INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO
MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol em aguardente/brandy por cromatografia gasosa (GC-ECD)

JOÃO PEDRO MONTENEGRO PINTO LOUREIRO
Outubro de 2021

POLITÉCNICO
DO PORTO

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol em aguardente/brandy por cromatografia gasosa (GC-ECD)

Symington Family Estates, Vinhos, S.A.

João Pedro Montenegro Pinto Loureiro

Mestrado em Engenharia Química – Qualidade

Outubro 2021

Orientação:

Engª Cláudia Santos (Symington)

Doutora Manuela Correia

Doutora Cristina Matos

Definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol em aguardente/brandy por cromatografia gasosa (GC-ECD)

Agradecimentos

Aos meus pais por todo o apoio que me deram ao longo do meu percurso académico e por todos os sacrifícios que sempre fizeram para que nunca me faltasse nada.

A todos os meus amigos que me acompanharam e ajudaram nestes últimos anos.

A toda a minha família, em especial ao meu avô Arnaldo.

À Engenheira Cláudia Santos, por me ter dado a oportunidade de realizar este estágio e por toda a confiança, apoio e experiência transmitidos.

A toda a equipa da Symington que sempre me fez sentir confortável e sempre se disponibilizaram para ajudar no que fosse preciso, em especial à Engenheira Rita Rama.

Às Doutoras Cristina Matos e Manuela Correia pelo apoio e orientação da tese, sempre que necessário.

Por último, à Marta, por me ter acompanhado desde o primeiro dia e me ter guiado nos piores momentos.

Sumário

O presente relatório foi feito no âmbito da unidade curricular "Dissertação/Estágio" do Mestrado em Engenharia Química – Ramo Qualidade, na Symington Family Estates, Vinhos, S.A..

Esta dissertação teve como objetivo a definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) em aguardente/brandy por microextração em fase sólida (SPME) no *headspace* (HS) e posterior análise por cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

Foram realizados estudos comparativos com métodos já em prática no laboratório, desenvolvidos para outras matrizes, e estudos de otimização das condições de extração de aguardente 40% (v/v), comparando as respostas obtidas para as diferentes condições de trabalho SPME. Para além disto, foi também estudado o fator de diluição da aguardente. Concluiu-se que seriam utilizadas as mesmas condições de trabalho do método DOC (Vinho do Porto), utilizando curvas de calibração diferentes, próprias de aguardente. Assim, obtiveram-se resultados satisfatórios com 25 minutos de tempo de extração, 5 minutos de dessorção, um teor alcoólico de 6,5% (v/v), obtido por diluição, e utilizando 50 µL de solução de 2,3,6-TCA (padrão interno).

Para validar o método foram realizados estudos de linearidade, da gama de trabalho, limiares analíticos, precisão, exatidão e incerteza. Para a gama de trabalho de 2,0 ng/L a 8,0 ng/L, os resultados demonstram uma boa linearidade, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,995, um limite de deteção de 0,13 ng/L e um limite de quantificação de 0,39 ng/L. Os testes realizados com amostras de Brandy 30% e 43% (v/v) demonstraram que o método é eficaz na análise de todas as bebidas espirituosas existentes na empresa.

Palavras-Chave: 2,4,6-TCA, 2,3,6-TCA, Brandy, Aguardente, Cromatografia gasosa, HS-SPME, Validação, Método.

Abstract

This report was carried out in the internship of the curricular unit "Dissertation/Internship" of the Master's in Chemical Engineering – Quality, at Symington Family Estates, Vinhos, S.A..

The main objective of this dissertation was to define and validate a method for the quantification of 2,4,6-Trichloroanisol (2,4,6-TCA) in brandy by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and analysis by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD).

Comparative studies on other methods currently in use at the lab, for other matrices, and on the optimization of the extraction conditions were performed, comparing the results obtained for different SPME work conditions. Besides this, the amount of dilution necessary for the analysis of brandy was studied. It was concluded that the same work conditions for the DOC method (Port wine) would be used, using different calibration curves, for brandy. This way, satisfactory results were obtained with 25 minutes of extraction time, 5 minutes of desorption, an alcoholic content of 6.5% (v/v), after dilution, and using 50 µL of 2,3,6-Trichloroanisol (internal standard).

The method validation followed studies of linearity, work range, analytical thresholds, precision, accuracy, and uncertainty. For the work range of 2.0 ng/L to 8.0 ng/L, the results have shown good linearity, with coefficients of determination (R^2) higher than 0.995, a detection limit of 0.13 ng/L and a quantification limit of 0.39 ng/L. The tests performed on other brandy samples with 30% and 43% (v/v) demonstrated that the method is effective in analyzing all the spirits existing in the company..

Keywords: 2,4,6-TCA, 2,3,6-TCA, Brandy, Gas Chromatography, HS-SPME, Validation, Method.

Índice

1 Introdução 1

1.1 Enquadramento 1

1.2 Symington Family Estates Vinhos, S.A. 1

1.3 Organização da dissertação 2

2 Estado da arte 3

2.1 Aguardentes e Brandy 3

2.2 2,4,6-Tricloroanisol (2,4,6-TCA) 4

2.3 Determinação de 2,4,6-TCA em aguardente/brandy 7

2.4 Microextração em fase sólida (SPME) 8

2.5 Cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD) 12

3 Validação de métodos analíticos 15

3.1 Avaliação Indireta 16

3.1.1 Identificação 16

3.1.2 Especificidade e seletividade 16

3.1.3 Sensibilidade 16

3.1.4 Limiares analíticos 17

3.1.5 Linearidade e gama de trabalho 17

3.1.5.1 Linearidade 18

3.1.5.2 Gama analítica 19

3.1.6 Precisão 20

3.1.6.1 Repetibilidade 21

3.1.6.2 Reprodutibilidade 21

3.1.6.3 Precisão intermédia 22

3.1.7 Robustez 22

3.2 Avaliação direta 23

3.2.1 Exatidão 23

3.2.1.1 Materiais de Referência Certificados 24
3.2.1.2 Ensaios Interlaboratoriais 24
3.2.1.3 Testes comparativos 25
3.3 Controlo da qualidade 25
3.3.1 Controlo de qualidade interno 25
3.3.2 Controlo de qualidade externo 26
3.4 Estimativa da incerteza 26
3.4.1 Reprodutibilidade intralaboratorial 27
3.4.1.1 Padrões de controlo 27
3.4.1.2 Duplicados de amostras/amostras fortificadas 27
3.4.2 Efeito sistemático do método e do laboratório 28
4 Materiais e Métodos 30
4.1 Preparação de soluções 30
4.1.1 Solução de etanol 12% (v/v) 30
4.1.2 Solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L) 30
4.1.3 Soluções de 2,4,6-TCA (1 mg/L e 1 µg/L) 31
4.2 Preparação de soluções 32
4.2.1 Solução de limpeza (BL) 32
4.2.2 Padrões de calibração em matriz 32
4.3 Equipamentos 33
4.4 Microextração em fase sólida 35
5 Resultados 37
5.1 Estudo da viabilidade de utilização do método implementado para análise de rolhas 39
5.2 Estudo da viabilidade de utilização do método implementado para análise de vinhos 44
5.3 Curvas de Calibração 49
5.4 Carta de controlo 50

5.5 Validação da gama de trabalho 51

5.6 *Carryover* 51

5.7 Exatidão 51

5.8 Precisão 52

5.9 Incerteza 52

5.10 Validação para Brandy 30% e 43% (v/v) 53

6 Conclusão 54

Referências bibliográficas 56

Anexos 60

A. Exemplos de cálculo para preparação de soluções intermédias 60

B. Resultados 64

Índice de tabelas

Tabela 2.1-Estrutura química de alguns haloanisóis e respetivo limite de perceção sensorial [10] 6

Tabela 2.2-Propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA [13] 7

Tabela 4.1-Volumes usados para preparar as soluções com teor etanólico de 6,5% e 12% (v/v) a partir das diferentes de amostras 32

Tabela 5.1-Áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para matriz etanólica a 12% (v/v) 41

Tabela 5.2-Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras de aguardente diluídas até teor etanólico de 12% (v/v) 41

Tabela 5.3-Comparação dos valores obtidos de declive, ordenada na origem e R^2, nas curvas de calibração preparadas para o estudo da viabilidade do uso de matriz etanólica diluída até 12% (v/v) 44

Tabela 5.4-Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras de vinho DOC diluídas até teor etanólico de 6,5 % (v/v) 46

Tabela 5.5- Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras aguardente diluídas até teor etanólico de 6,5 % (v/v) 46

Tabela 5.6- Comparação dos valores obtidos de declive, ordenada na origem e R^2, nas curvas de calibração preparadas para o estudo da viabilidade do uso de matriz diluída até 6,5% (v/v) 47

Tabela 5.7-Curvas de calibração e respetivos coeficientes de determinação, desvios padrões, limites de deteção e de quantificação 49

Tabela 5.8-Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais 52

Tabela 5.9- Valores obtidos nos testes em Brandy 30% e 43% (v/v) pelo método em estudo 53

Tabela A.1-Valores de concentrações reais (ng/L) dos padrões de calibração para diferentes volumes de solução stock II µL 63

Tabela A.2-Dados da Curva de Calibração nº1 64

Tabela A.3-Dados da Curva de Calibração nº2 65

Tabela A.4-Dados da Curva de Calibração nº3 65

Tabela A.5-Valores utilizados para projeção da carta de controlo 67

Índice de figuras

Figura 2.1-Reação de biometilação realizada por fungos filamentosos [6] 5

Figura 2.2-Modelação computacional da molécula 2,4,6-TCA; Estrutura molecular (a); vista de topo (B) e vista lateral (c) da estrutura eletrónica, com as regiões de baixa energia potencial a azul e a vermelho as de alto potencial [11] 7

Figura 2.3-Configurações de SPME [16] 9

Figura 2.4-Diagrama esquemático de um aparelho SPME [18] 9

Figura 2.5-Modos de extração SPME: (A) extração direta; (B) headspace SPME; (C) SPME com membranas protetoras [16] 10

Figura 2.6-Parâmetros típicos a ter em consideração na otimização e desenvolvimento de um método de SPME [16] 11

Figura 2.7-Componentes de um sistema de cromatografia gasosa [19] 13

Figura 2.8-Detetor de captura de eletrões [19] 15

Figura 3.1-Esquema representativo da avaliação do fator desempenho, "z-score"[22] 24

Figura 4.1-Vials com a solução stock I de 2,4,6-TCA (1) e solução stock II de 2,4,6-TCA (II) 31

Figura 4.2-Amostras para análise 33

Figura 4.3-Micropipeta Scientific eVol 33

Figura 4.4-Micropipeta Gilson 1 a 10 mL 34

Figura 4.5-Cromatógrafo de gás com detetor de captura de eletrões Thermo Scientific Trace 1300 ECD 34

Figura 4.6-Programação da temperatura do forno 35

Figura 5.1-Cromatograma obtido para solução de branco, entre 12,55 min e 13,80 min 37

Figura 5.2-Cromatograma obtido para solução 2 ng/L 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA 10 µg/L para o intervalo de tempo entre 12,4 min e 13,80 min 37

Figura 5.3-Cromatograma obtido com solução 8 ng/L de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para o intervalo de tempo entre 12,5 min e 13,80 min 38

Figura 5.4-Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos para solução de branco, solução de 2,4,6-TCA 2 ng/L e 8 ng/L todas com 10 µg/L de 2,3,6-TCA 38

Figura 5.5-Cromatograma obtido para solução etanólica a 12% (v/v) com 2,4,6-TCA 3,5 ng/L e 2,3,6-TCA 10 µg/L 40

Figura 5.6-Cromatograma obtido para uma amostra de aguardente diluída a 12% (v/v) de etanol com 2,4,6-TCA 3,5 ng/L e 2,3,6-TCA 10 µg/L 40

Figura 5.7-Comparação entre as áreas de analito dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente 42

Figura 5.8- Comparação entre as áreas de padrão interno dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente 43

Figura 5.9- Razões de área obtidas de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente 43

Figura 5.10-Cromatograma obtido na análise de 2,4,6-TCA numa amostra de vinho com teor etanólico de 6,5% (v/v) 45

Figura 5.11- Cromatograma obtido na análise de 2,4,6-TCA numa amostra de aguardente diluída até teor etanólico de 6,5% (v/v) 45

Figura 5.12-Áreas de padrão interno dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método 48

Figura 5.13- Áreas de analito dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método 48

Figura 5.14- Razões de área obtidas de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método 49

Figura 5.15-Carta de controlo para os declives das retas de calibração 50

Figura A.1-Curva de Calibração nº1 64

Figura A.2-Curva de Calibração nº2 65

Figura A.3-Curva de Calibração nº3 66

Siglas e Acrónimos

CQE - Controlo de qualidade externo

CQI - Controlo de qualidade interno

ECD - *Electron Capture Detector*

EIL – Ensaios Interlaboratoriais

GC- *Gas Chromatography*

HS – *Headspace*

ISO – *International Standard Organization*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD - Limite de deteção

LQ - Limite de quantificação

MRC – Material de Referência Certificado

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

SPME - *Solid Phase Microextraction*

TCA - Tricloroanisol

u.a. - Unidades arbitrárias

1 Introdução

Neste capítulo são abordados o enquadramento do trabalho e a apresentação da empresa.

1.1 Enquadramento

Um dos principais desafios na indústria vinícola é a perda de qualidade do produto, sendo ele vinho, aguardente ou brandy, devido à presença de compostos nas rolhas ou noutros materiais em contacto, que conferem um odor a mofo ao produto. Um dos principais responsáveis por este efeito é o 2,4,6-Tricloroanisol.Têm sido realizados vários estudos para tentar perceber como, quando e onde é que este composto contamina o produto vinícola.

Nesta dissertação, será feito o estudo da definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-Tricloroanisol em aguardente/brandy por cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

1.2 Symington Family Estates Vinhos, S.A.

A Symington Family Estates Vinhos, S.A., é uma empresa de vinhos de consumo e vinhos do Porto, sendo um dos maiores produtores mundiais de vinho do Porto premium, o principal proprietário de vinhas no Alto Douro e um dos principais produtores de vinho de Portugal [1].

A família Symington, de origem britânica e portuguesa, está presente em Portugal há cinco gerações, desde o século XIX, no ano 1882, graças a Andrew James Symington. A empresa é gerida pela 4ª e 5ª geração da família, baseando-se num profundo compromisso com o povo de Portugal, as suas terras e os seus vinhos [1]. São proprietários de 26 Quintas no Douro, abrangendo um total de 2255 hectares, dos quais 1024 hectares são plantados com vinha. São também proprietários e gerem quatro das grandes casas históricas de vinho do Porto: Graham's, Cockburn's, Dow's e Warre's [1].

A Symington Family Estates tem como valores o respeito, a paixão, a excelência, a custódia e a liderança, tendo como missão produzir vinhos do Porto e vinhos excecionais que celebrem e preservem a singularidade de Portugal, contribuindo para um futuro mais positivo das regiões [1].

A Symington Family Estates orgulha-se de ser um membro da *Primum Familiae Vini*, uma associação internacional de algumas das famílias produtoras dos melhores vinhos da França, Alemanha, Itália, Portugal e Espanha, as "Leading Wine Families" [1].

1.3 Organização da dissertação

Esta dissertação está organizada em seis capítulos. No primeiro capítulo, faz-se um enquadramento do trabalho realizado e apresenta-se a instituição de acolhimento do estágio.

No capítulo 2, apresentam-se as bebidas espirituosas em que se pretende validar a metodologia e abordam-se as principais características do 2,4,6-TCA. De seguida, explicam-se as técnicas de extração utilizadas (HS-SPME) e o método de análise (GC-ECD).

O terceiro capítulo aborda como é feita a validação de um método analítico.

No capítulo 4 descrevem-se as soluções, os materiais e os equipamentos utilizados na realização deste trabalho.

Por último, nos capítulos 5 e 6, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, as conclusões finais e as sugestões de trabalhos futuros.

2 Estado da arte

Neste capítulo, são apresentadas as matrizes que foram avaliadas, o analito em estudo, o método de análise utilizado e, por último, a validação de métodos internos de ensaio e os seus parâmetros associados.

As matrizes analisadas foram duas bebidas espirituosas: a aguardente vinícola e o brandy. O analito em estudo é o 2,4,6-Tricloroanisol, que passará a ser abreviado por 2,4,6-TCA ao longo da dissertação.

O método de análise utilizado foi a cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD), sendo a preparação da amostra realizada por microextração em fase sólida por headspace (HS-SPME).

2.1 Aguardentes e Brandy

As aguardentes vínicas, obtidas após a destilação dos vinhos, são líquidos praticamente incolores e com um elevado teor alcoólico. Tradicionalmente, são armazenadas em quartolas de madeira, fundamentalmente de carvalho, onde envelhecem, adquirindo uma qualidade superior, traduzidas em cor, aroma e sabor característicos [2].

O aroma das aguardentes é um importante fator de qualidade, capaz de influenciar a aceitabilidade do produto, pelo consumidor. Por isso, o conhecimento dos fatores intervenientes no aroma, é um dos objetivos principais dos trabalhos de investigação nesta área [2].

Segundo o Decreto-Lei nº 390/86, a aguardente vínica é o produto, com um teor alcoólico máximo de 80% (v/v), a 20 ºC, à saída dos aparelhos de destilação, obtido por destilação exclusiva de vinho e/ou por redestilação de destilados de vinho. O mesmo decreto-lei diz que após um período de envelhecimento mínimo de dois anos, a aguardente passa a designar-se aguardente vínica velha [2].

O Regulamento CEE nº 1576, de 1989, permitiu reduzir o período mínimo de envelhecimento para um ano, ou para seis meses no caso de os recipientes apresentarem um volume inferior a 1000 litros e propôs também a designação de aguardente velha para brandy [2].

O *brandy* é uma bebida espirituosa produzida a partir da destilação do vinho, e é armazenada em cascos de madeira de carvalho. É produzida em várias regiões no mundo, sendo, globalmente, a quinta maior categoria de bebidas espirituosas. Pode ser

caraterizado consoante a área geográfica onde são produzidas as uvas, pelo tipo de uvas utilizadas, ou pelas técnicas de destilação e armazenamento praticadas [3].

De acordo com a legislação em vigor na União Europeia (Regulamento (CE) n.° 110/2008), o *Brandy* é uma bebida produzida a partir de vinho espirituoso, com ou sem a adição de vinho destilado no máximo até 94,8% (v/v), desde que o destilado não exceda um máximo de 50% do teor alcoólico do produto final. Tem de conter uma quantidade de substâncias voláteis iguais ou superiores a 1,25 g/L de álcool puro e também possuir um teor de metanol máximo de 2,0 g/L de álcool puro [3].

Sendo o Brandy um produto da destilação de vinho, não contém todos os compostos orgânicos e inorgânicos do vinho. Possui um perfil aromático complexo, com centenas de compostos voláteis identificáveis, alguns presentes nas uvas (aromas primários), nos vinhos (aromas de fermentação), no processo de destilação ou então provenientes do casco de madeira [3].

O efeito do 2,4,6-TCA no *Brandy* é descrito como sendo o de um aroma semelhante ao de uma noz. Pode ser percetível entre 5 a 30 minutos após consumido [3].

2.2 2,4,6-Tricloroanisol (2,4,6-TCA)

Os anisóis são compostos orgânicos que têm na sua estrutura um éter ligado a um anel aromático e a um grupo metilo. Assim, os haloanisóis são anisóis com halogéneos na sua estrutura, podendo ser constituídos por átomos de cloro, bromo, iodo ou flúor [4].

Os haloanisóis são os compostos responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos. A sua formação dá-se devido a um mecanismo de defesa de alguns microrganismos quando expostos a ambientes poluídos por halofenóis [4].

Os halofenóis são formados a partir de uma reação direta entre os produtos resultantes da degradação da lenhina e de açúcares com fontes de cloro presentes no meio ambiente, e/ou a partir de compostos organoclorados, que fazem parte da composição química de diferentes produtos (preservantes de madeiras, pesticidas, desinfetantes, etc.) [5].

Durante bastante tempo era incerta a forma como os haloanisóis se formavam na cortiça. Após alguns estudos, foi provado que a origem dos haloanisóis está na biometilação dos clorofenóis.

A biometilação, ou *O*-metilação, é um processo de destoxificação, um mecanismo de redução de toxicidade de compostos clorofenólicos (halofenol), onde se dá a conversão destes compostos aos respetivos éteres metílicos (haloanisol). Este mecanismo é levado a cabo por microrganismos que possuem a enzima clorofenol-*O*-metiltransferase, CPOMT (Figura 2.1) [4].

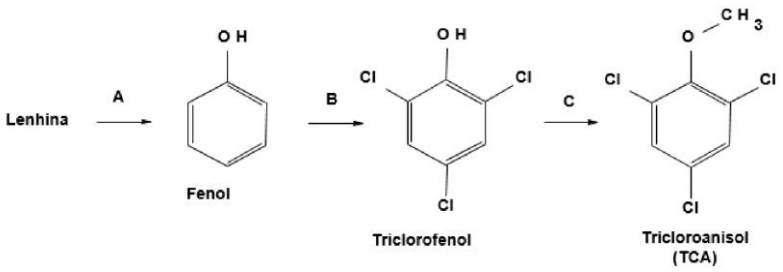
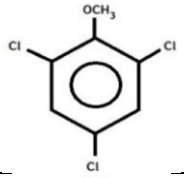
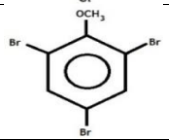
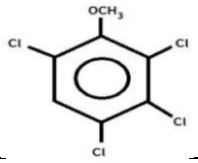
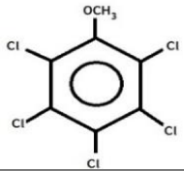


Figura 2.1-Reação de biometilação realizada por fungos filamentosos [6]

Os clorofenóis, devido ao facto de possuírem toxicidade para os animais e plantas, têm sido utilizados intensivamente, nas últimas décadas, como pesticidas e fungicidas, tornando-se num dos grupos mais importantes de contaminantes na biosfera. Atualmente, a sua utilização está proibida na União Europeia (UE). A sua toxicidade dá-se principalmente devido à ligação não específica destes compostos com moléculas biológicas [7,8].

Na cortiça podem ser encontrados vários haloanisóis que conferem um sabor a bolor ou mofo. Na Tabela 2.1 apresentam-se os haloanisóis mais encontrados no vinho. Destes, o 2,4,6-TCA é, sem dúvida, aquele que mais importância tem pela sua frequente presença em rolhas de cortiça [9].

Tabela 2.1-Estrutura química de alguns haloanisóis e respetivo limite de perceção sensorial [10]

Composto	Estrutura Química	Limite de deteção em solução alcoólica
2,4,6-Tricloroanisol (2,4,6-TCA)		1,5 a 3 ng/L
2,4,6-Tribromoanisol (2,4,6-TBA)		3,4 ng/L
2,3,4,6-Tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA)		5 a 15 ng/L
Pentacloroanisol (PCA)		Superior a 50 ng/L

O 2,4,6-TCA é um composto que não se degrada facilmente ao longo do tempo, mesmo em concentrações muito baixas. É muito volátil e pode facilmente migrar. O 2,4,6-TCA é não é tóxico nem perigoso para o ser humano. É um composto apolar com grande afinidade para os lípidos, tais como os que são encontrados na cortiça ou nas cutículas das plantas [4].

A molécula de 2,4,6-TCA é composta por três átomos de cloro, um anel benzénico e um grupo metóxido (grupo éter, -OCH_3). Através do estudo computacional da molécula é possível observar e compreender a sua estrutura eletrónica (Figura 2.2). Os três átomos de cloro com a sua eletronegatividade polarizam o anel benzénico induzindo-se nele uma carga positiva [11].

O TCA causa uma enorme depreciação no produto a consumir, mesmo apresentando concentrações que se quantificam na ordem de nanogramas por litro (ng/L) [12].

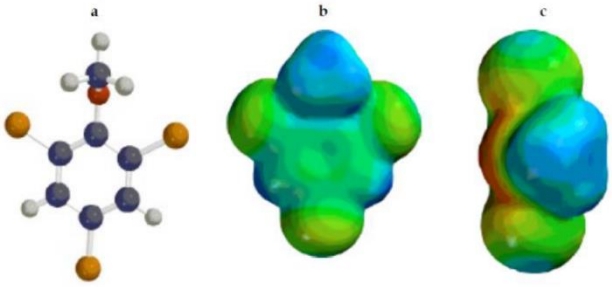


Figura 2.2-Modelação computacional da molécula 2,4,6-TCA; Estrutura molecular (a); vista de topo (B) e vista lateral (c) da estrutura eletrónica, com as regiões de baixa energia potencial a azul e a vermelho as de alto potencial [11]

Algumas das propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA encontram-se na Tabela 2.2 [4].

Tabela 2.2-Propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA [13]

Propriedade	Valor
Pressão de vapor	22,8 x 10^{-3} mmHg
Constante de Henry	130 atm cm^3mol^{-1}
Solubilidade em água	10 mg L^{-1}
Massa molar	211,47 g mol^{-1}
Ponto de fusão	60 a 62 °C
Ponto de ebulição	216 °C (a 760 mmHg)

A contaminação das rolhas de cortiça pode ser de origem intrínseca, no caso de ser contaminada durante o processo de crescimento da árvore, ou extrínseca, com origem na adsorção de 2,4,6-TCA do meio. Hoje sabe-se que a contaminação pode advir de diversas fontes extrínsecas tais como plásticos, cartão, papel, borracha, entre outros materiais [14].

Mesmo quando a cortiça não se encontra em contacto físico direto com uma fonte de contaminação, mas está em contacto com uma atmosfera contaminada, tem a capacidade de adsorver 2,4,6-TCA e posteriormente contaminar o produto. Neste caso a cortiça funciona como um transmissor da contaminação [15].

O 2,4,6-TCA é mais atraído para o etanol do que para a cortiça. Portanto, quando a cortiça contaminada com 2,4,6-TCA está em contacto com o etanol, as moléculas de 2,4,6-TCA separam-se da matriz da cortiça e passam para a solução de etanol [8].

2.3 Determinação de 2,4,6-TCA em aguardente/brandy

O procedimento analítico para determinação de 2,4,6-TCA em amostras complexas consiste em várias etapas que incluem, tipicamente, a amostragem, a

preparação das amostras, a separação, a quantificação, a avaliação estatística e a discussão dos resultados. Cada etapa é crucial para obter resultados precisos, exatos e informativos [16].

A etapa da amostragem obriga a decidir onde obter as amostras e escolher o método para as obter nas quantidades adequadas [16].

Na presente dissertação, a preparação das amostras foi feita por microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*). Esta etapa tem como objetivo isolar os componentes de interesse da matriz da amostra [16].

De seguida, os componentes dessa mistura complexa são separados por cromatografia gasosa (GC do inglês *gas chromatography*) e o analito de interesse é quantificado através de um detetor de captura de eletrões (ECD, do inglês *electron capture detector*).

2.4 Microextração em fase sólida (SPME)

As técnicas de microextração foram desenvolvidas não só para responderem à necessidade de reduzir o uso de solventes e de reduzir o tamanho da instrumentação de extração, mas também para explorar a habilidade desta técnica para tornar a preparação de amostras mais rápida e conveniente [16].

A SPME foi desenvolvida para garantir uma rápida preparação da amostra, tanto no laboratório como no próprio local de amostragem. Nesta técnica, uma pequena quantidade da fase de extração dispersa no suporte sólido é exposta à amostra por um período de tempo definido. Reduz o uso de solventes orgânicos e é muito simples. Tem, geralmente, um maior limite de deteção do que a extração em fase sólida (SPE) porque a extração não é exaustiva, e tem uma restrita gama de aplicações devido às dificuldades encontradas na análise de compostos hidrofílicos e não-voláteis [16,17].

Na Figura 2.3 estão representadas algumas formas possíveis de implementar a técnica de SPME, tais como fibras revestidas, mecanismos de discos agitados, recipientes, etc.

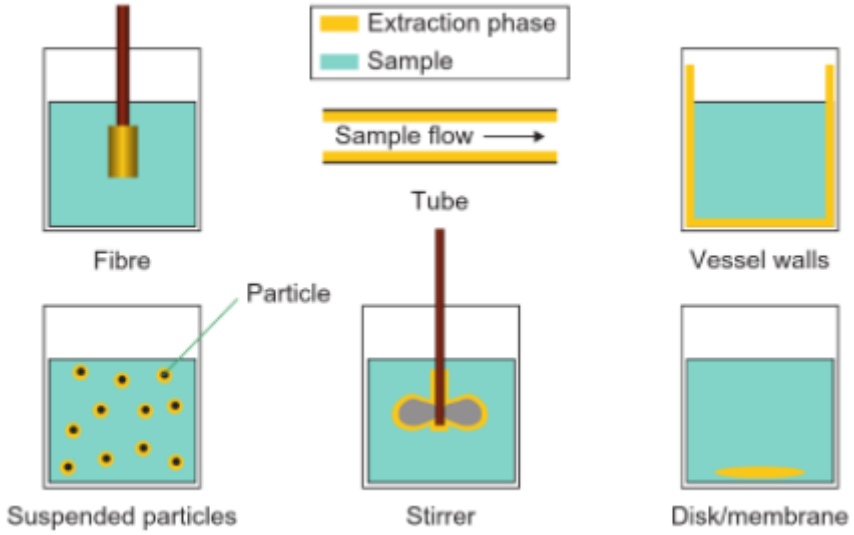


Figura 2.3-Configurações de SPME [16]

A técnica com fibra é a mais utilizada para SPME, atualmente. A fibra é exposta à amostra (gasosa ou líquida) até atingir o equilíbrio entre o analito na amostra e na fibra. O analito é então dessorvido da fibra, a uma elevada temperatura, no injetor e posteriormente analisado por CG. Na Figura 2.4 encontra-se um diagrama esquemático de um aparelho de SPME com fibra [16,17].

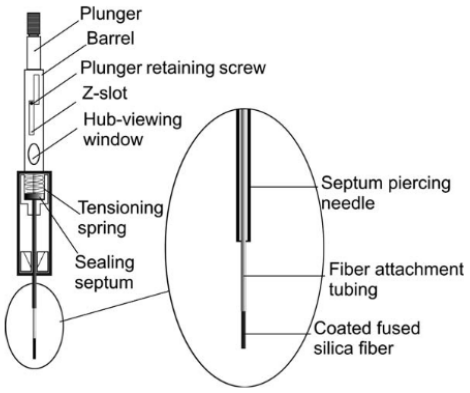


Figura 2.4-Diagrama esquemático de um aparelho SPME [18]

Existem três modos de extração quando se utiliza SPME em amostras líquidas: extração direta, extração *headspace* e extração com membranas protetoras (Figura 2.5).

Na extração direta, a fibra revestida é inserida diretamente na amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz da amostra para a fase de extração [16].

Na amostragem por *headspace*, a fibra é inserida no *headspace* acima da matriz aquosa. Apenas os analitos relativamente voláteis são extraídos. É também muito vantajosa para amostras com interferentes de elevado peso molecular [16].

O uso de membranas protetoras é adequado para amostras em que tanto o analito como os compostos interferentes de elevado peso molecular, são não voláteis [16].

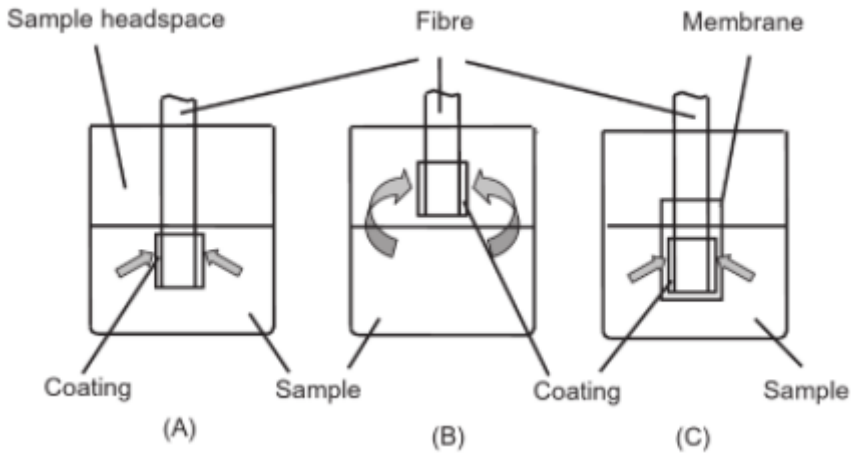


Figura 2.5-Modos de extração SPME: (A) extração direta; (B) headspace SPME; (C) SPME com membranas protetoras [16]

O processo SPME é um processo de equilíbrio de fases. No caso da HS-SPME, (*headspace* SPME), considera-se três fases: o revestimento da fibra, o *headspace* e a matriz homogénea. Durante a extração, os analitos migram entre as três fases até atingir um equilíbrio. Pela Equação 2.1 pode-se determinar as condições de equilíbrio de cada fase a partir de um balanço de massa, considerando que a massa total do analito se mantém constante durante toda a extração [16]:

$$C_0 \times V_A = C_F^{\infty} \times V_F + C_H^{\infty} \times V_H + C_A^{\infty} \times V_A \qquad \text{Equação 2.1}$$

Em que:

- C_0 é a concentração inicial do analito na matriz;
- $C_F^{\infty}, C_H^{\infty}$, e C_A^{∞} são as concentrações de equilíbrio do analito no revestimento da fibra, no *headspace*, e na matriz, respetivamente;
- V_F, V_H, e V_A, são os volumes do revestimento de fibra, do *headspace*, e da matriz, respetivamente.

Definindo as constantes de distribuição do analito entre a fibra e o *headspace* (K_{FH}) e entre o *headspace* e a matriz da amostra (K_{HA}), pelas equações 2.2 e 2.3, é possível calcular a quantidade de analito, *n*, absorvida pela fibra, através da equação 2.4 [16]:

$$K_{FH} = \frac{C_F^{\infty}}{C_H^{\infty}} \qquad \text{Equação 2.2}$$

$$K_{HA} = \frac{C_H^{\infty}}{C_A^{\infty}} \qquad \text{Equação 2.3}$$

$$n = \frac{K_{FH} \times K_{HA} \times V_F \times C_0 \times V_A}{K_{FH} \times K_{HA} \times V_F + K_{HA} \times V_H + V_A} \qquad \text{Equação 2.4}$$

Antes de proceder à técnica de SPME, é preciso analisar e seguir várias etapas que irão influenciar as condições de operação, tais como a seleção do revestimento da fibra, entre outras. Na Figura 2.6 apresentam-se alguns parâmetros que devem ser considerados.

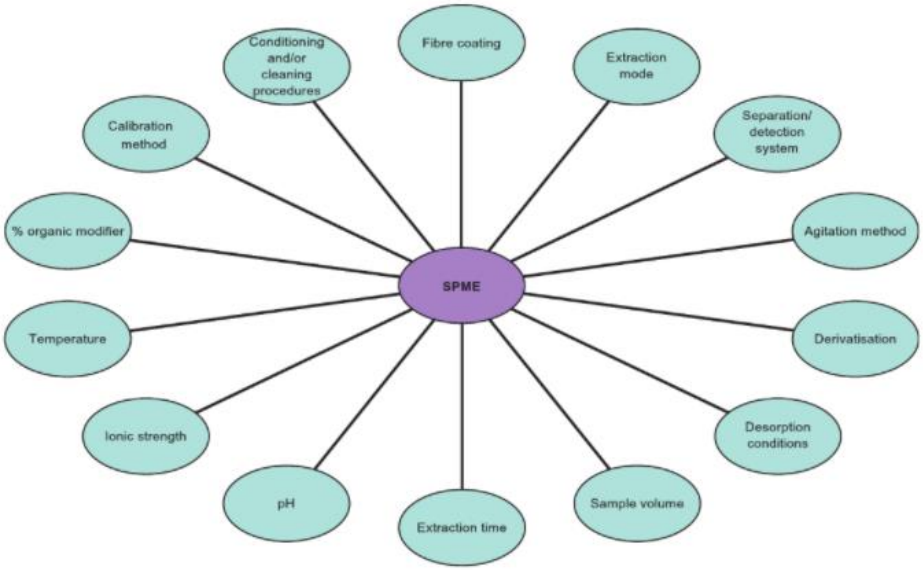


Figura 2.6-Parâmetros típicos a ter em consideração na otimização e desenvolvimento de um método de SPME [16]

Existem vários tipos de revestimento de fibra, variando na polaridade, na espessura da fase estacionária e no comprimento do revestimento, com boas seletividades para diferentes analitos. Geralmente, para analitos apolares é preferível uma fase de polidimetilsiloxano (PDMS), e para compostos polares uma fase de poliacrilato. Uma fase estacionária espessa é mais adequada para compostos voláteis, enquanto uma fase mais fina é mais eficiente para moléculas maiores [16,17].

O método de agitação escolhido pode reduzir o tempo necessário para atingir o equilíbrio. Consoante o tipo de aplicação, existem vários tipos de agitação tais como

agitação magnética, vibração da agulha, agitação vortex do frasco, ultrassons, entre outros. Cada um tem as suas vantagens e desvantagens [16].

O tempo de extração depende do coeficiente de partição do analito e da agitação da amostra, sendo, geralmente, mais curto para extrações em *headspace* [17].

A temperatura da amostra não deve ser elevada, exceto para acelerar a libertação dos analitos para a fase gasosa [17].

A força iónica pode ser aumentada adicionado um sal (NaCl, Na_2SO_4) à solução. Isto torna os compostos orgânicos menos solúveis, e os coeficientes de partição podem ser muito maiores. No entanto, pode haver uma perda da seletividade da fibra e a fibra torna-se mais quebradiça e, portanto, menos duradoura, em particular na extração direta [17].

2.5 Cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD)

A cromatografia é um método físico-químico de análise largamente empregado tanto na separação de compostos químicos como na identificação (análise qualitativa) e quantificação (análise quantitativa) das espécies separadas. De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel [19].

A cromatografia gasosa é um processo de separação em que a fase móvel é um gás, e a fase estacionária é um sólido (cromatografia gás-sólido) ou um líquido (cromatografia gás-líquido). Esta técnica permite a separação de gases ou substâncias orgânicas voláteis. A separação ocorre devido aos processos diferenciados de transferência de massa dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel. Ou seja, cada analito interage de maneira particular com a fase estacionária, influenciado por características físico-químicas, como pressão de vapor e forças intermoleculares [19].

O objetivo principal do gás de arraste é transportar a amostra através da fase estacionária sem alterar a sua estrutura e conduzi-la ao detetor com o mínimo de interferência possível. Deve ser de alta pureza, inerte e deve ser adequado ao tipo de detetor. Os principais gases de arraste são He, N_2 e H_2 [19].

Os principais componentes de um sistema de CG são o injetor, a coluna, o forno, o detetor e o sistema de aquisição de dados. A Figura 2.7 representa o exemplo de um esquema de um sistema de cromatografia gasosa [19].

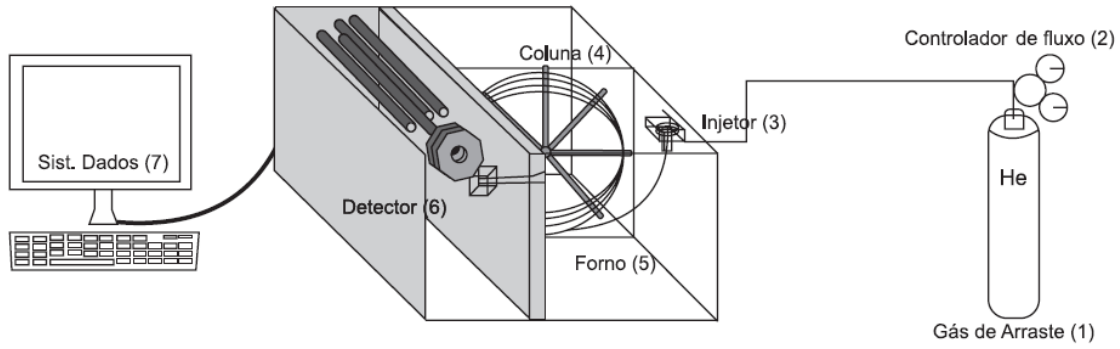


Figura 2.7-Componentes de um sistema de cromatografia gasosa [19]

O injetor é composto por vários componentes que integram o sistema de injeção: a seringa de injeção, o septo, e o *inlet liner*. A escolha adequada das condições e componentes do sistema de injeção proporciona uma maior reprodutibilidade e menores limites de deteção. Existem vários parâmetros que podem interferir no resultado da análise, tais como: a preparação da amostra, a escolha do solvente, as propriedades do analito, o tipo de seringa, a temperatura do injetor, o modo de injeção, entre outros [19].

A coluna deve ser escolhida de acordo com as propriedades do analito a ser analisado: polaridade, peso molecular, volatilidade, quantidade de analito na amostra. A sua capacidade em separar certos analitos, isto é, a sua seletividade, é determinada pelas interações físico-químicas dos analitos com a fase estacionária. Alguns fatores que influenciam a separação são a programação da temperatura do forno e o comprimento da coluna [19].

Um bom controlo da temperatura é essencial para a separação. O forno tem de ser robusto e ao mesmo tempo possuir um bom sistema de controlo para manter a temperatura programada e permitir um rápido aquecimento e arrefecimento [19].

O detetor de captura de eletrões (ECD) baseia-se na reação entre as espécies eletronegativas e os eletrões presentes para formar iões com carga negativa. A perda desses eletrões está relacionada com a quantidade de analito na amostra. O ECD é seletivo para compostos eletronegativos [19].

No interior do detetor, existe uma fonte radioativa de níquel (^{63}Ni) que emite eletrões (partículas beta), quando se encontrar à temperatura adequada (≈300 °C) [19].

Os eletrões primários (partículas beta) produzidos pela fonte radioativa (^{63}Ni) colidem com as moléculas de gás (normalmente nitrogénio) e dão início ao processo de ionização, com a formação de eletrões secundários e iões positivos, de acordo com a Equação 2.5 [19]:

$$\beta^- + N_2 \rightarrow N_2^+ + 2e^- \qquad \text{Equação 2.5}$$

Essa reação promove a formação de uma nuvem estável de eletrões na célula do detetor. A diferença de potencial aplicada (20-100 V) entre os elétrodos gera uma corrente elétrica, que é recolhida, convertida no sistema de dados e medida. Uma sequência de impulsos elétricos é aplicada de tempos em tempos para manter a corrente constante. Quando os compostos eletronegativos são eluídos da coluna, combinam-se imediatamente com alguns eletrões livres, reduzindo temporariamente a corrente, como se vê pela Equação 2.6 [19]:

$$A + e^- \rightarrow A^- \qquad \text{Equação 2.6}$$

Assim, a população de eletrões reduz-se e a sequência de impulso é aumentada para manter a corrente constante e igual inicialmente. Ao contrário de outros detetores, que medem um aumento do sinal, os detetores ECD medem a sequência de impulsos necessária para manter a corrente [19].

Para um detetor ECD é aconselhável utilizar He ou N_2 como gases de arraste. A utilização de outro gás, não apropriado, poderia reduzir a resposta do detetor e a vida da coluna devido à humidade e oxigénio. A sua sensibilidade e seletividade dependem da eletronegatividade do analito e podem ser afetadas por parâmetros operacionais e condições analíticas. É um tipo de detetor não destrutivo. Na Figura 2.8 encontra-se o esquema de um detetor de captura de eletrões [19]:

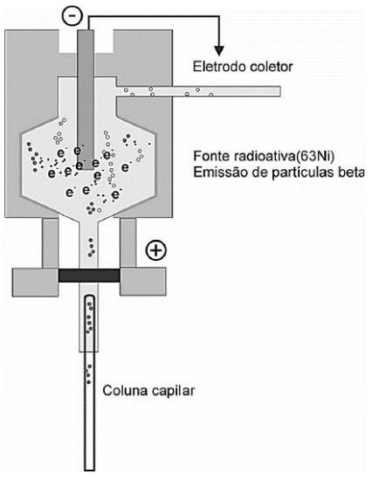


Figura 2.8-Detetor de captura de eletrões [19]

3 Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica, pelo que tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comités industriais e entidades reguladoras. Isso ocorre pela necessidade de uniformizar os critérios utilizados com o fim de demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida [20].

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios) o que, em algumas situações, pode alterar de forma significativa o valor do resultado final [20].

Pela norma NP EN ISO/IEC 17025, validação é a confirmação, através de exames e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos [20].

Segundo as recentes diretivas da IUPAC e da Conferência Internacional sobre a Harmonização, para que um método analítico seja validado completamente têm de ser avaliados nove parâmetros: identificação, especificidade e seletividade, sensibilidade, limiares analíticos, linearidade e gama analítica, precisão, exatidão, robustez e coerência [21].

O processo de validação do método pode ser dividido em dois grupos de avaliação: a avaliação indireta e direta. Para além disso, ainda envolve o controlo químico da qualidade, bem como a estimativa da incerteza [22].

3.1 Avaliação Indireta

A avaliação indireta corresponde à determinação e evidência dos parâmetros característicos do método [22].

3.1.1 Identificação

O ensaio de identificação tem como objetivo demonstrar a capacidade do método em identificar inequivocamente a presença ou ausência do analito na amostra, evidenciando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está diretamente relacionada com a presença do analito. O processo de identificação é feito através da comparação de uma propriedade da amostra com a mesma propriedade de um padrão de referência [23-25].

3.1.2 Especificidade e seletividade

A determinação destes parâmetros tem o interesse em perceber se existem interferências no método e a sua influência nos resultados, uma vez que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. A seletividade avalia a capacidade de um método identificar um analito e um número restrito de interferentes numa mistura complexa. A especificidade tem a capacidade de responder apenas a um analito de interesse presente numa mistura complexa [22].

Para averiguar o efeito de possíveis interferentes poder-se-á realizar um teste de recuperação, usando uma série de amostras com a mesma matriz, existindo apenas variação da concentração do analito em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.

3.1.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método ou de um equipamento para distinguir pequenas variações de concentração do analito. Corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de calibração. Pela equação 3.1, seguindo um modelo linear, a sensibilidade será constante em toda a gama de trabalho e corresponde ao declive (m) da reta de calibração.

$$Sensibilidade\ (m) = \frac{\Delta y}{\Delta x} \qquad \text{Equação 3.1}$$

em que a sensibilidade (m) é definida como o menor incremento da concentração do analito (Δx) necessário para dar origem a uma variação detetável no valor do sinal lido (Δy) [22].

3.1.4 Limiares analíticos

Os conceitos de limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) são muito importantes, uma vez que estes permitem que o analista trace os limiares analíticos possíveis de alcançar com o método a utilizar [22, 25, 26].

O limite de deteção corresponde à menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser fiavelmente distinguida do branco. Com uma dada confiança estatística, geralmente 95%, o limite de deteção corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra, indicando se o analito em questão está presente ou ausente [26].

O limite de deteção pode ser calculado mediante a expressão:

$$LD = \frac{3{,}3 \times s_{y/x}}{m} \qquad \text{Equação 3.2}$$

Onde $s_{y/x}$ corresponde ao desvio-padrão da curva de calibração e *m* representa o declive da reta de calibração [22].

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Em termos práticos, o LQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. Pode calcular-se pela expressão:

$$LQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{m} \qquad \text{Equação 3.3}$$

Onde $s_{y/x}$ corresponde ao desvio-padrão da curva de calibração e *m* representa o declive da reta de calibração [22].

3.1.5 Linearidade e gama de trabalho

A quantificação de um método analítico requer o conhecimento sobre a dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Esta relação é conseguida através da curva de calibração. Para realizar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados, é aconselhável o uso da norma ISO 8466-1 como referência para calibrações analíticas [22, 27].

3.1.5.1 Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade desse método em produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de trabalho.

A análise de correlação é uma forma de verificar a linearidade da curva de calibração. O coeficiente de correlação (*R*), definido pela Equação 3.4, estabelece a interdependência entre o sinal medido e a concentração do padrão correspondente, enquanto o coeficiente de determinação (R^2) traduz a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais, ou seja, a viabilidade explicada pelo modelo. Esta representação é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes, (x_i, y_i); … ;(x_N, y_N), que corresponde a *N* pontos da curva de calibração. $\bar{x}$ representa a média de valores de concentração dos padrões e $\bar{y}$ a média dos valores do sinal instrumental [22, 23, 27].

$$R = \frac{\sum_{i=1}^{N}\{(x_i-\bar{x})(y_i-\bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^{N}(x_i-\bar{x})^2\{\sum_{i=1}^{N}(y_i-\bar{y})^2\}]}} \qquad \text{Equação 3.4}$$

A avaliação da linearidade pode ser feita através de um modelo estatístico, conforme a norma ISO 8466-1. Partindo de um conjunto de pares ordenados, determina-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, tal como os respetivos desvios-padrão residuais, $S^2_{y/x}$ e $S^2_{y^2}$. Sendo *N* o número de padrões de calibração, a diferença das variações (DS^2) é calculada pela equação 3.5:

$$DS^2 = (N-2)S^2_{\underset{x}{y}} - (N-3)S^2_{y^2} \qquad \text{Equação 3.5}$$

O valor teste (TV) é dado pela equação 3.6:

$$TV = \frac{DS^2}{S^2_{y^2}} \qquad \text{Equação 3.6}$$

É feita a comparação entre o valor obtido e o valor tabelado da distribuição F de Fisher.

- Se $TV \leq F_{crit}$: a função de calibração é linear.
- Se $TV > F_{crit}$: a função de calibração não é linear. Neste caso deve-se averiguar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

Através do método dos mínimos quadrados, é possível chegar ao melhor ajuste dos pontos obtidos. No caso de a função linear possuir o melhor ajuste, a equação da reta é dada pela equação 3.7 [22]:

$$y = mx + b \qquad \text{Equação 3.7}$$

Em que:

- *y* - resposta dada pelo equipamento;
- *x* - concentração do analito;
- *m* - declive da reta;
- *b* - ordenada na origem.

3.1.5.2 Gama analítica

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão. É recomendado o uso da norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau [22, 27, 28].

O teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar a gama de trabalho, quando é utilizado um método que envolve a representação gráfica de uma curva de calibração. Segundo a norma ISO 8466-1, é recomendado utilizar dez pontos de calibração. O primeiro e último padrão são analisados através de dez réplicas independentes, realizando-se o teste de homogeneidade de variâncias da seguinte forma [22, 23, 27],

- Determinação das variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1 e S_N), de acordo com equação 3.8:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10}(y_i - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \qquad \text{Equação 3.8}$$

Sendo $\bar{y}_i$ dado pela equação 3.9:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \qquad \text{Equação 3.9}$$

Para *i* = 1 e *i* = 10.

i representa o número do padrão e *j* o número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas para averiguar se existe diferença significativa entre elas, nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste através das equações 3.10 e 3.11:

$$TV = \frac{S_N^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_N^2 > S_1^2 \qquad \text{Equação 3.10}$$

$$TV = \frac{S_1^2}{S_N^2}, \text{ quando } S_N^2 < S_1^2 \qquad \text{Equação 3.11}$$

Comparando o valor teste *TV* e o valor tabelado da distribuição *F* de Fisher, para *n-1* graus de liberdade:

- Se $TV \leq F_{crit}$: a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $TV \leq F_{crit}$: a diferença de variâncias é significativa e deve reduzir-se a gama de trabalho até que a diferença entre as variâncias permita obter $TV \leq F_{crit}$.

3.1.6 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas.

De acordo com as diretivas da Relacre e da *International Conference on Harmonisation* (ICH), a precisão pode ser avaliada de três formas [22, 29-31]:

- Repetibilidade;
- Reprodutibilidade;
- Precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial.

Geralmente, a precisão é expressa sob a forma de desvio-padrão (s) (equação 3.12) ou pelo coeficiente de variação (CV) (equação 3.13), onde $\bar{x}$ corresponde à média dos resultados:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad \text{Equação 3.12}$$

$$CV(\%) = 100 \times \frac{s}{\bar{x}} \qquad \text{Equação 3.13}$$

3.1.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade é expressa pela dispersão dos resultados e pode ser determinada a partir de um ensaio interlaboratorial ou então intraboratorial, em amostras de diferentes concentrações, tendo em conta a gama de trabalho, materiais de referência certificados (MRC) internos ou em soluções padrões. A sua determinação exige, no mínimo, 10 ensaios [22, 30, 32].

O limite de repetibilidade (*Δr*) é o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de repetibilidade, determinada para o nível de confiança de 95% (equação 3.14).

$$\Delta r = t^{u}_{0,05(m-1)} \times \sqrt{2} \times S_{ri} \qquad \text{Equação 3.14}$$

sendo *m* o número de réplicas que servem de base para determinar o desvio-padrão, S_{ri}, referente à repetibilidade estimada e $t^{u}_{0,05(m-1)}$ o valor crítico da distribuição *t*-Student, com um nível de significância de 0,05 e com *m*-1 graus de liberdade.

Também é importante considerar o coeficiente de variação de repetibilidade, CV_r, que é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da repetibilidade (S_{ri}) e a média dos resultados obtidos, $\bar{x}$, segundo a equação 3.15.

$$CV_r(\%) = 100 \times \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \qquad \text{Equação 3.15}$$

3.1.6.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade representa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições experimentais diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio numa mesma amostra, variando determinadas condições de medição, como, por exemplo, os operadores, os laboratórios, os equipamentos, o intervalo temporal.

Este parâmetro define a amplitude de erros aleatórios de quantificação a uma escala transnacional e só pode ser estimado através de ensaios interlaboratoriais. O valor da variância associada à reprodutibilidade é determinado pela equação 3.16.

$$S^2_{Ri} = S^2_{Li} + S^2_{ri} \qquad \text{Equação 3.16}$$

em que S^2_{Ri} corresponde à variância da reprodutibilidade, S^2_{Li} à variância interlaboratorial e S^2_{ri} à variância da repetibilidade [21, 23].

O limite de reprodutibilidade (ΔR) corresponde ao valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios em condições de reprodutibilidade, determinada para o nível de confiança de 95% (equação 3.17).

$$\Delta R = t^{u}_{0,05(m-1)} \times \sqrt{2} \times S_{Ri} \qquad \text{Equação 3.17}$$

Também é importante considerar o coeficiente de variação de reprodutibilidade, CV_R, que é numericamente igual à razão entre o desvio-padrão da reprodutibilidade (S_{Ri}) e a média dos resultados obtidos, $\bar{x}$ (equação 3.18).

$$CV_R(\%) = 100 \times \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \qquad \text{Equação 3.18}$$

3.1.6.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia, também conhecida por variabilidade intralaboratorial, exprime a precisão estimada sobre a mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, dentro do mesmo laboratório, estabelecendo exatamente as condições que sofrem alterações, tais como os operados, os equipamentos ou o intervalo temporal. A precisão intermédia é determinada com base nos resultados de *t* padrões, que devem ser analisados em replicado, as mesmas *n* vezes, de acordo com a equação 3.19 [22, 31]

$$S_{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{t}\sum_{k=i}^{n}(y_{jk}-\bar{y}_j)^2}{t(n-1)}} \qquad \text{Equação 3.19}$$

em que $S_{precisão}$ corresponde ao desvio-padrão relativo da precisão intermédia, n ao número de réplicas, y_{jk} ao resultado replicado *k* (variando *k* entre 1 e *n*) do padrão *j* (variando *j* entre 1 e *t*) e $\bar{y}_j$ à média aritmética dos resultados de *n* ensaios realizados sobre o padrão *j*. Nesta equação é recomendo que o termo $t(n-1)$ seja ≥ 15 [22].

3.1.7 Robustez

A robustez de um método analítico corresponde à capacidade do método produzir o mesmo resultado, mantendo o seu desempenho analítico inalterável perante pequenas alterações das condições experimentais.

A avaliação da robustez e a verificação da influência de cada uma das variações nos resultados obtidos é feita através do teste de Youden. Este teste consiste na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra, efetuados segundo um plano de controlo de fatores (até um máximo de sete), suscetíveis de influenciar o processo.

Como fatores designam-se todos os parâmetros cujos efeitos se pretendem quantificar, através dos resultados de ensaios [22].

3.2 Avaliação direta

A avaliação direta pretende conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, ou seja, analisar a concordância entre o resultado fornecido pelo método de análise e o valor de referência aceite como verdadeiro [22].

3.2.1 Exatidão

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido pelo método de análise e o valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro. Este parâmetro, que está dependente de erros sistemáticos, pode ser estimado com base em análise de MRC, participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) e realização de ensaios de recuperação. Pode ser expresso através de [22]:

- Erro absoluto

O erro absoluto (Δ) é a diferença entre o valor exato (x) e o valor aceite como verdadeiro (x_v) (equação 3.20):

$$\Delta = x - x_v \qquad \text{Equação 3.20}$$

- Erro relativo

O erro relativo (RE) é o quociente entre erro absoluto e o valor aproximado (equação 3.21):

$$RE(\%) = \frac{x - x_v}{x_v} \qquad \text{Equação 3.21}$$

- Fator de desempenho

A utilização do fator de desempenho "*z-score*" permite quantificar a avaliação do desempenho obtido pelo laboratório, envolvendo o resultado obtido pelo método de análise em estudo (X_{lab}), o resultado aceite como verdadeiro (X_v) e o desvio-padrão entre os resultados obtidos por todos os laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial (s), de acordo com a equação 3.22 [22]

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \qquad \text{Equação 3.22}$$

O desempenho é avaliado segundo a escala de pontuação (Figura 3.1):

Figura 3.1-Esquema representativo da avaliação do fator desempenho, "z-score"[22]

- Erro normalizado

De acordo com a norma ISO 13528, o erro normalizado (E_n) é determinado pela equação 3.23 [33]:

$$E_n = \frac{X_i - X_{ref}}{\sqrt{u_i^2 - u_{ref}^2}} \qquad \text{Equação 3.23}$$

onde X_i é o valor obtido, X_{ref} é o valor referência, e u_i e u_{ref} são as incertezas expandidas.

- Percentagem de recuperação

Define-se pela quantidade de substância existente numa amostra que é extraída e possível de ser quantificada. Pode ser calculada pela equação 3.24:

$$Recuperação\ (\%) = \frac{valor\ quantificado}{valor\ real} \times 100 \qquad \text{Equação 3.24}$$

3.2.1.1 Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência certificados (MRC) apresentam um valor de uma determinada grandeza conhecida para um dado parâmetro, com uma incerteza associada a esse valor. Segundo o Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025, os MRC são "preparados por entidades reconhecidas, sendo atribuídos valores certificados e respetivas incertezas aos parâmetros" [34].

Os MRC estabelecem a rastreabilidade das medições químicas e permitem controlar a exatidão do método utilizado. Desta forma, poderão ser utilizados no processo de validação, na implementação ou como controlo de qualidade na utilização quotidiana [26].

3.2.1.2 Ensaios Interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais são uma ferramenta fundamental no controlo de qualidade externo, visto que asseguram a qualidade do resultado obtido pelo método. O fator de desempenho "z-score" permite quantificar a avaliação do desempenho obtido pelo laboratório [22].

Podem ser de vários tipos, consoante o objetivo final:

- Ensaio interlaboratorial de aptidão: avalia o desempenho dos laboratórios participantes, podendo funcionar como condição para a acreditação do laboratório. Os participantes optam pelo método que preferirem. São a melhor opção para evidenciar a exatidão dos resultados.
- Ensaio interlaboratorial de normalização: visa o estudo das caraterísticas de um método de análise (reprodutibilidade e repetibilidade). A utilização exclusiva do método em causa é uma exigência.

3.2.1.3 Testes comparativos

Os testes comparativos permitem estabelecer a comparação entre os resultados obtidos por um método interno de ensaio e os resultados de um método considerado como referência, além de serem uma opção mais económica. Este ensaio permite avaliar a exatidão do método interno face ao método de referência. Na prática baseia-se em usar ambos os métodos de ensaio, em separado, sobre as mesmas amostras, realizando análises em replicado [22].

3.3 Controlo da qualidade

Para além da validação do método analítico, deve ser realizado um controlo da qualidade que garanta que as condições de validade do método se mantêm. Qualquer análise química pode ser sujeita a manipulações que induzam a erros, tanto sistemáticos como aleatórios, que podem afetar significativamente o valor do resultado final. É, por isso, essencial a minimização das fontes de erros (designada por Garantia da Qualidade - GQ) e o controlo da sua ocorrência (designado por Controlo da Qualidade - CQ), com vista à garantia e melhoria da eficácia do Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) escolhido. A necessidade da avaliação periódica da exatidão dos resultados deve-se aos objetivos traçados pelo SGQ: garantia e controlo da qualidade dos resultados diários. Para tal, recorre-se ao controlo de qualidade interno (CQI) e ao controlo de qualidade externo (CQE) [22, 26].

3.3.1 Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno (CQI) dos métodos de ensaio corresponde ao conjunto de procedimentos realizados num laboratório para uma análise de rotina, tendo como objetivo o controlo da qualidade dos resultados obtidos à medida que as análises

são efetuadas. O sistema de CQI deve recorrer a determinadas ferramentas como, por exemplo [26]:

- Materiais de Referência Internos (MRI);
- Técnicas complementares de CQ de resultados, nomeadamente:
  - Análise de brancos em paralelo com amostras;
  - Uso de análises em duplicado;
  - Repetição de análises anteriormente efetuadas;
  - Ensaios de recuperação e fortificação de amostras;
  - Uso do método de adição de padrão;
  - Comparação de resultados obtidos por diferentes técnicas analíticas;
  - Correlação de resultados de características diferentes da mesma amostra;
- Tratamento estatístico de dados, como as cartas de controlo.

3.3.2 Controlo de qualidade externo

O controlo de qualidade externo (CQE) visa avaliar a exatidão dos resultados obtidos num determinado método de ensaio, através da participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) ou de materiais de referência certificados (MRC). Caso MRC e EIL não existam, o laboratório pode utilizar, como métodos alternativos de avaliação da exatidão ou evidência da comparabilidade dos resultados com outros laboratórios, os seguintes métodos:

- Padrões nacionais ou internacionais, devidamente reconhecidos pelo setor técnico;
- Comparação com métodos de referência;
- Ensaios em paralelo com outro laboratório acreditado.

A aceitação dos resultados baseia-se no erro percentual relativo [22, 26].

3.4 Estimativa da incerteza

Para demonstrar a fiabilidade de um método analítico e o cumprimento dos seus serviços, a sua validação passa sempre pela avaliação da incerteza global do método [35, 36].

A estimativa da incerteza é determinada com base na norma ISO 11352:2012, na qual é especificado um conjunto de procedimentos que permite aos laboratórios estimar a incerteza dos resultados utilizando uma abordagem que considera os dados de validação e controlo de qualidade dos métodos analíticos.

A incerteza do método é definida mediante a conjugação de duas componentes, a componente aleatória (precisão) e a componente sistemática (exatidão), que podem ser estimadas por várias abordagens.

3.4.1 Reprodutibilidade intralaboratorial

As estimativas das variações aleatórias (precisão) dos resultados das medições devem ser efetuadas sob as mesmas condições que são utilizadas quando a análise de rotina é realizada.

Para estimativa da componente de incerteza da precisão (reprodutibilidade intralaboratorial), u_{Rw}, podem ser considerados, pelo menos, dois tipos de abordagens, de acordo com a norma ISO 11352:2012:

- Padrões de controlo;
- Duplicados de amostras/amostras fortificadas.

3.4.1.1 Padrões de controlo

Como a componente da incerteza padrão a partir das cartas de controlo de amplitudes, $u_{r,range}$, normalmente apenas cobre a componente de repetibilidade, esta deve ser combinada com a incerteza padrão associada aos padrões de controlo, $u_{R_w,stand}$, para se obter uma estimativa real da reprodutibilidade intralaboratorial, de acordo com a equação 3.25:

$$u_{R_w} = \sqrt{u_{R_w,stand}^2 + u_{r,range}^2} \quad \text{Equação 3.25}$$

em que $u_{R_w,stand}$ corresponde à componente de incerteza associada aos padrões de controlo e $u_{r,range}$ à componente de incerteza das cartas de controlo de amplitudes.

3.4.1.2 Duplicados de amostras/amostras fortificadas

Neste caso, deverá ser combinada uma incerteza associada às variações dos duplicados, u_{R_w}, que se reflete na equação 3.26:

$$u_{R_w} = \sqrt{u_{r,range}^2 + u_{R_{w,bat}}^2} \qquad \text{Equação 3.26}$$

em que $u_{r,range}$ é componente de incerteza das cartas de controlo das amplitudes de duplicados de amostras e $u_{R_{w,bat}}$ é a componente de incerteza resultante da variabilidade entre duplicados.

3.4.2 Efeito sistemático do método e do laboratório

A veracidade do método corresponde à componente da incerteza dos efeitos sistemáticos (exatidão). A tendência sistemática pode ser estudada utilizando materiais de referência da matriz, ensaios interlaboratoriais, ensaios de recuperação, entre outras ferramentas de controlo de qualidade [36].

Neste trabalho foram consideradas como fontes de incertezas:

- A incerteza associada à interpolação de leitura da amostra na curva de calibração;
- A incerteza associada à diluição da amostra;
- A incerteza associada à precisão do método de ensaio.

A incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração é calculada através da equação 3.27:

$$u(curva) = \frac{S_{y/x}}{m} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\underline{y_0} - \underline{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^{N} (x_i - \bar{x})^2}} \qquad \text{(Equação 3.27)}$$

em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão;
- m é o declive da curva de calibração;
- N é o número de padrões da curva de calibração;
- n é o número de réplicas utilizadas na amostra;
- $\underline{y_0}$ é a resposta dada pelo equipamento para a amostra em causa;
- $\underline{y}$ é o valor médio das respostas dadas pelo equipamento para os padrões;
- x_i é a concentração dos padrões de calibração;
- $\bar{x}$ é o valor médio das concentrações dos padrões de calibração.

A incerteza associada à diluição da amostra determina-se segundo a lei da propagação de erros, calculada a partir da equação 3.28:

$$u(C) = C \times \sqrt{\left(\frac{u(reta)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(volume)}{V}\right)^2 \times 3} \qquad \text{(Equação 3.28)}$$

A incerteza da precisão calcula-se pela equação 3.29:

$$u(Precisão) = \frac{desvio\ padrão\ de\ n\ resultados}{\sqrt{n}} \qquad \text{(Equação 3.29)}$$

A determinação da incerteza padrão combinada consiste na combinação entre a incerteza padrão de precisão e a incerteza padrão de exatidão caso não sejam consideradas outras fontes de incerteza. É expressa segundo a equação 3.30 [36]:

$$u_{combinada} = \sqrt{u_{Curva}^2 + u_{precisão}^2} \qquad \text{Equação 3.30}$$

A incerteza expandida, U, corresponde à determinação global da incerteza, sendo o produto entre um fator de expansão, k, igual a 2, a um nível de confiança de 95%, e a incerteza padrão combinada, de acordo com a equação 3.33 [36]:

$$U = ku_{combinada} = 2u_{combinada} \qquad \text{Equação 3.31}$$

4 Materiais e Métodos

A metodologia analítica usada neste trabalho para determinação de 2,4,6-TCA foi HS-SPME combinada com GC-ECD. Neste capítulo serão descritas as preparações de todas as soluções utilizadas e de todos os ensaios, assim como as condições de trabalho do cromatógrafo, do detetor de captura de eletrões e da microextração em fase sólida.

4.1 Preparação de soluções

No estudo realizado foram utilizadas várias soluções em cada ensaio.

4.1.1 Solução de etanol 12% (v/v)

As soluções de etanol 12% (v/v) foram preparadas em bidões de 10 litros, sempre que necessário, pelos vários técnicos no laboratório. Foi seguido o procedimento indicado no manual de cromatografia. Lava-se, previamente, o recipiente com água do tipo II e, de seguida, adicionam-se 1200 mL de etanol absoluto (99% Vol. AGA) e 5000 mL de água tipo I. As medições são feitas em gobelés de plástico de 5000 mL, visto que não se trata de uma solução com concentração rigorosa. Segue-se uma homogeneização e por último adicionam-se 3800 mL de água tipo I, que é colhida na rede pública sendo filtrada por um desionizador de permuta iónica, uma coluna de resina e um filtro de 0,2 µm. A solução tem uma validade de 14 dias após a abertura e deverá ser devidamente identificada.

O exemplo de cálculo para a determinação do volume a utilizar da solução de etanol absoluto para a preparação da solução de etanol 12% (v/v) encontra-se no Anexo A.1.

4.1.2 Solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L)

No método de análise por cromatografia em fase gasosa, utiliza-se a solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L) como padrão interno. A preparação desta solução efetua-se a partir da diluição de solução comercial de 2,3,6-TCA de concentração 10 mg/L em ciclohexano (P.A.; Dr. Ehrenstorfer). O exemplo de cálculo necessário para saber o volume a utilizar da solução comercial de 2,3,6-TCA encontra-se no Anexo A.2.

Em primeiro lugar adiciona-se solução de etanol 12% (v/v) num balão volumétrico de 100,00 mL. Depois, utilizando uma micropipeta, introduz-se 100 µL da solução comercial de 2,3,6-TCA no balão, perfazendo o volume com a solução etanólica 12% (v/v).

A solução é depois armazenada em *vials* de 20 mL, no frigorífico, utilizando papel de alumínio para proteger da luz.

4.1.3 Soluções de 2,4,6-TCA (1 mg/L e 1 µg/L)

Para distinguir as duas soluções de 2,4,6-TCA, denomina-se a solução de concentração 1 mg/L como solução stock I, e a solução de concentração 1 µg/L como solução stock II.

A solução stock I é preparada a partir da solução comercial de 2,4,6-TCA de concentração 100 mg/L em metanol (P.A, Sigma-Aldrich), que se encontra disponível em ampolas de 1 mL. Utilizando um balão volumétrico de 100,00 mL, adicionou-se solução de etanol absoluto 99% (v/v) e de seguida transferiu-se a ampola com 1 mL da solução comercial de 2,4,6-TCA. Por fim, perfez-se o volume com a solução de etanol absoluto 99% (v/v). O exemplo de cálculo do volume a utilizar da solução comercial de 2,4,6-TCA encontra-se no Anexo A.3.

A solução stock II obtém-se a partir da diluição da solução stock I. O procedimento para a preparação da solução é semelhante ao da solução stock I, em que se utiliza um balão de 100,00 mL com solução de etanol 12% e pipeta-se o volume necessário de solução stock I, perfazendo o volume com a solução etanólica. O exemplo de cálculo do volume a utilizar da solução stock II encontra-se no Anexo A.4.

Por último, as soluções foram armazenadas no frigorífico, a solução *stock* I em *vials* de 20 mL e a solução *stock* II em *vials* de 1,5 mL, de modo a evitar perdas por volatilização quando abertos, e devidamente protegidos da luz envoltos em papel de prata. A Figura 4.1 apresenta fotografias dos *vials* para as soluções *stock I e II*.

Figura 4.1-Vials com a solução stock I de 2,4,6-TCA (1) e solução stock II de 2,4,6-TCA (II)

4.2 Preparação de soluções

Para cada ensaio é necessária a preparação de diferentes *vials* com diferentes soluções. Podemos dividir os diferentes *vials* por soluções de limpeza e padrões de calibração.

4.2.1 Solução de limpeza (BL)

Os *vials* de soluções de limpeza são constituídos por 10,0 mL de solução de etanol 12% (v/v). Têm como função limpar a fibra, no início e no fim de cada ensaio, e também verificar se a solução de etanol 12% não se encontra contaminada com 2,4,6-TCA ou 2,3,6-TCA. Estes *vials* são sempre marcados a cor verde.

4.2.2 Padrões de calibração em matriz

A recolha de amostra (brandy, aguardente) é feita diretamente a partir do armazém de líquidos, onde são armazenados e distribuídos os produtos para as linhas de produção. As amostras depois de abertas, são devidamente armazenadas durante 14 dias no laboratório. A preparação das amostras tem em conta o grau alcoólico. As amostras são diluídas até terem 12% (v/v) ou 6,5% (v/v) de teor etanólico. Na Tabela 4.1 encontram-se os volumes usados para preparar as diferentes soluções etanólicas a partir das diferentes amostras.

Tabela 4.1-Volumes usados para preparar as soluções com teor etanólico de 6,5% e 12% (v/v) a partir das diferentes de amostras

	Concentração inicial da amostra (%(v/v))	**Concentração final pretendida (% (v/v))**	**Volume de amostra a colocar no vial (ml)**	**Volume de água tipo I a colocar no vial (ml)**
Aguardente 40%	40	6,5	1,63	8,38
Brandy 30%	30		2,17	7,83
Brandy 43%	43		1,51	8,49
Aguardente 40%	40	12	3,00	7,00
Brandy 30%	30		4,00	6,00
Brandy 43%	43		2,79	7,21

As amostras são colocadas em *vials* de 10 mL, onde são adicionados 3 g de cloreto de sódio (NaCl). De seguida, utilizando a micropipeta, adicionam-se os volumes

adequados de amostra e de água tipo I. Por último, adiciona-se 50 µL de padrão interno, e o volume necessário de 2,4,6-TCA (10 µg/L). Na Figura 4.2 observam-se *vials* com várias amostras.

Figura 4.2-Amostras para análise

4.3 Equipamentos

A realização deste trabalho envolveu a utilização de três equipamentos essenciais: a micropipeta Gilson 1 a 10 mL (Figura 4.3), micropipeta Scientific eVol (Figura 4.4) com seringas de 50 µL e 500 µL, e o cromatógrafo de gás com detetor de captura de eletrões Thermo Scientific Trace 1300 ECD (Figura 4.5).

Figura 4.3-Micropipeta Scientific eVol

Figura 4.4-Micropipeta Gilson 1 a 10 mL

O cromatógrafo possui uma coluna capilar TG-5MS, que tem 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Figura 4.5-Cromatógrafo de gás com detetor de captura de eletrões Thermo Scientific Trace 1300 ECD

A programação de temperatura do forno utilizada no método cromatográfico foi a representada na Figura 4.6.

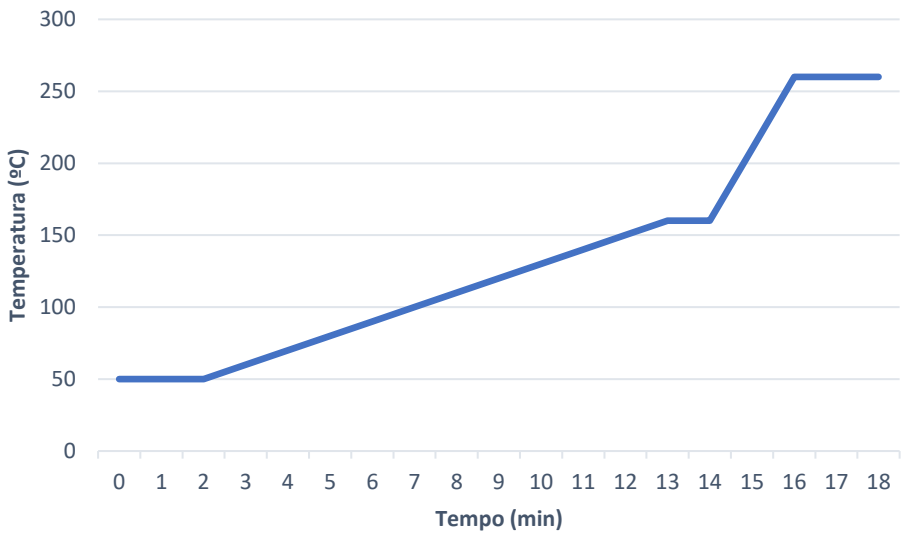


Figura 4.6-Programação da temperatura do forno

O método de quantificação utilizado é o método do padrão interno, que se baseia em adicionar uma quantidade conhecida de um composto, o padrão interno, a todas as amostras e soluções-padrão. Tem como principal vantagem poder eliminar possíveis variações de sinal do equipamento devido a alterações nas condições de análise. O sinal instrumental vem expresso pela razão entre as áreas do pico de 2,4,6-TCA e as áreas do pico de 2,3,6-TCA (padrão interno), sendo as concentrações obtidas expressas em ng/L.

4.4 Microextração em fase sólida

As condições operacionais usadas na SPME, realizadas num "autosampler" Supelco foram as seguintes:

- Fase estacionária: PDMS 100 µm (Supelco, Fused Silica, Autosampler);
- Temperatura de extração: 40 ºC;
- Tempo de extração: 25 minutos, sob agitação:
- Agitação: ciclos de 20 segundos com agitação e de 60 segundos sem agitação;
- Velocidade de agitação: 250 rpm;
- Temperatura de dessorção: 250ºC;
- Tempo de dessorção: 5 minutos;
- *Vials* de 10 mL com tampa roscada de septo.

As condições adotadas na SPME basearam-se nas descritas na norma ISO 20752:2014 - Rolhas – Determinação de 2,4,6-TCA, método implementado e utilizado no laboratório da empresa Symington.

5 Resultados

Neste estudo, optou-se por proceder à validação do método analítico para doseamento de 2,4,6-TCA utilizando apenas amostra de aguardente 40% (v/v), sendo no final avaliada a eficácia da metodologia com as outras bebidas espirituosas.

Da análise de vários cromatogramas de solução de branco e soluções com diferentes concentrações de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (10 µg/L) determinou-se o tempo de retenção do analito (2,4,6-TCA) e do padrão interno (2,3,6-TCA). Pelas Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3, que correspondem a cromatogramas de um branco, de uma solução 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA e uma solução 8,0 ng/L de 2,4,6-TCA, ambas com 10 µg/L de 2,3,6-TCA, conclui-se que o tempo de retenção do analito 2,4,6-TCA é de 12,96 minutos, e o do padrão interno 2,3,6-TCA de 13,58 minutos.

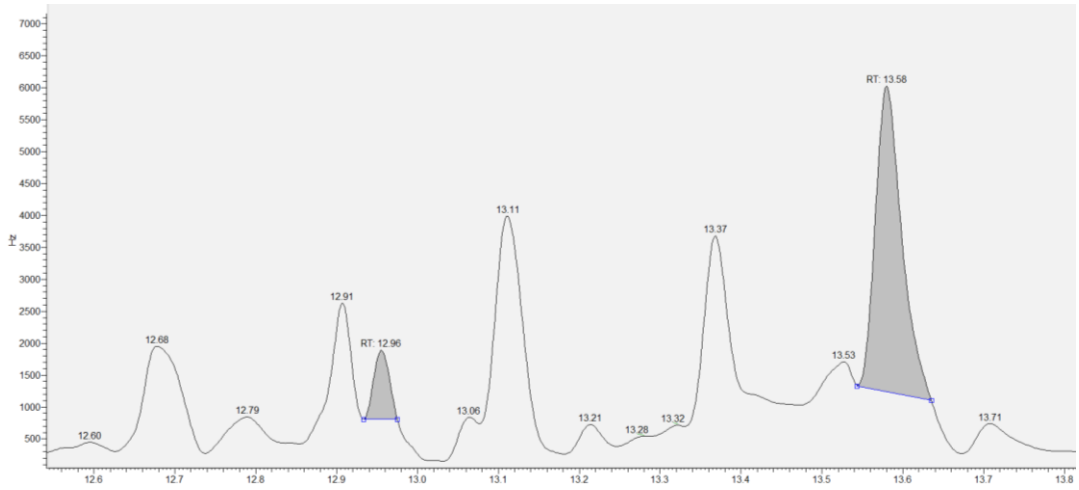


Figura 5.1-Cromatograma obtido para solução de branco, entre 12,55 min e 13,80 min

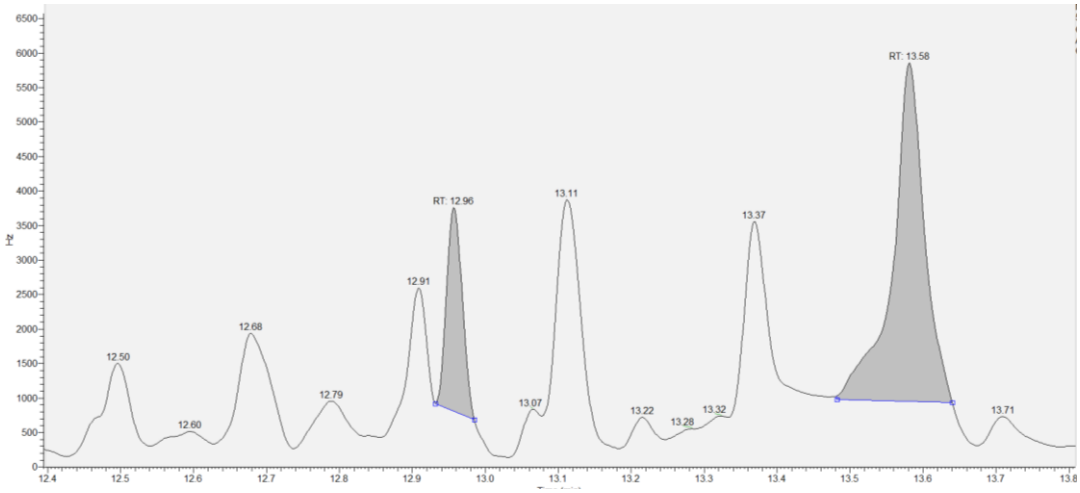


Figura 5.2-Cromatograma obtido para solução 2 ng/L 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA 10 µg/L para o intervalo de tempo entre 12,4 min e 13,80 min

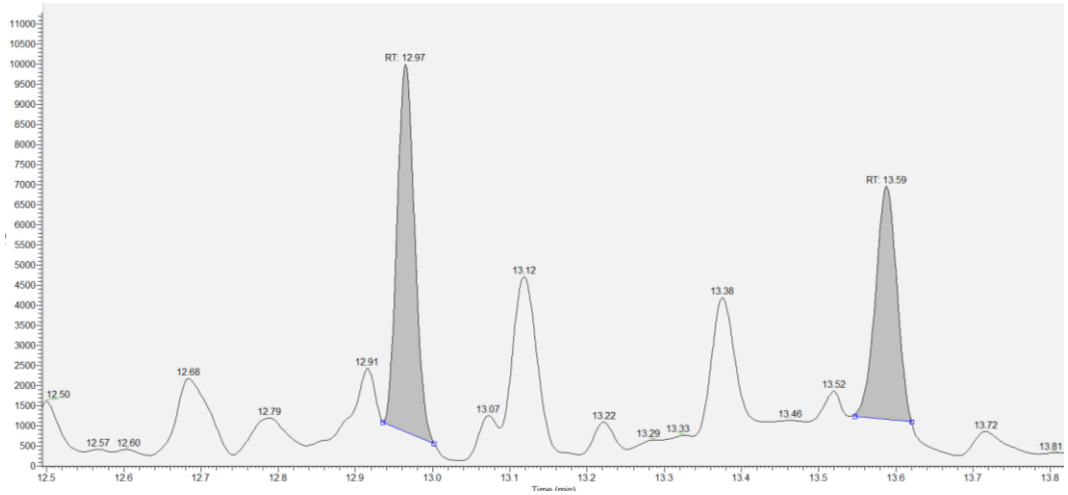


Figura 5.3-Cromatograma obtido com solução 8 ng/L de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para o intervalo de tempo entre 12,5 min e 13,80 min

Pela Figura 5.4, comparando as áreas dos picos cromatográficos nos tempos de retenção dos compostos, verifica-se que, para o padrão interno, as áreas se mantêm constantes nos três casos, e para o 2,4,6-TCA a área aumenta com a concentração do analito, o que reforça o referido anteriormente.

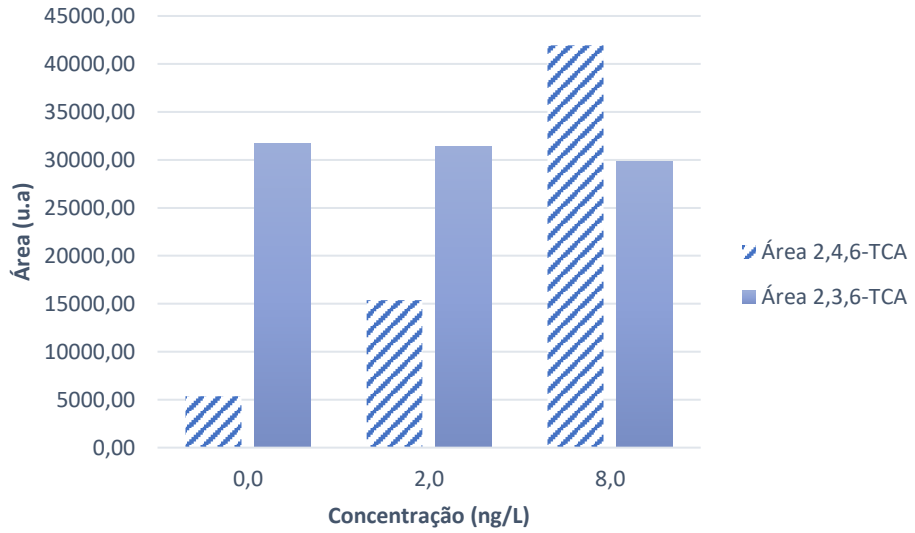


Figura 5.4-Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos obtidos para solução de branco, solução de 2,4,6-TCA 2 ng/L e 8 ng/L todas com 10 µg/L de 2,3,6-TCA

Não encontrando na literatura qualquer referência a um método para análise de 2,4,6-TCA em aguardente, partiu-se dos métodos já existentes no laboratório da empresa Symington, para quantificar 2,4,6-TCA. Este plano, para além de mais rápido, poderia poupar custos à empresa no uso de reagentes e no desgaste dos equipamentos. Assim, começou-se por tentar usar o método implementado para análise de 2,4,6-TCA noutras

situações: em rolhas e em vinho DOC. No primeiro usaram-se soluções etanólicas a 12% (v/v) e, no método DOC, utilizou-se uma matriz vínica de 6,5% (v/v) de etanol.

5.1 Estudo da viabilidade de utilização do método implementado para análise de rolhas

Neste estudo pretendeu-se verificar a possibilidade de usar o método desenvolvido no laboratório da Symington para análise de 2,4,6-TCA em rolhas e aplicá-lo na análise deste composto em amostras de aguardente diluídas até igualar o teor etanólico (12% (v/v)) mantendo as mesmas condições de trabalho de SPME, e a mesma quantidade de 2,3,6-TCA (10 µg/L) como padrão interno.

A preparação das amostras de matriz etanólica efetua-se adicionando 10 mL de solução etanólica 12% (v/v), 3 g de NaCl, 20 µL de padrão interno e a quantidade necessária de analito consoante a concentração desejada. As amostras de aguardente foram preparadas do mesmo modo, tendo sido necessário diluir as amostras de forma ao teor etanólico ser de 12%.

Este método utiliza as seguintes condições de extração:

- Fase estacionária: PDMS 100 µm (Supelco, Fused Silica, Autosampler);
- Temperatura de extração: 40ºC;
- Tempo de extração: 15 minutos, sob agitação:
- Agitação: ciclos de 20 segundos com agitação e de 60 segundos sem agitação;
- Velocidade de agitação: 250 rpm;
- Temperatura de dessorção: 250ºC.
- Tempo de dessorção: 2 minutos.
- *Vials* de 10 mL com tampa roscada de septo.

Nas Figura 5.5 e Figura 5.6, estão representados cromatogramas de uma solução etanólica a 12% (v/v) e uma solução de aguardente diluída de forma a conter 12% (v/v) de etanol.

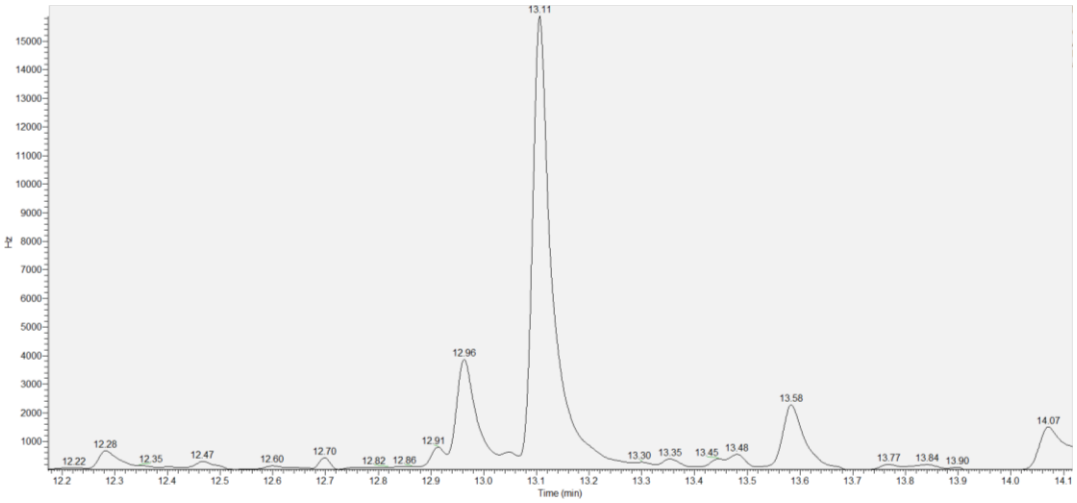


Figura 5.5-Cromatograma obtido para solução etanólica a 12% (v/v) com 2,4,6-TCA 3,5 ng/L e 2,3,6-TCA 10 µg/L

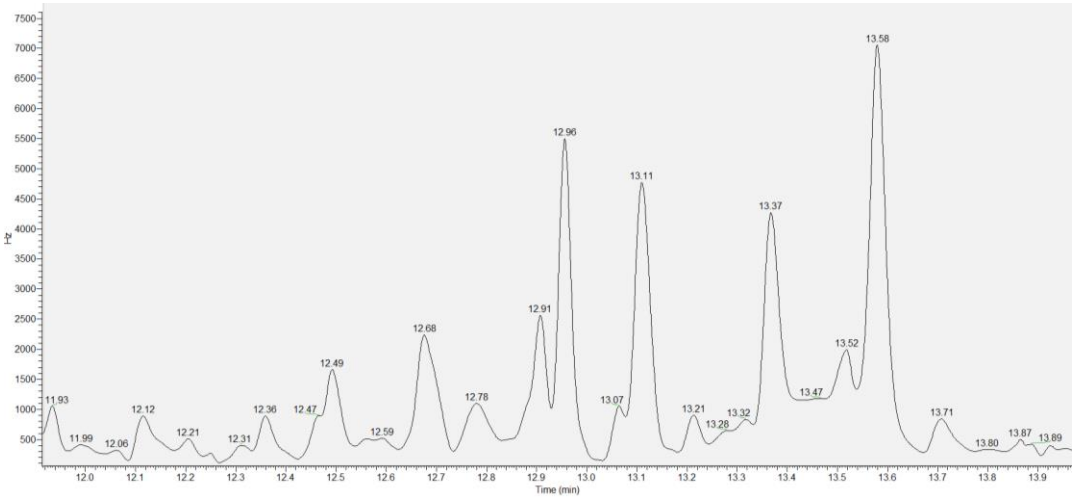


Figura 5.6-Cromatograma obtido para uma amostra de aguardente diluída a 12% (v/v) de etanol com 2,4,6-TCA 3,5 ng/L e 2,3,6-TCA 10 µg/L

Observa-se que, para os mesmos intervalos de tempo, o cromatograma correspondente à matriz aguardente apresenta muitos mais picos, sendo, no entanto, possível identificar os picos do 2,4,6-TCA e do 2,3,6-TCA nos tempos de retenção anteriormente identificados 12,96 minutos e 13,58 minutos, respetivamente.

Na Tabela 5.1 apresentam-se os valores obtidos para as áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA para as soluções usadas para traçar a curva de calibração em matriz etanólica a 12% (v/v).

Tabela 5.1-Áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para matriz etanólica a 12% (v/v)

Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	**Área 2,4,6-TCA (u.a)**	**Área 2,3,6-TCA (PI) (u.a)**	$\frac{Área\ 2,4,6-TCA}{Área\ 2,3,6-TCA}$
0,5	658,7	2851,3	0,23
2,5	1963,9	3198,0	0,61
3,5	2357,5	3014,4	0,78
4,5	3078,3	3177,6	0,97
5,5	3422,5	2989,9	1,14
7,5	4592,4	3047,2	1,51
9,5	6159,0	3264,6	1,89
	Média	3077,6	
	Desvio-Padrão	132,7	
	Desvio-Padrão Relativo (%RSD)	7,1	

Observa-se que o valor médio das áreas dos picos de padrão interno é de 3077,6 u.a. sendo o desvio padrão de 132,7 u.a. a que corresponde o desvio padrão relativo de 7,1%.

Na Tabela 5.2 encontram-se os valores obtidos efetuando a mesma análise para a aguardente diluída até conter 12% (v/v) de etanol.

Tabela 5.2-Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras de aguardente diluídas até teor etanólico de 12% (v/v)

Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	**Área 2,4,6-TCA (u.a)**	**Área 2,3,6-TCA (PI) (u.a)**	$\frac{Área\ 2,4,6-TCA}{Área\ 2,3,6-TCA}$
0,0	1349,6	5020,5	0,27
1,5	3611,2	6059,4	0,60
3,5	6156,1	5794,7	1,06
5,5	9903,6	5985,6	1,65
7,5	13401,7	5540,3	2,42
9,5	17290,4	5796,1	2,98
	Média	5699,1	
	Desvio-Padrão	345,5	
	Desvio-Padrão Relativo (%RSD)	17,4	

Comparando os valores das Tabelas 5.1 e Tabela 5.2, verifica-se que apesar das áreas de 2,3,6-TCA serem da mesma ordem de grandeza, para a matriz de aguardente os valores são superiores aos da matriz etanólica, possuindo um maior desvio-padrão de 345,5 u.a e um desvio-padrão relativo de 17,4%.

Assim, da análise das tabelas é ainda possível concluir que os valores das áreas de 2,4,6-TCA na matriz de aguardente são muito superiores aos das áreas do composto na solução etanólica. Nas Figuras 5.7 e 5.8 podemos comparar os valores das áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA, respetivamente, para ambas as matrizes (solução etanólica a 12% (v/v) e aguardente diluída a 12% (v/v)).

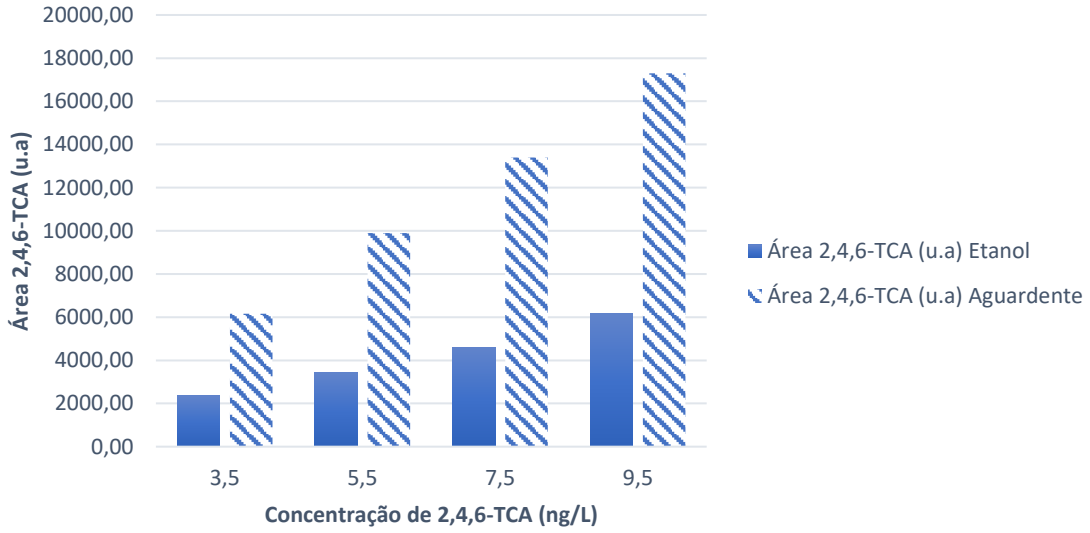


Figura 5.7-Comparação entre as áreas de analito dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente

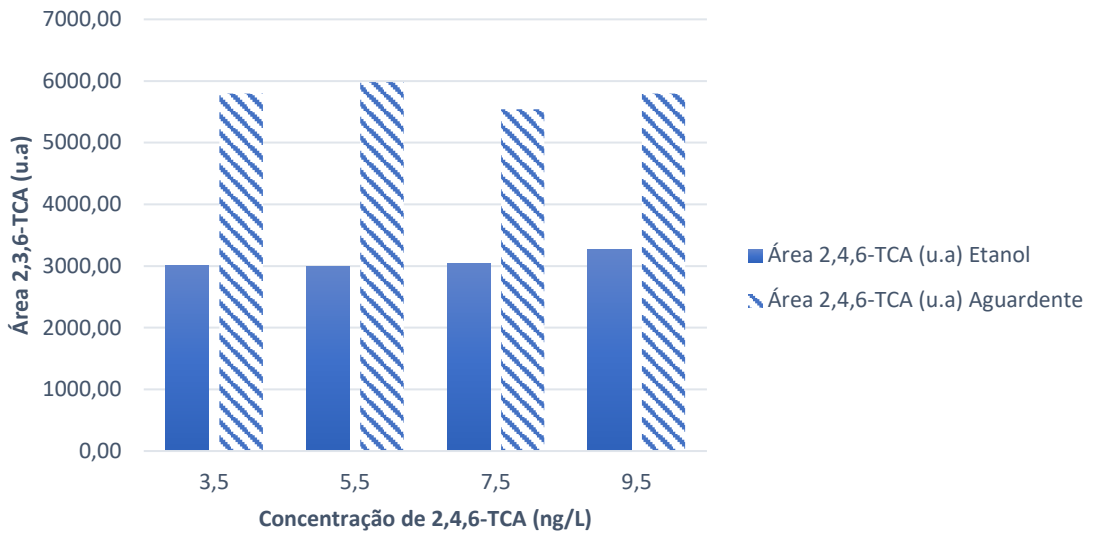


Figura 5.8- Comparação entre as áreas de padrão interno dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente

Por último, na Figura 5.9, registam-se os valores das razões das áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA em ambas as matrizes.

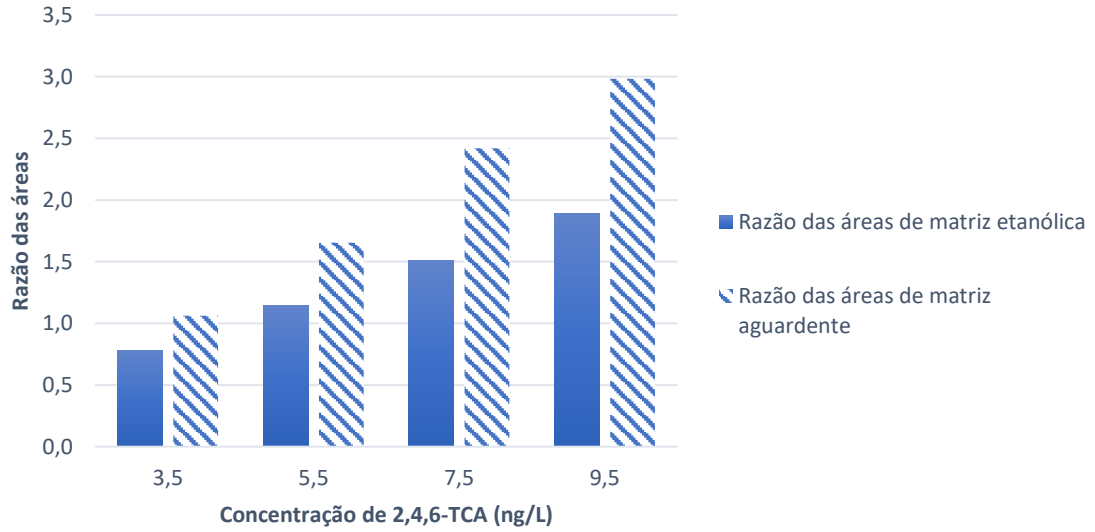


Figura 5.9- Razões de área obtidas de soluções padrão de 2,4,6-TCA 3,5, 5,5, 7,5 e 9,5 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L entre as matrizes etanólica e matriz aguardente

A diferença entre a razão das áreas é significativa em toda a gama de trabalho, sendo ainda mais notória para valores de concentração mais elevados.

Foram realizadas um total de quatro curvas de calibração na matriz aguardente para averiguar se seria viável utilizar as condições de trabalho. Pela Tabela 5.3 verifica-se que os valores dos declives e das ordenadas de origem não são coerentes entre si, pelo

elevado coeficiente de variação que apresentam. Individualmente, os valores de R^2 estão abaixo do aceitável (>0,995), com exceção do ensaio 4.

Tabela 5.3-Comparação dos valores obtidos de declive, ordenada na origem e R^2, nas curvas de calibração preparadas para o estudo da viabilidade do uso de matriz etanólica diluída até 12% (v/v)

	Ensaio 1	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**	**Ensaio 4**	**CV (%)**
Declive	0,0399	0,2508	0,2949	0,3492	58%
Ordenada na origem	0,0439	0,2345	0,1575	0,1784	38%
R^2	0,9928	0,9948	0,9914	0,9996	

Conclui-se então que para a aguardente analisada, não seria viável utilizar uma curva de calibração em matriz etanólica a 12%, pois não se verifica uma repetibilidade entre as curvas de calibração de amostra realizadas nestas condições de trabalho.

5.2 Estudo da viabilidade de utilização do método implementado para análise de vinhos

A preparação de amostras para uso de uma curva de calibração de matriz vínica (método DOC) é feita adicionando 10 mL do vinho diluído a 6,5% (v/v), 3 g de NaCl, 50 µL de padrão interno e a quantidade necessária de 2,4,6-TCA de acordo com a concentração pretendida. A preparação das amostras de aguardente para este método encontra-se no Anexo A.5. As condições de extração SPME foram as seguintes:

- Temperatura de extração: 40 ºC;
- Tempo de extração: 25 minutos;
- Agitação: ciclos de 20 segundos ligada e 60 segundos desligada;
- Temperatura de dessorção: 250 ºC;
- Tempo de dessorção: 5 minutos.

De seguida apresentam-se as Figura 5.10 e Figura 5.11 que ilustram, respetivamente, o cromatograma de um ensaio com matriz vínica (6,5% (v/v)) e um ensaio com matriz aguardente, para o mesmo nível de concentração de 2,4,6-TCA.

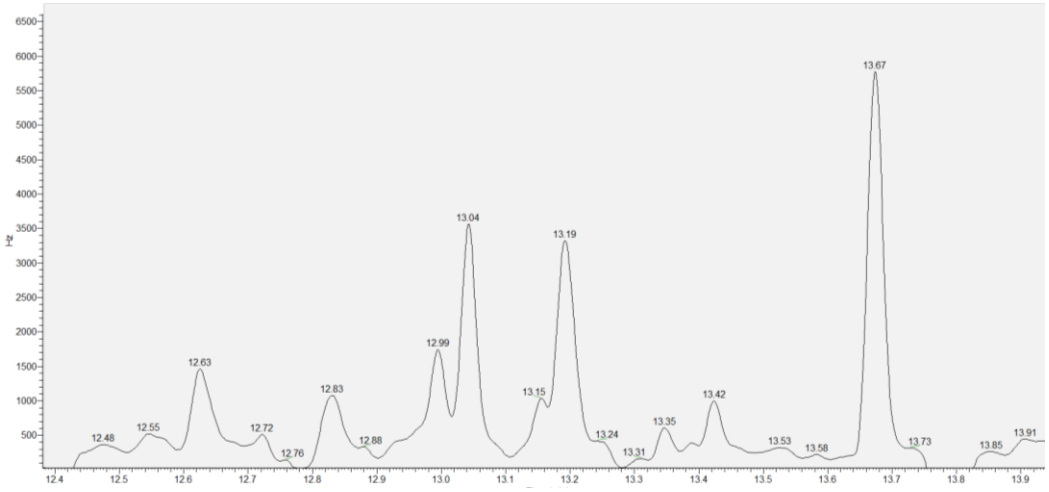


Figura 5.10-Cromatograma obtido na análise de 2,4,6-TCA numa amostra de vinho com teor etanólico de 6,5% (v/v)

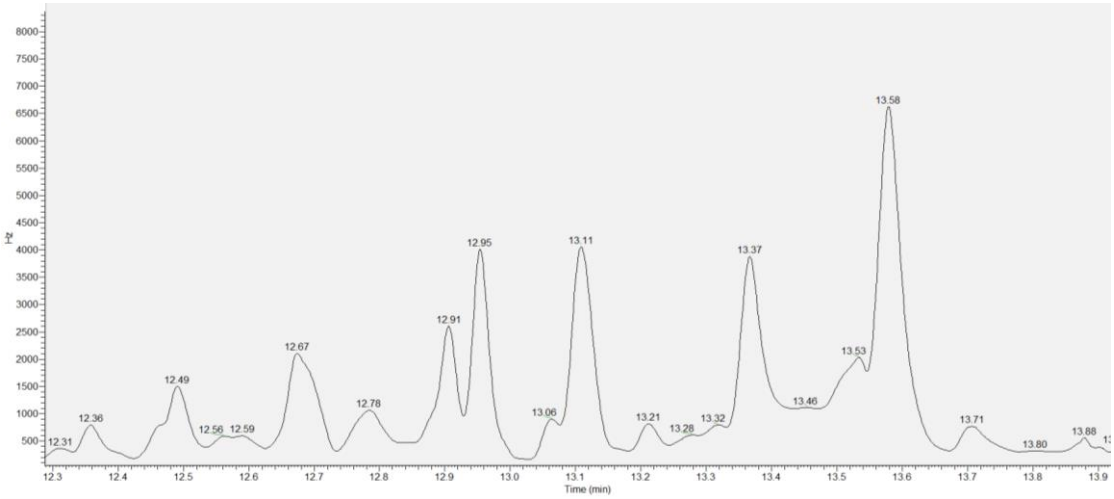


Figura 5.11- Cromatograma obtido na análise de 2,4,6-TCA numa amostra de aguardente diluída até teor etanólico de 6,5% (v/v)

Analisando o cromatograma de matriz aguardente, é possível identificar facilmente os picos de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA, apesar de existirem mais picos correspondentes a diferentes compostos do que os existentes no cromatograma de matriz vínica.

Na Tabela 5.4 apresentam-se os valores das áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA, utilizando matriz vínica a 6,5%, para os vários padrões de calibração.

Tabela 5.4-Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras de vinho DOC diluídas até teor etanólico de 6,5 % (v/v)

Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	**Área 2,4,6-TCA (u.a)**	**Área 2,3,6-TCA (PI) (u.a)**	$\frac{Área\ 2,4,6-TCA}{Área\ 2,3,6-TCA}$
0,0	2003,2	47808,4	0,04
2,0	3438,5	41826,2	0,08
3,5	5284,1	40779,0	0,13
5,0	6809,5	35259,8	0,19
6,5	10416,5	42152,8	0,25
8,0	11787,2	39037,2	0,30
	Média	41143,9	
	Desvio-Padrão	3765,9	
	Desvio-Padrão Relativo (%RSD)	6,5	

A média das áreas de padrão interno é de 41143,9 u.a. com um desvio padrão de 3765,9 u.a. e um desvio padrão relativo de 6,5%.

Na Tabela 5.5 estão representados os valores obtidos para a mesma análise em aguardente diluída até teor de etanol de 6.5%.

Tabela 5.5- Áreas dos picos cromatográficos de soluções de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações e contendo 2,3,6-TCA 10 µg/L para amostras aguardente diluídas até teor etanólico de 6,5 % (v/v)

Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	**Área 2,4,6-TCA (u.a)**	**Área 2,3,6-TCA (PI) (u.a)**	$\frac{Área\ 2,4,6-TCA}{Área\ 2,3,6-TCA}$
0,0	3562,18	26928,87	0,13
2,0	13116,93	31089,53	0,42
3,5	17986,54	28161,16	0,64
5,0	27812,91	31839,06	0,87
6,5	33972,49	30892,87	1,10
8,0	41468,25	31380,65	1,32
	Média	30048,69	
	Desvio-Padrão	1829,0	
	Desvio-Padrão Relativo (%RSD)	5,2	

Observa-se que as áreas de padrão interno são da mesma ordem de grandeza, apesar de menor valor do que no caso anterior. As áreas de 2,4,6-TCA são muito superiores, o que faz com que haja uma diferença nos valores das razões das áreas.

Ao realizar uma segunda curva de calibração verificou-se que os valores obtidos para os declives e ordenadas na origem eram próximos entre si. Assim sendo, realizaram-se, ao todo, cinco curvas de calibração para estudar a sua repetibilidade, sendo que os ensaios 3, 4 e 5 foram realizados com a gama de trabalho definida, como será mostrado no capítulo 5.3, enquanto que os ensaios 1 e 2 possuem menos níveis de concentração. Pela Tabela 5.6 observa-se que os valores de declive obtidos são muito próximos entre si, assim como as ordenadas na origem.

Tabela 5.6- Comparação dos valores obtidos de declive, ordenada na origem e R^2, nas curvas de calibração preparadas para o estudo da viabilidade do uso de matriz diluída até 6,5% (v/v)

	Ensaio 1 Curva 29-06-21	**Ensaio 2 Curva 09-07-21**	**Ensaio 3 Curva 16-07-21**	**Ensaio 4 Curva 19-07-21**	**Ensaio 5 Curva 26-07-21**	**%CV**
Declive	0,1515	0,1253	0,1512	0,1564	0,1526	1%
Ordenada na origem	0,1646	0,1201	0,1247	0,1748	0,1368	14%
R^2	0,9999	0,9998	0,9997	0,9996	0,9997	

Confirmada a repetibilidade das curvas de calibração, decidiu-se avançar com a validação do método, pois não seria possível utilizar as mesmas razões de área e curvas de calibração, utilizando as mesmas condições de trabalho SPME do método de matriz vínica 6,5%.

As Figura 5.12 e Figura 5.13 ilustram os valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos para as soluções de 2,3,6-TCA e de 2,4,6-TCA, respetivamente, para as diferentes concentrações de 2,4,6-TCA.

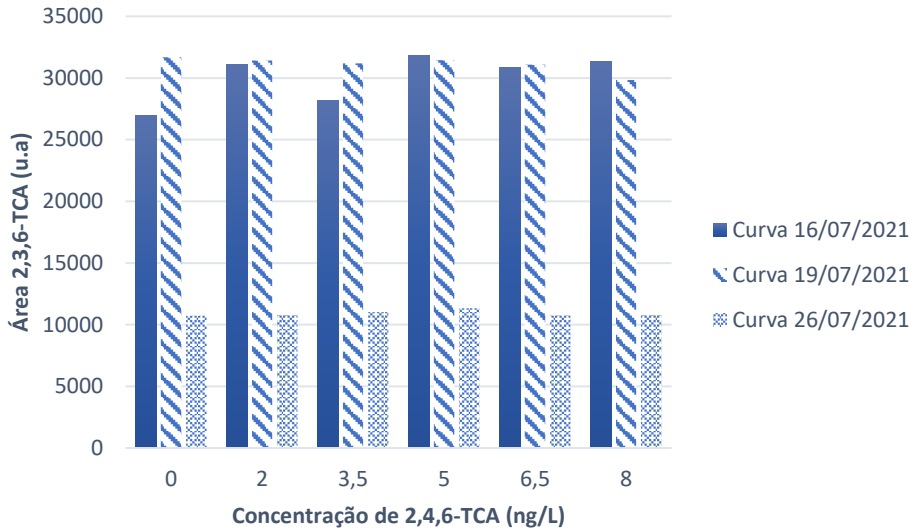


Figura 5.12-Áreas de padrão interno dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método

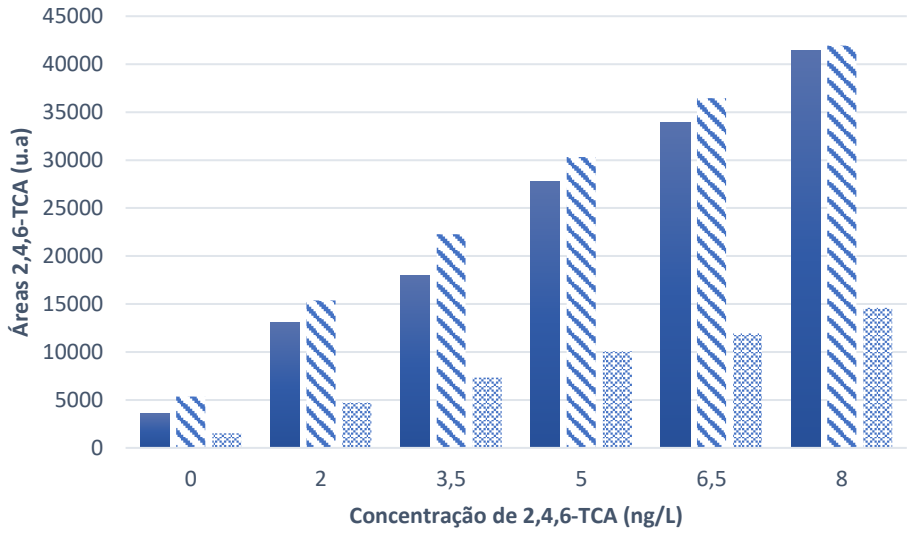


Figura 5.13- Áreas de analito dos picos cromatográficos obtidos de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método

Os resultados obtidos demonstram uma estabilidade e mesma tendência entre os valores das áreas de analito e de padrão interno, com exceção do terceiro ensaio, que apesar de mostrar valores mais baixos, apresenta o mesmo comportamento para as diferentes concentrações.

Por último, na Figura 5.14 estão apresentados os valores das razões das áreas.

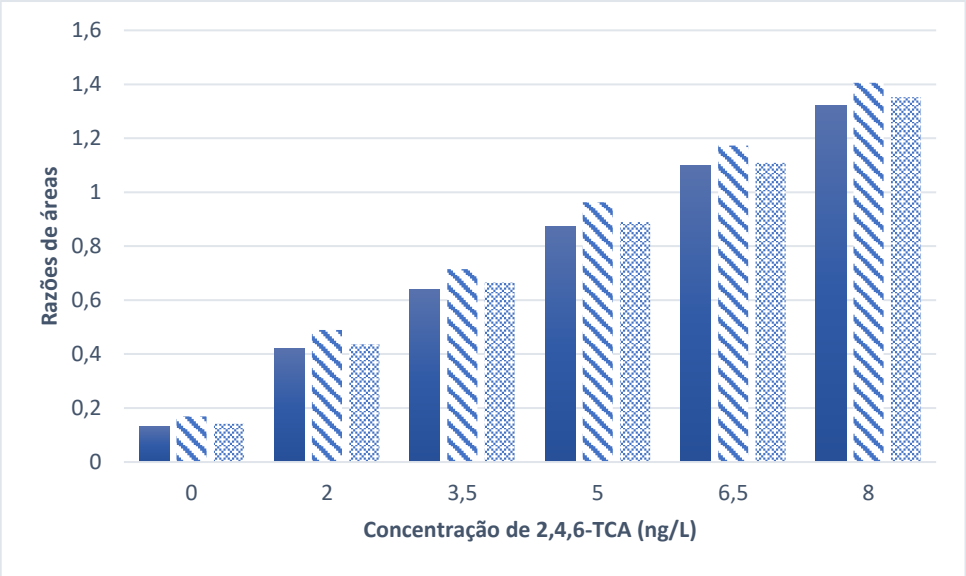


Figura 5.14- Razões de área obtidas de soluções padrão de 2,4,6-TCA 0,0, 2,0, 3,5, 5,0, 6,5 e 8,0 ng/L e de 2,3,6-TCA 10 µg/L para a matriz aguardente, pelo novo método

Verifica-se que, para o mesmo padrão de calibração, os valores são muito semelhantes e concordantes entre si. Deste modo, conclui-se que seria viável utilizar uma curva de calibração de solução aguardente com as condições de trabalho anteriormente referidas, para analisar os resultados.

5.3 Curvas de Calibração

Na Tabela 5.7 estão apresentadas as curvas de calibração realizadas, recorrendo ao método do padrão interno. Os padrões de calibração são amostras de aguardente diluídas a 6,5% (v/v), com fortificação de 2,4,6-TCA em 5 níveis diferentes de concentração, preparados em triplicado.

Tabela 5.7-Curvas de calibração e respetivos coeficientes de determinação, desvios padrões, limites de deteção e de quantificação

Equação da reta	**Coeficiente de determinação (R^2)**	**Desvio Padrão da Curva de Calibração ($S_{y/x}$)**	**LD (ng/L)**	**LQ (ng/L)**
$y = 0{,}1512x + 0{,}1247$	0,9997	0,0053	0,12	0,35
$y = 0{,}1564x + 0{,}1748$	0,9996	0,0068	0,14	0,44
$y = 0{,}1526x + 0{,}1368$	0,9997	0,0057	0,12	0,37

Analisando a Tabela 5.7 verifica-se uma boa linearidade, tendo todas as curvas coeficientes de determinação superiores a 0,9995, o que obedece ao critério de aceitação para uma curva (R^2 superior a 0,995).

Os valores dos declives são muito semelhantes entre si, apresentado um coeficiente de variação de 1%. Os valores das ordenadas na origem apresentam um coeficiente de variação de 14%, o que demonstra também valores aceitáveis.

Os valores dos limites de deteção e de quantificação foram calculados de acordo com equações B.1 e B.2, respetivamente (Anexo B.2). Observa-se que o valores do limite de quantificação estão abaixo do primeiro ponto da curva de calibração (2,0 ng/L). Tanto para os limites de deteção como de quantificação, os valores são muito próximos e concordantes entre si. Os valores de desvio-padrão $S_{y/x}$ são muito baixos e semelhantes.

5.4 Carta de controlo

Optou-se por traçar uma carta de controlo para os declives das retas de calibração, de modo a verificar se de facto se confirmava a repetibilidade das curvas de calibração ao longo de todos os ensaios. Na Figura 5.15 está representada a carta de controlo para os declives das retas de calibração. Os valores utilizados na preparação da curva encontram-se no Anexo B.3.

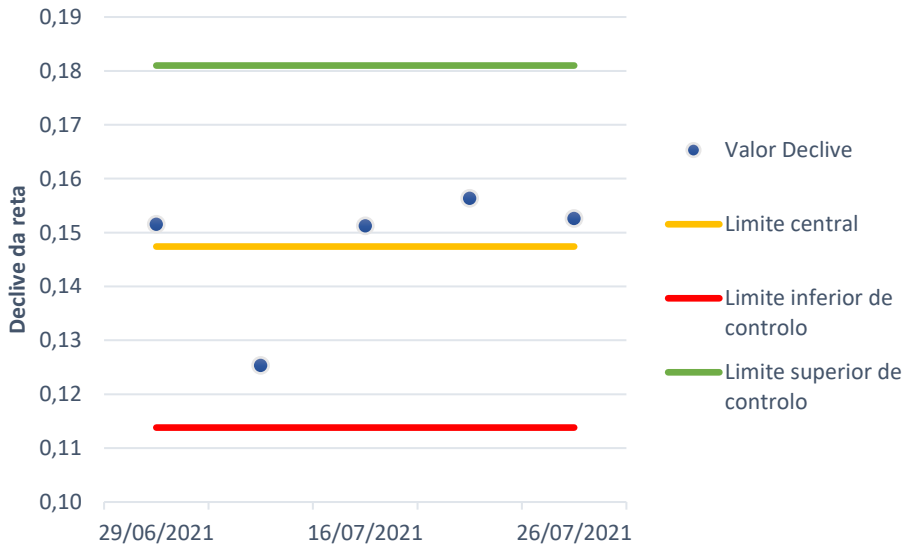


Figura 5.15-Carta de controlo para os declives das retas de calibração

Pela figura verifica-se que todos os pontos estão dentro dos limites de controlo.

5.5 Validação da gama de trabalho

Na validação da gama de trabalho foram preparadas dez soluções padrão independentes, com a concentração mais baixa e a mais elevada da curva de calibração, 2,0 ng/L e 8,0 ng/L de 2,4,6-TCA, respetivamente. No total foram feitos três ensaios para cada concentração. De seguida, analisaram-se os valores de coeficiente de variação para cada uma das concentrações.

Para a concentração 2,0 ng/L o valor de coeficiente de variação obtido foi de 4,3%. Para os 8,0 ng/L, obteve-se um coeficiente de variação de 2,8%. Sendo que estes valores são inferiores a 10%, limite estabelecido para não garantir variações significativas nos sinais obtidos, considera-se a gama de trabalho adequada [22].

No Anexo B.4 encontram-se os resultados obtidos para todos os ensaios.

5.6 *Carryover*

O estudo do efeito *Carryover* é realizado para verificar se não há arrastamento de 2,4,6-TCA na fibra, fruto de uma dessorção incompleta da mesma, que pode levar à contaminação de outras amostras numa mesma corrida. Para tal, são analisados 10 *vials* de soluções de branco, preparados apenas com a amostra, NaCl e padrão interno.

Os resultados obtidos demonstram que não existe arrastamento do analito, sendo que todos os resultados foram inferiores ao limite de deteção. No Anexo B.5 encontram-se os valores deste parâmetro.

5.7 Exatidão

A avaliação da exatidão do método foi feita a partir de ensaios de recuperação e ensaios interlaboratoriais.

Para os ensaios de recuperação procedeu-se à fortificação de amostras com concentrações de 2,0 ng/L, 5,0 ng/L e 8,0 ng/L em 2,4,6-TCA. Em primeiro lugar analisou-se cada amostra sem a fortificação de 2,4,6-TCA e, de seguida, analisou-se a mesma amostra fortificada. A recuperação foi determinada consoante a quantidade de analito adicionada à amostra e quantidade quantificada de acordo com a equação 3.24. O exemplo de cálculo encontra-se no Anexo B.6.

Na avaliação dos resultados seguiu-se o critério de aceitação definido pelo laboratório, que indica que a taxa de recuperação deverá estar compreendida entre 80% e 120%. A média dos valores obtidos foi 85%, estando dentro dos limites, portanto, conclui-

se que o método permite obter valores exatos. Os valores para estes ensaios encontram-se no Anexo B.6.

Na Tabela 5.8 encontram-se os resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais. Para os laboratórios B e C, os valores obtidos estão corrigidos pelo fator de diluição, sendo que nestes laboratórios a análise foi feita por GC-MS.

Tabela 5.8-Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais

Código	Valor referência (ng/L)	Valor obtido	Desvio padrão	Z-score
A		2,5		1,8
B	1,99	2,1	0,30	0,3
C		2,8		2,8
A		4,5		0,7
B	3,98	2,6	0,77	1,8
C		2,2		0,8

Verifica-se que os laboratórios A e B apresentam resultados aceitáveis, sendo os do laboratório C questionáveis.

5.8 Precisão

Na precisão foi avaliado o limite de repetibilidade, tendo por base os resultados do desvio padrão de 10 ensaios sobre uma mesma amostra, de forma consecutiva, tal como indicado no capítulo 3.1.6.1 [22, 30, 32]. O valor de limite de repetibilidade foi 0,24 ng/L, para concentrações de 2 ng/L, e de 0,62 ng/L para concentrações de 8 ng/L de 2,4,6-TCA. Sendo a diferença entre as várias réplicas sempre menor do que o limite de repetibilidade, considera-se o método preciso, para um nível de confiança de 95%. Os cálculos efetuados encontram-se no Anexo B.8

5.9 Incerteza

Neste parâmetro foi calculada a incerteza expandida, que tem por base todas as grandezas envolvidas num ensaio. Foram determinadas as seguintes incertezas:

- A incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração;
- A incerteza associada ao volume na preparação das amostras;
- A incerteza associada à precisão do método;
- A incerteza combinada.

O valor da incerteza expandida foi de 0,1 ng/L, para toda a gama de trabalho. O exemplo de cálculo para cada incerteza encontra-se no Anexo B.9.

5.10 Validação para Brandy 30% e 43% (v/v)

Após completar todos os parâmetros de validação do método, optou-se por verificar se seria possível quantificar 2,4,6-TCA também em Brandy 30% (v/v) e 43% (v/v), sendo diluídas até teor de etanol 6,5 %. Para tal, analisaram-se ambas as amostras, em triplicado, com diferentes níveis de fortificação de analito: 1,5 ng/l, 3,0 ng/L e 4,5 ng/L em 2,4,6-TCA. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.9.

Tabela 5.9- Valores obtidos nos testes em Brandy 30% e 43% (v/v) pelo método em estudo

Brandy 30 % (v/v)		**Brandy 43% (v/v)**	
Identificação do vial	**Concentração calculada (ng/L)**	**Identificação do vial**	**Concentração calculada (ng/L)**
B30_1,5_1	2,0	B43_1,5_1	1,6
B30_1,5_2	1,9	B43_1,5_2	1,6
B30_1,5_3	1,6	B43_1,5_3	1,6
B30_3,0_1	3,0	B43_3,0_1	3,6
B30_3,0_2	3,2	B43_3,0_2	3,4
B30_3,0_3	3,4	B43_3,0_3	3,3
B30_4,5_1	4,5	B43_4,5_1	4,5
B30_4,5_2	4,5	B43_4,5_2	3,0
B30_4,5_3	4,4	B43_4,5_3	4,6

Verifica-se que os resultados são positivos e muito próximos do esperado, o que significa que este método abrange todas as bebidas espirituosas existentes na empresa.

6 Conclusão

A realização deste trabalho teve como objetivo principal a implementação e validação de um método de análise de 2,4,6-Tricloroanisol em bebidas espirituosas, por microextração em fase sólida (HS-SPME) associada a cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

A estratégia escolhida passou por verificar a viabilidade do uso de um dos métodos já implementados e validados no laboratório, sendo eles o método de matriz etanólica (Rolhas) 12% (v/v) e o método de matriz vínica (DOC) 6,5% (v/v). Para cada um deles, foi necessário recorrer a curvas de calibração preparadas com aguardente 40% (v/v), posteriormente diluída, e ajustado o teor etanólico a cada uma das percentagens sendo depois estudada a viabilidade do uso de cada método, comparando cromatogramas obtidos para cada matriz, tempos de retenção do 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA como padrão interno, valores de área de pico para o padrão interno e razões de área dos picos cromatográficos do 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA.

Verificou-se que nenhum dos métodos cumpria os critérios de validade, mas os resultados obtidos a partir do método DOC (solução etanólica 6,5%) permitiam usar as condições operacionais de SPME, sendo necessário preparar novas curvas de calibração em matriz aguardente diluída de forma ao teor etanólico ser de 6,5% e validar.

A validação do método incluiu estudos de linearidade, gama de trabalho, *carryover*, precisão, exatidão e incertezas.

Na linearidade do método, as curvas de calibração realizadas apresentaram sempre coeficientes de determinação superior a 0,995 e RSD sempre inferiores a 20%. O coeficiente de variação dos valores de declive foi 1% e das ordenadas na origem de 14%. Os valores médios para os limites de deteção e de quantificação foram de 0,13 ng/L e 0,39 ng/L, respetivamente. Os pontos na carta de controlo dos declives de todas as curvas de calibração realizadas, encontravam-se dentro dos limites inferior e superior de controlo.

A validação da gama de trabalho utilizada, 2,0 a 8,0 ng/L de 2,4,6-TCA, apresentou resultados satisfatórios para os coeficientes de variação, sempre inferiores a 10%.

O teste de *carryover* provou que não havia qualquer arrastamento de 2,4,6-TCA da fibra entre amostras.

Na exatidão realizaram-se ensaios de recuperação e interlaboratoriais. Os ensaios de recuperação mostraram um valor médio das taxas de recuperação de 85%, estando dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório. Os ensaios interlaboratoriais obtiveram um *z-score* aceitável, sendo apenas um deles no limite do questionável.

A precisão apresentou um limite de repetibilidade de 0,24 ng/L para o padrão de calibração de 2 ng/L, e de 0,62 ng/L para o padrão de calibração de 8 ng/L.

A incerteza expandida do método, que envolve todas as fontes de incerteza intervenientes num ensaio, conduziu a um valor médio de 0,1 ng/L para toda a gama de trabalho.

Os testes em amostras de Brandy 30% e 43% (v/v) provam que o método é eficaz para detetar e quantificar 2,4,6-TCA em todas as bebidas espirituosas da empresa.

Conclui-se então que o objetivo pretendido neste trabalho foi alcançado, tendo a empresa um método válido que permite determinar 2,4,6-TCA em amostras de aguardente por HS-SPME-GC-ECD.

Sugere-se para trabalhos futuros a realização de ensaios interlaboratoriais com mais participantes, o estudo da precisão intermédia e da reprodutibilidade.

Referências bibliográficas

[1] "Symington Family Estates." https://www.symington.com/ (accessed Dec. 02, 2020).

[2] I. M. J. Caldeira "O aroma de aguardentes vínicas envelhecidas em madeira. Importância da tecnologia de tanoaria," Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia, 2004: DOI: 10.13140/RG.2.1.1858.4722

[3] A. Tsakiris, S. Kallithraka, and Y. Kourkoutas, "Grape brandy production, composition and sensory evaluation," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, no. 3, pp. 404–414, 2014: DOI: 10.1002/JSFA.6377.

[4] J. F. M. Coque, J.J.R.; Pérez, E.R.; Goswami, M.; Martínez, R.F.; García, S.C.; Rodríguez, M.L.A.; Martín, "Wine Contamination by Haloanisoles: Towards the development of biotechnological strategies to remove chloroanisoles from cork stoppers," *Inbiotec*, pp. 3–51, 2006.

[5] M. M. Rocha, "Apoio nas Atividades Laboratoriais de Controlo da Qualidade da Unidade Industrial de Sousa," Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química – Universidade do Porto. 2015.

[6] J. Sofia and F. Soares, "Caracterização do processo de cozedura SRCC e do período de estabilização pós-cozedura," Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Processos Químicos e Biológicos – Instituto Superior de Engenharia de Coimbra. 2013.

[7] G. Rasul Chaudhry and S. Chapalamadugu, "Biodegradation of halogenated organic compounds," *Microbiol. Rev.*, vol. 55, no. 1, pp. 101–111, 1991, DOI: 10.1128/MMBR.55.1.59-79.

[8] F. Janu, "O 2,4,6-tricloroanisol extraído de rolhas de cortiça para solução etanólica extraído de rolhas de cortiça para solução etanólica," Relatório de estágio de Mestrado - Universidade do Porto. Faculdade de Ciências, 2013.

[9] C. Q. Ribeiro, "Deteção individual de TCA: Implementação e validação de um sistema para análise de rolhas naturais e de champanhe," Relatório de estágio de Mestrado – Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, 2016.

[10] P. Neto, "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 para obtenção do Grau de Mestre em Método Instrumentais e Controlo da Qualidade Analítica – Universidade de Aveiro p. 129, 2005.

[11] M. Dinis, "Caso de Estudo: UI-Equipar . Procedimento de Amostragem de Aparas para Quantificação de 2, 4, 6-Tricloroanisol," Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica – Universidade de Lisboa, 2014.

[12] C. Pereira and L. Gil, "O Problema do Odor a Mofo nas Rolhas de Cortiça e Processos para a sua Redução/Eliminação," *Silva Lusit.*, vol. 14, no. 1, pp. 101–111, 2006.

[13] L. M. N. Gonçalves, "Avaliação de processos de redução/eliminação de TCA em amostras de cortiça," Dissertação para obtenção do Grau de Mestre Química - Universidade de Évora, 2014.

[14] D. L. Capone, G. K. Skouroumounis, D. A. Barker, H. J. McLean, A. P. Pollnitz, and M. A. Sefton, "Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 91–98, 1999, DOI: 10.1111/J.1755-0238. 1999.TB00292. X.

[15] D. A. Barker *et al.*, "Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 7, no. 1, pp. 40–46, 2001, DOI: 10.1111/J.1755-0238. 2001.TB00192. X.

[16] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 1ª. Elsevier, 2011 DOI: 10.1016/C2011-0-04297-7.

[17] H. Prosen and L. Zupančič-Kralj, "Solid-phase microextraction," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 18, no. 4, pp. 272–282, 1999, DOI: 10.1016/S0165-9936(98)00109-5.

[18] C. Camarasu, C. Madichie, and R. Williams, "Recent progress in the determination of volatile impurities in pharmaceuticals," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 25, no. 8, pp. 768–777, 2006, DOI: 10.1016/J.TRAC.2006.05.013.

[19] R. F. do Nascimento, A. C. A. de Lima, P. G. A. Barbosa, and V. P. A. da Silva, *Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos*. Fortaleza: Imprensa

Universitária (UFC), 2018.

[20] A. S. R. Mendes, "Implementação e Validação de Métodos Analíticos," Laboratório Regional de Controlo da Qualidade da Água, 2004.

[21] "Validation of Analytical Procedures: text and methodology," International Conference on Harmonisation, 2014.

[22] "Guia Relacre 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química," Lisboa, 2000.

[23] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 835–855, 2002, DOI: 10.1351/PAC200274050835.

[24] J. K. Taylor, Quality Assurance of Chemical Measurements, CRC Press. 1987.

[25] F. Leite, Validação em Análise Química, 5ª. Campinas: Átomo, 2008.

[26] "Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos - OGC 002," IPAC, 2011.

[27] "ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function," International Standard Organization, 1990.

[28] "ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 2: Statistical strategy for non-linear second-order calibration functions," International Standard Organization, 2001.

[29] "ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions," International Standard Organization, 1994.

[30] "ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method," International Standard Organization, 1994.

[31] "ISO 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and

results — Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method," International Standard Organization, 1994.

[32] "ISO 5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 6: Use in practice of accuracy values," International Standard Organization, 1994.

[33] A. Raizer and M. P. Fonseca, "Utilização de célula GTEM em comparação interlaboratorial de emissão radiada," pp. 1–4, 2017.

[34] "Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 (OGC 001)," IPAC, 2010.

[35] "Avaliação da incerteza da mediação em calibração (OGC 010)," IPAC, 2015.

[36] "ISO 11352:2012 Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data," International Standard Organization, 2012.

Anexos

A. Exemplos de cálculo para preparação de soluções intermédias

A.1 - Preparação de solução etanólica 12% (v/v)

A preparação da solução etanólica 12% (v/v) realiza-se para recipientes de 10 L e baseia-se na diluição de etanol absoluto 99% com água tipo I. A quantidade de etanol absoluto (99% Vol. AGA) a utilizar é determinado pela equação A.1.

$$C_{etanol\ absoluto} \times V_{etanol\ absoluto} = C_{solução\ EtOH\ 12\%} \times V_{solução\ EtOH\ 12\%} \quad (A.1)$$

Em que:

- $C_{etanol\ absoluto}$ é a concentração de etanol absoluto, em % (v/v);
- $V_{etanol\ absoluto}$ é o volume utilizado de etanol absoluto, em mL;
- $C_{solução\ EtOH\ 12\%}$ é a concentração de solução etanólica, em % (v/v);
- $V_{solução\ EtOH\ 12\%}$ é o volume total de solução etanólica, em mL.

$$100 \times V_{etanol\ absoluto} = 12 \times 10000 \leftrightarrow V_{6,5\%} = 1200\ mL$$

A.2 - Preparação de solução 2,3,6-TCA (10 µg/L)

Na preparação da solução de 2,3,6-TCA de concentração 10 µg/L determina-se o volume necessário de solução comercial de 2,3,6-TCA de concentração 10 mg/L a ser diluído, com etanol absoluto, a partir da equação A.2.

$$C_{comercial} \times V_{comercial} = C_{solução\ preparada} \times V_{solução\ preparada} \quad (A.2)$$

Em que:

- $C_{comercial}$ é a concentração da solução comercial de 2,3,6-TCA, em µg/L;
- $V_{comercial}$ é o volume utilizado da solução comercial de 2,3,6-TCA, em mL;
- $C_{solução\ dilúida}$ é a concentração da solução preparada de 2,3,6-TCA, em µg/L;
- $V_{solução\ prepada}$ é o volume total da solução preparada de 2,3,6-TCA, em mL.

$$10 \times 10^3 \frac{\mu g}{L} \times V_{comercial} = 10 \frac{\mu g}{L} \times 100{,}00\ mL$$

$$\leftrightarrow V_{comercial} = 0{,}10\ mL = 100\ \mu L$$

A.3 - Preparação de solução 2,4,6-TCA (*stock* I) (1 mg/L)

Na preparação da solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L, denominada de *stock* I, determina-se o volume necessário de solução comercial de 2,4,6-TCA de concentração 100 mg/L a ser diluído, com metanol, a partir da equação A.3.

$$C_{comercial} \times V_{comercial} = C_{solução\ stock\ I} \times V_{solução\ stock\ I} \quad \text{(A.3)}$$

Em que:

- $C_{comercial}$ é a concentração da solução comercial de 2,4,6-TCA, em mg/L;
- $V_{comercial}$ é o volume utilizado da solução comercial de 2,4,6-TCA, em mL;
- $C_{solução\ stock\ I}$ é a concentração da solução preparada de 2,4,6-TCA, em mg/L;
- $V_{solução\ stock\ I}$ é o volume total da solução preparada de 2,4,6-TCA, em mL.

$$100 \frac{mg}{L} \times V_{comercial} = 1 \frac{mg}{L} \times 100{,}00\ mL$$

$$\leftrightarrow V_{comercial} = 1{,}00\ mL$$

A.4 - Preparação de solução 2,4,6-TCA (*stock* II) (1 µg/L)

Na preparação da solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 µg/L, denominada de *stock* II, determina-se o volume necessário de solução *stock* I de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L a ser diluído, com solução etanólica 12%, a partir da equação A.4.

$$C_{stock\ I} \times V_{stock\ I} = C_{solução\ stock\ II} \times V_{solução\ stock\ II} \quad \text{(A.4)}$$

Em que:

- $C_{stock\ I}$ é a concentração da solução *stock* I de 2,4,6-TCA, em µg/L;
- $V_{stock\ I}$ é o volume utilizado da solução *stock* I de 2,4,6-TCA, em mL;
- $C_{solução\ stock\ II}$ é a concentração da solução preparada *stock* II de 2,4,6-TCA, em µg/L;

- $V_{solução\ stock\ II}$ é o volume total da solução preparada *stock* II de 2,4,6-TCA, em mL.

$$1000\,\frac{\mu g}{L} \times V_{stock\ I} = 1\ \frac{\mu g}{L}\ \times 100{,}00\ mL$$

$$\leftrightarrow V_{stock\ I} = 0{,}100\ mL = 100\ \mu L$$

A.5 - Preparação de solução de Aguardente 6,5% (v/v)

A solução de Aguardente 6,5 % (v/v) é preparada a partir de uma amostra de aguardente retirada do armazém de líquidos, com um teor de álcool de 40%. O volume de amostra de aguardente a utilizar é determinado pela equação A.5.

$$C_{Aguardente} \times V_{Aguardente} = C_{6{,}5\%} \times V_{6{,}5\%} \quad \text{(A.5)}$$

Em que:

- $C_{Aguardente}$ é a concentração de aguardente, em % (v/v);
- $V_{Aguardente}$ é o volume utilizado de aguardente, em mL;
- $C_{6{,}5\%}$ é a concentração de aguardente, em % (v/v);
- $V_{6{,}5\%}$ é o volume total de aguardente 6,5%, em L.

$$40 \times V_{aguardente} = 6{,}5 \times 0{,}01 \leftrightarrow V_{aguardente} = 1{,}63\ mL$$

A.6 - Preparação dos padrões de calibração

Na preparação dos padrões de calibração é necessário determinar o volume de solução *stock* II a utilizar, pela equação A.6.

$$C_{stock\ II} \times V_{stock\ II} = C_{padrão} \times V_{padrão} \qquad \text{(A.6)}$$

Em que:

- $C_{stock\ II}$ é a concentração da solução *stock* II de 2,4,6-TCA, em ng/L;
- $V_{stock\ II}$ é o volume utilizado da solução *stock* II de 2,4,6-TCA, em µL;
- $C_{padrão}$ é a concentração da solução-padrão preparada, em ng/L;
- $V_{padrão}$ é o volume total da solução-padrão preparada, em mL.

$$1000\,\frac{ng}{L} \times V_{stock\ II} = 2{,}0\ \frac{ng}{L}\ \times 10{,}00\ mL$$

$$\leftrightarrow V_{stock\ II} = 20{,}0\ \mu L$$

De seguida, calcula-se a concentração real dos padrões nos *vials*, a partir da equação A.7.

$$C_{stock\ II} \times V_{stock\ II} = C_{real\ do\ padrão} \times V_{final\ do\ padrão} \qquad \text{(A.7)}$$

Em que:

- $C_{stock\ II}$ é a concentração da solução *stock* II de 2,4,6-TCA, em ng/L;
- $V_{stock\ II}$ é o volume utilizado da solução *stock* II de 2,4,6-TCA, em µL;
- $C_{real\ do\ padrão}$ é a concentração real da solução-padrão preparada, em ng/L;
- $V_{final\ do\ padrão}$ é o volume total da solução-padrão preparada, que equivale à soma dos 10,00 mL de solução etanólica, do volume de solução *stock* II de 2,4,6-TCA (1 µg/L) adicionado e do volume adicionado de padrão interno 2,3,6-TCA (10 µg/L), em µL.

$$1000\frac{ng}{L} \times 20{,}0\ \mu L = C_{real\ do\ padrão} \times (10{,}00 \times 10^3 + 20 + 50)$$

$$\leftrightarrow C_{real\ do\ padrão} = 1{,}986\ ng/L$$

As concentrações reais dos padrões de calibração, na construção da curva de calibração de matriz aguardente e 50 µL de padrão interno, estão representadas na Tabela A.1.

Tabela A.1-Valores de concentrações reais (ng/L) dos padrões de calibração para diferentes volumes de solução stock II µL

Concentração do padrão (ng/L)	**Volume solução stock II (µL)**	**Concentração real (ng/L)**
0	0,0	0,0000
2,0	20,0	1,9861
3,5	35,0	3,4705
5,0	50,0	4,9505
6,5	65,0	6,4261
8,0	80,0	7,8973

B. Resultados

B.1 - Curvas de Calibração

Nas Tabela B.1, Tabela B.2, Tabela B.3 apresentam-se os valores de áreas obtidos para as três curvas de calibração. Nas Figura B.1, Figura B.2 e Figura B.3 estão representadas as respetivas curvas de calibração.

Tabela A.2-Dados da Curva de Calibração nº1

Vial id	Concentração teórica	Concentração calculada	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	Razão de áreas
CRF_1	0,000	0,050	3562,18	26928,87	0,1323
CRF_2,0_2	1,986	1,966	13116,93	31089,53	0,4219
CRF_3,5_2	3,471	3,399	17986,54	28161,16	0,6387
CRF_5,0_1	4,951	4,952	27812,91	31839,06	0,8735
CRF_6.5_2	6,426	6,448	33972,49	30892,87	1,0997
CRF_8.0_2	7,897	7,915	41468,25	31380,65	1,3215

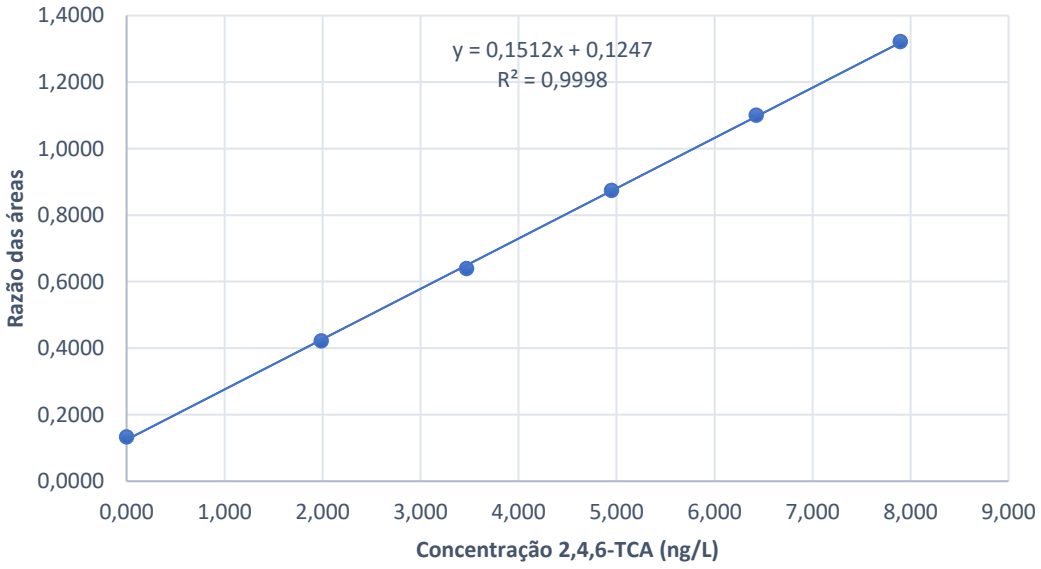


Figura A.1-Curva de Calibração nº1

Tabela A.3-Dados da Curva de Calibração nº2

Vial ID	Concentração teórica	Concentração calculada	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	Razão de áreas
CRF_1	0,000	-0,037	5354,38	31685,29	0,1690
CRF_2,0_3	1,986	2,012	15381,18	31426,17	0,4894
CRF_3,5_2	3,471	3,454	22287,19	31177,21	0,7149
CRF_5,0_3	4,951	5,044	30308,21	31455,46	0,9635
CRF_6.5_1	6,426	6,384	36471,38	31091,52	1,1730
CRF_8.0_2	7,897	7,874	41948,16	29834,91	1,4060

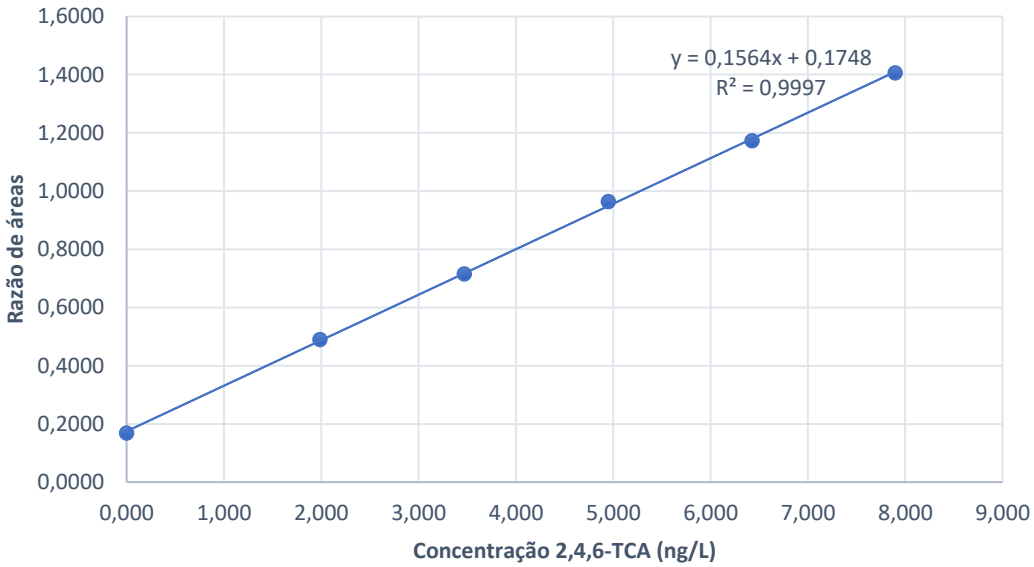


Figura A.2-Curva de Calibração nº2

Tabela A.4-Dados da Curva de Calibração nº3

Vial ID	Concentração teórica	Concentração calculada	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	Razão de áreas
CRF_1	0,000	0,036	1529,77	10744,08	0,1424
CRF_2,0_2	1,986	1,970	4711,77	10773,71	0,4373
CRF_3,5_2	3,471	3,460	7324,10	11017,81	0,6648
CRF_5,0_1	4,951	4,930	10063,11	11319,68	0,8890
CRF_6.5_2	6,426	6,370	11931,98	10761,32	1,1088
CRF_8.0_2	7,897	7,964	14598,12	10797,26	1,3520

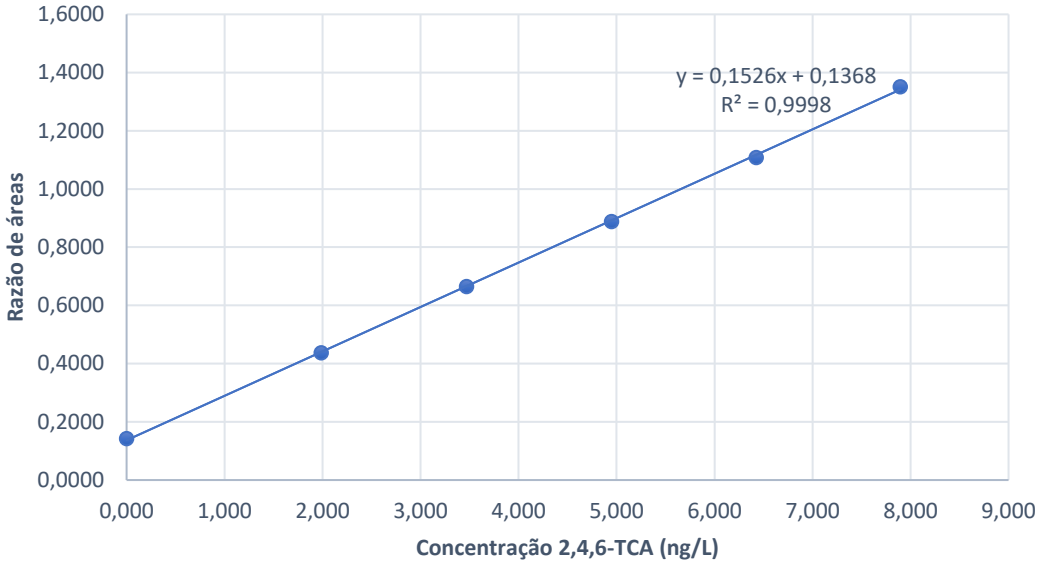


Figura A.3-Curva de Calibração nº3

B.2 - Cálculo dos limites de deteção e quantificação

Seguindo como base os dados da primeira curva de calibração, a exemplificação de cálculo para o limite de deteção representa-se pela Equação B.1, e para o limite de quantificação pela Equação B.2.

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{m} \qquad \text{(B.1)}$$

$$LOD = \frac{3{,}3 \times 0{,}0058}{0{,}1526} = 0{,}1167\ ng/L$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \qquad \text{(B.2)}$$

$$LOQ = \frac{10 \times 0{,}0058}{0{,}1526} = 0{,}3727\ ng/L$$

B.3 – Dados para carta de controlo dos declives

Na Tabela B.4 estão representados os valores para projetar a carta de controlo dos declives das curvas de calibração, estando indicados os valores dos limites, dos declives e respetivas datas de ensaio e do desvio padrão.

Tabela A.5-Valores utilizados para projeção da carta de controlo

Data de ensaio	Declive	Desvio padrão (σ) (ng/L)	LC	LIC	LSC
29/06/2021	0,1515	0,0112	0,1474	0,1138	0,1810
09/07/2021	0,1253		0,1474	0,1138	0,1810
16/07/2021	0,1512		0,1474	0,1138	0,1810
16/07/2021	0,1564		0,1474	0,1138	0,1810
26/07/2021	0,1526		0,1474	0,1138	0,1810

O valor do limite central (LC) corresponde ao valor médio dos declives ($\underline{x}$). O cálculo dos limites inferior e superior de controlo estão demonstrados pelas Equações B.3 e B.4.

$$LIC = \underline{x} - 3 \times \sigma \qquad \text{(Equação B.3)}$$

$$LSC = \underline{x} + 3 \times \sigma \qquad \text{(Equação B.4)}$$

B.4 – Dados para validação da gama de trabalho

Tabela B.1-Dados para validação da gama de trabalho para o padrão 2,0 ng/L

	Ensaio 1			**Ensaio 2**			**Ensaio 3**		
Identificação	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)
Padrão 2,0 ng/L	1,8	3408,2	19916,4	2,1	7763,6	18142,6	2,1	9992,3	19091,3
	2,2	3177,2	13077,7	2,0	8352,6	19935,0	2,0	11120,2	22263,8
	2,0	3208,1	15466,5	1,8	7323,1	17867,9	2,1	9114,1	17718,0
	2,0	3238,3	16089,8	2,0	7582,7	18076,1	2,1	9746,1	18771,7
	2,0	3429,3	16944,9	2,0	7801,4	18332,9	2,0	9989,1	19839,4
	1,9	3196,0	17164,1	2,0	7806,3	18479,0	2,1	8958,3	17173,5
	2,0	3300,8	15390,7	2,0	7777,6	18500,1	1,9	9353,7	19361,9
	1,9	3192,4	16146,7	1,9	7815,6	18748,8	2,0	9507,1	19209,6
	2,0	3255,9	15163,4	2,1	7941,6	18418,0	1,9	10275,1	21594,2
	2,1	3200,9	14554,2	1,9	7671,5	18390,9	1,8	10293,6	21748,3
Média	1,99	3260,7	15991,4	2,0	7783,6	18489,1	1,99	9835,0	19677,2
Desvio Padrão	0,09	86,3	1720,5	0,07	248,19	536,10	0,10	611,5	1620,8
Coeficiente de Variação (%)	**4,51%**	**2,6%**	**10,8%**	**4%**	**3%**	**3%**	**5%**	**6%**	**8%**

Tabela B.2-Dados para validação da gama de trabalho para o padrão 8,0 ng/L

	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
Identificação	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Concentração real 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)
Padrão 8,0 ng/L	8,0	19524,7	13430,0	7,8	16780,1	18904,5	8,2	27111,8	16265,4
	8,0	21233,0	14752,7	7,8	16305,5	18403,6	8,0	27995,7	17245,6
	8,3	21295,3	14004,9	8,0	16921,6	18879,1	7,9	28384,2	17697,5
	8,4	21576,9	14104,6	8,0	16594,2	18467,6	7,8	30744,8	19325,6
	7,3	19828,5	15112,6	7,8	16552,5	18728,8	7,9	31280,4	19463,8
	7,3	20826,0	16078,5	7,9	17317,0	19373,3	7,9	29491,4	18294,8
	7,1	20892,3	16451,4	7,9	17690,1	19860,1	7,9	30905,8	19288,9
	7,9	19621,9	13690,5	7,9	16505,0	18508,4	7,9	28310,9	17565,3
	8,0	20245,8	13907,6	7,9	16661,0	18598,2	7,8	29464,3	18463,1
	8,6	23726,7	15123,8	7,9	16672,5	18650,7	7,7	28704,0	18326,5
Média	7,90	20877,1	14665,7	7,9	16799,9	18837,4	7,90	29239,32	18193,66
Desvio Padrão	0,47	1175,5	969,8	0,06	393,13	433,16	0,13	1314,40	972,25
Coeficiente de Variação (%)	6,01%	5,6%	6,6%	1%	2%	2%	2%	4%	5%

B.5 – Estudo do efeito *carryover*

Na Tabela B.7 apresentam-se os resultados obtidos na realização do estudo do efeito *carryover*.

Tabela B.3-Resultados do efeito carryover

Vial	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	Razão de áreas	Concentração obtida (ng/L)
1	2922,56	23023,13	0,13	0,0
2	3321,90	18606,94	0,18	0,0
3	2912,81	18356,75	0,16	0,0
4	3024,27	19912,07	0,15	0,0
5	2648,07	14994,78	0,18	0,0
6	2987,54	23157,68	0,13	0,0
7	3367,80	20974,87	0,16	0,0
8	3261,25	20306,98	0,16	0,0
9	3298,82	20353,72	0,16	0,0
10	3110,01	17173,41	0,18	0,0

B.6 – Ensaios de recuperação

Na Tabela B.8 representam-se os valores obtidos nos ensaios de recuperação.

Tabela B.4-Valores obtidos na realização de ensaios de recuperação

Concentração de 2,4,6-TCA na Amostra fortificada (ng/L)	Concentração 2,4,6-TCA Amostra não fortificada (ng/L)	Concentração adicionada de 2,4,6-TCA (ng/L)	%Recuperação
2,03	0,45	2,00	79%
4,85	0,56	5,00	86%
7,95	0,69	8,00	91%

O exemplo de cálculo para a taxa de recuperação está representado pela Equação B.5.

$$\%\ Recuperação = \frac{4{,}83-0{,}56}{5{,}00} \times 100 = 86\ \% \qquad \text{(Equação B.5)}$$

B.8 – Estudo da Precisão

Nas Tabela B.9 e Tabela B.10 encontram-se os valores obtidos de coeficiente de repetibilidade para os três ensaios para as concentrações de 2 ng/L e 8 ng/L.

Tabela B.5-Valores de coeficiente de repetibilidade para cada ensaio de concentração 2 ng/L e o valor médio

2 ng/L	**Coeficiente de repetibilidade**
	0,251
	0,204
	0,268
Média	0,241

Tabela B.6-Valores de coeficiente de repetibilidade para cada ensaio de concentração 8 ng/L e o valor médio

8 ng/L	**Coeficiente de repetibilidade**
	1,330
	0,160
	0,365
Média	0,618

Na Equação B.6 encontra-se o exemplo de cálculo do coeficiente de repetibilidade (r) para o ensaio 1 de concentração 2 ng/L.

$$r = 2{,}8 \times desvio\ padrão = 2{,}8 \times 0{,}09 = 0{,}251 \qquad \text{(Equação B.6)}$$

Anexo B.9 – Cálculo da Incerteza

O cálculo da incerteza expandida implicou o cálculo da incerteza curva de calibração, do volume da amostra, da precisão e a incerteza combinada, para cada curva de calibração, obtendo depois um valor intermédio.

Os exemplos de cálculo seguintes foram realizados para a curva de calibração A.

O cálculo da incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração foi feito a partir da Equação B.7.

$$u(curva) = \frac{0{,}0057}{0{,}1526} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{3} + \frac{(1{,}398 - 0{,}77)^2}{(0{,}036^2 + 1{,}970^2 \ldots + 7{,}964^2) - \frac{(0{,}036 + 1{,}970)^2}{6}}} = 0{,}035\ ng/L$$

(Equação B.7)

O cálculo da incerteza associada à diluição da amostra determina-se pela Equação B.8.

$$u(C) = 8{,}3 \times \sqrt{\left(\frac{0{,}035}{8{,}3}\right)^2 + \left(\frac{9{,}8\times10^{-6}}{1{,}63}\right)^2 \times 3} = 0{,}035\ ng/L \quad \text{(Equação B.8)}$$

A incerteza da precisão do método é feita de acordo com a Equação B.9, utilizando os valores do 2º ensaio de validação da gama de trabalho, para 8 ng/L.

$$u(Precisão) = \frac{0{,}005}{\sqrt{10}} = 0{,}001\ ng/L \qquad \text{(Equação B.9)}$$

A incerteza combinada calcula-se de acordo com a Equação B.10.

$$u(Combinada) = \sqrt{0{,}035^2 + 0{,}001^2} = 0{,}036\ ng/L \qquad \text{(Equação B.10)}$$

Por último, a incerteza expandida é determinada pela Equação B.11.

$$u(Expandida) = 0{,}036 \times 2 = 0{,}071\ ng/L \qquad \text{(Equação B.11)}$$

Na Tabela B.11 encontram-se os valores de incertezas para as três curvas, assim como o valor médio.

Tabela B.7 -Valores de incerteza expandida para curva de calibração

Curva de calibração	Incerteza expandida (ng/L)	Média (ng/L)
A	0,07	0,08
B	0,086	
C	0,073	