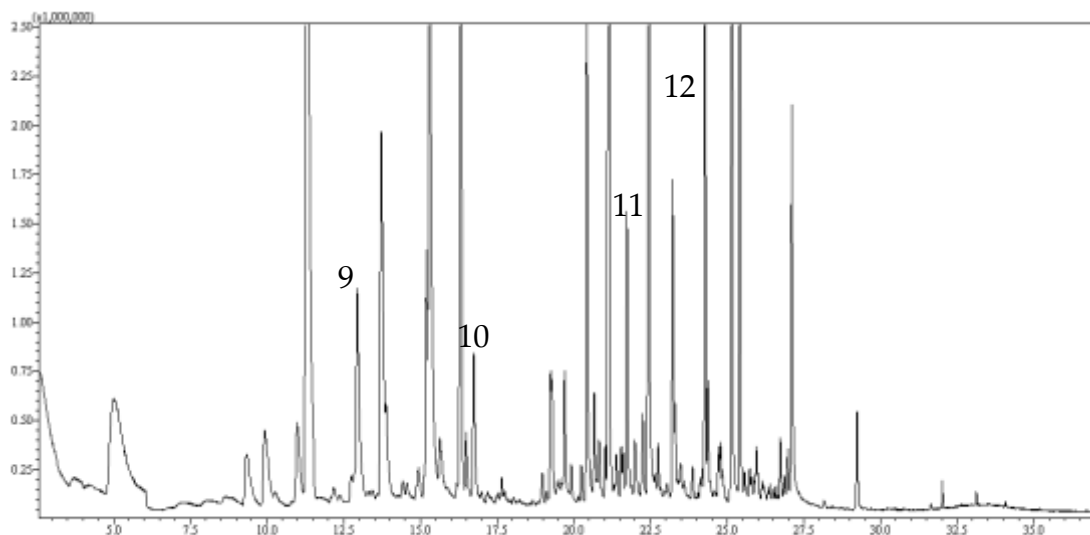


Figura 3.4 - Cromatograma obtido na análise de uma amostra recolhida da área não pastoreada.

Os compostos identificados foram reportados na bibliografia em associação à resposta do sobreiro a períodos de seca e/ou alterações climáticas (Staudt et al., 2008) não havendo qualquer referência prévia da influencia do pastoreio na ocorrência dos mesmos.

A composição de compostos voláteis das cortiças amadia e virgem em áreas não pastoreadas vem assim mostrar que existem diferenças nas composições químicas de voláteis nos dois tipos de cortiça, à semelhança do que se encontrou na área pastoreada. Os compostos 1,2,3,4,5,6-Hexametil-1,3-ciclohexadieno, 2-Borneol, Alloaromadendreno, Borneol, Fenchol, Metiltimol e α -Copaeno foram identificados em amostras correspondentes a árvores com cortiça amadia em ambas áreas de estudo e os compostos 1,5-Octadien-3-ol, 2-Etilhexanol, 2-Propanol e 4-Metildodecano foram identificados em árvores com cortiça virgem. Este compostos foram associados à presença de determinados defeitos nomeadamente a “mancha amarela” (Rocha *et al.*, 1996).

Este resultado pode indicar diferenças entre cortiças, virgem e amadia, especificamente em relação à sua composição de voláteis. Estas poderão ter ocorrido durante o processo de crescimento da cortiça na árvore e fruto da adsorção de compostos do ambiente.

Tratando-se de um estudo preliminar é prematuro fazer associação à presença dos compostos, relacionando-os com o pastoreio e com o tipo de cortiça.. Pode-se sim afirmar a existência de diferenças ao nível da composição volátil entre as amostras de cortiça das árvores nestas áreas. Uma amostragem mais intensiva (maior número e amostras por árvore e/ou maior número de árvores) deve ser tida em conta para a eliminação de outras variantes tais como a distribuição espacial das árvores.

As diferenças encontradas entre a composição de voláteis da cortiça entre áreas pastoreadas e não pastoreadas podem assim apenas indiciar que: i) nas áreas pastoreadas a cortiça nas árvores pode ter uma maior diversidade de compostos voláteis e; ii) esta maior diversidade parece ser possível encontrar tanto na cortiça virgem, em árvores que nunca tinham sido descortiçadas e na cortiça, amadia, em árvores em exploração cuja cortiça é produzida pela felogene traumática. Estes resultados, no entanto, devem ser interpretados com algum

cuidado pois que existem muitos fatores que poderão influenciar a composição de voláteis da cortiça.

7.2. Análise de compostos fenólicos nas amostras de cortiça

7.2.1. Otimização do processo de extração e quantificação de compostos fenólicos totais

Na análise de compostos fenólicos, procedeu-se à otimização do método de extração. Foram testadas cinco concentrações de solução extratante e quantidade de amostra diferentes. O procedimento final utilizado encontra-se descrito em 6.1. Para a determinação do teor de fenóis totais (FT) foi usada a técnica de Folin-Ciocalteu. Foi preparada uma reta de calibração obtida com diferentes concentrações de ácido gálico, para a quantificação dos compostos fenólicos totais. Para a análise dos compostos fenólicos presentes no extrato usou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para a extração dos compostos, inicialmente utilizou-se um método usado internamente no laboratório (Belo, 2012), no entanto verificou-se que os valores de teor de fenóis obtidos eram inferiores aos descritos na bibliografia (Fernandes *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010; Conde *et al.*, 1998). Analisando os resultados, procedeu-se à alteração da quantidade de farinha de cortiça a utilizar, passando de 1,5g para 2g de cortiça em 25 mL de uma solução de EtOH/H₂O (50:50 v/v).

Foram utilizadas duas granulometrias de cortiça de forma a determinar de que forma se extraia mais compostos: usando cortiça cortada em dimensões máximas de 5mm*5mm*5mm ou cortiça moída (figura 3.5).

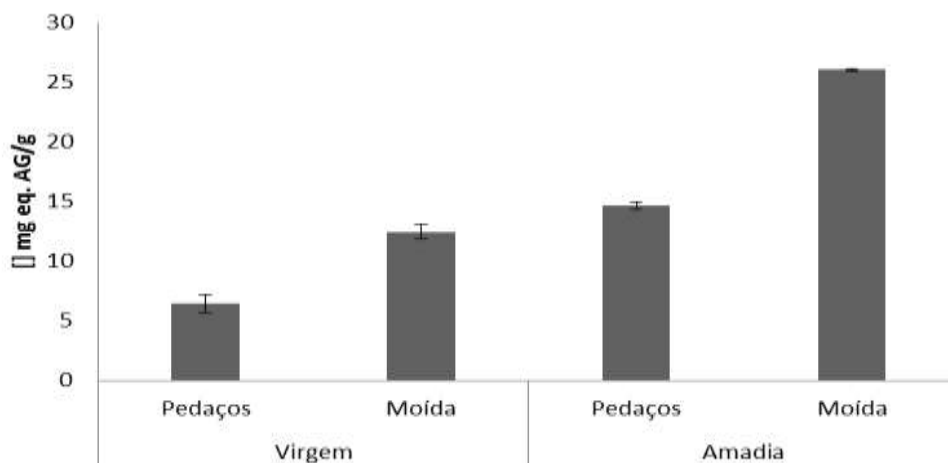


Figura 3.5 - Resultados da extração dos compostos obtidos durante a otimização da granulometria da cortiça.

Tendo em conta os resultados obtidos (figura 3.5), procedeu-se à moenda das amostras em estudo segundo o descrito em 6.1. Este resultado era de esperar dado que ao moer a cortiça a superfície de contacto com o extratante é superior o que possibilitará um maior rendimento na extração dos compostos.

De forma a verificar também a influência da solução extratante, testaram-se 5 concentrações diferentes de extratante e procedeu-se à quantificação de fenóis totais pelo mesmo método.

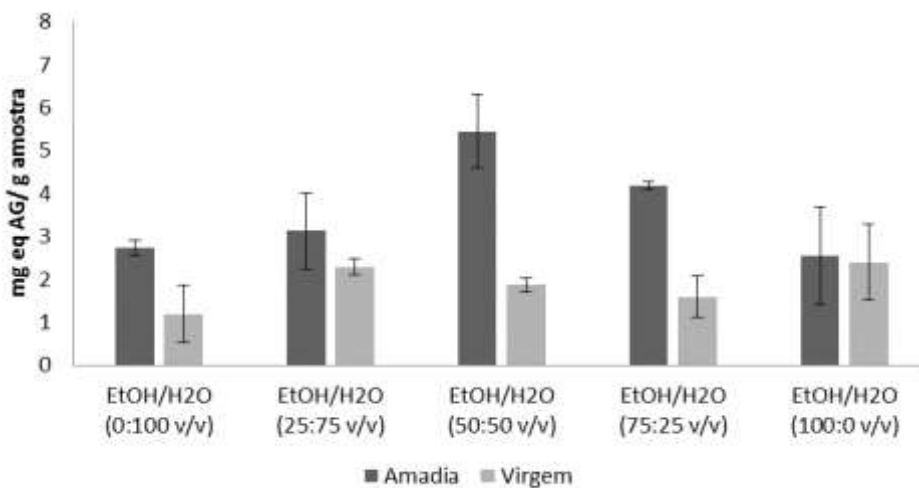


Figura 3.6 - Resultados da extração dos compostos obtidos durante a otimização da concentração do extratante.

Os resultados apresentados na figura 3.6 mostram que o melhor solvente para a extração dos compostos fenólicos da farinha de cortiça amadia é a mistu-

ra de EtOH/H₂O (50:50 v/v), visto ser com este solvente que se obtém maior concentração de fenóis comparativamente aos restantes extratantes. No entanto o mesmo não se verificou na farinha de cortiça virgem. Isto pode dever-se ao facto da granulometria da amostra (a cortiça virgem atingiu granulometria inferior a 1,5 mm com mais facilidade que a cortiça amadia) ou até mesmo com a polaridade dos compostos presentes na cortiça virgem, possuindo maior afinidade com a solução extratante com mais concentração de solvente.

Os extratos obtidos foram analisados por HPLC- DAD de forma a confirmar a existência de diferenças qualitativas ou quantitativas entre amostras. Neste tipo de análise foram testados diferentes métodos que utilizaram um gradiente de eluentes diferente de modo a obter os melhores resultados. O método I (figura 3.7).é um método mais rápido, o que faz com que compostos os compostos estejam pior resolvidos. Foram posteriormente testados outros dois métodos de forma a otimizar a resolução entre os picos. No método II (figura 3.8) manteve-se a duração do método e alterou-se a % de. De forma a encurtar o tempo de análise do método II, testou-se um outro método (método III) (figura 3.9).

Em face dos resultados optou-se pelo método III que a nível de % de eluentes é igual ao método II, permitindo uma melhor resolução, com uma duração de análise de 135 min ao invés de 160 min.

7.2.2.Análise das amostras de cortiça

Após a otimização dos parâmetros mencionados anteriormente para as condições de extracção, procedeu-se à análise de 72 amostras, utilizando o método espectrométrico e por HPLC-DAD com vista ao estudo da composição fenólica das amostras.

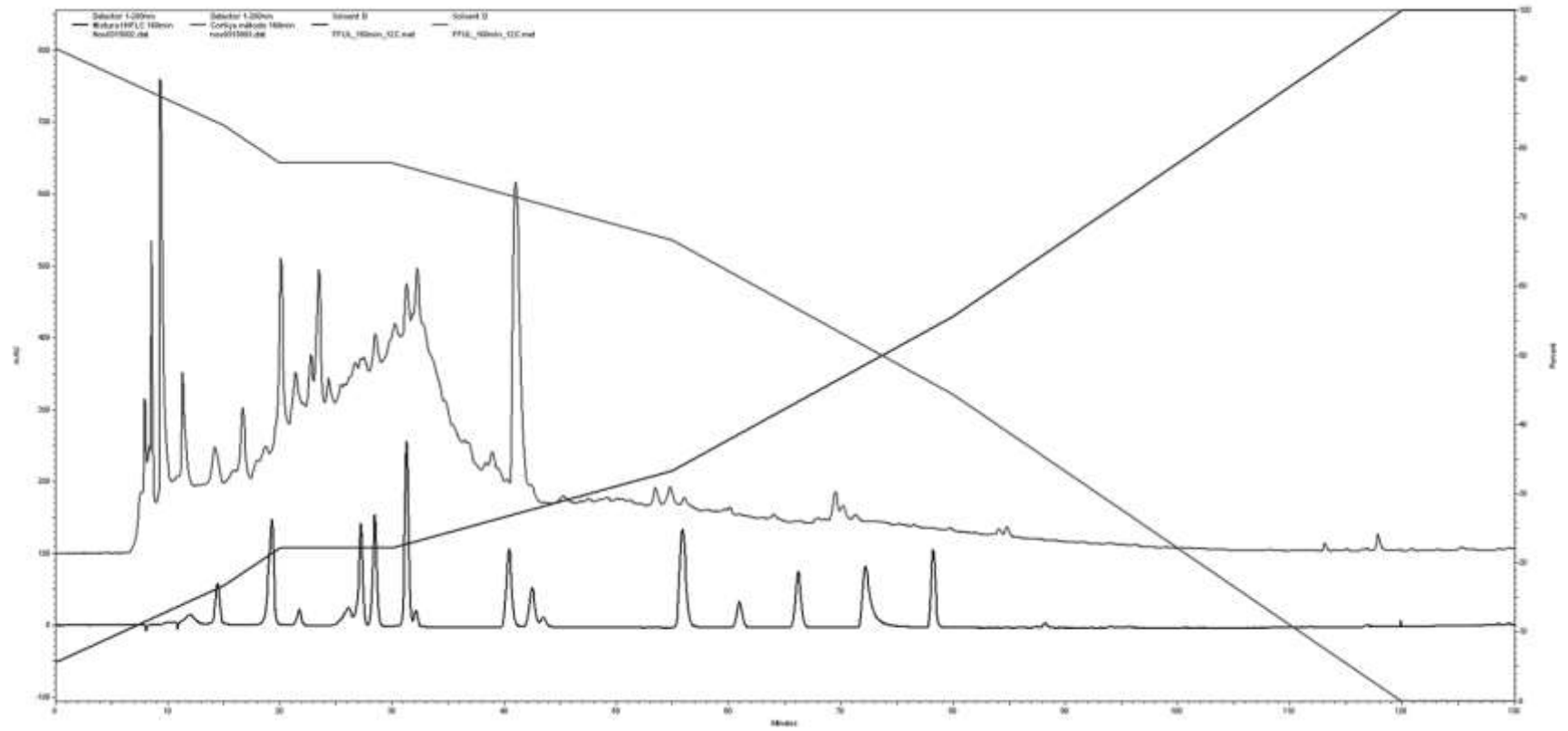


Figura 3.7 - Resultados obtidos com a utilização do método I.

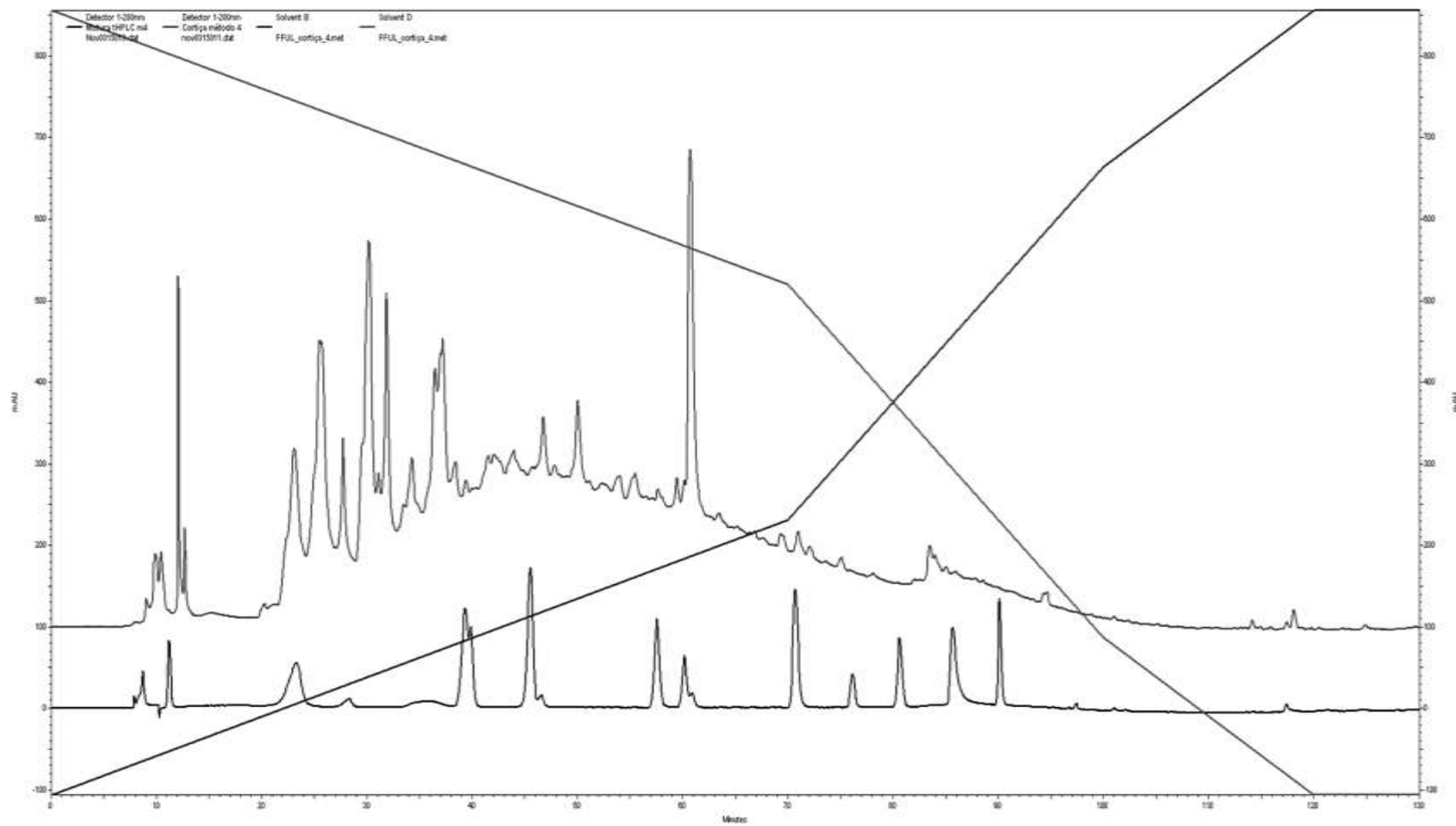


Figura 3.8 – Resultados obtidos com a utilização do método II.

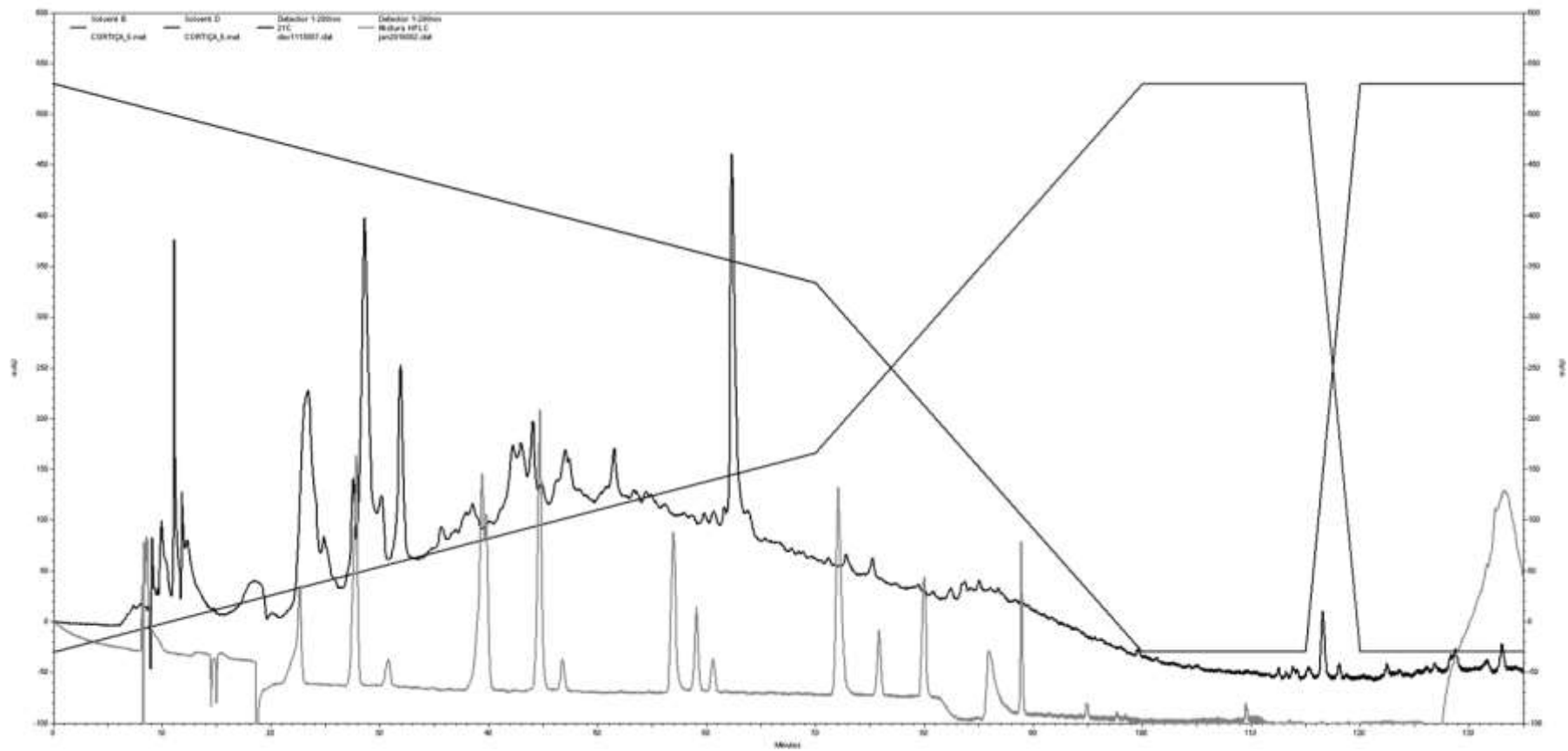


Figura 3.9 - Resultados obtidos com a utilização do método III.

7.2.2.1. Quantificação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu e por HPLC-DAD.

Procedeu-se à quantificação de fenóis totais nas amostras de farinha de cortiça pelo método de Folin-Ciocalteu. Realizaram-se retas de calibração na gama de 1-6 ppm de ácido gálgico) sempre que se procediam as leituras espectrofotométricas das amostras, de forma a verificar a variação dos parâmetros da reta de calibração. As várias retas de calibração usadas encontram-se na figura 3.10.

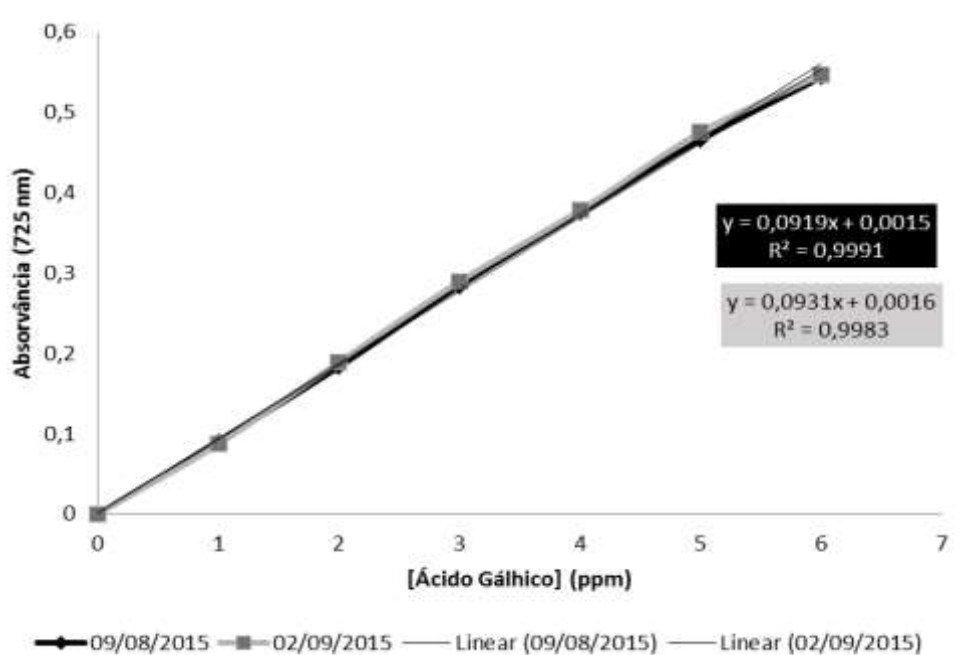


Figura 3.10 – Retas de calibração de ácido gálgico utilizadas para a quantificação de fenóis totais pelo método de Folin -Ciocalteu, traçadas em datas diferente.

A partir dos valores de absorvâncias lidas no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 725 nm e utilizando a reta de calibração do ácido gálgico foi possível calcular o teor em fenóis totais nas amostras. Os resultados obtiveram-se em triplicado (Anexo III) e determinou-se para cada amostra a concentração média de fenóis totais, o desvio— padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPr) (%). Procedeu-se também à quantificação de fenóis totais por HPLC-DAD utilizando a detecção a 280 nm.

Os resultados obtidos mostram que os teores de fenóis totais determinados a partir do método de Folin são superiores aos determinados pelo método

de HPLC e para a amostra 84 o valor é cerca de 3 vezes superior. A partir destes valores elaborou-se um gráfico de dispersão que relaciona os teores obtidos para as duas técnicas de quantificação (figura 3.11).

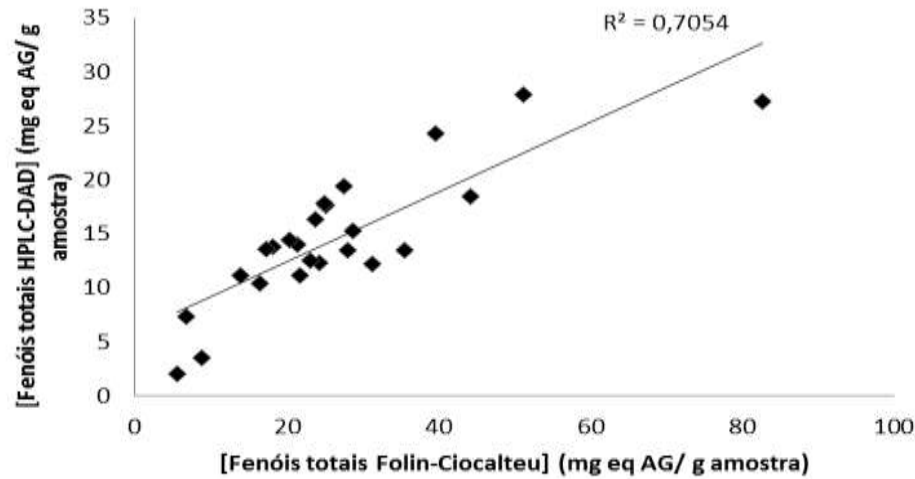


Figura 3.11 – Correlação dos teores de fenóis totais obtidos pelas técnicas de quantificação utilizadas.

Atendendo aos valores apresentados, verifica-se uma boa correlação ($R^2=0,7054$) entre os dois métodos utilizados para quantificar o teor de fenóis totais (figura 3.11). O método de Folin é um método usado tradicionalmente. Tendo em conta os valores referenciados na bibliografia: 2,4 – 10,6 mg eq. AG /g de amostra (Santos et al., 2010) obtidos pelo método de Folin, os valores obtidos para as amostras analisadas neste trabalho foram superiores aos referenciados.

Os resultados encontrados mostram que independentemente do tipo de árvore (com cortiça virgem ou com cortiça amadia) e do tipo de área de estudo (pastoreada ou não pastoreada), o teor de fenóis das amostras de cortiça retiradas a 1,30 m de altura do solo é superior ao existente em amostras de cortiça retiradas ao nível de 0,30 m (figura 3.12).

A cortiça virgem e a cortiça amadia apresentam quantidades médias semelhante de compostos fenólicos, mas esta quantidade parece ser ligeiramente superior na cortiça virgem (cerca de 4mg superior em ambas as áreas de estudo).

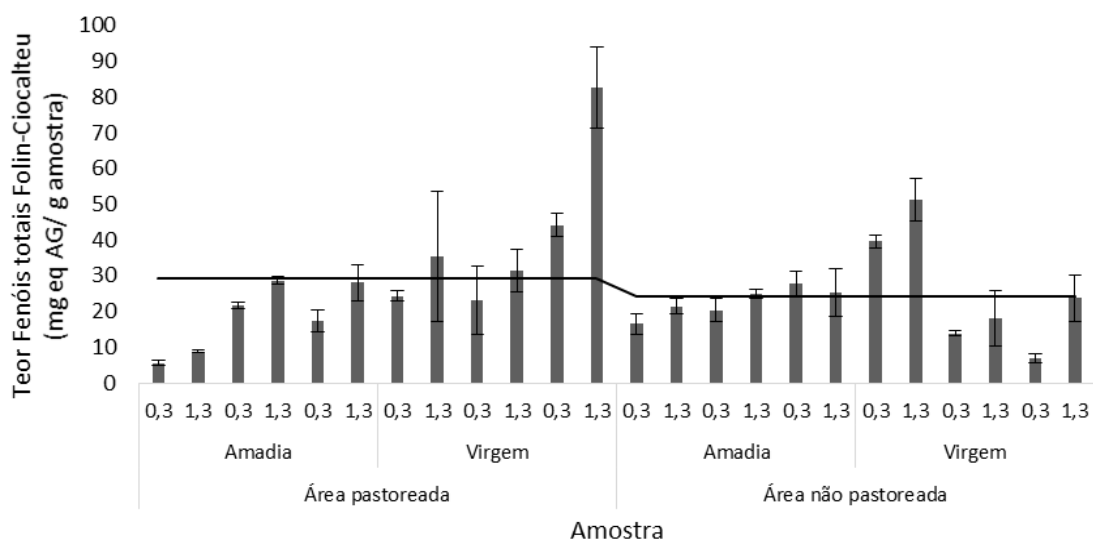


Figura 3.12 - Teores médios de fenóis totais obtidos por espectrofotometria (Folin Ciocalteu para cada amostra (n=3).

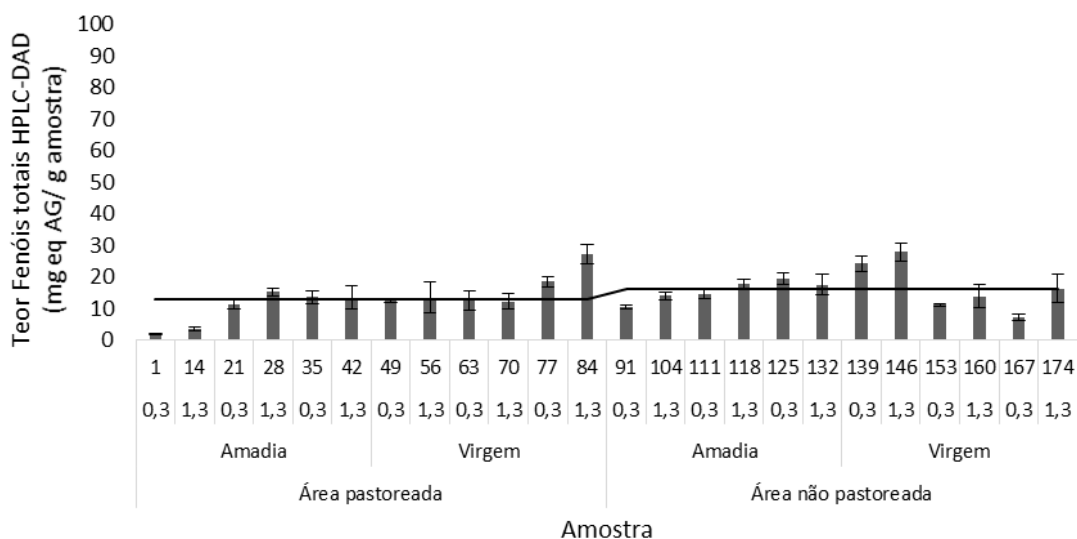


Figura 3.13 – Teores médios de fenóis totais obtidos por HPLC-DAD para cada amostra (n=3).

Tendo em conta os resultados obtidos na quantificação do teor de fenóis totais por HPLC-DAD (figura 3.13) podemos verificar que o teor de fenóis é superior ao nível de 1,30 m, nas árvores com cortiça virgem. A área não pastoreada apresenta também um teor de compostos fenólicos superior ($16,201 \pm 5,777$ mg eq. AG /g de amostra) em relação a $12,921 \pm 6,429$ mg eq. AG /g de amostra obtidos na área não pastoreada.

Os resultados obtidos vão de acordo com os reportados na bibliografia (Pereira, 1988) sendo que, para o método de Folin-Ciocalteu, o teor médio de fenóis é superior nas árvores virgens do que nas árvores amadias. Verifica-se também uma diferença entre os teores médios obtido pela técnica de Folin e por HPLC: na primeira a área não pastoreada apresentava um teor médio de fenóis mais elevado, não se verificando o mesmo quando usada a técnica de HPLC. Os valores mais elevados obtidos para o método de Folin podem ser explicados pela presença de outros compostos, que não compostos fenólicos, que interagem com o reagente de Folin e não absorvem a 280 nm (utilizado para quantificação por HPLC-DAD), não sendo quantificados a esse comprimento de onda.

7.2.2.2. Identificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD

Analisando os perfis cromatográficos obtidos para cada amostra (n=3) (anexo IV) e tendo em conta a semelhança entre eles, utilizou-se somente um perfil cromatográfico representativo de cada uma das amostras para realizar a comparação entre elas. Tentou-se proceder à identificação de compostos por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção dos picos das amostras e os espectros de absorção de misturas de padrões.

As misturas de padrões (figura 3.14) continham compostos que estão descritos na bibliografia como sendo característicos de amostras de cortiça (Santos, 2012; Fernandes *et al.*, 2011; Maga & Puech, 2005; Conde *et al.*, 1997) e ainda outros compostos que, atendendo aos tempos de retenção, poderiam estar presente nas amostras. Os compostos existentes nas amostras e na mistura de padrões foram identificados por semelhança de espectros.

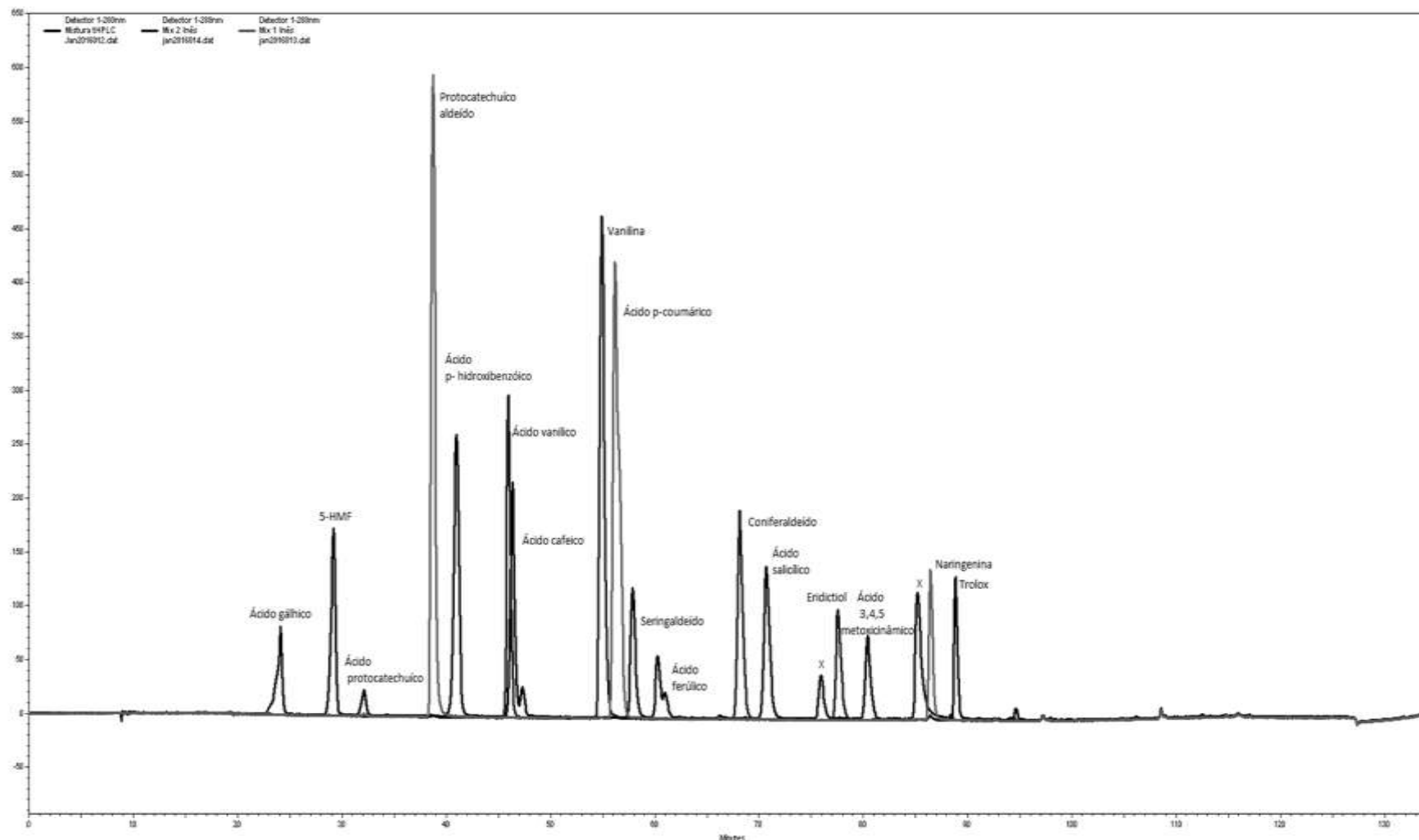


Figura 3.14 – Cromatogramas das mistura de padrões usados na identificação.

Verificou-se que os compostos: ácido gálico, 5- hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido cafeico e ácido ferúlico são comuns a todas as amostras analisadas. No entanto não se verificou a presença de naringenina em nenhuma das amostras. A sua presença foi reportada (Santos, 2012) num extrato realizado a diferentes condições dos extratos analisados no presente e estudo, sendo o solvente usado o MeOH:H₂O, revelando possuir uma polaridade diferente dos restantes compostos extraídos no presente estudo.

Nas amostras correspondentes à área pastoreada foi possível a identificação do ácido protocatechuico (1), do ácido p- hidroxibenzoico (2) e do ácido vanílico (3) (figura 3.15) sem que tenham sido identificados na área não pastoreada. Por outro lado o ácido p-cumárico (4) foi encontrado na área pastoreada e não pastoreada (figuras 3.16 e 3.17). O ácido 3,4,5 metoxicinâmico (5) só foi possível identificar numa amostra correspondente à área não pastoreada (figura 3.17).

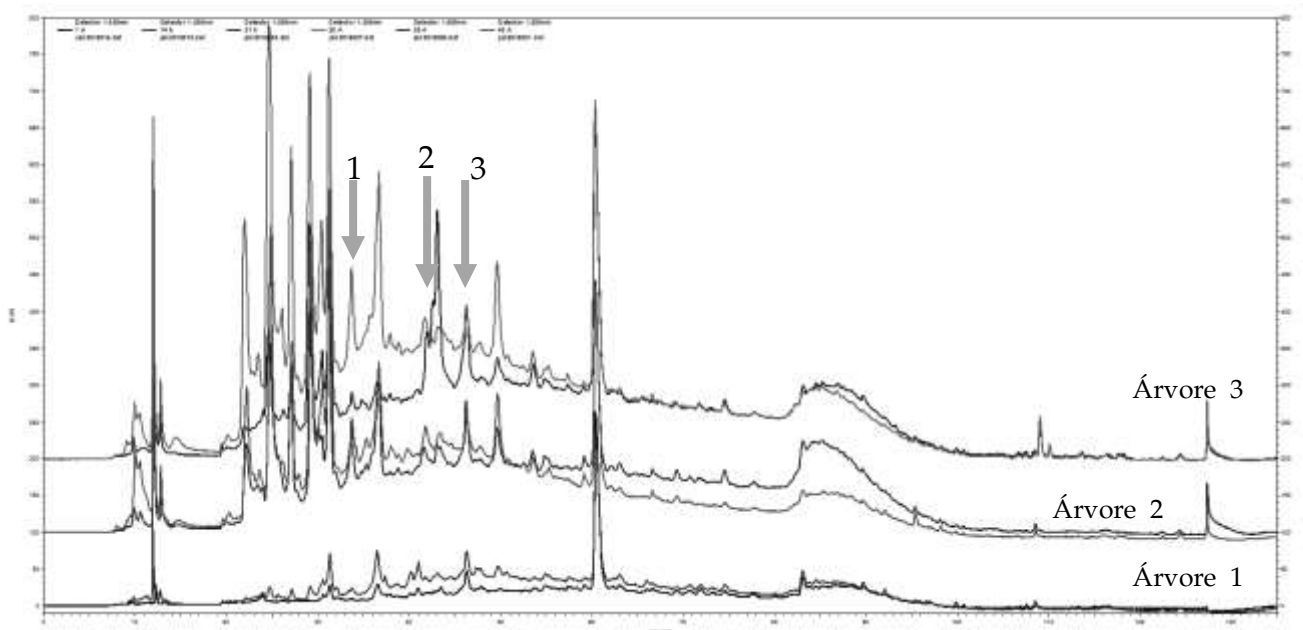


Figura 3.15 – Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça amadia recolhidas na área pastoreada.

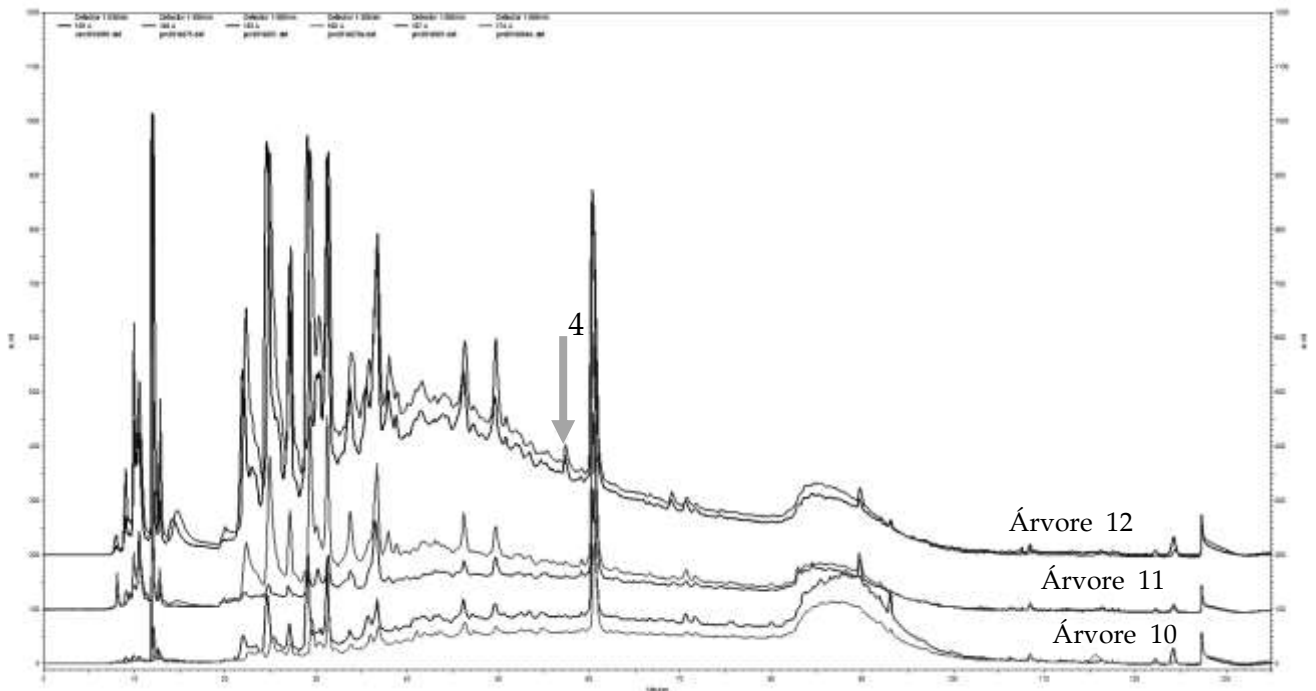


Figura 3.16 - Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça virgem recolhidas na área não pastoreada.

Deve-se acrescentar que estes compostos, ácido vanílico, ácido p-cumárico (4) e o ácido 3,4,5 metoxicinâmico (5) foram identificados somente em amostras respeitantes a cortiça virgem. Não se identificaram compostos que fossem exclusivos de amostras com cortiça amadia.

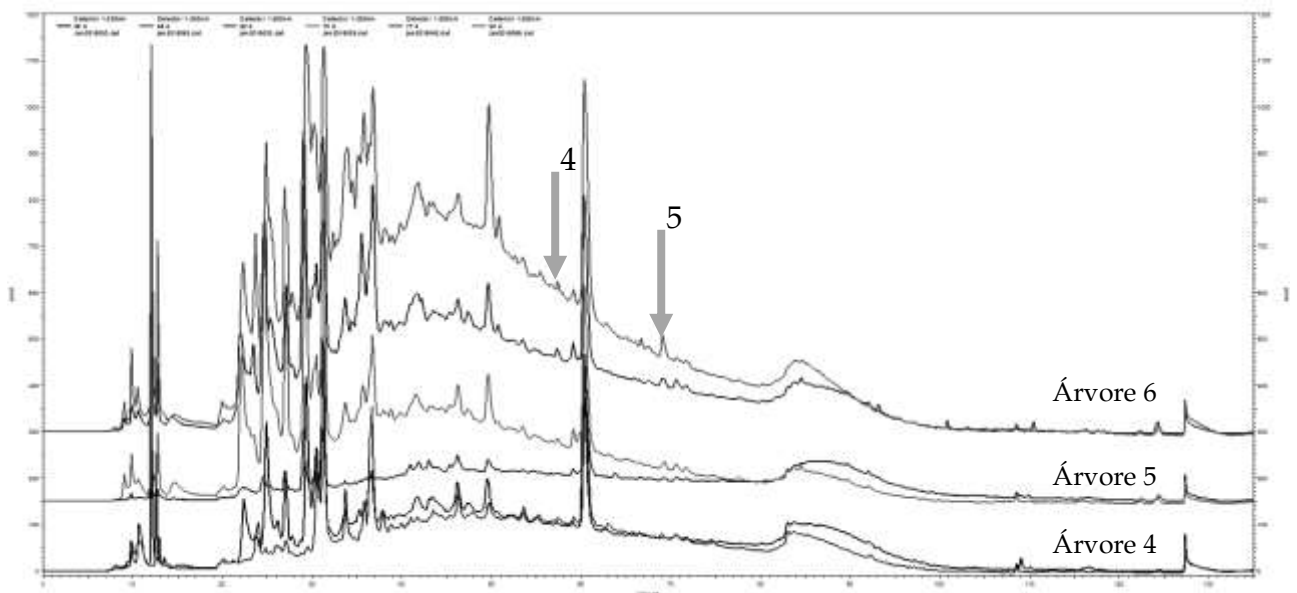


Figura 3.17- Cromatogramas correspondentes a amostras de cortiça virgem recolhidas na área pastoreada.

Quanto ao nível da cortiça na árvore, no nível de 1,30 m o composto Eriodictiol foi o único que se revelou comum a árvores com cortiça amadia e árvores com cortiça virgem e nas duas áreas em estudo.

A presença de gado em pastoreio pode ser diferenciador na composição fenólica da cortiça no entanto seria necessário proceder a uma identificação de todos os compostos presentes nos extratos para suportar a informação aqui apresentada. A cromatografia líquida associada à espectrometria de massa revelou em estudos já realizados (Santos, 2012; Fernandes. *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2010) a presença de outros compostos para além dos indicados no presente estudo, sendo interessante, no futuro, a análise dos extratos para identificação de possíveis compostos indicadores da influência do pastoreio na fração fenólica da cortiça virgem e amadia, aos dois níveis de extração.

7.3. Caracterização da cortiça por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR)

7.3.1. Otimização do processo de análise da cortiça

Na análise da composição fenólica da cortiça pela técnica de FTIR, procedeu-se à otimização da forma da amostra em análise. Inicialmente utilizou-se farinha de cortiça preparada segundo o método descrito em 6.1 e comparou-se o seu espectro com o espectro da pastilha de farinha de cortiça preparada segundo o método descrito em 6.4.1 (figura 3.18).

É possível verificar que o sinal obtido é superior quando usada a pastilha de farinha de cortiça, havendo uma menor interferência na zona da banda característica da água (entre 3100 e 3600 cm^{-1}).

Foram testadas duas espessuras de pastilhas (aproximadamente 2mm e 5mm), de forma a que quando colocado o acessório do equipamento, estas não se desfizessem. Devido à composição da própria farinha a pastilha não deveria ser a espessura mais elevada (5mm) não permitia compactação completa da pastilha, fazendo com que esta se desfizesse. Conclui-se que a melhor espessura seria de aproximadamente 2mm (e com peso aproximado de 100mg).

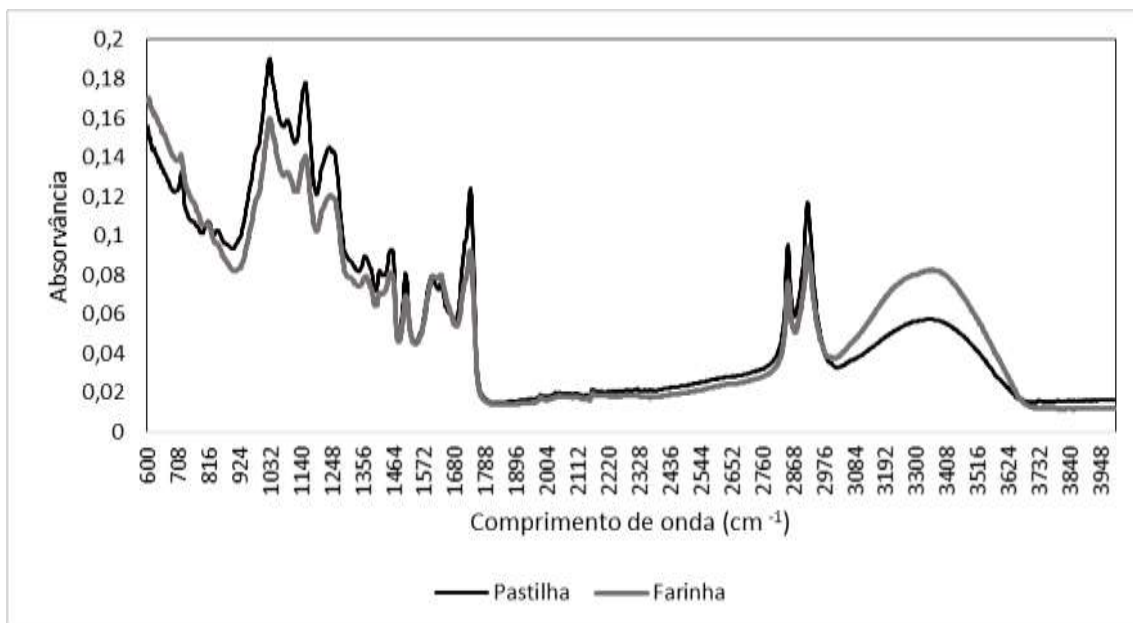


Figura 3.18 – Espectro de comparação entre a utilização de farinha solta e pastilha de cortiça.

7.3.2. Análise das amostras de cortiça

A média dos espectros obtidos para cada amostra apresenta o mesmo perfil reportado em estudos já realizados usando amostras de cortiça natural. As bandas de absorção respeitantes aos compostos fenólicos têm vindo a ser exploradas e encontram-se identificadas, podendo o seu sinal ser identificado região $1680\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ (Falcão & Araújo, 2014; Garcia *et al.*, 2014; Ortega-Fernández *et al.*, 2006).

Nas amostras analisadas verificou-se uma maior intensidade de banda em amostras de cortiça amadia relativas à área pastoreada (figura 3.19) quando comparadas com as amostras de cortiça amadia recolhidas na área não pastoreada. Relativamente à cortiça virgem, é possível verificar que a zona de identificação dos compostos fenólicos é muito semelhante entre as duas áreas, no entanto, este é ligeiramente superior na área não pastoreada (figura 3.20).

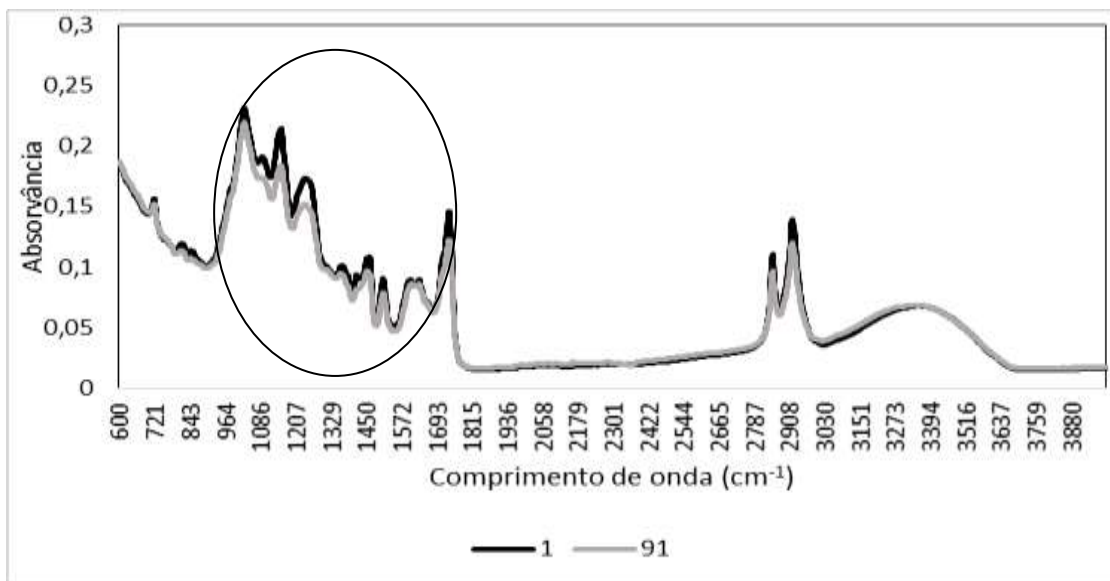


Figura 3.19 – Espectro de amostras de cortiça amadia da zona pastoreada (1) e da zona não pastoreada (91).

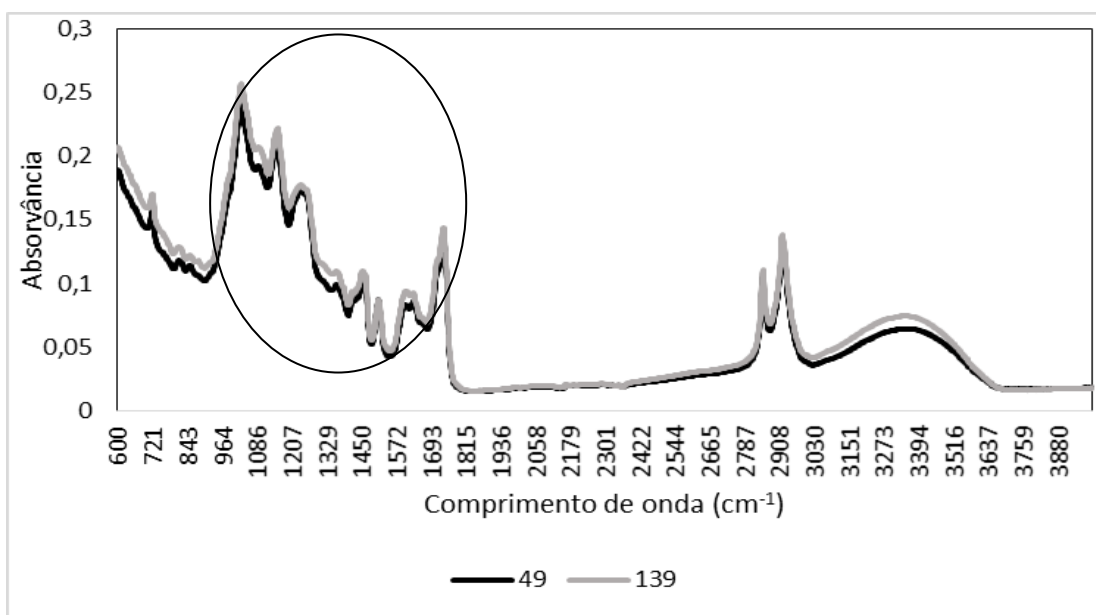


Figura 3.20 – Espectro de amostras de cortiça virgem da zona pastoreada (49) e da zona não pastoreada (139).

Os espectros correspondentes à média de 6 espectros para cada amostra, foram sujeitos a análise multivariada. O objetivo seria, em face do elevado número de dados, conseguir-se rapidamente comparar os resultados e avaliar se ocorreria a separação das amostras em grupos. Utilizando o conjunto de todos os dados (números de onda) medidos para cada espectro, a projeção das amostras (figura 3.21) no plano definido pelas componentes 1 e 2 e que corresponde

aproximadamente a 80% da variância total acumulada, mostra que não há uma distinção clara entre os diferentes tipos de amostras. Tal facto pode dever-se ao número de amostras ser pequeno.

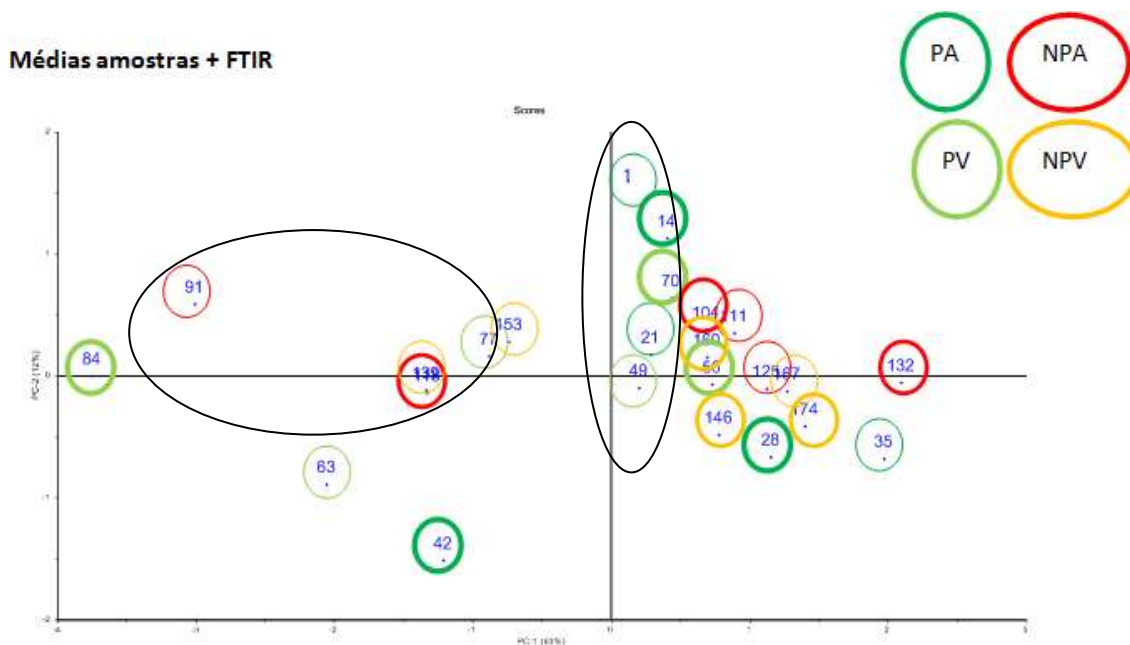


Figura 3.21 – Distribuição das amostras nas duas primeiras componentes (variância total acumulada de 75%) mediante valores médios de absorvância obtidos por FTIR-ATR. PA: amostras de cortiça amadia da área pastoreada; NPA: amostras de cortiça amadia da área não pastoreada; PV: amostras de cortiça virgem da área pastoreada e; NPV: amostras de cortiça virgem da área não pastoreada.

Verifica-se a existência de amostras (figura 3.21) que se destacam do grupo em análise, nomeadamente a amostra 84. Esta amostra representa o teor mais elevado de fenóis calculado pelo método de Folin.

Ao comparar os valores da função discriminante PC1 (Eixo xx) e da função discriminante PC2 (eixo yy) para as amostras de cortiça virgem (49 e 139) e amadia (91 e 1) (figuras 3.19 e 3.20) podemos afirmar que as diferenças entre as áreas pastoreada e não pastoreada estão refletidos na PC1 (amostras 91 e 139) que explica 63% da variabilidade (a maior parte do total de 80% de variabilidade explicada pelas duas primeiras componentes principais) e que as diferenças entre o tipo de cortiça (virgem vs. amadia) estão refletidos pela PC2 (amostras 1 e 49). Estes resultados podem indicar que as diferenças encontradas entre amostras de cortiça podem ser devidas mais ao tipo de pastoreio do que ao tipo de cortiça.

Em estudos previamente realizados utilizando a técnica de FTIR, realizou-se uma separação química dos compostos constituintes da cortiça (Prades *et al.*, 2014) com o objetivo de eliminar bandas correspondentes à celulose que podem interferir na determinação dos compostos fenólicos.

Em futuros estudos seria interessante realizar uma extração de compostos fenólicos ligados a frações insolúveis da cortiça de forma a verificar se o pastoreio influencia a composição fenólica da cortiça, usando a técnica de FTIR.

4

Conclusões

Neste estudo exploratório de análise da fração volátil e fenólica da cortiça em verde, na árvore, os resultados obtidos permitem-nos concluir que existem diferenças entre amostras provenientes das áreas pastoreada e não pastoreada nas composições voláteis dos dois tipos de cortiça. Tratando-se de um estudo preliminar é prematuro fazer ainda esta associação - presença dos compostos, tipo de pastoreio. Uma amostragem mais intensiva deve ser tida em conta para a eliminação de outras variantes tais como a distribuição espacial das árvores.

Os resultados obtidos para teor de compostos fenólicos permitiu-nos concluir que o teor médio de fenóis é superior nas árvores virgens do que nas árvores amadias. Relativamente ao nível de extração da cortiça verificou-se uma quantificação mais elevada ao nível de 1,30m, com exceção numa árvore da área não pastoreada. Essa mesma árvore apresentou também um desvio-padrão relativo de 26%, o que justifica o facto de não ter apresentado a tendência de todos os outros resultados observados.

Quando analisados os dados obtidos por HPLC, a área não pastoreada apresentava um teor médio de fenóis menor que a área pastoreada, não se verificando o mesmo quando usada a técnica de Folin. Os valores mais elevados obtidos para o método de Folin podem ser explicados pela presença de outros compostos, que não compostos fenólicos, que interagem com o reagente de Fo-

lin e não absorvem a 280 nm (comprimento de onda utilizado para quantificação por HPLC-DAD), não sendo quantificados a esse comprimento de onda.

Relativamente à identificação de compostos fenólicos verificou-se que os compostos: ácido gálico, 5- hidroximetilfurfural (5-HMF), ácido cafeico e ácido ferúlico são comuns a todas as amostras analisadas, no entanto não se verificou a presença de naringenina em nenhuma das amostras. Nas amostras correspondentes à área pastoreada foi possível a identificação do ácido protocatechuíco, do ácido p- hidroxibenzóico e do ácido vanílico sem que tenham sido identificados na área não pastoreada. Foi possível também estabelecer a relação de presença e/ou ausência de outros compostos mediante o tipo de cortiça e a sua altura de extração.

Na utilização da técnica de FTIR obtiveram-se espectros com aspeto semelhante aos reportados pela bibliografia, tendo usado amostras com um formato diferente do reportado. Apesar de as duas primeiras componentes principais explicarem 80% da variância total, pode-se verificar para amostras específicas que as diferentes são mais significativas entre áreas pastoreadas e não pastoreadas (influência do pastoreio) do que entre tipos de cortiça (virgem e amadia).

Tratando-se este estudo de um estudo preliminar, para futuros trabalhos dever-se-á proceder a uma quantificação dos compostos voláteis e da fração fenólica. Será interessante complementar os resultados obtidos com a identificação de outros compostos por espectrometria de massa. Será também essencial ter uma amostragem mais representativa de cada situação em estudo, aumentando o número de amostras a ensaiar. Mesmo assim este trabalho já permitiu otimizar condições de preparação de amostra para as 3 metodologias usadas, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e FTIR e de análise, para este tipo de amostras.

Bibliografia

Akapo, S. O. & McCrea, C. M. M. (2008). SPME-GC determination of potential volatile organic leachable in aqueous-based pharmaceutical formulations packaged in overwrapped LDPE "vial". *J. of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 47: 526-534.

Apcor (2014) Anuário Cortiça 2014, <http://www.apcor.pt/wp-content/uploads/2015/07/AnuarioAPCOR2014.pdf>

Angelo, P. M. & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*.66(1): 232-240.

Babushok, V. I., Linstrom, P. J., Zenkevich I. G. (2011) Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol. 40, No. 4

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99: 191-203.

Barreto, M.C., Vilas Boas, L., Carneiro, L. C., San Romão, M. V.(2011) Volatile Compounds in Samples of Cork and also Produced by Selected Fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (12), pp 6568–6574

Barrionuevo, W. R. & Lanças, F. M. (2001). Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. *Química Nova* 24 (2): 172-175.

Belo, C. C., M. S. Pereira, A. C. Moreira, I. S. Coelho, N. Onofre, and A. A. Paulo (2009). Montado. Pages 251–293 in H. M. Pereira, T. Domingos, L. Vicente, and V. Proença, editors. *Ecosistemas e Bem-Estar Humano*. Escolar Editora.

Belo, M. (2012). Estudo de diferentes variedades de milho utilizadas na produção de broa. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos.

Bennett, R. N., Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.

Bredie, W. L. P., Guy, R. C. E., Mottram, D. S. (1998). Aroma volatiles from the extrusion cooking of model systems containing proline and ornithine. *Flavour Science: Recent Developments*; Eds: Taylor, A. J., Mottram, D. S., .p. 221-224, Woodhead Publishing.

Buttery, R. G., Ling, L. C., Stern, D. J. (1997). Studies on Popcorn Aroma and Flavor Volatiles. *J.Agric. Food Chemistry*, 45: 837-843.

Caldentey, P., Fumi, M., Mazzoleni, V., Careri, M. (1998). Volatile compounds produced by microorganisms isolated from cork. *Flavour and Fragrance Journal* 13:185-188.

Castola, V., Marongiu, B., Bighelli, A., Floris, C., Lai, A., Casanova, J., Extractives of cork (*Quercus suber* L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts, *Ind. Crops Prod.*, 21, 65–69, 2005.

Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S. and Labadie, M.D., (2004). Identification and responsibility of 2, 4, 6 -tribromoanisole in musty, corked odors in wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1255-1262.

Chaudry, G. Rasul, Chapalamadugu, S.,(1991). Biodegradation of halogenated Organic Compounds, Departement of biological Sciences Oakland University, *Microbiological Reviews*, p.59-79.

Conde, E., Cadahía, E.,Vallejo,M.,Simón, B. e Adrados, J. (1997). Low Molecular Weight Polyphenols in Cork of *Quercus suber*. *J. Agric. Food Chem* 45: 2695–2700.

Conde,E., Cadahía, E.,Vallejo,M.,Simón, B. (1998). Polyphenolic Composition of *Quercus suber* Cork from Different Spanish Provenances. *J. Agric. Food Chem* 46: 3166–3171.

Costa, A. & Pereira, H. (2007). Montados e sobreirais: uma espécie, duas perspectivas. *Árvores e Florestas de Portugal. Os Montados. Muito para além das árvores. Volume 3: 17-37.*

Costa A & Pereira H (2010). Influence of cutting direction of cork planks on the quality and porosity characteristics of natural cork stoppers. *Forest Systems*,19:51-60.

Costa A, Nunes LC, Graça J & Spiecker H (2015). Insights into the responsiveness of cork oak (*Quercus suber* L.) to bark harvesting. *Economic Botany* 69(2): 171-184. doi: 10.1007/s12231-015-9305-z

Costa A, Barbosa I, Roussado C, Graça, J & Spiecker H (2016) Climate response of cork growth in Mediterranean oak (*Quercus suber* L.) woodlands of southwestern Portugal. *Dendrochronologia* 38: 72-81. doi:10.1016/j.dendro.2016.03.007.

Costa A, Madeira M, Santos JL & Oliveira A (2011). Change and dynamics in Mediterranean evergreen oak woodlands landscapes of Southwestern Iberian Peninsula. *Landscape and Urban Planning* 102(3):164-176.

Costa, A., H. Pereira, and M. Madeira (2009). Landscape dynamics in endangered cork oak woodlands in Southwestern Portugal (1958–2005). *Agroforestry Systems* 77:83– 96.

Costa, A., Pereira, H., Oliveira, A. (2003). Variability of radial growth in cork oak adult trees under cork production. *Forest Ecology and Management* 175: 239-246.

Decreto de Lei n.º 169/2001 de 25 de Maio.

Domingues, V - Utilização de um produto natural (cortiça) como adsorvente de pesticidas piretróides em águas – Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2005.

Escarpa, A., Gonzales, M. C., Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography A*, 2000. 897: p. 161 – 170.

Ettre, L. S., The beginning of headspace. *LCGC North America*, 2002. 20(12): p. 1120–1129.

Ezquerro, Ó., Tena, M. T., Determination of odour-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase micro extraction, *J. Chromatogr. A.* 1068, 201-208, 2005.

Falcão, L. & Araujo, M., (2014) Application of ATR-FTIR spectroscopy to the analysis of tannins in historic leathers: The case study of the upholstery from the 19th century Portuguese Royal Train. *Vibrational Spectroscopy* 74: 98-103.

Faria, S., (2012). Implementação e validação de um método para determinação de contaminantes em vinho por micro-extração em fase sólida e GC-MS/MS e a sua correlação com a análise sensorial. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto.

Fernandes, A.; Fernandes, I.; Cruz, L.; Mateus, N.; Cabral, M.; de Freitas, V. (2009). Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 11154–11160 DOI: 10.1021/jf902093m.

Fernandes, A. ; Sousa, A.; Mateus, N.; Cabral, M.; de Freitas, V., (2011). Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chem.* , 125, 1398-1405.

Fernandes, J. (2014). Efeito do pastoreio na herpetofauna de uma paisagem agrícola Mediterrânica. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia da Conservação. Departamento de Biologia animal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Fonseca, M. (2013). 2,4,6 – Tricloroanisol: validação do método de análise e estudos de adsorção e dessorção em rolhas de cortiça. Dissertação de Mestrado em Enologia - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Fortes, M.A., Rosa, M.E. & Pereira, H. (2004). *A Cortiça*. 2ª Edição. Instituto Superior Técnico, Lisboa, 259 pp.

Garcia, A., Lopes, L., Barros, R., Ilharco, L. (2014). The Problem of 2,4,6-Trichloroanisole in Cork Planks Studied by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy: Proof of Concept. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 128–135.

Ghalem A, Barbosa, I, Bouhraou RT & Costa A (2016). Climate signal in cork-ring chronologies: A case study at Portugal (Benavente) and Algeria (Ha-fir-Zarieffet). Submitted to Tree-Ring Research (# TRR2016-5).

Gonçalves, P., S. Alcobia, L. Simões, and M. Santos-Reis (2011). Effects of management options on mammal richness in a Mediterranean agro-silvo-pastoral system. *Agroforestry Systems* 85:383–395.

Jové, P. Olivella, M., Cano, L. (2011) Study of variability in chemical composition of bark layers of *Quercus suber* L. from different production areas. *Bio Resources* 6 (2), 1806-1815.

Kaseleht, K., Leitner, E., Paalme, T., Determination aroma-active compounds in kama flour using SPME-GC/MS and GC-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 2010.

Kefeli, V. I.; Kalevitch, M. V.; borsari, B.,(2003). Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol.* 2, 13-18.

Leite, J. (2008). Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Lopes, M., Barros, A., Neto, P., Rutledge, D., Delgadillo, I. (2001) Variability of Cork from Portuguese *Quercus suber* Studied by Solid-State ¹³C-NMR and FTIR Spectroscopies. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, Vol.62, 268–277.

Maga, J. e Puech, J. (2005). Cork and Alcoholic Beverages, *Food Reviews International*, 21:1, 53-68, DOI: 10.1081/FRI-200040593.

Majcher, M. & Jelén, H. H., Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *J. of Food Composition and Analysis*, 2009. 22: p. 606-612.

Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., Valcárcel, M.(2012) Headspace-multicapillary column-ion mobility spectrometry for the direct analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork samples. *J Chromatogr A*. Nov 23;1265:149-54. doi: 10.1016/j.chroma.2012.09.087. Epub 2012 Sep 29.

Mazzoleni, V., Caldentey, P., Careri, M., Mangia, A., Colagrande, O., (1994). Volatile components of cork used for production of wine stoppers, *Am. J. Enol. Viticult.*, 45 (4), 401–406.

Mazzoleni, V.; Caldentey, P.; Silva, A., (1998). Phenolic compounds in cork used for production of wine stoppers as affected by storage and boiling of cork slabs. *Am. J. Enol. Viticult.*, 49, 6-10.

Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P. & Dugo, G., Comprehensive two dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2005. 20: p. 136-140.

Monteiro, G. (2007). Análise de Revestimentos Orgânicos por Espectroscopia de Infravermelho. Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia dos Materiais, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa.

Naczki, M. & Shahidi, F., Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr A*, 2004. 1054 (1/2): p. 95-111.

Neto, P. (2005) Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de *Quercus suber* L.: Estudo dos efeitos de matriz por micro-extracção em fase sólida na região de espaço de cabeça. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Instrumentais e Controlo da Qualidade Analítica.

Oliveira, G. & Costa, A. (2012). How resilient is *Quercus suber* L. to cork harvesting? A review and identification of knowledge gaps. *Forest Ecology and Management*, 270:257-272.

Ortega-Fernández, C., González-Adrados, J., García-Vallejo, M., Calvo-Haro, R., Cáceres-Esteban, M. (2006). Characterization of Surface Treatments of Cork Stoppers by FTIR-ATR. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 54, No. 14, 4932-4936.

Pereira, H. (2007). A cortiça – um material único. In: Silva, J.S. (Ed). *Árvores e Florestas de Portugal*. 03. Os montados. Muito para além das árvores. Público e Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, pp. 59-75.

Pereira, H, Tomé, M. (2004). Non- wood products /Cork Oak. Elsevier, pp 613 – 620.

Pereira, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber* L. *Wood Sci. Technol.* 22: 211-218.

PHEROBASE:

[<http://www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php>, consultada em 2015 e 2016].

Pinto, F. (2012) Estudo do modelo tradicional de pastoreio das vacadas da Companhia das Lezírias, S. A. Relatório Final de Estágio do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.

Pinto-Correia, T., Ribeiro, N., Potes, J. (2013) Livro Verde dos Montados, Edição: ICAAM - Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas

Pintor, A., Ferreira, C., Pereira, J., Correia, P., Silva, S., Vilar, V., Botelho, C., Boaventura, R. (2012) Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research* 46: 3152-3166.

Pires Valente, A. L. & Augusto, F., SPME, SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION. Fundamental aspects of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) are discussed in the present paper. The application of SPME as a microtechnique of sample preparation for gas chromatographic analysis is considered and related to existing theoretical models. Both research prototypes and commercial SPME devices are considered. *Química Nova*, 2000.23(4): p. 523-530.

Plieninger, T. (2006). Habitat loss, Fragmentation, and Alteration – Quantifying the Impact of Land-use Changes on a Spanish Dehesa Landscape by Use of Aerial Photography and GIS. *Landscape Ecol* 21: 91. doi:10.1007/s10980-005-8294-1.

Prades, C., García-Olmo, J., Romero-Prieto, T., de Ceca, J., López-Luque, R., (2010). Methodology for cork plank characterization (*Quercus suber* L.) by near-infrared spectroscopy and image analysis. *Meas. Sci. Technol.* 21 065602 (11pp).

Prades, C., Gómez-Sánchez, I., García-Olmo, J, González-Hernández, F., González-Adrados, J. (2014) Application of VIS/NIR spectroscopy for estimating chemical, physical and mechanical properties of cork stoppers. *Wood Sci Technol* 48:811–830.

Rocha, S., delgadillo, I., Correia, A. J. (1996) GC-MS Study of Volatiles of Normal and Microbiologically Attacked Cork from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 865–871.

Santos, S. (2012) Compostos fenólicos a partir de subprodutos da indústria florestal. Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química.

Santos, S., Pinto, P., Silvestre, A., Neto, C. (2010) Chemical composition and antioxidante activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products* 31: 521-526.

Silva, S. P., Sabino, M. A. Fernandes, E. M., Correlo, V. M., Boesel, L. F., Reis, R. L.(2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews* Vol 50 N°6: 345-365.

Silva, F. - Controlo de Qualidade de Rolhas de Cortiça Microaglomeradas – Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Química pela Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2014.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R., M., Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 1999.299:p.157-178.

Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Amer. J Enol Vitic*, 1965. 16 (3): p. 144-58.

Staudt, M. Ennajah, A., Mouillot, F., Joffre, R. (2008) Do volatile organic compound emissions of Tunisian cork oak populations originating from contrasting climatic conditions differ in their responses to summer drought? *Can. J. For. Res.* 38: 2965–2975

Swain, T., Hillis, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolics constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1959. 10: p. 63–68.

Vékey, K., Mass Spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr.*, 2001. 921: p.227.

Veloso, S. - Identificação da microflora associada à cortiça crua com o defeito da “mancha amarela” - Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais pelo Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, 2014.

Xu F, Yu J, Tesso T, Dowell F, Wang D (2013) Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy* 104: 801-809.

Anexos

Anexo I – Identificação das amostras

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
1	Pastoreada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
2	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
3	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
4	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
5	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
6	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
7	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
8	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
9	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
10	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
11	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2
12	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2
13	Pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2
14	Pastoreada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
15	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
16	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
17	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
18	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
19	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
20	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
21	Pastoreada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
22	Pastreada	Amadia	0,3	Crom. 1
23	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
24	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
25	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
26	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
27	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
28	Pastoreada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis
29	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
30	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
31	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
32	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
33	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
34	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
35	Pastoreada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
36	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
37	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
38	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
39	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
40	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
41	Pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
42	Pastoreada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis
43	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
44	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
45	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
46	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
47	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
48	Pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
49	Pastoreada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
50	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
51	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
52	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
53	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
54	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
55	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
56	Pastoreada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
57	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
58	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
59	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
60	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
61	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
62	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
63	Pastoreada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
64	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
65	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
66	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
67	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
68	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
69	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
70	Pastoreada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
71	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
72	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
73	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
74	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
75	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
76	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
77	Pastoreada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
78	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
79	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
80	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
81	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
82	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
83	Pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
84	Pastoreada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
85	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
86	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
87	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
88	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
89	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
90	Pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
91	Não pastoreada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
92	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
93	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
94	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
95	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
96	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
97	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
98	Não pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
99	Não pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
100	Não pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 1
101	Não pastoreada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2

Amostra	Área de estudo ada	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
102	Não pastore- ada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2
103	Não pastore- ada	Amadia (sem costa)	0,3	Crom. 2
104	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis
105	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
106	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
107	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
108	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
109	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
110	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
111	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
112	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 1
113	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 1
114	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
115	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
116	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
117	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 2
118	Não pastoreada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis
119	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
120	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
121	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 1
122	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
123	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
124	Não pastoreada	Amadia	1,3	Crom. 2
125	Não pastoreada	Amadia	0,3	Ext. de fenóis
126	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
127	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1
128	Não pastoreada	Amadia	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo ada	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
129	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 2
130	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 2
131	Não pastore- ada	Amadia	0,3	Crom. 2
132	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Ext. de fenóis
133	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
134	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
135	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 1
136	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
137	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
138	Não pastore- ada	Amadia	1,3	Crom. 2
139	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
140	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 1
141	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
142	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
143	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
144	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
145	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
146	Não pastoreada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
147	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
148	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
149	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
150	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
151	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
152	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
153	Não pastoreada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
154	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
155	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo ada	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
156	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 1
157	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 2
158	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 2
159	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 2
160	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
161	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 1
162	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 1
163	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 1
164	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 2
165	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 2
166	Não pastore- ada	Virgem	1,3	Crom. 2
167	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Ext. de fenóis
168	Não pastore- ada	Virgem	0,3	Crom. 1

Amostra	Área de estudo	Tipo de exploração	Nível da árvore (cm)	Análise a realizar
169	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
170	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 1
171	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
172	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
173	Não pastoreada	Virgem	0,3	Crom. 2
174	Não pastoreada	Virgem	1,3	Ext. de fenóis
175	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
176	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
177	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 1
178	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
179	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2
180	Não pastoreada	Virgem	1,3	Crom. 2

Anexo II - Tabelas de identificação (presença /ausência) de compostos voláteis nos dois níveis de altura.

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
(-) -Aristoleno	+													
(-) -Cânfora		+		+					+		+			
(-) -Dehidroaromadendrano							+			+				
(-) -Terpinen-4-ol				+	+									
(-) -Triciclo [6.2.1.0(4,11)]undec-5-ene, 1,5,9,9-tetrametil- (isocariofille- ne-I1) ciclopenta[cd]indeno	+													
(-) -Tujopseno														+
(1R)-(-)-Canforquinona	+		+											
(1R)-(+)-Norinona	+													
(3E)-3,7-dimetil- 1,3,6-Octatrieno								+			+			
1,2,3,4,5,6-hexametil-1,3-Ciclohexadieno				+						+				

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
1,2,4-Trimetilbenzeno												+		
1,2-Bis(γ -trimetilsilipropoxi)etano						+						+	+	
1,3-Bis(1,1-dimetiletil)-Benzeno									+		+		+	+
1,6-Dihidrocarveol								+						
10s,11s-Himachala-3(12),4-dieno						+	+							
1-Acetil-2-butiloxirano		+												
1-Chloropentano	+						+			+		+		
1-Fluoro-2,2,4,4-tetrametil-3-pentanona	+													
1-Hexanol				+	+	+			+					
1-Isopropenil-4-metil-2-metileneciclohexano										+				
1-Nonadeceno									+		+			
1-Octen-3-ol	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
2,3,4-Trimetilhexano				+										
2,3,6,7-Tetrametiloctano									+			+		
2,3,6-trimetil-7-Octen-3-ol				+						+				
2,3-Dimetoxitolueno		+												
2,4-Dimetil-1-deceno										+				
2,5,5-Trimetil-2,3,4,5,6,7-hexahidro-1H-2,4a-etanonaftaleno											+			
2,5-Bornanediol								+						
2,6,11-Trimetildodecano										+				
2,7-Dimetil-1-Octanol									+					
2a,4,4,7-Tetrametil-2,2a,3,4,4a,5,7a,7b-octahidro-1H-ciclopenta[cd]indeno	+													
2-Aminoetildimetilamina			+											
2-Borneol			+						+		+			

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
2-Butil-1-Octanol									+					
2-Clorobornano			+	+										
2-Clorocanfano	+													
2-Etil-1-Hexanol												+		
2-Etilhexanol							+							
2-Hidroxicineol	+													
2-Isopropil-4-metilansole			+						+					
2-Isopropil-5-metil-1-heptanol											+	+		
2-Metil-1-butanol		+												
2-Metilene-4,8,8-trimetil-4-vinil- Bíciclo[5.2.0]nonano							+							
2-Metilene-5-(1-metilvinil)-8-metil-Bíciclo[5.3.0]decano					+	+	+							
2-Metilisoborneol										+		+		

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
2-Metilpentanal				+										
2-Norbornanol			+											
2-Pentilfurano		+					+				+			
2-Pentilfurano						+								
2-Propanol					+									
2-Undecanona						+								
3,5-Dimetilciclohexanol					+									
3,6,6-Trimetil-2-Norpinanona											+			+
3,7,7-Trimetilciclohepta-1,3,5-trieno	+													
3,7-Dimetildecano									+					
3,7-Dimetilnonano												+		
3-Careno										+				

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
3-Etil-3-metilheptano												+		
3-Metilene-p-Ment-8-eno								+				+		
3-Nonin-1-ol										+				
3-Octanona					+									
4,11-Selinadieno							+							
4,6-Dimetil-dodecano								+	+	+	+			
4,8-Dimetil-1-nonanol												+		
4-Caranol									+	+				
4-Metildodecano												+		
4-Terpinenol				+										
5,9,13-Trimetil-4,8,12-Tetradecatrienal						+								
5-Butilnonano								+	+	+	+	+		+

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
5-Metil-1-hexanol						+								
5-Metil-5-propilnonano									+					
5-Metilundecano									+	+				
6,6-Dimetil-3-metilene-Norpinano											+			
6-Metil-6-nitro-2-heptanona					+		+							+
6-Metil-hept-5-en-2-ol				+										
9-Octadeceno					+									
Acetato de fenchil			+	+										
Acoradieno														+
Alloaromadendreno	+	+												
Anisole						+	+				+			
Bergamiol						+		+						

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
Bis[2-(trimetilsilil)etil] malonato													+	+
Borneol				+					+					
Bornileno			+	+										
Canfeno	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+			+
Cânfora	+				+	+								
Cariofileno	+	+	+	+	+	+	+			+		+		
Ciclono	+	+	+	+			+							
Cicloisossativeno		+												
Cis-Mirtanol									+	+				
Cis-Ocimeno														+
Copaeno	+	+							+					+
Cupareno														+

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
D-Cânfora			+	+		+	+		+					+
Dehidroaromadendreno							+							
D-Germacreno		+												
Dioxido de limoneno					+									
Di-t-butilacetileno			+											
Docosano											+			
Durene		+												
E-conoftorina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Eicosano											+			
Eremofileno												+		
Eucaliptol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
Fenchol			+						+		+			

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
Fenchona	+		+	+					+	+				+
Gentisalaldeído		+	+	+	+		+		+	+	+	+		
Geosmina										+				
Hexadecano									+					
Hidrato de canfeno	+													
Humuleno	+	+					+							
Ilangeno				+										
Isoborneol				+										
Isocariofileno											+			
Isocineole			+	+		+	+	+			+			
Isolongifoleno					+									
Isooctanol						+								

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
Isopentanol				+	+	+			+					
Isotridecanol										+				
Ledeneo		+					+			+				
L-Fenchona		+							+	+				
Limoneno		+			+	+					+			
Linderol											+			
Longifoleno				+	+	+	+			+	+	+	+	
Metil 2-etilhexanoato									+	+				+
Metil 2-etilpentanoato														+
Metilcamfenoato											+			
Metiltimol								+	+					
Metoxi-fenil-Oxime	+		+			+		+		+		+		

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
N-Decanal						+								
Neoisotujol								+						
Nonanal						+								
Norfitano								+						
Octadecano										+				
Octanal					+									
Octanol							+							
p-Cimeno	+	+		+		+			+		+			
Pentadecano						+								
Pinocanfona	+	+	+	+				+	+	+	+			
Propionato de Linalil						+								
Sabineno				+										

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
Santaleno												+		
Sativeno	+		+	+	+	+	+							+
Selina-3,7(11)-dieno					+	+	+			+				
Sulcatona				+	+									
Tert-Butildimetilsilanol										+				
Tetrametilsilano													+	
Trans-p-Ment-2-en-7-ol,														+
Triciclono					+	+			+	+				
Trifluoroacetamido		+												
Tujopseno						+	+					+		
Valenceno						+								
Valerenal										+				

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A 1	A1 SC	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A7 SC	A 8	A 9	A1 0	A1 1	A1 2
α-Bergamoteno	+	+												
α-Cedreno														+
α-Chamigreno	+						+							+
α-Copaeno	+							+	+		+			
α-Cubebeno			+	+										
α-Guaiaeno		+	+	+							+			+
α-Gurjuneno							+							
α-Himachaleno														+
α-Ilangeno	+													
α-Longipineno					+	+								
α-Muuroleno		+												
α-Patchouleno							+							

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A	A1	A	A	A	A	A	A	A7	A	A	A1	A1	A1
	1	SC	2	3	4	5	6	7	SC	8	9	0	1	2
α-Pineno	+			+	+	+	+	+	+		+			
α-Terpineol				+		+			+					
α-Tujeno				+										
β-Cadineno		+												
β-Cariofileno											+			
β-Cedreno														+
β-Chamigreno	+													
β-Cimeno			+			+								
β-Farneseno	+													
β-Felandreno		+												
β-Himachaleno														+
β-Patchouleno										+				+

Árvores - nível 0,30cm

Composto	A	A1	A	A	A	A	A	A	A7	A	A	A1	A1	A1
	1	SC	2	3	4	5	6	7	SC	8	9	0	1	2
β -Pineno	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+			
β -Sinensal	+													
γ -Gurjuneno														+
δ -Cadineno		+												

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
(+)-Longifoleno										+		
(+)-Nopinona			+									
(1 α ,3 β ,4 α ,6 α)-4,7,7-trimetilbicyclo[4.1.0]heptan-3-ol								+				
(S) - (+)-1-Ciclohexiletilamina	+											
1,2,3,4,5,6-Hexametil-1,3-ciclohexadieno									+			
1,2,4,4-Tetrametilciclopenteno					+							
1,2,4,5-Tetrametil-6-metilenespiro [2.4] heptano									+			
1,2-Bis (γ -trimetilsilipropoxi) etano						+		+				
1,3,4,5,6,7-Hexahidro-2,5,5-trimetil-2H-2,4a-Etanonftaleno						+		+				+
1,3-Bis-(2-ciclopropil,2-metilciclopropil)-but-2-en-1-one									+			
1,3-Ditertiaributilbenzeno							+	+		+		+
1,4-Cineole	+	+	+		+	+						

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1,5-Octadien-3-ol				+								
1,6-Dihidrocarveol												+
10s,11s-Himachala-3(12),4-dieno			+									
1-Cloropentano	+		+			+		+		+		
1-Hexanol	+											
1-Mesitol-2,2-dimetil-1-propanona						+						
1-Octen-3-ol		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
2,2,6-Trimetilciclohexanona					+							
2,3,6,7-Tetrametil-octano								+	+			
2,3,6-Trimetil-7-Octen-3-ol												+
2,4,6-Tricloroanisole				+								
2,4-Dimetil-1-decene									+	+		
2,5-Bis[(trimetilsilil)oxi]-benzaldeído	+		+	+								

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
2,6,11-Trimetildodecano								+				+
2-Acetoxi-1,8-cineole	+	+				+		+	+			
2-Borneno		+										
2-Butil-1-octanol									+	+		
2-Canfanol									+			
2-Clorobornano	+	+										
2-Cloropentano					+							
2-Isopropil-4-metilansole		+										
2-Isopropil-5-metil-1-heptanol								+		+		
2-Metil-1-butanol				+								
2-Metil-1-Propanol				+								
2-Metil-2-borneno				+				+				
2-Metilisoborneol												+

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
2-Octen-1-ol			+									
2-Pentilfurano		+	+	+		+			+			
2-Propil-1-pentanol	+											
3,5,5,9-Tetrametil-2,4a,5,6,9,9a-hexahidro-1H-benzo[a]ciclohepteno			+									
3,6,6-Trimetil-2-norpinanona	+							+				
3,7-Dimetildecano									+	+		
3-Etil-2-metilheptano	+											
3-Etil-3-metilheptano										+		
3-Metilene-p-Ment-8-eno												+
3-Metil-hepta-1,6-dien-3-ol	+											
3-Nonen-2-one				+								
4,5-Dimetilnonano									+			
4,6-Dimetil-dodecano								+		+		

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
4-Metilcânfora												+
5-(2-Metilpropil)-nonano							+	+	+			
5,5,9-Trimetil-3-metilene-2,3,5,6,7,8,9,9a-octahidro-1H-benzo[a]ciclohepteno					+							
5-Butilnonano										+		
5-Isobutilnonano							+			+		
5-Metil-Undecano							+	+	+	+		
6-Etenildihidro-2,2,6-trimetil-2H-Piran-3(4H)-one	+		+									
6-Metil-6-nitro-2-heptanono			+			+						
6-Oxocineole			+									
6S-2,3,8,8-Tetrametiltriciclo[5.2.2.0(1,6)]undec-2-eno									+			
7-Isopropenil-1-metil-4-metilenedecahidroazulenoo				+	+	+						
Ácido Malónico		+										+
Acoradieno		+										

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Alaninol	+											
Alloaromadendreno	+						+	+				
Anisol					+				+			
Aristoleno				+								
Aromadendreno		+							+			
Borneol	+											
Bromido de bornil		+										
Bornileno		+										
Butan-2-ol	+											
Hidrato de Canfeno	+	+	+									
Canfeno	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Cânfora	+	+	+	+	+	+		+	+			+
Canforquinona	+	+										

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Careno	+						+					
Carvacrol metil eter				+					+			
Cariofileno	+	+	+	+		+			+			
Cedr-9-eno									+			+
Clorooctadecano								+				
Ciclono									+			
Ciclosativeno	+											+
Cis-1,1,3,5-Tetrametilciclohexeno	+											
Cis- Calameneno	+											
Cis-Mirtanol	+		+	+								
Cis-Ocimeno								+				
Cis-Tujopseno			+							+		
Copaeno		+	+	+								

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Dehidroaromadendrano		+										
Dehidroaromadendreno						+						
D-Fenchona					+				+			
Dietoxicarbonildiazeno							+					
Dimetilsilanediol		+	+				+					
Difenhidramina												
D-Limoneno					+							
Docosano								+				
E-conoftorina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Eucaliptol	+	+	+	+	+	+		+	+	+		
Acetato exo-2-Hidroxicineole		+										
Fenchol		+						+	+			
Fenchona	+	+	+	+	+		+	+	+			

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Gentisalaldeído			+									
Germacreno B			+									
Germacreno D	+											
Guaia-3,9-dieno					+							
Guanidina	+											
Heptadecano								+				
2-etil-, metil ester ácido hexanóico	+	+										+
3-etil-, metil ester ácido hexanóico				+								
Humuleno				+		+				+		
Hidrazinecarboxamido	+		+				+					
Imino(trifenil)fosforano							+					
Isoborneol									+			
Isoledeno				+								

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Isopentanol				+								
Isopinocânfona	+							+				
Isotujol								+				
Ledeno	+							+				
Limoneno	+	+	+	+	+		+	+	+			
Linderol								+				
Longifoleno					+	+		+	+	+		
M-Cimeno	+				+							
Metoxi-Benzeno						+						
Metoxi-fenil-Oxime	+	+	+						+			
Metil 2-etilhexanoato	+							+	+			
Metilbenzeno								+				
Metilcamfenoato					+		+	+				

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Mircene			+									
Mirtanol	+											
N,N-Dimetil-1,2-etilenediamina						+						
Nerolidol									+			
Nopinona			+									
p-Cimeno	+	+	+		+				+			
Ácido Pentanóico			+									
Pentilcarbinol				+								
Pinanediol	+											
Pinocanfona	+	+	+		+			+	+			
Sabineno			+									
Santaleno									+	+		
Sativeno	+				+	+	+					+

Árvores - nível 1,30cm

Composto	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Selina-3,7(11)-dieno						+						
Seichelleno							+					
Sulcatona	+			+								
Terpinoleno			+									
Tert-Butildimetilsilanol						+	+					
Tujopsene			+		+	+			+			+
Timil-metil-eter	+	+					+	+				
Torreiol												+
Trans-2,2-Dimetil-3-Deceno				+								
Trans-4-Metilciclohexanol				+								
Trans-Isolongifoleno						+						
Triciclono	+		+	+	+	+	+	+				
Tropilideno									+			

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Valenceno	+											
Virdifloreno						+						
Ilangeno									+			
α -Bergamoteno	+	+										
α -Bisabolol			+									
α -Cedreno			+									
α -Chamigreno						+			+			
α -Copaeno	+						+		+			
α -Guaieno	+	+				+		+	+			+
α -Gurjuneno	+								+			
α -Longipineno			+									
α -Muuroleno	+											
α -Fellandreno	+	+	+									

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
α -Pineno		+					+	+	+			
α -Terpineol		+							+			
α -Terpinoleno		+										
α -Tujeno			+									
β -Chamigreno	+	+	+			+			+	+		
β -Cadineno	+											
β -Cariofileno								+				
β -Cimeno									+			
β -Elemeno			+									
β -Guaieno								+				
β -Himachaleno									+			
β -Humuleno									+			
β -Fellandreno			+									

Árvores - nível 1,30cm

Composto	Árvores - nível 1,30cm											
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
β-Pineno	+	+	+	+	+		+	+	+			
β-AcetatoTerpinil									+			
γ-Gurjuneno									+			
γ-Muuroleno	+											
δ-Cadineno	+						+					

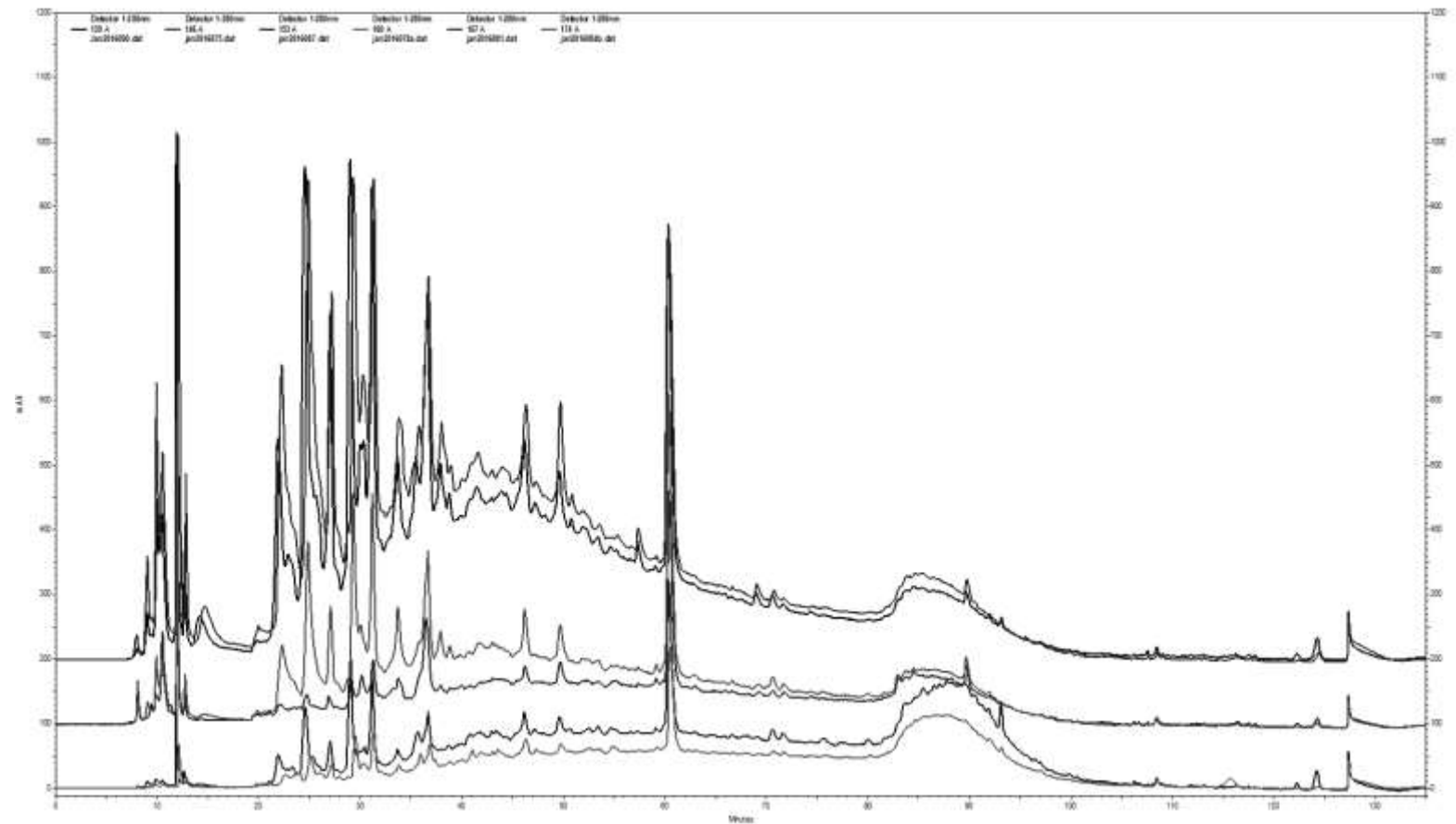
Anexo III – Resultados obtidos na quantificação de fenóis

Amostra	Fenóis totais	Fenóis totais	Folin-Ciocalteu
	Folin-Ciocalteu	HPLC-DAD	/
	(mg eq. AG/ g amostra)	(mg eq. AG/ g amostra)	HPLC-DAD
1	5,560 ± 0,60	2,024 ± 0,233	2,75
14	8,838 ± 0,35	3,477 ± 0,456	2,54
21	21,803 ± 0,91	11,087 ± 1,414	1,97
28	28,671 ± 1,13	15,233 ± 1,181	1,88
35	17,308 ± 3,05	13,523 ± 1,988	1,28
42	28,040 ± 5,03	13,511 ± 3,528	2,08
49	24,292 ± 1,44	12,306 ± 0,548	1,97
56	35,517 ± 18,1	13,466 ± 4,879	2,64
63	23,098 ± 9,67	12,496 ± 2,908	1,85
70	31,322 ± 5,96	12,240 ± 2,353	2,56
77	44,214 ± 3,31	18,435 ± 1,533	2,40
84	82,643 ± 11,3	27,259 ± 2,933	3,03
91	16,512 ± 2,88	10,429 ± 0,708	1,58
104	21,450 ± 2,10	14,014 ± 1,280	1,53
111	20,338 ± 3,24	14,466 ± 1,347	1,41
118	24,982 ± 1,31	17,776 ± 1,638	1,41
125	27,628 ± 3,73	19,421 ± 1,957	1,42
132	25,239 ± 6,64	17,566 ± 3,133	1,44
139	39,572 ± 1,92	24,269 ± 2,406	1,63
146	51,170 ± 5,98	27,879 ± 2,923	1,84
153	13,887 ± 0,78	11,173 ± 0,367	1,24

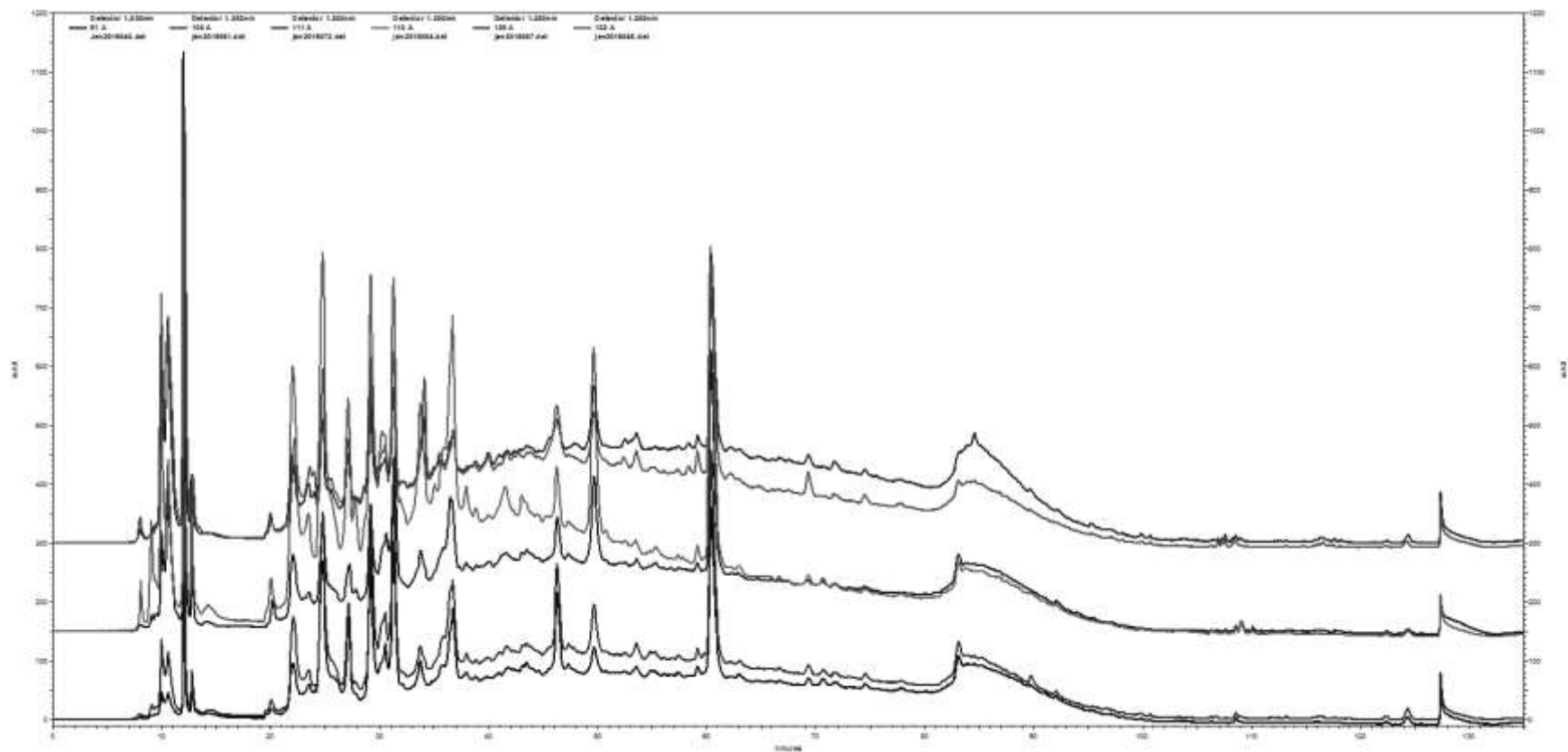
	Fenóis totais Folin-Ciocalteu	Fenóis totais HPLC-DAD	Folin-Ciocalteu / HPLC-DAD
Amostra	(mg eq. AG/ g amostra)	(mg eq. AG/ g amostra)	HPLC-DAD
160	18,162 ± 7,77	13,814 ± 3,711	1,31
167	6,790 ± 1,23	7,323 ± 0,993	0,93
174	23,800 ± 6,47	16,286 ± 4,421	1,46

Anexo IV – Cromatogramas obtidos na análise das amostras por HPLC-DAD.

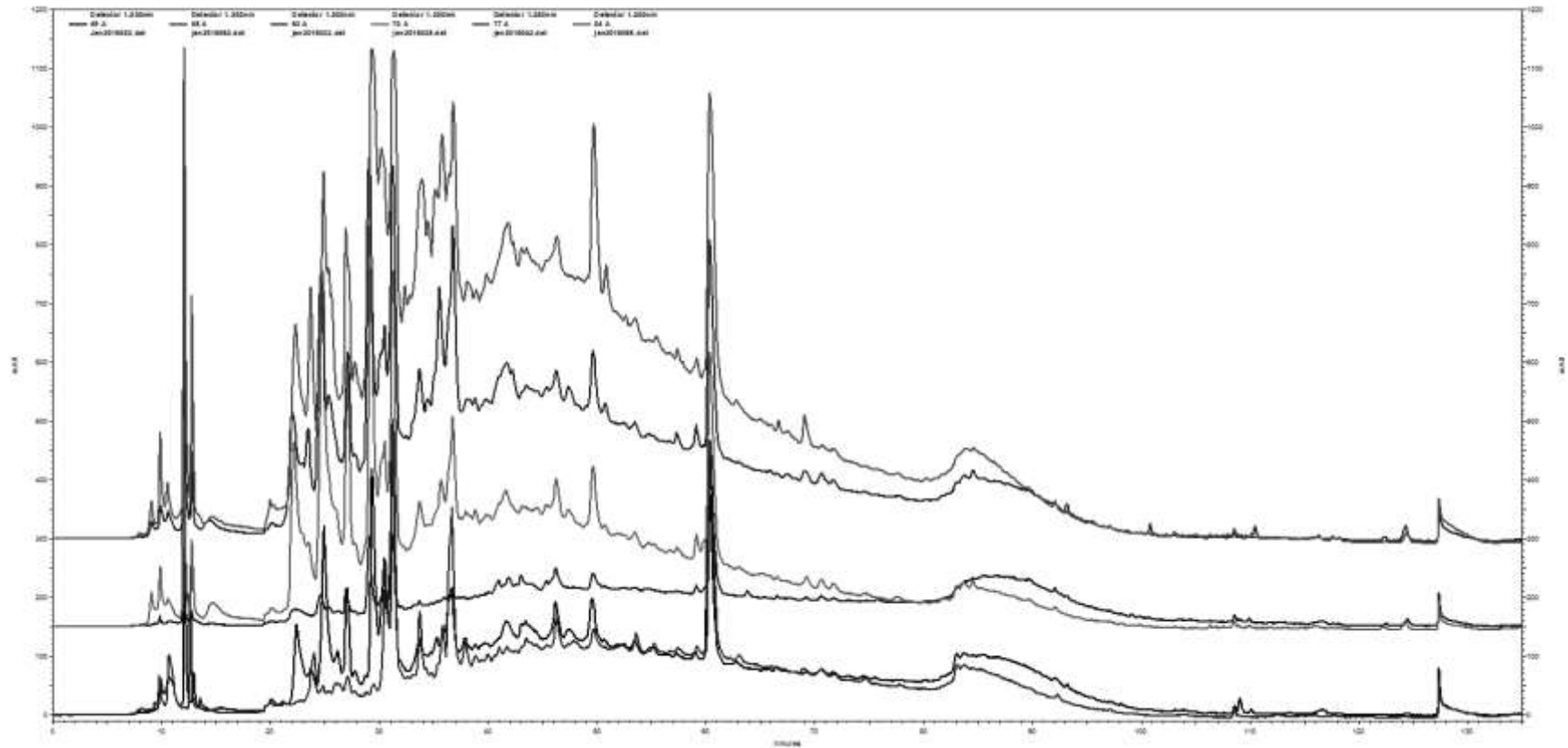
A – amostras de árvores com cortiça virgem da área não pastoreada



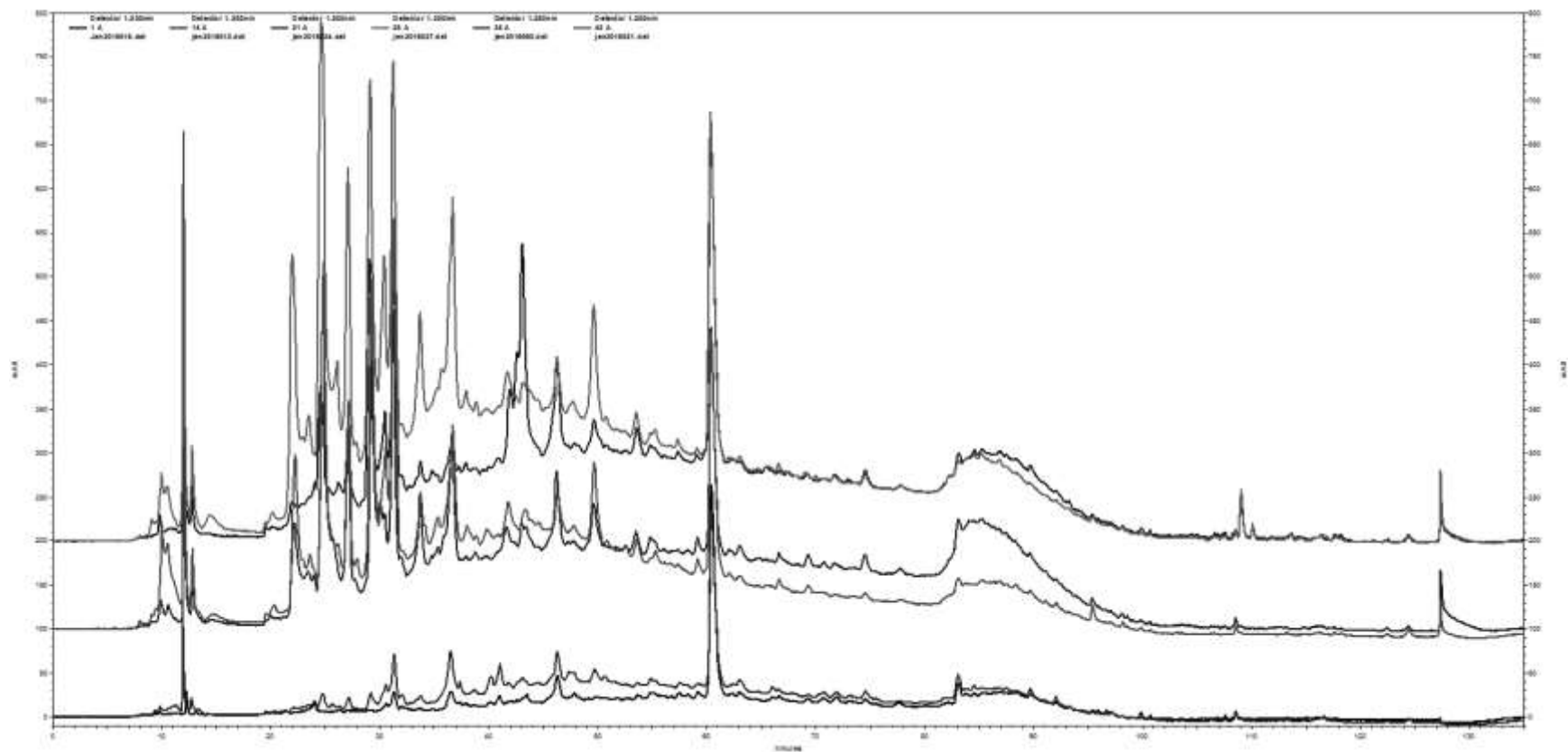
B – amostras de árvores com cortiça amadia da área não pastoreada



C – amostras de árvores com cortiça virgem da área pastoreada.



D – amostras de árvores com cortiça amadia da área pastoreada.



Anexo V

Publicações em revistas internacionais

Costa A, **Barbosa I**, Roussado C, Graça, J & Spiecker H (2016) Climate response of cork growth in Mediterranean oak (*Quercus suber* L.) woodlands of southwestern Portugal. *Dendrochronologia* 38: 72-81. doi:10.1016/j.dendro.2016.03.007

Ghalem A, **Barbosa I**, Bouhraoua RT & Costa A (2016). Comparing cork quality from Hafir-Zarieffet mountain forest (Tlemcen, Algeria) vs. Tagus basin Montado (Benavente, Portugal). *Cogent Biology* (2016), 2: 1236431: doi: 10.1080/23312025.2016.1236431