



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

MARTA CRISTINA FERREIRA SOARES

Outubro de 2021



SYMINGTON

Family Estates

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

Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química, ramo opcional Qualidade

Marta Cristina Ferreira Soares (1191180)

Orientação: Eng^a Cláudia Santos (Symington Family Estates);

Doutora Cristina Matos (ISEP);

Doutora Manuela Correia (ISEP)

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Engenheira Cláudia Santos, que permitiu a realização deste estágio na Symington Family Estates, por me ter ajudado no desenvolvimento desta dissertação e ter transmitido conhecimentos que serão úteis no meu futuro profissional.

Um agradecimento a toda a equipa que me integrou, fazendo-me sentir à vontade proporcionando um bom ambiente, e que me ajudaram sempre que precisei. Um especial agradecimento à Engenheira Rita Rama por toda a orientação e por toda a ajuda dada.

Às orientadoras Doutora Cristina Matos e Doutora Manuela Correia, por toda a orientação e disponibilidade ao longo da realização da minha dissertação.

Um agradecimento enorme aos meus pais por todos os sacrifícios que fizeram por mim e por sempre apoiarem-me. E ainda, ao meu irmão por ter sido sempre alguém que eu ambicionei ser no futuro, direcionando-me para o mundo da engenharia.

A todos os meus amigos que me acompanharam-me neste percurso, principalmente à minha amiga Raquel que sempre me acompanhou em tudo desde os tempos do secundário, apoiando em todas as alturas difíceis.

Por fim, um agradecimento ao João por ter estado sempre lá quando mais precisei de força e por ser sempre o meu companheiro em todas as aventuras.

Sumário

A dissertação foi realizada no âmbito da unidade curricular “Dissertação/Estágio” do Mestrado em Engenharia Química – Ramo Qualidade, na Symington Family Estates, Vinhos, S.A.

O objetivo da dissertação consistiu na definição e validação de um método de análise de 2,4,6-tricloroanisol em água por cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD) com microextração em fase sólida usada em modo *headspace* (HS) como método de preparação de amostra.

Foram realizados ensaios para otimização das condições de SPME usando uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) e alterando os tempos de extração e os tempos de dessorção mantendo os restantes parâmetros previamente estabelecidos. Com 8 min de tempo de extração e 3 min de tempo de dessorção, foram obtidos resultados satisfatórios, com um coeficiente de variação dos declives das curvas de calibração de 1,3% e um desvio padrão relativo (RSD) de 0,3%.

Na validação do método foram realizados estudos de linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão (repetibilidade), exatidão e incerteza. Obteve-se uma boa linearidade na gama de trabalho de 1,5 ng/L a 9,5 ng/L, coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,995 com limite de deteção de 0,21 ng/L e limite de quantificação de 0,72 ng/L. No estudo da repetibilidade os coeficientes de variação foram de 2,4% e 1,3% para as soluções padrão de 1,5 e 9,5 ng/L, respetivamente, e a taxa de recuperação média foi de 100% (98 – 102%). No ensaio interlaboratorial obteve-se *z-scores* satisfatórios, ou seja, inferiores a 2, com apenas um laboratório com um resultado questionável, com o *z-score* compreendido entre 2 e 3. A incerteza calculada do método foi de 0,1 ng/L.

Palavras-Chave: 2,4,6-TCA, Água, Cromatografia gasosa, SPME, Validação

Abstract

This dissertation was carried out within the curricular unit “Dissertation/Internship” of the Master's Degree in Chemical Engineering – Quality, at Symington Family Estates, Vinhos, S.A.

The goal of the dissertation was to develop and validate a method for analyzing 2,4,6-trichloroanisole in water by gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD) using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) as the sample preparation method.

Tests were carried out to optimize the microextraction conditions using a polydimethylsiloxane fiber (PDMS) and changing the extraction times and desorption times keeping the remaining parameters previously established. With 8 min of extraction time and 3 min of desorption time, satisfactory results were obtained, with a coefficient of variation of the slopes of the calibration curves of 1.3% and a relative standard deviation (RSD) of 0.3%.

In the validation of the method, studies of linearity, working range, limit of quantification and limit of detection, precision (repeatability), accuracy and uncertainty were carried out. Good linearity was obtained with a working range of 1.5 ng/L to 9.5 ng/L, coefficients of determination (R^2) higher than 0.995 with a detection limit of 0.21 ng/L and a limit of quantification 0.72 ng/L. In the repeatability study, the coefficients of variation were 2.4 and 1.3%, for the 1.5 and 9.5 ng/L standard solutions, respectively, and the average recovery was 100% (98% - 102%). In the interlaboratory test, satisfactory z-scores were obtained, that is, lower than 2, with only one laboratory with a questionable result, with the z-score between 2 and 3. The calculated uncertainty of the method was 0.1 ng/L.

Keywords: 2,4,6-TCA, Water, Gas Chromatography, SPME, Validation

Índice

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Objetivos	1
1.3 Apresentação da Empresa	1
1.4 Organização do relatório	2
2 Estado da Arte	4
2.1 O 2,4,6-TCA.....	5
2.2 Determinação do TCA	6
2.2.1 SPME.....	7
2.2.2 Cromatografia Gasosa	14
2.2.3 A problemática do 2,4,6-TCA em água na indústria vitivinícola..	19
2.3 Validação do Método	121
2.3.1 Linearidade	22
2.3.2 Gama de trabalho	23
2.3.3 Limites de deteção	24
2.3.4 Sensibilidade.....	25
2.3.5 Precisão.....	26
2.3.6 Exatidão	28
2.3.7 Incerteza.....	30
2.3.8 Controlo da Qualidade.....	31
3 Materiais e Métodos	34
3.1 Reagentes	34
3.2 Equipamentos	34
3.3 Microextração em fase sólida.....	36
3.4 Preparação dos Ensaios	37

3.4.1	Preparação de soluções stock de 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA	37
3.4.2	Preparação de soluções padrão	38
3.4.3	Preparação da amostra	39
4	Resultados.....	40
4.1	Identificação dos picos de 2,3,6-tricloroanisol e de 2,4,6-tricloroanisol 40	
4.2	Otimização do método	42
4.2.1	Ensaio 1	43
4.2.2	Ensaio 2	46
4.2.3	Ensaio 3	49
4.2.4	Ensaio 4	51
4.2.5	Ensaio 5	52
4.3	Curvas de calibração	56
4.4	Validação da gama de trabalho	56
4.5	Precisão	57
4.6	Exatidão.....	57
4.7	Estudo do <i>carry over</i>	58
4.8	Incerteza	59
5	Conclusão e Sugestões de Trabalho Futuro.....	60
	Anexo A: Cálculos para preparação de soluções intermédias	66
A.1	Preparação da solução Stock I de 2,4,6-TCA.....	66
A.2	Preparação da solução Stock II de 2,4,6-TCA.....	66
A.3	Preparação padrões de calibração.....	66
	Anexo B: Resultados	67
B.1	Resultados Curva de Calibração	71
B.2	Resultados do estudo da gama	75

B.3 Resultados Precisão	77
B.4 Resultados Exatidão.....	77
B.5 Resultados do Efeito “ <i>Carry Over</i> ”	78
B.6 Cálculo da Incerteza do método	79

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Principais haloanisóis envolvidos na contaminação do vinho e respetivos limites de perceção sensorial e odor caraterístico (adaptado de [7]).	5
Tabela 2.2: Propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA [10].	6
Tabela 2.3: Diferentes tipos de revestimentos, com as respetivas espessuras e as aplicações da mesma [19,20].	12
Tabela 2.4: Tipos de detetores mais utilizados na cromatografia gasosa [24].	17
Tabela 2.5: Valores teóricos de diferentes métodos analíticos para a análise do 2,4,6-TCA em água (adaptado de [29] e [30]).	18
Tabela 3.1: Parâmetros gerais da SPME realizados num "autosampler" Supelco.	37
Tabela 3.2: Volume da solução stock II de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações das soluções dos padrões de calibração.	38
Tabela 4.1: Parâmetros de trabalho dos dois métodos implementados na empresa.	42
Tabela 4.2: Valores otimizados para os ensaios realizados.	43
Tabela 4.3: Parâmetros otimizados do método a usar.	54
Tabela 4.4: Dados relativos às curvas de calibração realizadas.	56
Tabela 4.5: Resultados do ensaio interlaboratorial.	58
Tabela A.1: Concentrações dos padrões de calibração.	67
Tabela B.1: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 1.	67
Tabela B.2: Valores do LD e LQ do ensaio 1.	68
Tabela B.3: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 2.	68
Tabela B.4: Valores do LD e LQ do ensaio 2.	68
Tabela B.5: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 3.	69
Tabela B.6: Valores do LD e LQ do ensaio 3.	69
Tabela B.7: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 4.	69
Tabela B.8: Valores do LD e LQ do ensaio 4.	70
Tabela B.9: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 5.	70

Tabela B.10: Valores do LD e LQ do ensaio 5.....	71
Tabela B.11: Valores da 1º curva de calibração	71
Tabela B.12: Valores da 2º curva de calibração	72
Tabela.B.13: Valores da 3º curva de calibração	73
Tabela B.14: Resultados do ensaio de precisão para o padrão de concentração 1,5 ng/L	75
Tabela B.15: Resultados do ensaio de precisão para o padrão de concentração 9,5 ng/L	76
Tabela B.16: Valores obtidos do coeficiente de repetibilidade	77
Tabela B.17:Valores obtidos do coeficiente de repetibilidade	77
Tabela B.18: Resultados ensaio de recuperação	78
Tabela B.19: Resultados do ensaio carry over.....	78
Tabela B.20:Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para o declive.....	79
Tabela B.21:Incerteza associada a cada curva de calibração da validação do método.	80

Índice de figuras

Figura 2.1: Etapas de um processo analítico tendo como objetivo a sua análise por cromatografia gasosa [12].	6
Figura 2.2: Esquema de uma fibra de SPME comercial [14].	8
Figura 2.3: Modos de extração em SPME de amostras líquidas: A- Extração direta; B- Headspace; C- Extração com membrana protetora [16].	9
Figura 2.4: Esquema de um instrumento típico da cromatografia gasosa [27].	15
Figura 2.5: Secção transversal de um injetor vaporizador direto tipo microflash [24].	16
Figura 2.6: Processo de produção de vinhos tintos.	19
Figura 2.7: Sistema de filtração da água.	20
Figura 2.8: Exemplo de uma carta de controlo, com um ponto fora do limite de controlo [40].	33
Figura 3.1: Micropipeta Scientific eVo	34
Figura 3.2: Cromatógrafo Thermo Scientific Trace 1300 ECD	35
Figura 3.3: Gráfico do programa de temperatura do forno	36
Figura 3.4: Viais utilizados para o padrão interno (vial à esquerda) e para as soluções de stock I e II (vial à direita).	38
Figura 4.1: Cromatograma obtido para um branco (água, sal e padrão interno) entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção.	40
Figura 4.2: Cromatograma obtido para solução 1,5 ng/L em 2,4,6-TCA entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção.	41
Figura 4.3: Cromatograma obtido para solução 9,5 ng/L em 2,4,6-TCA entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção.	41
Figura 4.4: Cromatogramas do ensaio 1 (preto - 0 ng/L, vermelho - 1,5 ng/L, verde - 4,5 ng/L e azul - 9,5 ng/L em 2,4,6-TCA)	44
Figura 4.5: Cromatograma correspondente ao ensaio 1 com os 4 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 13,04 e 14,00 min.	44

Figura 4.6:Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 1.	45
Figura 4.7: Cromatogramas do ensaio 2 (amarelo - 0 ng/L, preto - 1,5 ng/L, vermelho - 4,5 ng/L, verde - 7,5 ng/L e azul - 9,5 ng/L de 2,4,6-TCA).	47
Figura 4.8: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 2 com os 4 pontos da curva de calibração, faltando o cromatograma da concentração de 4,5 ng/L, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.....	47
Figura 4.9:Cromatograma da concentração de 4,5 ng/L, no intervalo de tempo entre 12,77 e 14,35 min.....	48
Figura 4.10: Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 2	48
Figura 4.11: Cromatogramas do ensaio 3 (vermelho - 0 ng/L, preto - 1,5 ng/L, verde - 3,5 ng/L, azul - 7,5 ng/L e amarelo - 9,5 ng/L em 2,4,6-TCA).	49
Figura 4.12: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 3 com os 5 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.	50
Figura 4.13:Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 3	50
Figura 4.14::Cromatogramas correspondentes ao ensaio 4 com os 6 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.	51
Figura 4.15.Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 4	51
Figura 4.16: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 5 com os 6 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,15 min.	52
Figura 4.17:Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 5	53
Figura 4.18:Comparação da área do 2,4,6-TCA nos ensaios 3, 4 e 5, para as concentrações da gama de trabalho.....	53
Figura 4.19: Comparação da área do pico de 2,3,6-TCA nos ensaios 3, 4 e 5.	54
Figura 4.20:Parâmetros do método otimizado	55

Figura 4.21:Carta de controlo declive da reta.....	59
Figura B.1: Curva de calibração realizada no dia 16/07/2021.....	72
Figura B.2: Curva de calibração realizada no dia 19/07/2021.....	73
Figura B.3: Curva de calibração realizada no dia 21/07/2021.....	74

Siglas e Acrónimos

CAR – Carboxen

CIPR - Código Internacional das Práticas Rolheiras

CGL - Cromatografia gás-líquido

CGS - Cromatografia gás-sólido

CPOMT - Clorofenol *O*-metiltransferase

CQ - Controlo da Qualidade

CV - Coeficiente de variação

DVB – Divinilbenzeno

ECD - *Electron capture detector*

GC - *Gas Chromatography*

ISO - *International Organization for Standardization*

IUPAC- *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LD - Limite de deteção

LQ - Limite de quantificação

MRI - Materiais de Referência Internos

MS – Espetrometria de massa

PA - Poliacrilato

PCP – Pentaclorofenol

PDMS - Polidimetilsiloxano

PG – Valor teste

PI - Padrão Interno

RSD – Desvio Padrão Relativo

SPME - *Solid phase microextraction*

TCA – Tricloroanisol

u.a - Unidades Arbitrárias

1 Introdução

1.1 Enquadramento

Na indústria vinícola, existe a procura por um produto final excepcional e competitivo para responder às contínuas exigências dos consumidores. Existem vários fatores que provocam uma diminuição da qualidade do vinho e um dos principais fatores é o chamado “gosto a rolha”. Este altera o aroma do vinho conferindo-lhe um sabor que é associado a mofo e que faz com que seja um defeito no odor e/ou no gosto do vinho. O responsável por este defeito é o 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA), que apresenta um limite de deteção sensorial muito baixo.

A contaminação por este composto é muitas vezes associada ao vedante do vinho, ou seja, a rolha de cortiça sendo por isso conhecido por “gosto a rolha”. Mas a cortiça não é o único responsável por contaminar o vinho, uma vez que o TCA pode ter origem em fungicidas, biocidas, herbicidas e conservantes usados na madeira e até na água usada ao longo do processo.

1.2 Objetivos

O estágio curricular integrado no plano de estudos do Mestrado em Engenharia Química, ramo Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto, tem como objetivo apresentar aos alunos o funcionamento do mundo empresarial, permitindo a sua integração e conferindo-lhes uma experiência profissional.

O objetivo concreto do estágio em questão consistiu na definição de uma metodologia de análise por cromatografia gasosa com deteção de captura de eletrões (GC-ECD) para a determinação de 2,4,6-TCA em água utilizada no processo de engarrafamento do vinho. Para tal foi necessário a definição do método de ensaio e ainda a sua validação.

1.3 Apresentação da Empresa

O estágio decorreu na empresa Symington Family Estates Vinhos, S.A., nas instalações da Quinta de Santo António, em Vila Nova de Gaia, na secção de Qualidade de Materiais e Produto Acabado.

A Symington Family Estates é 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].

Trata-se de uma empresa familiar, de origem britânica e portuguesa, gerida pela 4.^a e 5.^a gerações, prosseguindo a tradição iniciada por Andrew James Symington em 1882. Atualmente são proprietários e gerentes de quatro casas históricas do vinho do Porto: *Graham's*, *Cockburn's*, *Dow's* e *Warre's*. Produzem um conjunto de vinhos do Douro, sendo eles a Quinta do Vesúvio, Quinta do Ataíde, Altano e Prats & Symington (uma parceria com reconhecimento mundial que produz *Chryseia* e *Post Scriptum*). Recentemente, possuem na região de Portalegre no Alto Alentejo um novo projeto: a Quinta da Fonte Souto [1].

A Symington Family Estates é o maior proprietário do Douro, onde detém 26 Quintas, abrangendo um total de 2.255 hectares, dos quais 1.024 hectares plantados com vinha [1].

1.4 Organização do relatório

O presente relatório está organizado em 5 capítulos. No capítulo 1 é apresentado um enquadramento da dissertação, referindo o problema e contextualizando-o.

O capítulo 2 descreve o estado da arte. São apresentados os vários conceitos teóricos necessários para a realização do objetivo da dissertação, que consiste na definição e validação do método de quantificação de 2,4,6-TCA em água por cromatografia gasosa. No subcapítulo 2.1 é apresentado o contaminante em estudo e as suas propriedades, o subcapítulo 2.2 é referente à determinação analítica, abordando as técnicas que irão ser utilizadas (a microextração em fase sólida e a cromatografia gasosa) e ainda a problemática do 2,4,6-TCA em água na indústria vinícola. Neste capítulo é ainda abordada a validação do método, referindo a linearidade, gama de trabalho, limites de deteção, sensibilidade, precisão, exatidão, incerteza e controlo da qualidade.

No capítulo 3 descrevem-se os materiais e os métodos utilizados ao longo da dissertação.

O quarto capítulo baseia-se na apresentação, análise e discussão dos resultados obtidos.

Por último, o capítulo 5 corresponde à conclusão e a sugestão de trabalhos futuros.

2 Estado da Arte

Um dos responsáveis pela perda económica na indústria vinícola é o defeito sensorial do vinho, concretamente o aroma associado ao "gosto a rolha". Este defeito é provocado quando o vinho contacta com produtos ou atmosferas contaminados com haloanisóis, como é o caso do 2,4,6-TCA. A estimativa de garrafas afetadas pela presença de 2,4,6-TCA nos vinhos varia entre 1-5%, podendo ocasionalmente ser superior a 30% [2].

O 2,4,6-TCA foi considerado o responsável pelo odor a mofo pela primeira vez em 1981 por Tanner *et al.*, e em 1982 Buser *et al.* apoiaram essa mesma conclusão com o auxílio da combinação de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS) [3]. Neste estudo associou-se a formação do 2,4,6-TCA com o processo de lavagem da cortiça, conhecido por lavação, no qual se utilizava hipoclorito de sódio [4].

Na indústria corticeira é proibido, portanto, a utilização do cloro ou de soluções contendo este composto halogenado, em qualquer etapa do processo da fabricação de rolhas. Esta proibição encontra-se explícita pelo Código Internacional das Práticas Rolheiras (CIPR). Atualmente, o processo aconselhado para lavagem das rolhas é através do uso de peróxido de hidrogénio como meio para a desinfeção e branqueamento [5].

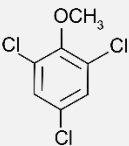
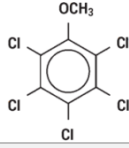
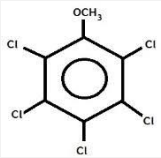
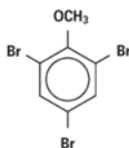
Apesar da principal fonte de contaminação do vinho por 2,4,6-TCA estar associada à rolha de cortiça, esta não é o único agente responsável. Além das origens anteriormente mencionadas existe a possível contaminação do vinho na etapa de higienização, na medida em que, muitas vezes, são utilizadas soluções à base de compostos clorados. Os haloanisóis podem ser transferidos para o vinho pelas condições da adega ou através do contacto com materiais contaminados, entre os quais se podem destacar a proteção dos reservatórios, mangueiras, barris, fragmentos de madeira de carvalho, filtros, vedantes e aditivos como a bentonite [3].

2.1 O 2,4,6-TCA

Os haloanisóis e os halofenóis são indicados como os responsáveis pela contaminação do vinho conferindo-lhe aromas fúngicos. São compostos muito voláteis com limites de percepção muito baixos, facilmente detetados sensorialmente, tanto em água como em soluções alcoólicas ou vinho [6].

Na tabela 2.1 apresentam-se alguns dos haloanisóis responsáveis pela contaminação do vinho.

Tabela 2.1: Principais haloanisóis envolvidos na contaminação do vinho e respetivos limites de percepção sensorial e odor característico (adaptado de [7]).

Nome do Composto	Estrutura Química	Limite de percepção sensorial	Odor característico
2,4,6 – Tricloroanisol (TCA)		30 - 300 pg/L (água) 1,5 - 3 ng/L (vinho branco) 6 ng/L (vinho tinto)	Mofo
Pentacloroanisol (PCA)		Composto organolepticamente fraco > 50 µg/L	Mofo, bolor
2,3,4,6 – Tetracloroanisol (TeCA)		4 ng/L (água) 10 - 15 ng/L (vinho branco e tinto) 5 ng/L (champanhe)	Mofo
2,4,6 – Tribromoanisol (TBA)		8 - 30 pg/L (água) 3,4 ng/L (vinho)	Mofo, bolor

É possível verificar que o 2,4,6-TCA é o haloanisol que apresenta menor limite de deteção sensorial em soluções alcoólicas. É facilmente encontrado na natureza, podendo estar presente na água, na terra, em legumes e frutas, em madeiras e na cortiça [8].

O TCA é um composto apolar com grande afinidade para os lípidos. É uma substância quimicamente estável e por isso não irá degradar-se, significativamente, no vinho ao longo do tempo [9].

Na tabela 2.2 apresentam-se algumas das propriedades físico-químicas do TCA.

Tabela 2.2: Propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA [10].

Propriedade	Valor
Massa Molar	211,5 g/mol
Ponto de Fusão	60 a 62 °C
Ponto de Ebulição	216 °C (a 760 mmHg)
Pressão de Vapor	$22,8 \times 10^{-3}$ mmHg
Constante de Henry	$130 \text{ atm cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
Solubilidade em Água	10 mg/ L

Existem várias hipóteses para a formação de cloroanisóis, sendo a mais aceite a síntese direta por biometilação (*O*-metilação) de clorofenóis por microrganismos [11].

2.2 Determinação do TCA

A determinação do TCA requer o desenvolvimento de um método analítico apropriado, sendo a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de captura de eletrões (GC-ECD, do inglês *gas chromatography - electron capture detector*) a técnica recomendada. A qualidade de um método analítico depende da qualidade das suas etapas, com os respetivos erros experimentais associados. As etapas encontram-se na figura 2.1 [12].

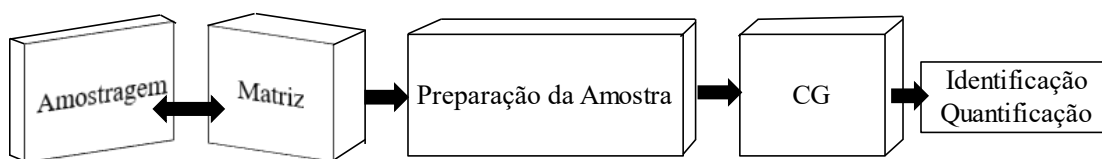


Figura 2.1: Etapas de um processo analítico tendo como objetivo a sua análise por cromatografia gasosa [12].

A primeira etapa de um processo analítico é a amostragem e logo a seguir a preparação da amostra. Esta etapa é um passo essencial na análise influenciando a precisão e exatidão do resultado, o tempo e o custo da análise. A preparação da amostra é necessária pois, de um modo geral, a matriz não pode ser diretamente analisada. Em GC este passo assume uma importância grande uma vez que a amostra na maior parte dos casos não pode ser injetada diretamente no cromatógrafo [12]. Neste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia analítica para determinação de 2,4,6-TCA em amostras de água usada ao longo do processo de engarrafamento, baseada em microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid phase microextraction*) como etapa de preparação de amostra seguida de GC-ECD.

2.2.1 SPME

A microextração em fase sólida (SPME) consiste numa técnica em que os processos de extração e pré-concentração de analitos ocorrem numa escala de baixas dimensões (micro), sendo uma técnica de preparação de amostra que não usa solventes orgânicos [12].

Este método foi descrito inicialmente por Arthur e Pawliszyn em 1990, sendo atualmente, uma das técnicas mais aceites e com novos artigos a serem publicados todos anos [13].

O princípio básico desta aplicação é o uso de um volume muito pequeno, normalmente menor do que 1 μL , da fase extratora. Esta pode ser um polímero líquido de elevado peso molecular, ou pode ser um material sólido, normalmente com porosidade elevada de modo a aumentar a área de superfície disponível para a adsorção [14].

Nesta técnica é usado um dispositivo com uma fibra de sílica fundida com um revestimento de uma fase estacionária. A fibra é exposta a uma amostra gasosa ou aquosa, durante um determinado tempo, desejavelmente até que se atinja o equilíbrio entre a concentração do analito na amostra e a concentração do analito na fibra [13].

Na figura 2.2 é possível observar um dispositivo comercial para utilização manual de SPME, produzido pela Supelco. A fibra que é acoplada a um tubo de aço inoxidável, é montada num suporte especial. O suporte é equipado com um medidor de

profundidade, ajustável, que permite controlar a profundidade que a agulha vai penetrando no recipiente da amostra ou no injetor. Este medidor permite preservar a fibra, uma vez que é um material que quebra com grande facilidade ao atingir um obstáculo. O movimento do êmbolo é limitado por um parafuso de pequenas dimensões. Para uma proteção extra da fibra, durante o armazenamento ou perfuração do septo, a fibra é retirada para dentro da agulha do dispositivo. Quando ocorre a extração ou a dessorção, a fibra é exposta pressionando o êmbolo [14].

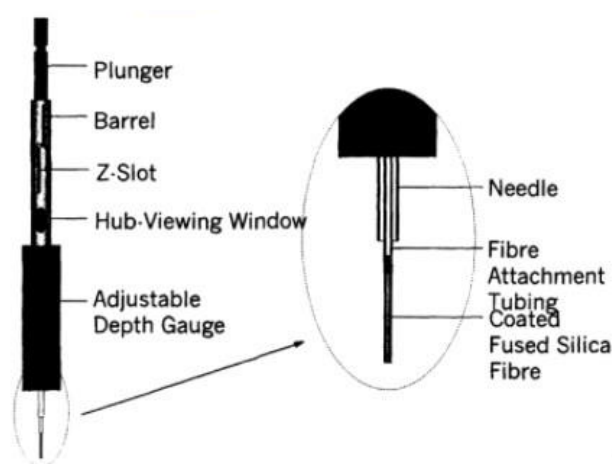


Figura 2.2: Esquema de uma fibra de SPME comercial [14].

Quando a técnica SPME é usada para posteriormente ocorrer a separação e quantificação do analito por cromatografia gasosa, a fibra é colocada no injetor do cromatógrafo, a temperaturas elevadas, onde ocorre a dessorção térmica dos analitos retidos.

A aplicação da SPME a amostras líquidas pode ser realizada utilizando três modos: extração direta, extração por *headspace* e extração com a membrana protetora. Na extração direta, a fibra revestida é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente da matriz da amostra para a fase extratora. O uso de agitação permite que os analitos presentes na amostra sejam transportados mais rapidamente para a proximidade da fibra, permitindo uma extração mais rápida [14].

Na extração por *headspace*, os analitos são extraídos da fase gasosa que se encontra em equilíbrio com a amostra, ou seja, expõe-se a fibra na atmosfera da amostra, em vez de imersa. Isto permite proteger a fibra de efeitos adversos que possam

ser causados por substâncias, não voláteis e de elevado peso molecular, presentes na matriz da amostra [14]. Assim a fibra é inserida na fase gasosa em equilíbrio com a amostra por um tempo necessário para que ocorra o equilíbrio, e a uma temperatura específica, de modo a que os compostos voláteis sejam concentrados no revestimento da fibra [15].

Por fim, na extração com a membrana protetora, a fibra é separada da amostra com uma membrana seletiva, que permite a passagem dos analitos, mas que ao mesmo tempo bloqueia as interferências. Ao usar a membrana, a fibra fica mais protegida contra efeitos adversos causados por compostos de alto peso molecular, sendo usada especialmente na análise de amostras mais complexas [14]. Este último processo tem a desvantagem de ser mais lento uma vez que a membrana dificulta a difusão dos analitos até ao revestimento [16].

Na figura 2.3 encontram-se representados os três processos.

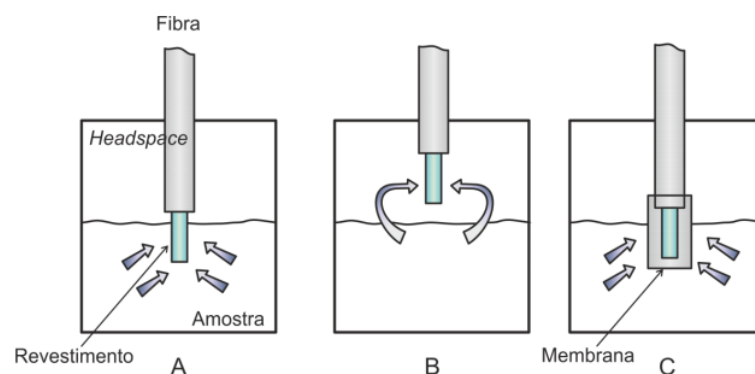


Figura 2.3: Modos de extração em SPME de amostras líquidas: A- Extração direta; B- Headspace; C- Extração com membrana protetora [16].

Princípios da SPME

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos, sendo que a extração em *headspace* consiste num sistema trifásico simples. Como este não é considerado um processo ideal é necessário considerar a eventual perda de analito por biodegradação ou por adsorção nas paredes do frasco onde se encontra a amostra [14].

Considerando um sistema trifásico com as fases: o revestimento da fibra, a fase gasosa ou a *headspace*, e a matriz da amostra, a quantidade total do analito nas três fases pode ser dada pelo balanço de massa apresentado na equação 2.1 [14]:

$$C_0 V_S = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad \text{Equação 2.1}$$

Sendo:

C_0 - concentração inicial do analito na amostra;

C_f^∞ - concentração no equilíbrio do analito na fibra extrativa;

C_h^∞ - concentração no equilíbrio do analito no *headspace*;

C_s^∞ - concentração no equilíbrio do analito na amostra;

V_f - volume da película de recobrimento da fibra;

V_h - volume do *headspace*;

V_s - volume da amostra.

A constante de partição, K_{fs} , entre a fibra e a matriz da amostra, é dada pela equação 2.2 [14]:

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad \text{Equação 2.2}$$

A constante de partição, K_{fh} do analito entre as fases fibra – *headspace*, é dada pela equação 2.3 [14]:

$$K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty} \quad \text{Equação 2.3}$$

A quantidade do analito recolhido na fibra extrativa, n , é calculada pela expressão da equação 2.4 [14]:

$$n = \frac{K_{fh} \times K_{fs} \times V_f \times C_0 \times V_s}{K_{fh} \times K_{fs} \times V_f + K_{fs} \times V_h + V_s} \quad \text{Equação 2.4}$$

Otimização do processo de SPME

O êxito do processo de SPME estará dependente da otimização dos parâmetros escolhidos para a extração e dessorção. Esta otimização é realizada através da manipulação das propriedades intrínsecas dos analitos de interesse como a volatilidade, solubilidade, afinidade para o revestimento da fibra, entre outros, de forma a melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade da metodologia analítica [17].

▪ **Variação do volume de solvente**

A quantidade de solução padrão a colocar no *vial* irá afetar o processo, uma vez que as soluções padrão são tipicamente preparadas em solventes voláteis como metanol, por exemplo. Assim, pode ocorrer a competição do solvente com os analitos de interesse na partição entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra, caso sejam utilizados volumes muito elevados de solução padrão [14].

Este volume deve ser selecionado tendo em base uma estimativa da constante de distribuição K_{fs} . A constante pode ser estimada utilizando valores de literatura para o analito em estudo, ou para um composto relacionado com o revestimento da fibra [14].

▪ **Seleção da fibra**

O revestimento da fibra, fase estacionária, a usar é determinado pelo analito que se pretende determinar. Existem vários tipos de fases estacionárias e a sua escolha depende da composição da fração volátil da amostra e das condições experimentais, como é possível verificar na tabela 2.3. A fibra de SPME mais utilizada é a revestida com polidimetilsiloxano (PDMS), um polímero apolar com maior afinidade para compostos apolares. Por sua vez, as fibras à base de poliacrilato (PA) são mais polares e, conseqüentemente, mais adequadas para a extração de compostos hidrofílicos [18].

Tabela 2.3: Diferentes tipos de revestimentos, com as respectivas espessuras e as aplicações da mesma [19,20].

Revestimento	Espessura (µm)	Aplicações
PDMS	100	GC/HPLC para voláteis
	30	GC/HPLC para semi-voláteis
	7	GC/HPLC para compostos apolares de elevado peso molecular.
PDMS/DVB	65	GC/HPLC para voláteis e aminas
PA	85	GC/HPLC para semi-voláteis polares
CW/DVB	65,70	GC/HPLC para álcoois e compostos polares
CAR/PDMS	75,85	GC/HPLC para gases
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC/HPLC para aromatizantes
PDMS/DVB	60	HPLC para aminas e compostos polares

CAR – Carboxeno; DVB – Divinilbenzeno; PA – Poliacrilato; PDMS - Poldimetilsiloxano

Quer a espessura do revestimento quer a constante de distribuição influenciam a sensibilidade do método e o tempo de extração. Revestimentos de maior espessura aumentam a sensibilidade, mas têm como desvantagem o aumento do tempo para obtenção do equilíbrio [14].

▪ **Tempo e temperatura de extração**

O tempo de equilíbrio é definido como o tempo a partir do qual a quantidade de analito extraído se mantém constante, independentemente do aumento do tempo de extração [14]. Ou seja, é o tempo necessário para se atingir o equilíbrio entre a concentração de analito no revestimento e na matriz. Pode ser usado um tempo de extração inferior ao de equilíbrio, desde que seja o necessário para garantir o sucesso da análise subsequente [21].

A temperatura de extração é de extrema importância em *headspace*, pois a operação é efetuada através da absorção de compostos mais voláteis. O aumento da temperatura de extração provoca a volatilização das moléculas da fase estacionária para a fase gasosa. Uma vez que o processo de absorção dos compostos pela fase estacionária

é um processo exotérmico, o coeficiente de partição entre a fase estacionária e a fase gasosa diminui [22]. O aumento da pressão de vapor e volatilidade dos compostos, melhora a eficácia do processo de transferência dos analitos da fase líquida para o *headspace* (aumenta o coeficiente de partição entre a amostra e a fase gasosa) levando a um aumento na concentração de analitos na fase gasosa [22].

- **Tempo de dessorção**

Na fase da extração, os analitos presentes na amostra nunca são adsorvidos na totalidade, independentemente do tempo de extração, uma vez que se trata de um processo de equilíbrio. Mas, através da manipulação do tempo de dessorção é possível assegurar a transferência por inteiro de todos os analitos retidos para o instrumento de análise posterior, contribuindo assim para o bom funcionamento do processo analítico como um todo [21].

- **Agitação**

A agitação da solução permite diminuir o tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio ao variar a constante de partição em favor do *headspace* [14].

A agitação magnética é mais usada em SPME manual, sendo necessário ter cuidado no uso desta técnica para garantir que a velocidade agitação da barra seja constante e que a placa não aqueça durante a agitação. Outra técnica é a técnica de vibração de agulha, que usa um motor para gerar um movimento vibratório na fibra e no *vial*. Esta segunda opção foi implementada pela Varian no amostrador automático de SPME e fornece uma boa agitação resultando em tempos de equilíbrio semelhantes aos obtidos na agitação magnética [14].

- **Salting Out**

O efeito da força iônica, fenómeno designado por “*salting out*”, ocorre quando se adiciona um eletrólito forte, como é o caso do NaCl, à amostra. A adição de um sal a uma solução aquosa pode resultar num aumento da eficiência da extração uma vez que aumenta a força iônica o que pode reduzir a solubilidade dos analitos presentes na matriz levando-os a volatilizar e migrar para o *headspace*. É mais eficaz, particularmente, quando são compostos polares ou voláteis [17].

2.2.2 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa foi inventada por A.J.P. Martin e A.T. James em 1952, tornando-se uma das técnicas analíticas mais importantes e amplamente aplicadas [23].

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados tendo em conta a sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida que se encontra dentro da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte, sendo que a fase móvel não interage com as moléculas do analito. A única função da fase móvel é o transporte do analito através da coluna [24]. Após a separação dos diferentes compostos, os analitos são medidos pelo detetor, observando-se o cromatograma obtido num computador acoplado. O detetor faz a medição contínua das propriedades físico-químicas da fase móvel à saída da coluna cromatográfica. De salientar que a temperatura do detetor deve ser superior à temperatura da coluna, permitindo que os analitos permaneçam na fase gasosa [25].

Existem dois tipos de cromatografia gasosa: cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS). Na CGL a fase móvel é um gás, enquanto a fase estacionária é um líquido retido na superfície de um sólido inerte por adsorção ou ligação química, enquanto na CGS a fase móvel é um gás, ao passo que a fase estacionária é um sólido que retém os analitos por adsorção física [24].

A calibração dos métodos de GC-ECD e de cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS) pode ser feita com recurso a diferentes padrões internos, como o 2,3,6-tricloroanisol e o 2,3,6-triclorotolueno, no primeiro caso, ou com isótopos deuterados (d3-TCA, d5-TCA) no caso de GC-MS [26].

Os componentes básicos de um instrumento típico que permite realizar a cromatografia gasosa são mostrados na figura 2.4.

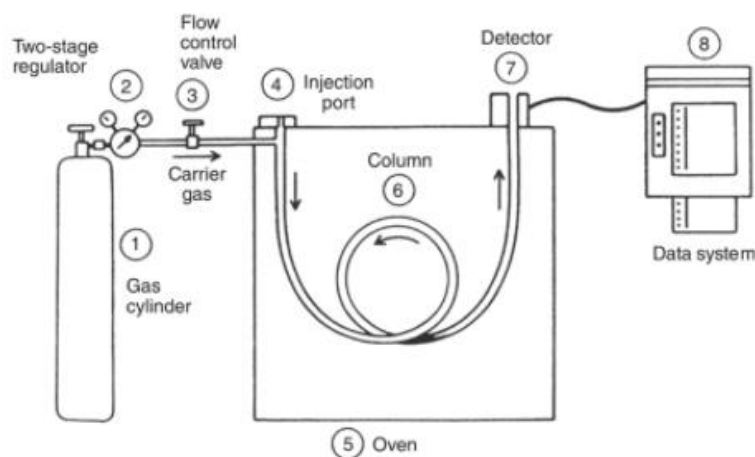


Figura 2.4: Esquema de um instrumento típico da cromatografia gasosa [27].

A fase móvel é designada por gás de arraste, tendo como requisito ser inerte e não interagir quimicamente com a amostra. Tem como objetivo principal arrastar a amostra ao longo da coluna e tem como objetivo secundário fornecer uma matriz adequada, de modo que o detetor meça os componentes da amostra. O gás de arraste mais comum é o hélio, embora o árgon, o nitrogénio e o hidrogénio sejam também usados [27].

A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente, ou um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte.

O caudal do gás de arraste é controlado por um regulador de pressão no cilindro do gás e por um regulador de pressão ou regulador de caudal montado no cromatógrafo, como é possível confirmar na figura 2.4 [24]. A medição e o controlo do caudal do gás de arraste é essencial para a eficiência quer da coluna quer da análise qualitativa [27].

Para além do caudal do gás de arraste, a eficiência da coluna requer que a amostra tenha um tamanho adequado, que varia consoante o tipo de coluna, e que seja introduzida com a velocidade adequada. A porta de injeção da amostra é mantida a cerca de 50 °C acima do ponto de ebulição do componente menos volátil da amostra. Na figura 2.5 encontra-se esquematizado a vista da secção transversal de um injetor vaporizador direto tipo *microflash* [24].

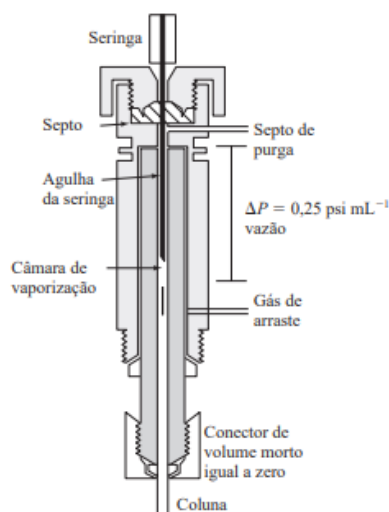


Figura 2.5: Seção transversal de um injetor vaporizador direto tipo microflash [24].

De modo a ser possível obter volumes de amostra mais reprodutíveis, nos sistemas automáticos, utiliza-se uma válvula de amostragem (*autosampler*), que limita o erro humano. Este sistema permite injetar um volume fixo da amostra, usando uma seringa que penetra o *vial* selado, repetindo o processo várias vezes [27].

As amostras líquidas são injetadas através de seringas calibradas por meio de diafragmas ou septos de silicone na porta de injeção localizada no início da coluna. As amostras sólidas são injetadas como soluções ou, alternativamente, são seladas em vias de parede fina que podem ser inseridos na cabeça da coluna e perfurados ou quebrados externamente, sendo analisadas após extração dos componentes voláteis [24].

Relativamente às colunas podem ser de dois tipos: colunas de empacotamento e colunas capilares. Para a maioria das aplicações atuais, as colunas capilares são as mais utilizadas por serem mais eficientes e permitirem uma análise mais rápida. As colunas encontradas no mercado variam em comprimento desde 2 m até 50 m ou mais, a sua construção pode ser de aço inoxidável, sílica fundida ou teflon. De modo a encaixarem no forno, as colunas são enroladas em bobinas com diâmetro de 10 a 30 cm [24].

Tendo em conta que a separação em GC é realizada através de uma programação de temperatura na coluna cromatográfica, o forno corresponde a um componente importante do sistema. A temperatura no interior do forno deve ser o mais próximo

possível das temperaturas programadas para a análise, sendo necessário possuir um tempo de resposta curto e uma capacidade de regressar à temperatura inicial num curto intervalo de tempo antes da análise seguinte [27].

A solubilidade e a volatilidade dos componentes da amostra vão influenciar a sua separação. Ou seja, um componente solúvel na fase estacionária demora mais tempo a percorrê-la do que um componente insolúvel e as substâncias com maior afinidade para a fase estacionária são retidas durante mais tempo, logo deslocam-se mais lentamente. Quanto mais volátil a substância, maior a sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente se desloca ao longo da coluna [27].

Após a separação dos componentes, como já referido, eles são detetados por um detetor. Os detetores mais usados na cromatografia gasosa encontram-se na tabela 2.4 onde se indicam alguns exemplos de aplicação e os respetivos limites de deteção típicos.

Tabela 2.4: Tipos de detetores mais utilizados na cromatografia gasosa [24].

Tipo	Amostras a que são aplicáveis	Limite de Deteção Típico
Ionização de chama (FID)	Hidrocarbonetos	0,2 pg/s
Condutividade térmica (TCD)	Detetor Universal	500 pg/mL
Captura de eletrões (ECD)	Compostos Halogenados	5 fg/s
Espetrometria de massa (MS)	Ajustável a qualquer espécie	0,25-100 pg

Como indicado na tabela 2.4, a cromatografia gasosa associada ao detetor de captura de eletrões é empregue em compostos halogenados. Baseia-se no fenómeno de espécies eletronegativas reagirem com eletrões térmicos presentes de modo a formar iões carregados negativamente. A perda dos eletrões está diretamente relacionada com a quantidade de analito na amostra [24].

Para a produção de eletrões térmicos capturáveis (de baixa energia), o gás de arraste é ionizado por partículas beta de uma fonte radioativa na célula, geralmente,

correspondente a uma lâmina do isótopo radioativo níquel-63. Este fluxo de elétrons produz uma corrente que é medida. Esta forma uma nuvem de elétrons estáveis e livres na célula detetora. O sistema elétrico do ECD utiliza pulsos de voltagem periódicos para manter a corrente elétrica constante. Quando os componentes da amostra entram na célula, os elétrons que seriam capturados no eletrodo são capturados pela amostra, resultando numa diminuição da corrente elétrica. Esta alteração é assim registada no cromatograma [26, 28].

Como já referido, a GC acoplada ao ECD é normalmente usada para análise de 2,4,6-TCA e outros cloroanisóis.

Na tabela 2.5 é possível observar diferentes métodos de análise do 2,4,6-TCA em água com informação pertinente para o desenvolvimento do método.

Tabela 2.5: Características principais de diferentes métodos analíticos publicados para a análise do 2,4,6-TCA em água (adaptado de [29])

Método	LD (ng/L)	Gama linear (ng/L)	RSD (%)	Tempo de extração (min)
SPME-GC-MS/MS	0,34	1,0-500	20,8	30
PT-GC-MS	0,40	10-200	6,2	25
SPME-PTV-GC-MS	0,32	0,5-50	6,9	30
SBSE-GC-MS/MS	0,03	0,4-500	13,3	30
SPME-GC-ECD	0,70	5-80	3,4	60
USAEME-GC-MS/MS	0,20	1,0-5000	6,3	5,0

PT- "Purge&Trap"; PTV- Injetores por vaporização com temperatura programada; SBSE- Extração Sortiva em Barra de Agitação (*stir bar sorptive extraction*); USAEME- microextração de emulsificação assistida por ultrassom

Considerando que o método a ser usado é a SPME com GC-ECD, os valores apresentados na tabela 2.5 serão usados para discussão dos resultados. Num outro trabalho, o limite de quantificação (LOQ) para a análise de 2,4,6-TCA por SPME com GC-ECD apresentou um valor de 2,3 ng/L [30].

2.2.3 A problemática do 2,4,6-TCA em água na indústria vitivinícola

A presença de contaminantes organoléticos no vinho representa uma fonte de perda financeira nesta indústria. Deste modo, o controlo da qualidade organolética dos vinhos é indispensável para que se obtenha um produto de elevada qualidade. As fontes de contaminação por 2,4,6-TCA são diversas, sendo uma delas por água nas etapas onde ocorre higienização [31]. Na figura 2.6 encontra-se apresentado um fluxograma, simplificado, para a produção de vinho tinto.



Figura 2.6: Processo de produção de vinhos tintos.

Nas etapas da colheita, receção da uva, classificação e pesagem a problemática da contaminação por água é bastante reduzida pois não há etapas de higienização. Após estas etapas a uva é transferida para os restantes equipamentos com o auxílio de tegões ou num tapete de escolha manual. Assim, a uva é transferida para um desengaçador onde ocorre o esmagamento da uva e a sulfitagem do mosto. Este é, posteriormente, transferido para uma cuba onde ocorre a fermentação alcoólica [32].

Na remontagem ocorre a retirada do mosto em fermentação pela parte inferior da cuba e reposição do mesmo na parte superior, e para tal é necessário recorrer ao uso de bombas e tubagens [32].

A desencuba consiste na entrada do mosto quando passa no desengaçador para um cilindro rotativo. Ocorre de seguida a fermentação malolática e novamente a

sulfitagem do vinho ainda na mesma cuba. A trasfega é a passagem do vinho sem borra para uma outra cuba. A maturação e a clarificação ocorrem nessa cuba [32].

A filtração é feita com recurso a um filtro tangencial com dois cilindros de celulose por onde o vinho é filtrado. De seguida o vinho prossegue para a linha de enchimento onde é engarrafado e ocorre o seu envelhecimento em garrafa. Antes de o vinho ser engarrafado é necessário o enxaguamento prévio das garrafas [32].

Na figura 2.6 as etapas finais, assinaladas a amarelo, são as que ocorrem na Quinta de Santo António, onde os vinhos de mesa, vinhos do Porto, aguardentes e os *brandies* são recebidos em cubas, e armazenados até à etapa do enchimento. As cubas onde se encontram armazenados necessitam, quando ficam vazias, de serem higienizadas. A higienização é realizada através da água da companhia, proveniente da Águas de Gaia, EM, SA.

De seguida o vinho segue por tubagens para a linha de enchimento, onde ocorre o engarrafamento do mesmo. Na linha de enchimento, antes da garrafa receber o vinho é necessário a passagem da mesma na enxaguadora, ocorrendo assim o processo de higienização. O processo na enxaguadora consiste na lavagem das garrafas através de um jato de água, com pressão suficiente para eliminar todas as possíveis impurezas. A água da enxaguadora provém também das Águas de Gaia, passando por um sistema de 3 filtros, como se observa na figura 2.7, um de cartucho, outro de carvão ativado e um



Figura 2.7: Sistema de filtração da água.

Esta água é analisada anualmente externamente por um laboratório de sistema UV. análises de águas, analisando o depósito da enxaguadora e a torneira de saída da paleta de filtração.

Com o desenvolvimento e validação do método para a análise de TCA em água, será possível analisar a água do processo, quer a água usada nas etapas finais, que ocorrem no local de estágio, quer ao longo das etapas da produção dos vinhos. Com este método vai ser possível, ainda, a determinação de TCA em outros materiais do processo, como por exemplo em garrafas vazias armazenadas em locais húmidos e propícios ao desenvolvimento de fungos, como é o caso das caves. Para isso, utiliza-se água para lavar essas garrafas, analisando posteriormente a água de lavagem com o método desenvolvido. Este é um dos muitos exemplos que é possível pôr em prática.

Assim, é na etapa do engarrafamento que vão ser estudadas as possíveis contaminações de 2,4,6-TCA através da água, uma vez que é usada água para enxaguar as garrafas e para além disso, as cubas quando vazias são limpas com água, para além de outros materiais que são limpos com água. Os locais de amostragem serão os tanques de armazenamento da água da enxaguadora, entre outros locais necessários para a validação do método.

2.3 Validação do Método

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Assim, a validação de um método analítico é um aspeto crucial da garantia da qualidade analítica [33].

De acordo com a norma ISO/IEC 17025 a validação de um método analítico garante a credibilidade de um novo processo, de um equipamento e, sobretudo, da metodologia analítica. É essencial que os laboratórios mostrem a partir da validação, que os métodos internos que utilizam diariamente, fornecem resultados suficientemente próximos do valor verdadeiro. É de referir que todos os métodos devem estar descritos num procedimento experimental e todos os equipamentos e instrumentos utilizados devem encontrar-se em perfeito estado de funcionamento e devidamente calibrados [9].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento de parâmetros como a gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exatidão.

2.3.1 Linearidade

Linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados numa faixa analítica especificada. Este parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico (R^2). Este coeficiente traduz a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais, ou seja, a variabilidade explicada pelo modelo, e deve apresentar um valor superior a 0,995 [34].

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, de modo a verificar se a regressão linear é a mais adequada para o caso em estudo. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, bem como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_y^2 [33].

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela equação 2.5:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_y^2 \quad \text{Equação 2.5}$$

sendo que N corresponde ao número de padrões de calibração. A equação 2.6 permite obter o valor teste, PG :

$$PG = \frac{DS^2}{S_y^2} \quad \text{Equação 2.6}$$

Após o cálculo este valor é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher [35]:

- Se $PG \leq F$, a função de calibração linear conduz a um melhor ajuste dos pontos.

- Se $PG > F$, a função de calibração linear não conduz a um melhor ajuste dos pontos. A gama de concentrações deve ser reduzida ou então aplica-se uma função de calibração não linear.

2.3.2 Gama de trabalho

Em todos os métodos quantitativos existe um intervalo de concentrações para o analito em que o método pode ser aplicado. Assim, a gama de trabalho representa a gama de concentrações na qual a sensibilidade é considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico [38, 40].

Sempre que a metodologia adotada envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Recomenda-se a norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. O recurso a ajustes polinomiais deve ser devidamente fundamentado. Para os métodos em que não ocorra o traçado de curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá depender de alguns fatores como a quantidade de amostra disponível, da boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos no caso de volumetrias [33].

O cálculo das variâncias associadas ao primeiro e último padrão, S_i e S_N , respetivamente, é efetuada recorrendo à equação 2.7:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{Equação 2.7}$$

sendo que:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^N y_{i,j}}{n_i} \quad \text{Equação 2.8}$$

i – o número do padrão que vai de 1 a N

j – o número de repetições efetuadas para cada padrão

As variâncias são calculadas para verificar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do valor teste PG , que

pode ser calculado de duas formas consoante o valor de S^2_I e S^2_N . Ou seja, quando $S^2_N > S^2_I$ calcula-se através da equação 2.9, caso contrário, através da equação 2.10

$$PG = \frac{S^2_N}{S^2_I} \quad \text{Equação 2.9}$$

$$PG = \frac{S^2_I}{S^2_N} \quad \text{Equação 2.10}$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher, para $n-1$ graus de liberdade [33]:

- Se $PG \leq F$ as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $PG > F$ as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter $PG \leq F$.

2.3.3 Limites de deteção

Na validação de um método é importante avaliar, também, os limites analíticos do método. De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) são definidos como: limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) [33].

Segundo a IUPAC o conceito de LD corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente. O conceito de LQ corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10%) para se poder efetuar uma deteção quantitativa, deste modo, na prática deve usar-se o LQ como início da zona em que se reportam valores numéricos [35].

A gama entre o LD e o LQ deve ser entendida como uma zona de deteção qualitativa, e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos nesta gama.

- **Limite de detecção**

Em termos qualitativos, o conceito de LD corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz, mas não contém o analito [33].

Uma leitura inferior ao LD não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor [33].

O cálculo do LD é possível através da equação 2.11.

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 2.11}$$

sendo que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração; este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração [24].

- m é o declive da curva de calibração

- **Limite de quantificação**

O LQ corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. Após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória [33].

O cálculo do LQ é possível através da equação 2.12.

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 2.12}$$

2.3.4 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico expresso como:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\Delta L}{\Delta c} = m \quad \text{Equação 2.13}$$

ou seja, sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido, ΔL , e a variação da concentração, ΔC , correspondente aquele acréscimo.

Na prática a sensibilidade pode ser obtida pelo declive da curva de calibração, como demonstrado na equação 2.13. Como resultado, o método terá mais sensibilidade quanto maior for o declive.

2.3.5 Precisão

Segundo a ISO 3534 entende-se por precisão a “concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas”. Ou seja, pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [33].

É, geralmente, avaliada através da determinação da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, sendo expressas como desvio padrão ou desvio padrão relativo.

A precisão é calculada a partir da equação 2.14, que permite calcular o desvio padrão, ou pelo coeficiente de variação, CV (equação 2.15).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 2.14}$$

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 2.15}$$

A estimativa da variância, S_r^2 , de um método pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises nas condições de repetibilidade pela equação 2.16:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) \times S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad \text{Equação 2.16}$$

Sendo:

S_{ri}^2 a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

S_{wi}^2 a variância associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

$n_{wi}-1$ os graus de liberdade da série de análises;

P o número de Laboratórios participantes.

- **Repetibilidade**

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo [36].

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i, X_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas [33].

A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efetuados no próprio Laboratório, intralaboratoriais. Para a sua determinação no próprio laboratório, efetua-se uma série de medições, com um mínimo de 10 ensaios [33].

A repetibilidade, r , é calculada para o nível de confiança de 95% pela equação 2.17.

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} \quad \text{Equação 2.17}$$

O valor 2,8 é referente ao fator crítico e S_{ri} é a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados. O valor crítico é sugerido pela ISO 5725-6:94 [33].

Os duplicados das determinações referentes à repetibilidade só são aceites se a diferença entre os dois valores e (x_{i1} e x_{i2}) for menor que r , ou seja $|x_{i1} - x_{i2}| \leq r$ [33].

- **Precisão Intermédia**

A precisão intermédia consiste na avaliação no próprio laboratório, dos resultados, mas alterando as condições, ou seja, dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes [37].

O limite de precisão intermédia (pi) para um conjunto de duplicados é dado pela equação 2.18.

$$pi = \frac{2,8 \times S_{pi}}{\bar{x}} \quad \text{Equação 2.18}$$

- **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade avalia a precisão do método em condições experimentais diferentes, variando determinadas condições como analistas, laboratórios e tempos. É obtida através de ensaios interlaboratoriais, sendo por isso analisadas uma série de amostras em p laboratórios participantes [33].

O valor da variância associada à reprodutibilidade é determinado segundo a equação 2.19.

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad \text{Equação 2.19}$$

em que S_{Ri}^2 é a variância da reprodutibilidade, S_{Li}^2 a variância interlaboratorial e S_{ri}^2 a variância da repetibilidade.

2.3.6 Exatidão

A exatidão é definida como a proximidade do resultado obtido em relação ao valor de referência, que é considerado como verdadeiro.

A exatidão de um método analítico pode ser determinada através da participação em ensaios interlaboratoriais, pelo estudo de materiais de referência certificados, através de ensaios fortificados e por comparação com métodos de referência [36].

Uma forma de avaliação da exatidão é através do erro relativo do valor obtido experimentalmente (x_{exp}) em relação ao valor aceite como verdadeiro (x_v), como demonstrado na equação 2.20.

$$\%E_r = \frac{x_{exp} - x_v}{x_v} \times 100 \quad \text{Equação 2.20}$$

O grau de exigência relativamente à exatidão do método é do critério do laboratório, sendo que, o valor de E_r inferior ou igual a 5% em alguns casos pode ser satisfatório.

Outra forma de avaliação do desempenho do laboratório é o cálculo do fator de desempenho Z (“z-score”).

$$Z = \frac{x_{exp} - x_v}{S} \quad \text{Equação 2.21}$$

Sendo que S representa, a unidade de desvio, que pode ser a incerteza do valor verdadeiro.

O desempenho de cada laboratório é avaliado de acordo com uma escala de pontuação [39]:

- $|Z| \leq 2 \rightarrow$ resultado aceitável ou satisfatório;
- $2 < |Z| < 3 \rightarrow$ resultado questionável;
- $|Z| \geq 3 \rightarrow$ resultado incorreto.

A recuperação, R , de um analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. A escolha da concentração da fortificação deve ser baseada na gama de trabalho de modo a serem avaliadas concentrações nos extremos e no centro da gama. A percentagem de recuperação permite verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, ou seja, efeito de matriz [38, 40]. É calculada através da equação 2.22.

$$\%R = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2.22}$$

em que C_1 é a média da concentração do analito na amostra fortificada, C_2 a média da concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 a concentração conhecida do analito adicionada à amostra.

2.3.7 Incerteza

A incerteza avalia a dispersão de valores que podem ser atribuídos ao ensaio. É muitas vezes confundida com o erro de um resultado, o que é incorreto, na medida que, a incerteza exprime a possibilidade de erro do resultado, enquanto o erro é a medida da exatidão do erro do resultado [33].

Considerando o trabalho a ser desenvolvido na dissertação, as incertezas necessárias são:

- Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração;
- Incerteza associada ao volume da amostra;
- Incerteza associada à preparação dos padrões de calibração;
- Incerteza associada à variabilidade / precisão / dispersão do método de ensaio.

A incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração é dada através da equação 2.23

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{\text{lid}} - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 2.23}$$

sendo que:

S_y - desvio padrão

b – declive da curva de calibração

N – nº de padrões da curva de calibração

n – nº de réplicas utilizadas na amostra

y_{lid} - Valor dado pelo equipamento para a amostra problema

\bar{y} - Valor médio das leituras fornecidas pelo equipamento para os padrões de calibração

x_i - Concentração dos padrões de calibração

\bar{x} - Valor médio das concentrações dos padrões de calibração

Relativamente à incerteza associada ao volume da amostra é calculada pela lei da propagação de erros presente na equação 2.24.

$$u(C) = C \times \sqrt{\left(\frac{u(\text{reta})}{c}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{volume})}{v}\right)^2} \times 3 \quad \text{Equação 2.24}$$

A incerteza da precisão é calculada através do desvio padrão de 10 ou mais amostras, como na equação 2.25.

$$u(\text{Precisão}) = \frac{\text{desvio padrão } n \text{ resultados}}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 2.25}$$

Assim sendo, a incerteza combinada será dada pela equação 2.26.

$$u(\text{combinada}) = \sqrt{(u(C))^2 + (u(\text{Precisão}))^2} \quad \text{Equação 2.26}$$

Para um grau de confiança de 95,45%, a incerteza expandida é calculada pela equação 2.27.

$$u(\text{expandida}) = 2 \times u(\text{combinada}) \quad \text{Equação 2.27}$$

Relativamente aos algarismos significativos, a incerteza associada ao resultado deve ser apresentada com um ou no máximo dois algarismos significativos.

2.3.8 Controlo da Qualidade

Após aprovação do método analítico é necessário o controlo da sua execução de modo a garantir que as condições de validade do método mantêm-se.

Como ao longo de qualquer análise química podem surgir erros, sistemáticos ou aleatórios, que irão afetar o produto final é necessário um sistema de Controlo da Qualidade (CQ) interno dos resultados [38, 40].

O controlo da qualidade interno dos métodos de ensaio é o conjunto de procedimentos que são realizados num laboratório, que tem como objetivo o controlo da qualidade dos resultados obtidos à medida que as análises são realizadas. Assim, o sistema CQ que o laboratório possui deverá recorrer a algumas ferramentas como Materiais de Referência Internos (MRI), técnicas complementares de CQ de resultados,

como a análise de brancos em paralelo com amostras, o uso de duplicados de análises, uso do método de adição de padrão, ensaios de recuperação e fortificação de amostras, entre outras, e por último, tratamentos estatísticos de dados, como as cartas de controlo [38].

As cartas de controlo foram desenvolvidas em 1931 por Walter Shewhart e são essenciais, quer na identificação de tendências que prejudicam os processos produtivos, quer na tomada de decisão sobre as medidas corretivas adequadas. A intervenção imediata, em casos de anomalias, acaba por reduzir os riscos de rejeição de produtos e erros nos resultados [39].

As cartas de controlo mais comuns são cartas de médias ou de indivíduos, representam ao longo do tempo um determinado parâmetro ou uma média em função do teor, e as cartas de amplitude ou de amplitude móveis que representam ao longo do tempo a diferença de valores entre vários ensaios repetidos (dois ou mais) do mesmo material ou de materiais diferentes dentro de uma determinada gama de trabalho [39].

Esta ferramenta contém um conjunto de linhas que permitirão saber se o processo é ou não controlado. Por exemplo, o limite central (LC) especifica o valor mais provável (média das leituras efetuadas). Os limites de controlo superior e inferior (LCS e LCI), os chamados limites de ação, correspondem aos limites de confiança estabelecidos a 99% (extremos), enquanto os limites de aviso superior e inferior (LAS e LAI) são estabelecidos a 95%, pois alertam para a entrada numa zona de perigo. Na figura 2.8 é possível verificar um exemplo de uma carta de controlo, com um ponto fora do limite de controlo.

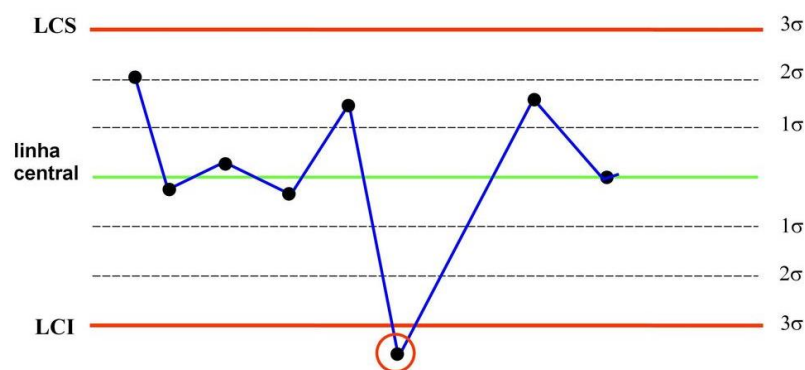


Figura 2.8: Exemplo de uma carta de controlo, com um ponto fora do limite de controlo [40]

Os Materiais de Referência Internos (MRI) permitem o controlo da exatidão e a precisão/fidelidade ao longo do tempo e a frequência do seu uso é estabelecida consoante as características de cada análise. Os padrões de calibração e de controlo são efetuados através dos MRI independentes e devem ter concentrações semelhantes às das amostras (em análises de rotina) e estabelecidas junto à zona de interesse (obrigatório a utilização de padrões nos limiares das gamas de trabalho) [38,39].

Os padrões de controlo são independentes dos padrões de calibração sendo utilizados uma vez que os reagentes, solventes e soluções usados no controlo da curva de calibração devem apresentar um grau de pureza e estabilidade compatíveis com a qualidade exigida pelos resultados. Sempre que seja realizada uma calibração, deve ser feita a análise, no mínimo, de um padrão e de acordo com o desempenho do método na fase de validação, em condições de precisão intermédia, os critérios de aceitação podem ser definidos com base em critérios de aceitação fixos [39,40].

Para a verificação de ocorrência de contaminações ou deterioração de reagentes, é utilizado o controlo de brancos, que basicamente é um ensaio onde estão presentes todos os reagentes, exceto a amostra. Permite ainda controlar indiretamente o limite de deteção e/ou quantificação [39].

A análise de duplicados consiste em ensaios sobre duas tomas de amostras, realizando as várias medições nas duas amostras independentemente. Este tipo de análise deve ser considerado como uma ferramenta de deteção de erros acidentais e de controlo de repetibilidade, sendo aconselhável que a frequência da sua realização não seja inferior a 5% [39,40].

3 Materiais e Métodos

A metodologia desenvolvida para cumprir o objetivo do presente trabalho baseou-se na determinação de 2,4,6-TCA por SPME combinada com GC-ECD aplicada a amostras de água.

3.1 Reagentes

Na realização do método foi necessário o uso do padrão 2,4,6-tricloroanisol (Supelco, Sigma Aldrich, 100 $\mu\text{g/mL}$ em metanol) e como padrão interno o 2,3,6-tricloroanisol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em ciclohexano). O eletrólito utilizado nos padrões e amostras foi o cloreto de sódio (Honeywel Fluka Purriss, p.a. $\geq 99,5\%$).

A água usada para a realização das curvas de calibração consiste em água da rede pública que passa por um processo de filtração e depurada de cloro, que é a água utilizada nas enxaguadoras. O ponto de amostragem é o reservatório da enxaguadora. Para além da água do reservatório da enxaguadora, foi utilizada água do tipo I que consiste em água da rede pública a qual passa por um desionizador de permuta iónica, uma coluna de resina e um filtro de 0,2 μm de tamanho de poros.

3.2 Equipamentos

Ao longo do desenvolvimento do método foram necessários os seguintes equipamentos: Micropipeta Gilson 1 a 10 mL, Micropipeta Scientific eVol com seringas de 50 μL e 500 μL , como é possível observar na figura 3.1.



Figura 3.1: Micropipeta Scientific eVo

Para a determinação de TCA recorreu-se a um cromatógrafo de gás com detetor de captura de eletrões Thermo Scientific Trace 1300 ECD, equipado com uma coluna capilar TG-5MS, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Na figura 3.2 é possível observar o equipamento utilizado.

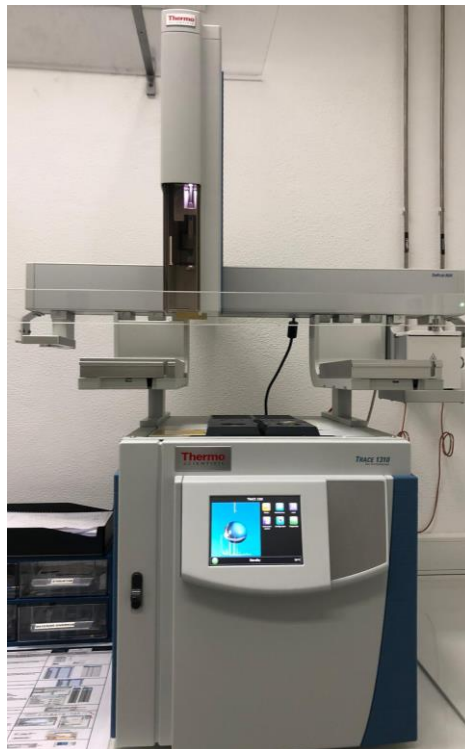


Figura 3.2: Cromatógrafo Thermo Scientific Trace 1300 ECD

O programa de temperatura usado no desenvolvimento do método encontra-se na figura 3.3. Este programa é baseado na Norma ISO 20752:2014 – Rolhas Determinação de 2,4,6-TCA. Esta norma corresponde à norma implementada pelo laboratório na sua análise diária de TCA em rolhas.

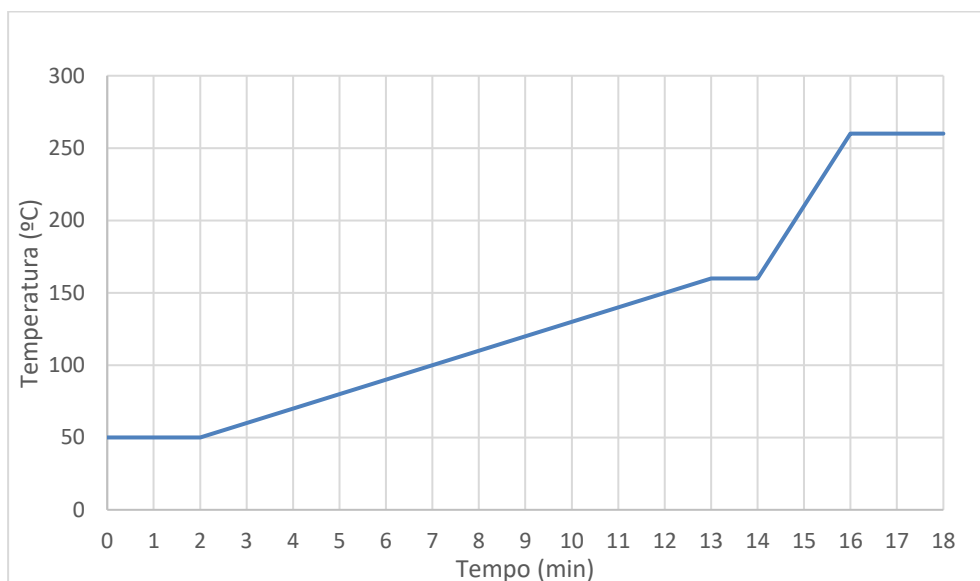


Figura 3.3: Gráfico do programa de temperatura do forno

A temperatura do injetor corresponde a uma temperatura de 250 °C e a temperatura do detector ECD uma temperatura de 280 °C.

O gás de arraste é o Hélio com um caudal de 1 mL/min, sendo que a injeção é realizada em modo *splitless* durante 2 minutos, com um caudal de *split* de 15 mL/min. O gás de make-up é o Azoto, com um caudal de 20 mL/min.

3.3 Microextração em fase sólida

Na etapa da microextração em fase sólida a fase estacionária utilizada é uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm.

Na tabela 3.1 apresentam-se os parâmetros gerais de SPME realizados num “autosampler” Supelco que são baseados na Norma ISO 20752:2014 – Rolhas-Determinação de 2,4,6-TCA.

Tabela 3.1: Parâmetros gerais da SPME realizados num "autosampler" Supelco.

Parâmetros	Condições
Temperatura de extração	40 °C
Tempo de extração	15 minutos sob agitação
Agitação	Ciclos de 20 segundos ligada e 60 segundos desligada
Velocidade de agitação	250 rpm
Temperatura de dessorção	250 °C
Tempo de dessorção	5 minutos

Para a otimização do método é necessário a realização de vários ensaios com diferentes condições de SPME.

3.4 Preparação dos Ensaio

3.4.1 Preparação de soluções stock de 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA

A solução comercial, adquirida pelo laboratório, de 2,4,6-TCA tem uma concentração de 100 µg/mL. Como se pretende uma solução de concentração final de 1 µg/mL é necessário fazer duas diluições sucessivas.

Primeiramente, a solução comercial que vem em ampolas de 1 mL é diluída em metanol para uma concentração final de 1 mg/L, esta solução é chamada de solução stock I. De seguida, a solução stock I é diluída para 1 µg/L dando origem à solução stock II, que é usada para preparação de padrões da curva de calibração e padrões de controlo.

Relativamente ao padrão interno, este é adquirido comercialmente em vias de 10 mL com a concentração de 10 mg/L, sendo diluído para 10 µg/L. Os cálculos para todas diluições referidas estão referenciados no anexo A.

As condições de armazenamento das soluções de stock I e stock II correspondem a vials isolados da luz e refrigerados. Na figura 3.4 é possível observar os vials utilizados.



Figura 3.4: Vials utilizados para o padrão interno (vial à esquerda) e para as soluções de stock I e II (vial à direita).

3.4.2 Preparação de soluções padrão

As soluções padrão são preparadas a partir da solução stock II de 2,4,6-TCA 1 µg/L. Os padrões de calibração são preparados diretamente em vials de 20 mL utilizando o volume de solução stock II conforme a tabela 3.2 e utilizando ainda amostra, água, 10,0 mL.

Tabela 3.2: Volume da solução stock II de 2,4,6-TCA para diferentes concentrações das soluções dos padrões de calibração.

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)
1,5	15,0
3,5	35,0
4,5	45,0
5,5	55,0
7,5	75,0
9,5	95,0

Considerando que os padrões de calibração são preparados diretamente nos *vials* o volume final será ligeiramente superior aos 10 mL e por isso as concentrações finais serão ligeiramente diferentes, sendo necessário o seu cálculo. Os cálculos das concentrações reais dos padrões encontram-se no anexo A.

3.4.3 Preparação da amostra

Os ensaios foram efetuados em viais de 20 mL com tampas de rosca com septo. Em cada ensaio, é adicionado no vial 3 g de cloreto de sódio (NaCl) com pureza > 99,5%. O valor da massa de NaCl está de acordo com a norma ISO 20752:2014. A conservação do sal e a garantia da ausência de água é efetuada com o auxílio de um exsiccador.

O volume de amostra usado em cada ensaio é 10,00 mL. A amostra foi em todos os ensaios, água da enxaguadora, ou seja, água do processo, exceto no ensaio 2. É ainda adicionado o volume de solução de 2,4,6-TCA pretendido e solução de padrão interno 2,3,6-TCA.

4 Resultados

Nesta secção serão apresentados todos os resultados obtidos, desde a otimização do método até à validação do método.

4.1 Identificação dos picos de 2,3,6-tricloroanisol e de 2,4,6-tricloroanisol

Para identificar o tempo de retenção do analito e do padrão interno, observou-se cromatogramas de ensaios em branco e ensaios com concentrações diferentes de 2,4,6-TCA.

Nas figuras 4.1, 4.2 e 4.3 encontram-se representados, respetivamente, os cromatogramas do branco, do padrão de menor concentração de 2,4,6-TCA (1,5 ng/L) e do padrão de concentração superior de 2,4,6-TCA (9,5 ng/L).

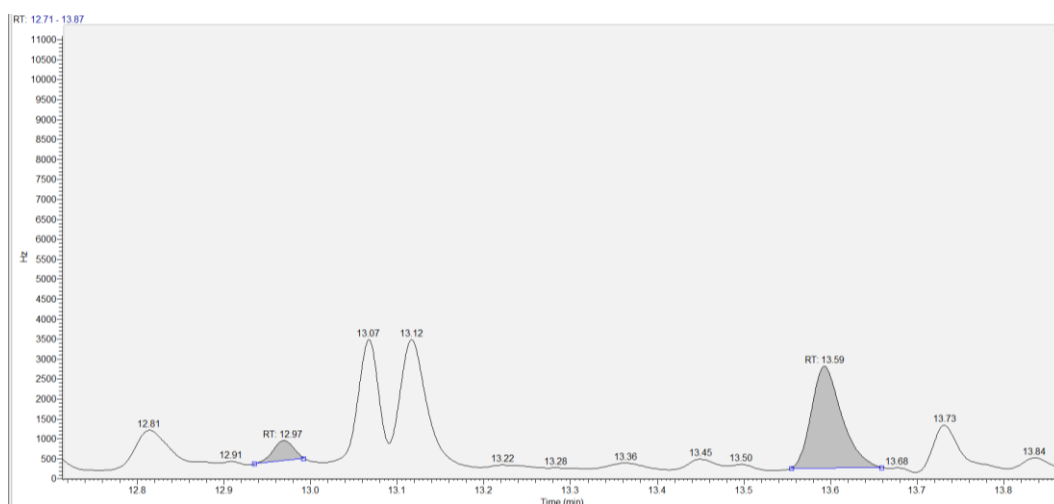


Figura 4.1: Cromatograma obtido para um branco (água, sal e padrão interno) entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

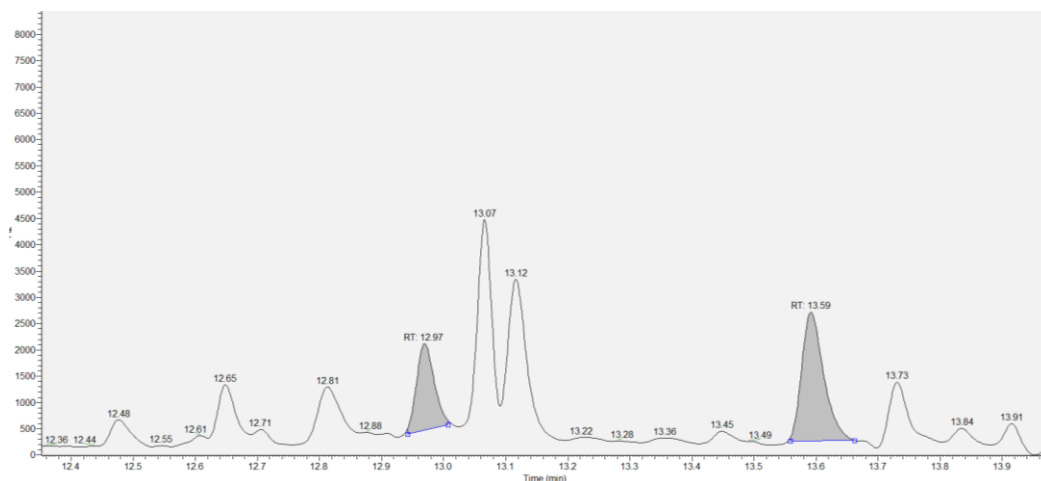


Figura 4.2: Cromatograma obtido para solução 1,5 ng/L em 2,4,6-TCA entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

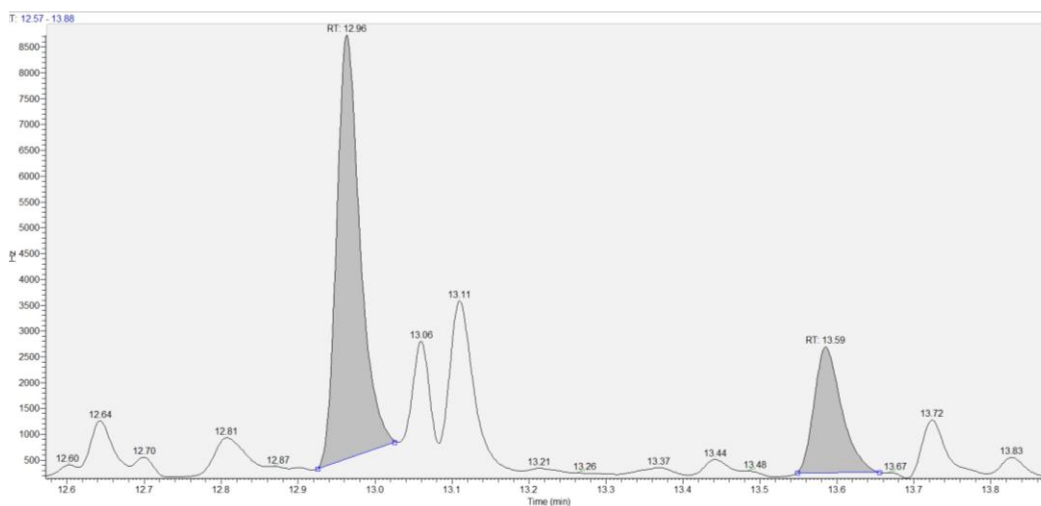


Figura 4.3: Cromatograma obtido para solução 9,5 ng/L em 2,4,6-TCA entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

Como é possível observar nas figuras 4.1, 4.2 e 4.3 o pico que se mantém constante em área é o pico que ocorre aos 13,59 min de tempo de retenção, concluindo-se que este é o tempo de retenção do padrão interno 2,3,6-TCA. Já o tempo de retenção do analito, é possível confirmar que corresponde ao tempo de retenção de 12,96 min, visto que no ensaio do branco existe apenas um pico residual neste tempo, enquanto no vial fortificado com 1,5 e 9,5 ng/L, o pico encontra-se com uma área maior, aumentando consoante a concentração de 2,4,6-TCA.

4.2 Otimização do método

O laboratório de qualidade e materiais da Symington tem implementados dois métodos de ensaio para análise e quantificação de 2,4,6-TCA: o método das rolhas, de acordo com a Norma ISO 20752:2014, que utiliza curvas de calibração com matriz de solução etanólica 12% (v/v) e o método do vinho DOC, que foi criado e otimizado internamente no laboratório que utiliza uma curva de calibração com um teor de etanol de 6,5% (v/v) obtido por diluição do vinho DOC. Os parâmetros de cada método encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros de trabalho dos dois métodos implementados na empresa

	Método das Rolhas	Método do Vinho DOC
Tempo de Extração (min)	15	25
Tempo de Dessorção (min)	5	5
Volume de amostra (mL)	10	10 (5 mL de vinho tinto DOC + 5 mL água desionizada tipo I)
Volume PI (2,3,6-TCA) (µL)	20	50

Em termos logísticos, é do interesse do laboratório conseguir que um método permita analisar vários tipos de amostra. Assim sendo, o primeiro passo da otimização consistiu na tentativa de aplicar o método das rolhas às amostras de água.

A partir desse primeiro ensaio, analisando os resultados obtidos, começou-se a alterar alguns dos parâmetros, mais concretamente, o tempo de extração e dessorção. Na tabela 4.2 é possível verificar as condições em cada ensaio.

Tabela 4.2: Valores otimizados para os ensaios realizados.

	Tempo de Extração (min)	Tempo de Dessorção (min)	Amostra	Volume de PI (µL)	Gama de trabalho (ng/L)
Ensaio 1	15	5	Água do processo	20	[1,5; 9,5]
Ensaio 2	15	5	Água desionizada	20	[1,5; 9,5]
Ensaio 3	10	5	Água do processo	20	[1,5; 9,5]
Ensaio 4	8	5	Água do processo	20	[1,5; 9,5]
Ensaio 5	8	3	Água do processo	20	[1,5; 9,5]

4.2.1 Ensaio 1

No ensaio 1 começou-se por fazer uma curva de calibração apenas com 4 pontos de modo a prevenir um gasto indevido de reagentes tendo em conta que seria o primeiro ensaio a ser realizado. Assim as condições utilizadas neste ensaio são as expressas na tabela 4.2. A amostra foi recolhida no depósito de água da enxaguadora.

Ao observar os cromatogramas foi possível observar que no tempo de 3,53 minutos ocorria saturação da fibra o que resulta num pico com aspeto de um degrau. Esta saturação da fibra ocorreu em todas as gamas de concentração, mas sem repetibilidade, por exemplo nas concentrações 0 ng/L e 4,5 ng/L das 3 réplicas em cada uma das concentrações houve 1 réplica sem saturação.

Na figura 4.4 e na figura 4.5 é possível observar os cromatogramas dos 4 pontos escolhidos para a curva de calibração, sendo que a figura 4.4 corresponde ao cromatograma na totalidade sendo visível a saturação e na figura 4.5 o cromatograma ampliado nos tempos de retenção do 2,3,6-TCA e 2,4,6-TCA, entre 13,04 e 14,00 min.

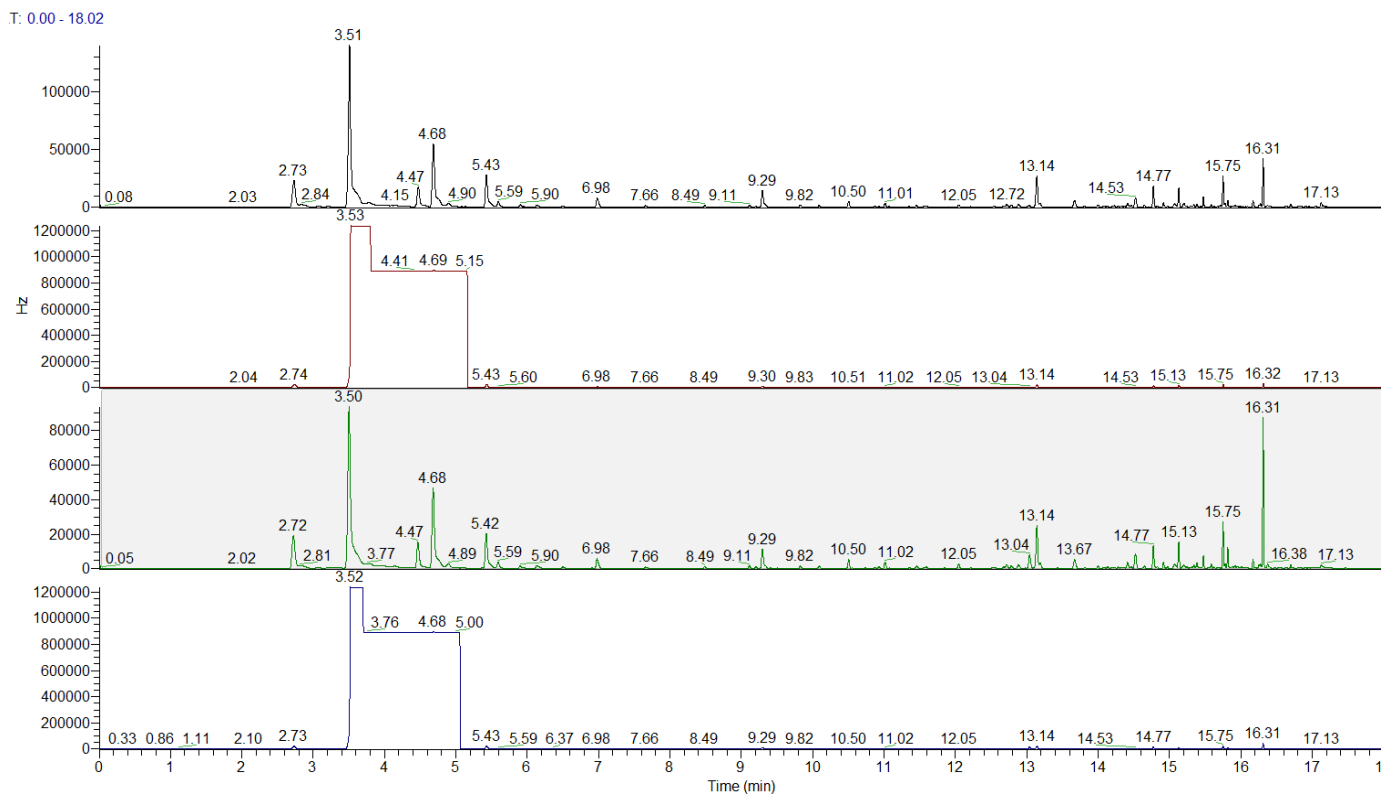


Figura 4.4: Cromatogramas do ensaio 1 (preto - 0 ng/L, vermelho - 1,5 ng/L, verde - 4,5 ng/L e azul - 9,5 ng/L em 2,4,6-TCA)

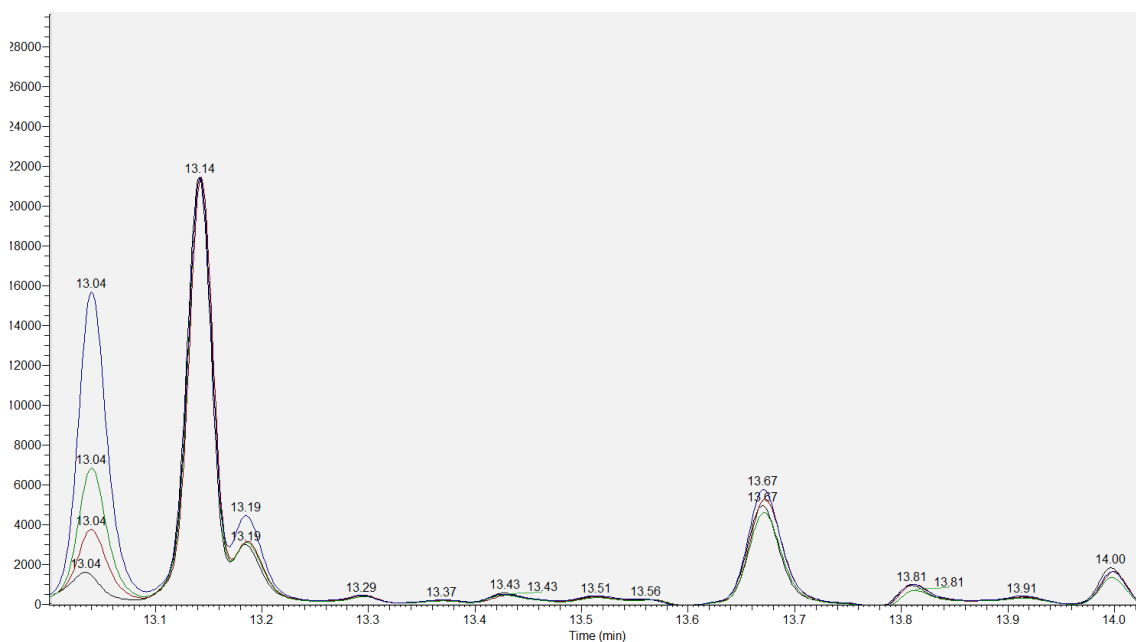


Figura 4.5: Cromatograma correspondente ao ensaio 1 com os 4 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 13,04 e 14,00 min.

A curva de calibração para o ensaio 1 foi obtida utilizando os padrões de calibração: 0; 1,5; 4,5 e 9,5 ng/L, e é possível observá-la na figura 4.6.

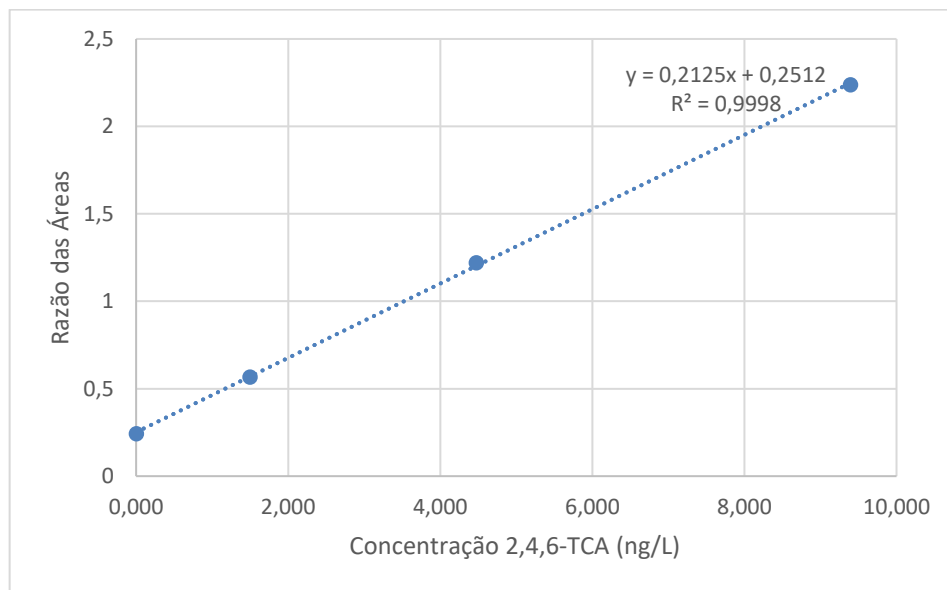


Figura 4.6: Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 1.

Observando a figura 4.6, é possível verificar que existe uma boa linearidade entre a razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) e a concentração de 2,4,6-TCA, comprovada com o coeficiente de determinação de 0,9998. Apesar da boa linearidade, não corresponde a uma curva de calibração adequada pois apenas possui 4 pontos. Relativamente às áreas do pico do PI obteve-se um desvio padrão relativo, RSD, de 8,9%.

O limite de detecção e o limite de quantificação, cujos cálculos se encontram no anexo B, foram respetivamente de 0,233 ng/L e de 0,775 ng/L.

Com este ensaio foi possível verificar que existe uma saturação da fibra. Esta poderá ocorrer por diversas razões sendo as mais plausíveis a fibra não estar nas melhores condições de utilização ou algum componente da matriz da amostra analisada interferir. O detetor de captura de eletrões funciona ionizando os eletrófilos da amostra convertendo a resposta num sinal. Sabendo que na matriz da água é possível encontrar eletrófilos como Cl, Br, F, NO_x, P entre outros, um destes componentes poderá estar presente com uma maior concentração, obtendo-se um sinal de maior intensidade que

corresponde a um pico de área bastante elevada que ultrapassa a escala, ou seja, a amostra satura assim a fibra.

A hipótese de a fibra não estar nas melhores condições foi eliminada uma vez que nos ensaios de rotina efetuados no laboratório em nenhum ocorreu saturação da fibra. Por outro lado, o laboratório tem implementado um sistema de qualidade, que consiste na troca da fibra a cada 1000 viais analisados, quando não existem indícios de anomalias, sendo que quando se realizou o ensaio, a fibra ainda estava no período de utilização.

É necessário também ponderar uma contaminação por via dos materiais, como por exemplo dos viais, uma vez que a saturação da fibra não ocorreu em todas as concentrações, e nas amostras em triplicado nem sempre acontecia nas 3 amostras. Mas esta hipótese também é facilmente rejeitada, uma vez que o laboratório tem implementado um procedimento de lavagem do material muito rigoroso, sendo lavado com solução etanólica a 12%, depois com uma solução de detergente, de seguida passado por água tipo I e coloca-se na estufa a secar. Antes de cada utilização os viais são novamente enxaguados com água do tipo I.

Apesar de a saturação ocorrer 10 minutos antes do pico do 2,4,6-TCA, não interferia no resultado, no entanto, em termos de vida útil da fibra esta fica bastante reduzida. De modo a comprovar que esta saturação é resultado de algum efeito de matriz procedeu-se ao ensaio 2 em que a amostra corresponde a água desionizada do tipo I, do laboratório.

4.2.2 Ensaio 2

Como já referido, no ensaio 2 utilizou-se água desionizada do tipo I de modo a verificar se, do mesmo modo que no ensaio 1, ocorre saturação da fibra. Para isso utilizou-se as mesmas condições do ensaio 1, mas acrescentando mais uma concentração à curva de calibração de modo a ter os 5 pontos mínimos.

Na figura 4.7 é possível verificar o cromatograma das cinco soluções padrão da curva de calibração, sem ocorrência de saturação da fibra.

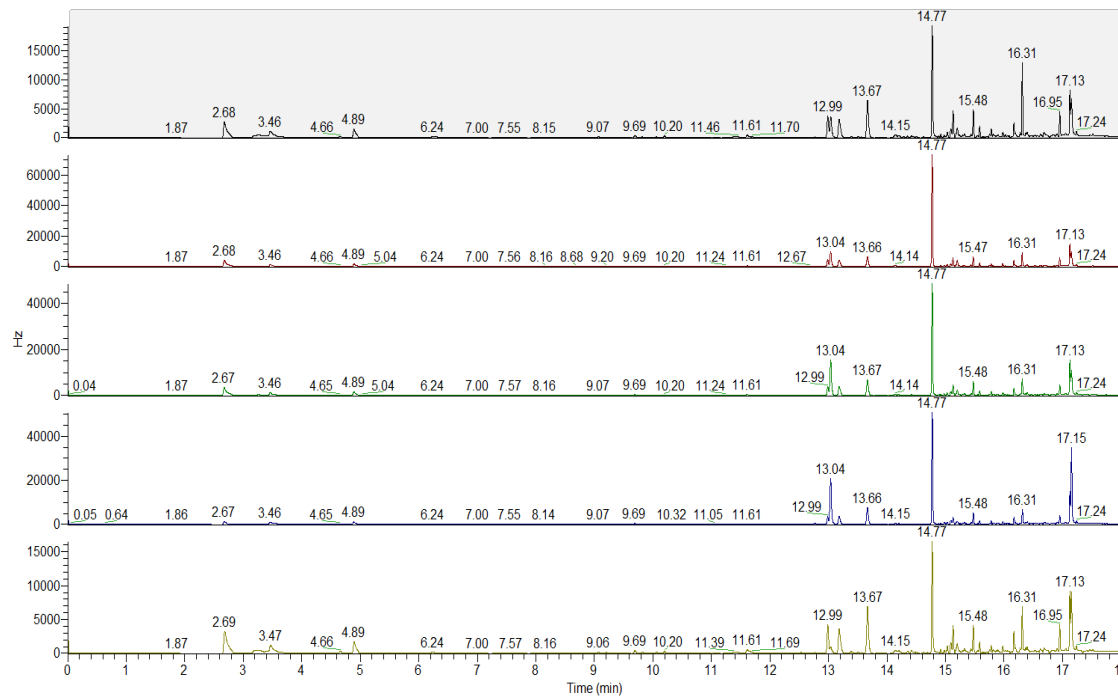


Figura 4.7: Cromatogramas do ensaio 2 (amarelo - 0 ng/L, preto - 1,5 ng/L, vermelho - 4,5 ng/L, verde - 7,5 ng/L e azul - 9,5 ng/L de 2,4,6-TCA).

Nas figuras 4.8 e 4.9 encontram-se os cromatogramas referentes ao ensaio 2, sendo que “RT” corresponde ao tempo de retenção e “MA” à área.

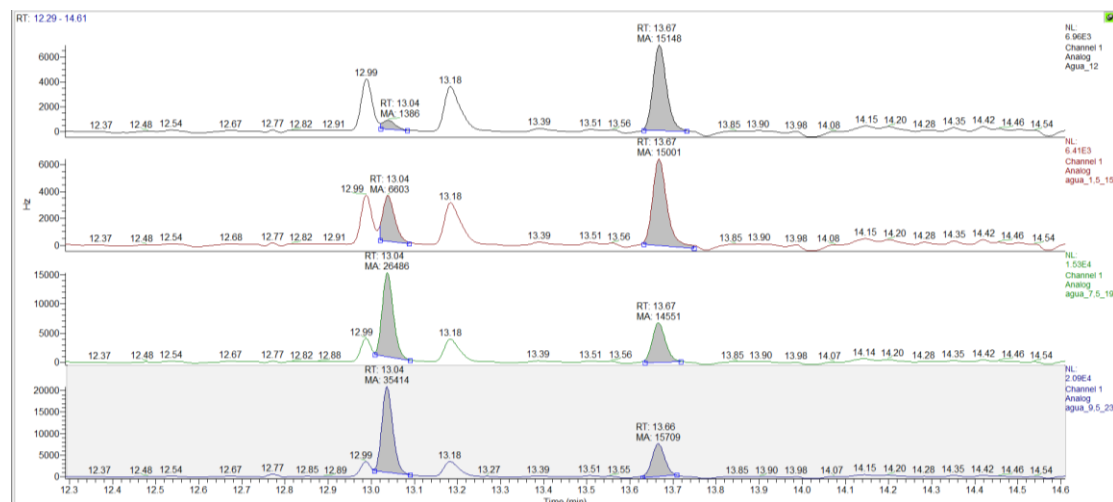


Figura 4.8: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 2 com os 4 pontos da curva de calibração, faltando o cromatograma da concentração de 4,5 ng/L, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.

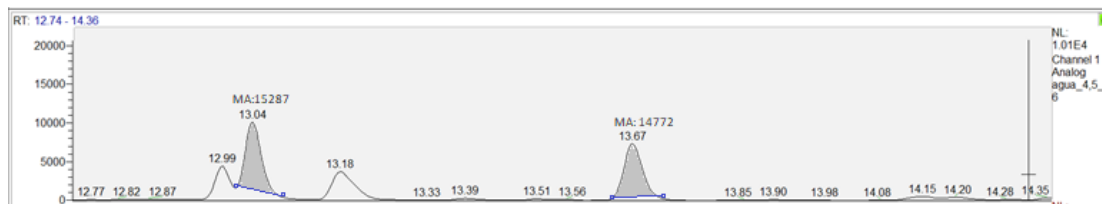


Figura 4.9: Cromatograma da concentração de 4,5 ng/L, no intervalo de tempo entre 12,77 e 14,35 min.

A área do PI na figura 4.8 parece diminuir com o aumento da concentração do 2,4,6-TCA, por causa da escala do programa mudar com o aumento do pico do 2,4,6-TCA. Observando “MA” é possível verificar que a área do PI se mantém praticamente constante. A partir da análise dos cromatogramas traçou-se a curva de calibração da figura 4.10. Observando a curva de calibração é possível verificar novamente uma excelente linearidade ($R^2=0,9993$) e relativamente às áreas obtidas do PI obteve-se um RSD de 10%.

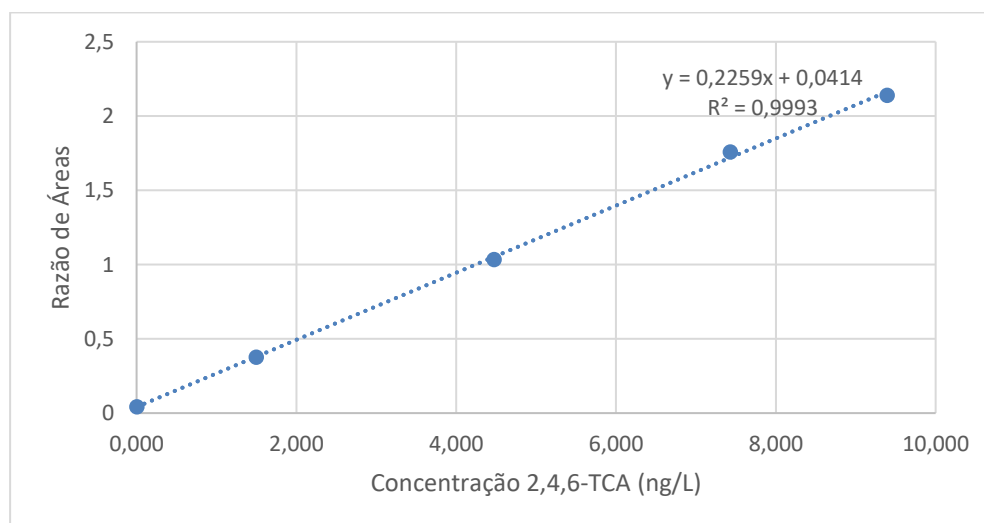


Figura 4.10: Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 2

Analisando os valores do LD e LQ que foram, respetivamente, 0,39 ng/L e 1,29 ng/L, é possível afirmar que ambos se encontram próximos dos valores do ensaio 1.

Considerando os resultados obtidos, foi possível concluir que a saturação ocorrida no ensaio 1 corresponde de facto a algum componente presente na matriz água confirmando assim a não existência de problema com a fibra.

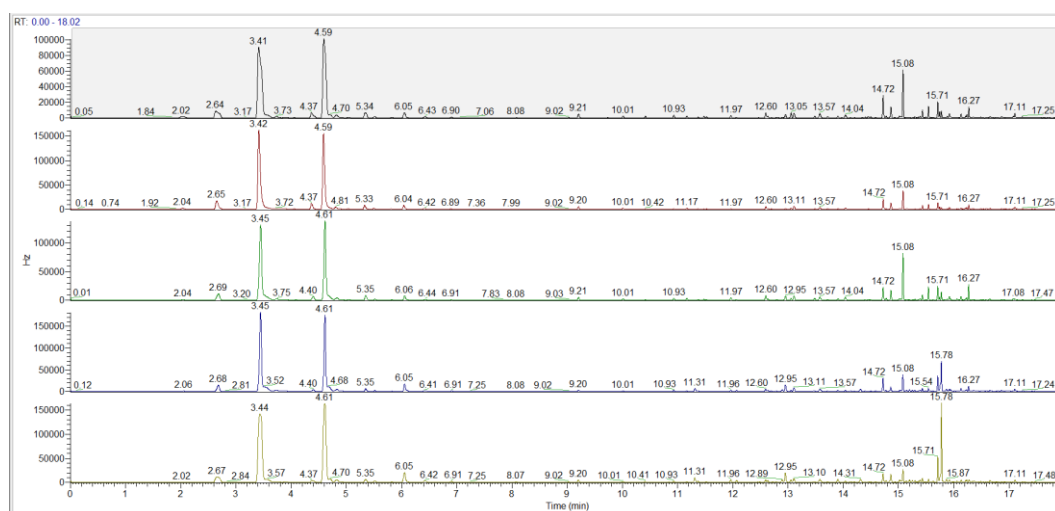
Uma vez que com o método de rolhas ocorreu saturação da fibra, em que o tempo de análise é inferior ao do método do vinho DOC, a tentativa de aplicar este método foi assim posta de parte, sabendo que com 25 min de extração a fibra estaria ainda mais tempo exposta à matriz e por isso iria saturar ainda mais.

De modo a tentar que a saturação não aconteça os parâmetros nos próximos ensaios vão ser alterados, nomeadamente no tempo de extração e dessorção.

4.2.3 Ensaio 3

Considerando que com a matriz da amostra de água de processo ocorreu saturação da fibra, foi necessário alterar o tempo de extração. Começou-se por alterar este parâmetro uma vez que este corresponde ao tempo que a fibra se encontra exposta à amostra, e ao diminuir este parâmetro a saturação deverá diminuir. Neste ensaio, experimentou-se um tempo de extração de 10 minutos, reduzindo 5 minutos à condição do ensaio 1, e manteve-se o tempo de dessorção. A gama de trabalho também se manteve.

Na figura 4.11 é possível observar os cromatogramas das 5 soluções padrão da curva de calibração, sem ocorrência de saturação da fibra.



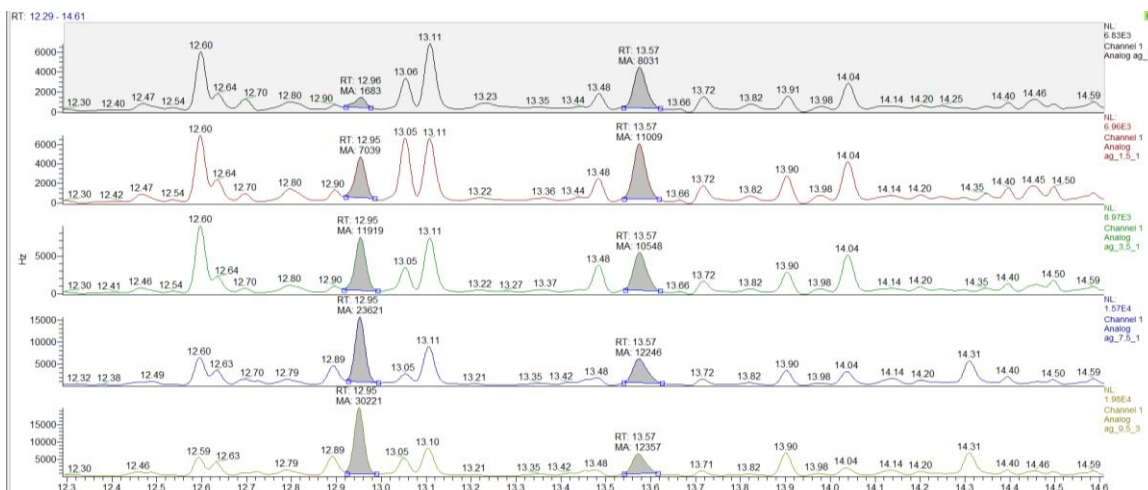


Figura 4.12: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 3 com os 5 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.

Relativamente à curva de calibração, correspondente à figura 4.13, foi necessário excluir da reta a concentração de 5,5 ng/L, uma vez que este ponto ficava afastado da curva. Obteve-se um coeficiente de determinação bom, de 0,9995 e relativamente às áreas obtidas do PI obteve-se um %RSD de 14,2%.

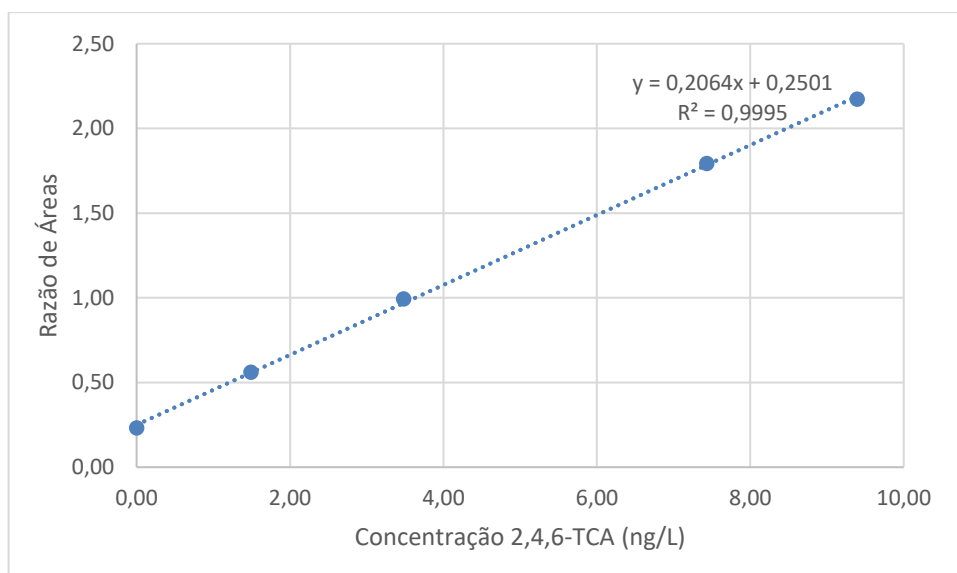


Figura 4.13: Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 3

4.2.4 Ensaio 4

O ensaio 4 foi planeado para baixar ainda mais o tempo de extração mantendo os restantes parâmetros do ensaio anterior. Deste modo será possível reduzir o tempo de análise. Observando os cromatogramas da figura 4.14, é possível verificar que não houve saturação da fibra e que os picos se encontram bem definidos com o tempo de retenção do 2,4,6-TCA de 12,96 min e do 2,3,6-TCA (PI) de 13,57 min.

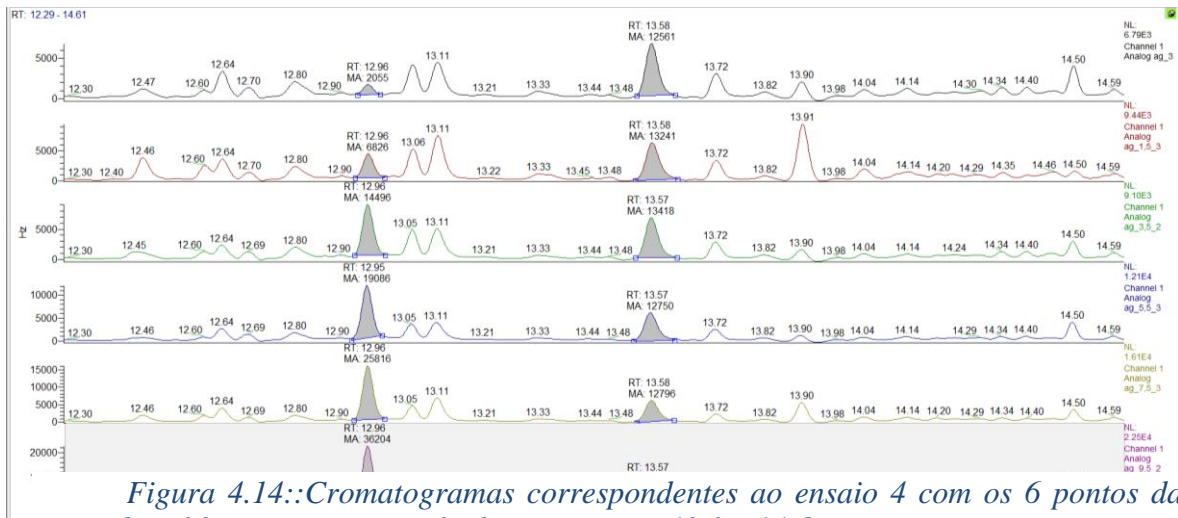


Figura 4.14::Cromatogramas correspondentes ao ensaio 4 com os 6 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,6 min.

Na figura 4.15 encontra-se a curva de calibração correspondente ao ensaio 4.

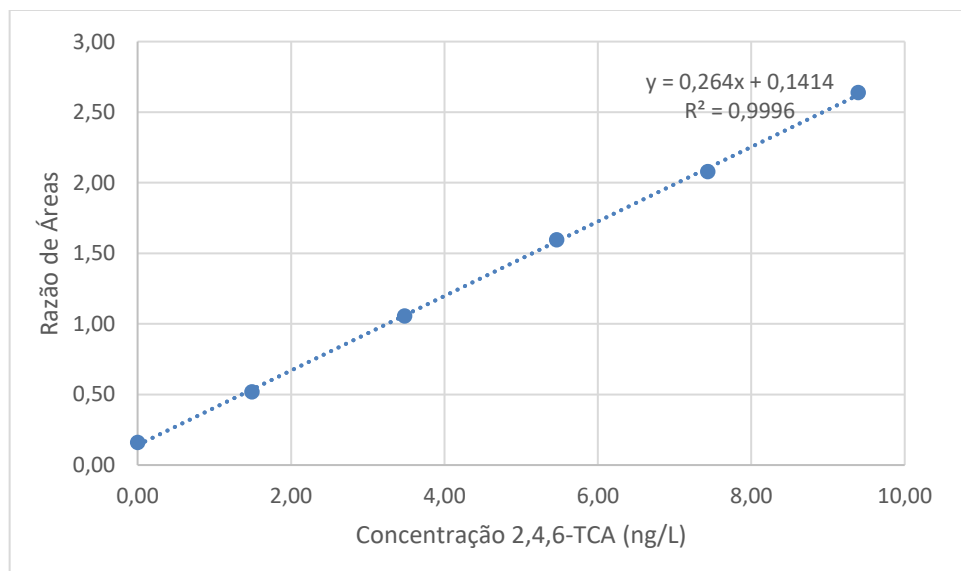


Figura 4.15. Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 4

Como se pode verificar, existe uma relação linear ($R^2=0,9996$) entre a razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA (PI) e a concentração de 2,4,6-TCA, na gama

estudada, com um coeficiente de correlação superior ao obtido no ensaio 3, utilizando o tempo de extração de 10 min. Para além disso obteve-se um RSD de 5,6% referente às áreas dos picos do PI, muito inferior ao do ensaio 3.

4.2.5 Ensaio 5

Por último, neste ensaio testou-se a possibilidade de reduzir ainda mais o tempo de análise, avaliando a redução do tempo de desorção de 5 para 3 min e mantendo o tempo de extração de 8 min. Na figura 4.16 são apresentados os cromatogramas ampliados para o intervalo de tempo de 12,3 a 14,15 minutos.

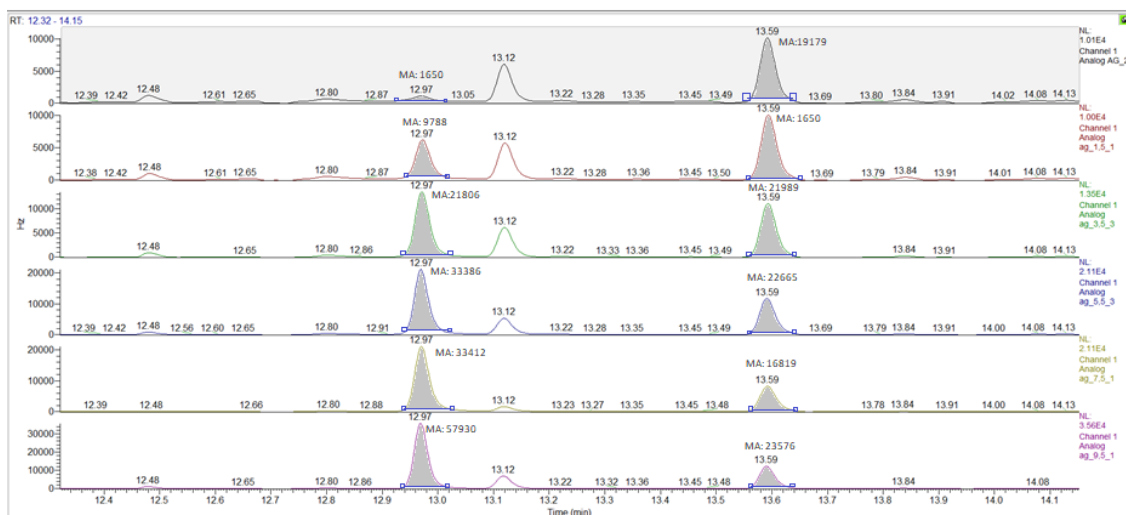


Figura 4.16: Cromatogramas correspondentes ao ensaio 5 com os 6 pontos da curva de calibração, no intervalo de tempo entre 12,3 e 14,15 min.

Na figura 4.17 é apresentada a curva de calibração do ensaio 5, onde se verificou uma relação linear ($r^2=0,9996$) e obteve-se um RSD de 12% das áreas dos picos do PI.

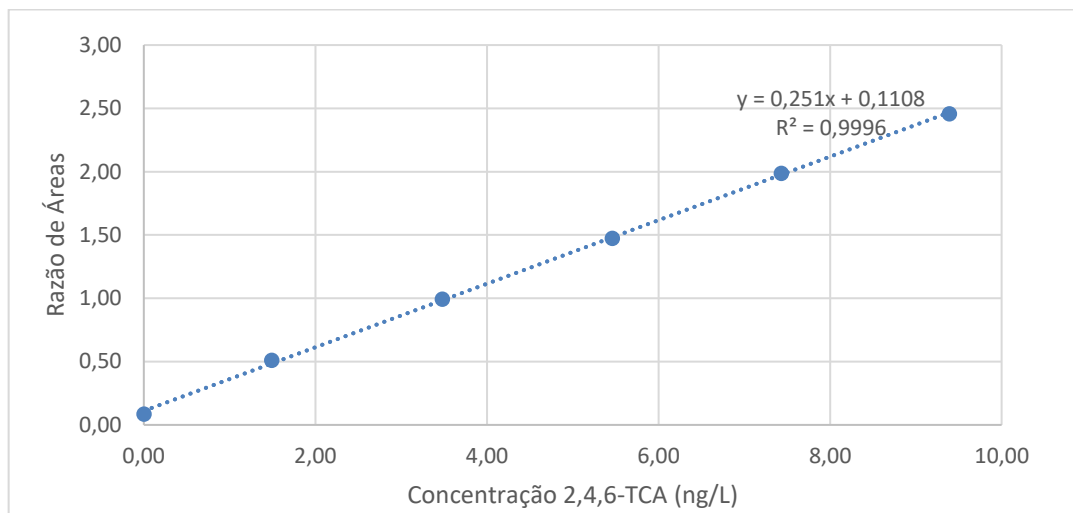


Figura 4.17: Curva de calibração da razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) em função da concentração do 2,4,6-TCA, para o ensaio 5

Analisando a figura 4.18, é possível comparar a área do 2,4,6-TCA para cada concentração nos ensaios 3, 4 e 5.

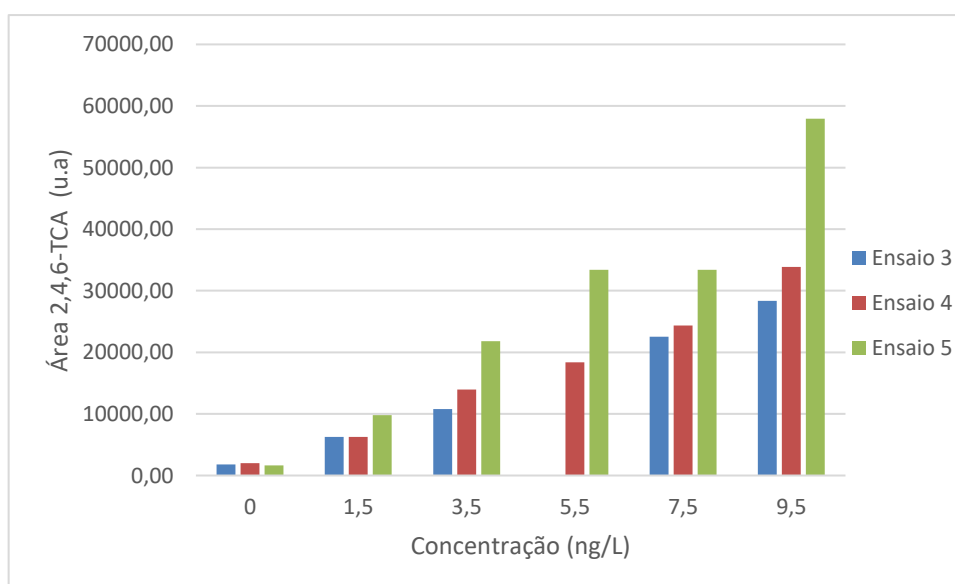


Figura 4.18: Comparação da área do 2,4,6-TCA nos ensaios 3, 4 e 5, para as concentrações da gama de trabalho.

É possível observar que utilizando os parâmetros do ensaio 5 foi possível obter a área do 2,4,6-TCA maior para qualquer uma das concentrações de 2,4,6-TCA.

Na figura 4.19 é possível comparar a área do PI para as três condições diferentes utilizadas. Assim sendo, é notório que ao utilizar o tempo de dessorção de 3 min e de extração 8 min obtém-se uma média da área maior. Este aumento das áreas pode não se traduzir num aumento da sensibilidade do método, uma vez que são usadas razões de áreas, como se pode observar ao comparar os declives das curvas de calibração que são 0,206; 0,264 e 0,251 para os ensaios 3, 4 e 5, respetivamente.

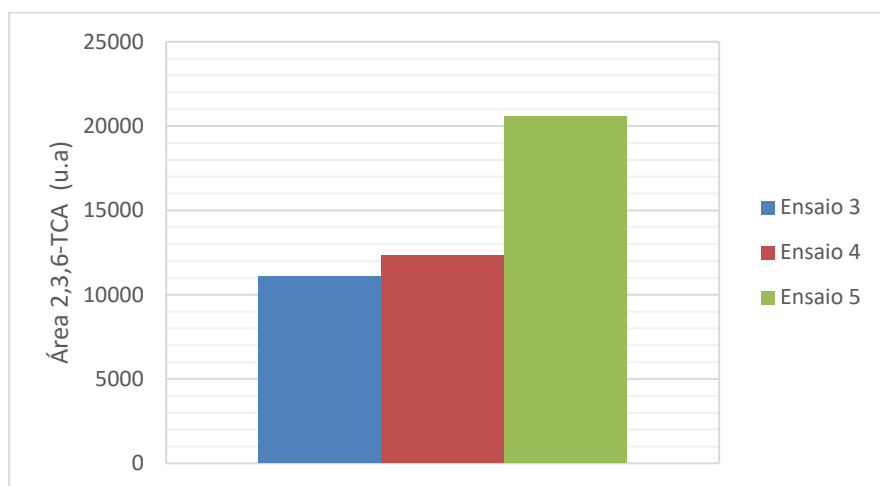


Figura 4.19: Comparação da área do pico de 2,3,6-TCA nos ensaios 3, 4 e 5.

Assim é possível concluir que o método a ser utilizado corresponde ao ensaio 5, uma vez que permite um tempo total de análise inferior e consegue ter áreas de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA superiores. Os parâmetros finais a ser usados encontram-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros otimizados do método desenvolvido.

Volume da amostra	10 mL
Volume do PI	20 µL
Gama de concentração	1,5-9,5 ng/L
Tempo de extração	8 min
Tempo de dessorção	3 min

Na figura 4.20 é possível observar as especificações dos parâmetros no *Autosampler* do método criado.

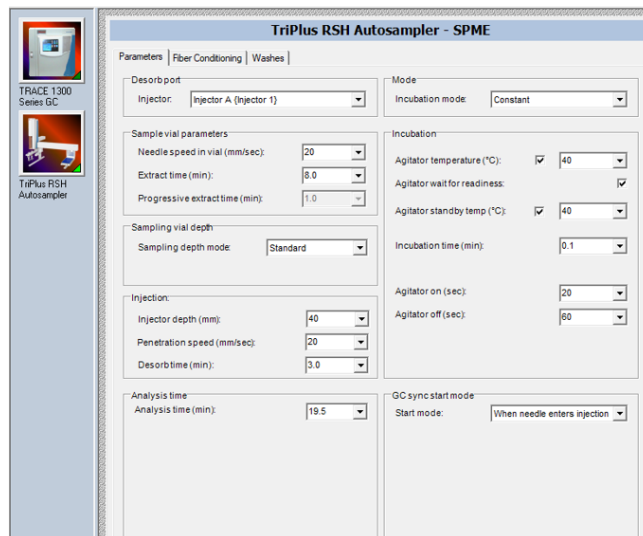


Figura 4.20: Parâmetros do método otimizado

Os parâmetros otimizados apenas foram os tempos de extração e dessorção. Uma vez que o equipamento não era exclusivo para a criação deste método, parâmetros como a temperatura e outros referidos no capítulo 2 não puderam ser alterados nem testados.

4.3 Curvas de calibração para amostras de água do processo nas condições otimizadas

As curvas de calibração encontram-se apresentadas na tabela 4.4. Foram realizadas recorrendo ao método do padrão interno, e obtidas através da fortificação de uma amostra de água do processo em 5 níveis de concentração diferentes (entre 1,5 e 9,5 ng/L).

Tabela 4.4: Curvas de calibração e respetivos parâmetros de caracterização

Equação	Coefficiente de determinação (R²)	Desvio Padrão (s_{y/x})	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
y=0,251x+0,1108	0,9996	0,020	0,24	0,80
y=0,258x+0,1402	0,9996	0,022	0,25	0,84
y=0,252x+0,1719	0,9998	0,013	0,16	0,52
Média			0,22	0,77

Os resultados apresentados demonstram que existe uma boa linearidade, apresentando todas as curvas valores de coeficiente de determinação superior a 0,9995. Os limites de deteção e quantificação foram calculados baseados no desvio padrão da curva de calibração linear e no declive de cada reta.

Comparando os limites de deteção e de quantificação obtidos com os da literatura, presentes no capítulo 2.2.3, é possível verificar que não são iguais. O valor da literatura para o método de análise SPME-GC-ECD para o LD é 0,70 ng/L enquanto o obtido foi de 0,22 ng/L e o LQ da literatura é 2,3 ng/L, sendo que o obtido foi 0,77 ng/L [29, 30]. Portanto, é possível verificar que o método otimizado consegue detetar e quantificar 2,4,6-TCA com menores concentrações, sendo um aspeto bastante positivo.

4.4 Validação da gama de trabalho

A validação da gama de trabalho foi realizada através da comparação dos valores dos coeficientes de variação do primeiro e último ponto das curvas de

calibração, preparando 10 viais para a concentração de 1,5 ng/L e para concentração de 9,5 ng/L.

O coeficiente de variação obtido foi de 2,4% e 1,3%, respetivamente, para os padrões de 1,5 e 9,5 ng/L. Estes valores são bastante inferiores a 10% e muito próximos entre si, podendo considerar-se a gama de trabalho adequada.

4.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada calculando o desvio padrão de 10 ensaios sobre a mesma amostra.

Utilizando a equação 2.17, o valor do limite de repetibilidade (r) foi de 0,10 ng/L para concentrações de 1,5 ng/L e de 0,34 ng/L para concentrações de 9,5 ng/L. Como a diferença entre réplicas é menor do que o limite de repetibilidade, todos os resultados são aceites.

4.6 Exatidão

A exatidão da metodologia foi avaliada por ensaios de recuperação, através da fortificação de amostras de água de processo com concentrações de 1,5; 3,5 e 5,5 ng/L. A recuperação relaciona-se com a quantidade de analito adicionada à amostra ou padrão e que é quantificada no processo. O critério de aceitação para a recuperação é normalmente 80-120%, sendo que o laboratório poderá definir outro critério, de acordo com o desempenho e/ou a complexidade do método, ou a quantidade presente na amostra.

As percentagens de recuperação obtidas foram em média 100%, tendo oscilado entre 98% e 102%. Este valor encontra-se dentro dos limites normalmente tidos como aceitáveis. Os valores obtidos neste ensaio encontram-se no anexo B.4.

Relativamente aos ensaios interlaboratoriais, preparou-se 2 amostras fortificadas cada uma com 2 ng/L e 4 ng/L de 2,4,6-TCA, e distribuiu-se por 3 laboratórios. Os resultados do ensaio encontram-se na tabela 4.5.

Tabela 4.5: Resultados do ensaio interlaboratorial.

Código do Laboratório	Valor Verdadeiro (ng/L)	Valor Obtido (ng/L)	Desvio Padrão	Z-Score
A	1,99	2,5	0,63	0,9
B		1,1		1,4
C		2,3		0,5
A	3,98	4,0	0,40	0,0
B		3,0		2,5
C		3,6		0,9

Verifica-se que apenas o laboratório B para a concentração de 4,0 ng/L possui um *z-score* superior a 2, sendo um resultado questionável. Os restantes apresentam resultados aceitáveis.

4.7 Estudo do *carry-over*

O estudo do *carry-over* consiste em estudar o efeito de memória, que é caracterizado pela dessorção incompleta dos analitos adsorvidos na fibra. Este efeito tem como resultado o aumento “falso” da concentração de analito. Neste estudo analisaram-se 10 viais de branco em sequência. Analisando a sua resposta ao analito é possível verificar se existe efeito de memória na fibra. Estes brancos contêm água, cloreto de sódio e padrão interno.

Os resultados obtidos, que se encontram no anexo B.5, demonstram que não existe efeito de memória na fibra uma vez que nenhum dos viais apresentava concentração superior ao limite de quantificação.

4.8 Cartas de controlo

Construiu-se a carta de controlo, utilizando os declives da curva de calibração para a validação e ainda uma curva de calibração que se efetuou após um mês das curvas de validação. Estas cartas de controlo possuem um limite central, um limite inferior de controlo e um limite superior de controlo. O exemplo de cálculo destes limites encontra-se no Anexo B.6.

Na figura 4.21 encontra-se a carta de controlo obtida para os declives da reta de calibração:

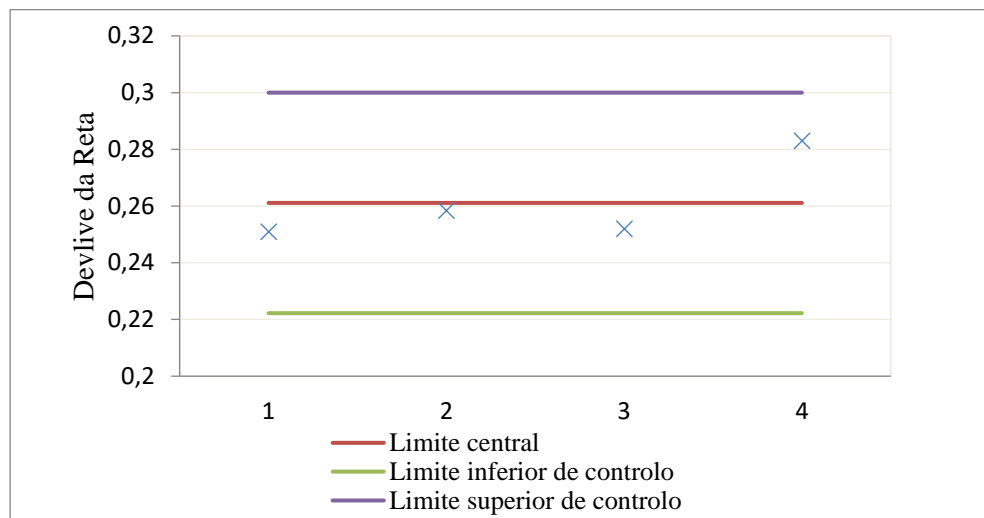


Figura 4.21: Carta de controlo declive da reta

Analisando a carta de controlo, da figura 4.21, é possível verificar que todos os pontos se encontram dentro dos limites de controlo.

4.9 Incerteza

Para o cálculo da incerteza expandida associada à concentração de uma amostra, é necessário definir as origens da incerteza intervenientes sendo que neste trabalho foram consideradas as seguintes:

- Incerteza associada à interpolação da amostra na curva de calibração;
- Incerteza associada ao volume da amostra;
- Incerteza associada à precisão do método de ensaio.

Calculando a incerteza combinada, para toda a gama de trabalho, obtém-se em média um valor de 0,1 ng/L.

5 Conclusão e Sugestões de Trabalho Futuro

Os objetivos principais desta dissertação de mestrado foram a definição e validação de um método de análise de 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) em água por cromatografia gasosa com detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

Na fase inicial, estudou-se a possibilidade do uso do método baseando-se na norma ISO 20752:2014, mais concretamente, o método que o laboratório utiliza para as suas análises quotidianas de 2,4,6-TCA em rolhas.

Perante a conclusão de que a fibra saturava com o uso desse método, procedeu-se a uma etapa de otimização para encontrar as melhores condições analíticas para analisar a água do processo. Verificou-se que as condições ótimas de SPME são 8 min de tempo de extração em *headspace* (HS), 5 min de dessorção e com adição de 20 µL de padrão interno, o 2,3,6-TCA.

Na validação do método foi avaliada a gama de trabalho, determinaram-se os limites de deteção (LD) e quantificação (LQ), a precisão, a exatidão e a incerteza do resultado.

Relativamente à gama de trabalho utilizada foi de 1,5 ng/L a 9,5 ng/L, sendo que os limites de deteção e de quantificação foram de 0,22 ng/L e 0,77 ng/L, respetivamente. O valor de limite de repetibilidade foi de 0,1 ng/L, para concentrações de 1,5 ng/L, e de 0,3 ng/L, para 9,5 ng/L. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação, sendo que a percentagem de recuperação média obtida foi de 100% (98 – 102%). Os resultados de ensaios interlaboratoriais de duas amostras de água de processo fortificadas com 2,4,6-TCA em concentrações de 2,0 ng/L e 4,0 ng/L conduziram a valores de *z-scores* de 0,9; 1,4; e 0,5 para a concentração de 2,0 ng/L e de 0,0; 2,5 e 0,9 para a concentração de 4,0 ng/L, para os laboratórios A, B e C, respetivamente. Todos eles são resultados satisfatórios, exceto o resultado de 2,5.

Construiu-se ainda uma carta de controlo dos declives das curvas de calibração, onde se confirmou que todos os valores se encontravam dentro dos limites de controlo.

A incerteza calculada do método foi de 0,1 ng/L.

É possível concluir que o método se encontra devidamente otimizado e validado, alcançando assim o objetivo da dissertação e permitindo à empresa implementar o método sempre que precisar de analisar uma amostra de água com suspeita de 2,4,6-TCA.

Algumas sugestões futuras, de modo a dar continuidade à implementação do método, consistem em realizar ensaios de estudo de precisão intermédia e reprodutibilidade, realizar mais curvas de calibração de modo a ter uma carta de controlo dos declives da curva de calibração mais extensa e fazer um ensaio interlaboratorial com mais participantes. Sugere-se ainda tentar novas condições de otimização, como por exemplo variando o volume do PI, e por último, analisar amostras reais com suspeita de TCA.

Bibliografia

[1] Symington. Acesso online: <https://pt.symington.com/a-nossa-historia> - consultado em 2 de janeiro 2021.

[2] Soleas, J.G., Yan, J., Seaver, T. e Goldberg, M.D. (2002). “Method for the Gas Chromatographic Assay with Mass Selective Detection of Trichloro Compounds in Corks and Wines Applied To Elucidate the Potential Cause of Cork Taint”. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Volume 50, 5ª Edição, pp 1032–1039

[3] Fischer, C. e Fischer, U. (1997). “Analysis of Cork Taint in Wine and Cork Material at Olfactory Subthreshold Levels by Solid Phase Microextraction”. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, Volume 45, 6ª Edição, pp 1995–1997

[4] Buser, R.H., Zanier, C. e Tanner, H. (1982). “Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine”. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Volume 30, 2ª Edição, pp 359–362

[5] APCOR. Acesso online: <https://www.apcor.pt/combate-ao-tca-tricloroanisole/> - consultado em 16 de março 2021.

[6] Barker, D. A., Capone, D. L., Pollnitz, A. P., McLean, H. J., Francis, I. L., Oakey, H., and Sefton, M.A. (2001) “Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment”. *Aust. J. Grape Wine Res*, Volume 7, 1ª Edição, pp 40–46.

[7] J. Coque, M. Rodríguez, M. Goswami, e R. Martínez. (2006). “Causes and origins of wine contamination by haloanisoles”, *Infoprint S.L*, Volume 1, 1ª Edição, pp 7 - 26.

[8] Simões, P. e Macena, T., (2006). “O gosto a rolha no Vinho”. Instituto Superior de Agronomia: Enologia.

[9] N Campillo, N Aguinaga, P Viñas, I López-García, M Hernández-Córdoba. (2004). “Purge-and-trap preconcentration system coupled to capillary gas chromatography with atomic emission detection for 2,4,6-trichloroanisole

determination in cork stoppers and wines”. Journal of Chromatography A, Volume 1061, 1ª Edição, pp 85-91.

[10] PubChem. Acesso online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/246-Trichloroanisole#section=Experimental-Properties> – consultado em 2 de janeiro de 2021.

[11] Couto, A.I. (2013). Método para deteção de 2,4,6-TCA por contaminação de gases halogenados de uma superfície emissora de iões positivos. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Física- Universidade de Lisboa

[12] Valente, P.L.A e Augusto F. (2000). “Microextração por Fase Sólida”. Química Nova, Volume 23, 4ª Edição, pp 523-530

[13] Prosen, H. & Zupančič-Kralj, L. (1999). “Solid-phase microextraction. TrAC Trends” Analytical Chemistry, Volume 18, 4ª Edição, pp 272-282.

[14] Jinno, K., Dean, J. R., Weber, S., Malik, A., Gorecki, T., Mani, V., & Vaes, W. (2007). “Applications of solid phase microextraction.” Royal Society of Chemistry, Volume 5, 1ª Edição, pp 57-72.

[15] Bertuzzi, A., McSweeney, P., Rea, M. and Kilcawley, K.(2018). “Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese”. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Volume 17, 2ª Edição, pp 371-390.

[16] Carasek, E. e Merib, J. (2015). “Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review”, Analytica Chimica Acta, Volume 880, 1ª Edição, pp 8-25

[17] Supelco. (1998). “Bulletin 923 Solid Phase Microextraction : Theory and Optimization of Conditions,”

[18] Lord, H. and Pawliszyn, J. (2000). “Evolution of solid-phase microextraction technology”. Journal of Chromatography A, Volume 885, 1ª Edição, pp 153-193.

- [19] Pawliszyn, J. (1997) “Solid Phase Microextraction: Theory and Practice”. Wiley–VCH, New York, Volume 1, 1ª Edição
- [20] Alpendurada, M. F. (2000). “Solid-phase microextraction: A promising technique for sample preparation in environmental analysis”. *J. Chromatogr. A*, Volume 889, 1º Edição, pp 3–14
- [21] J. Pawliszyn. (2012). “Handbook of Solid Phase Microextraction”, Elsevier,.1ª Edição.
- [22] J. Pawliszyn. (1999). “Applications of Solid Phase Microextraction”, RSC Chromatography Monographs, 2ª Edição
- [23] Bartle, D.K and Myers, P. (2002). “History of gas chromatography” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 21, Edição 10ª, pp 547-557
- [24] Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. A., (1998) “Princípios de Análise Experimental”. Porto Alegre : Bookman, 5ª Edição.
- [25] Harris, D., (2012). “Análise Química Quantitativa”. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora Lda, 8ª Edição.
- [26] R. Tarasov, A., Rauhut, D., Jung, (2017). “Cork taint’ responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review.” *Talanta*, Volume. 175, pp. 82–92.
- [27] McNair, M.H, Miller, M.J and Snow, H.N. (2019). “Basic Gas Chromatography” 3ª Edição, pp 69-80
- [28] Agilent. (2001). “Electron Capture Detector (ECD)”. Acesso online: <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Agilent6890ser/0340%20ECD%20detector.pdf> – consultado em 19 de janeiro 2021
- [29] Pinheiro, M.B.P e Silva, J. (2005) “Detection of 2,4,6-trichloroanisole in chlorinated water at nanogram per litre levels by SPME–GC–ECD”. *Anal Bioanal Chem*, Volume 382, pp 341–346
- [30] Fontana, A e Altamirano, J. (2010). “Sensitive determination of 2,4,6-trichloroanisole in water samples by ultrasound assisted emulsification microextraction

prior to gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis”. *Talanta* Volume 81, pp 1536-1541.

[31] Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., Pizarro, C., (2004). “Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine” *Journal of Chromatography A*, Volume 1056, 2ªEdição, pp 49-56.

[32] Viera, R. (2017). “Acompanhamento da produção de vinho tinto e branco da região Dão”. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar- Escola Superior Agrária de Coimbra

[33] Relacre (2000) “Guia Relacre 13- Validação de métodos internos de ensaio em análise química.”

[34] Brito, N., Junior, O., Polese, L. and Ribeiro, M. (2003). “Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão”. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, Volume 13, pp 129-146

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

[36] EURACHEM. (2014) *Eurachem Guide: “The fitness for purpose of Analytical Methods”, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*

[37] ISO 5725-3:2013. (2013). “Accuracy (trueness and precision of measurement methods and results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.”.

[38] IPAC (2011) “Guia para a acreditação de laboratórios químicos (OGC 002)”

[39] Relacre (1996) “Guia Relacre 3-Validação de resultados em laboratórios químicos “

[40] “Carta de controle para o desvio-padrão” Acesso online: <https://docplayer.com.br/20870542-Carta-de-controle-para-o-desvio-padrao.html> - consultado em 18 de março 2021

Anexos

Anexo A: Cálculos para preparação de soluções intermédias

A.1 Preparação da solução Stock I de 2,4,6-TCA

A solução comercial de 2,4,6-TCA, com volume inicial de 1 mL de concentração 100 mg/L, é diluída em metanol num balão de 100 mL obtendo-se a solução Stock I de 1 mg/L, como demonstrado nos seguintes cálculos.

$$C_{comercial} \times V_{comercial} = C_{stock I} \times V_{stock I} \leftrightarrow 100 \frac{mg}{L} \times 1 mL = 1 \frac{mg}{L} \times 100 mL$$

A.2 Preparação da solução Stock II de 2,4,6-TCA

Com a solução Stock I é possível obter a solução Stock II, diluindo com solução etanólica 12 % (v/v), como demonstrado nos seguintes cálculos.

$$\begin{aligned} C_{stock I} \times V_{stock I} &= C_{stock II} \times V_{stock II} \leftrightarrow 1 \frac{mg}{L} \times 10^3 \frac{\mu g}{mg} \times V_{stock I} \\ &= 1 \frac{\mu g}{L} \times 100 mL \\ &\leftrightarrow V_{stock I} = 0,10 mL = 100 \mu L \end{aligned}$$

A.3 Preparação dos padrões de calibração

O cálculo do volume de solução stock II necessário é:

$$\begin{aligned} C_{stock II} \times V_{stock II} &= C_{padrão} \times V_{padrão} \leftrightarrow 1 \frac{\mu g}{L} \times 10^3 \frac{ng}{\mu g} \times V_{stock II} \\ &= 0,5 \frac{ng}{L} \times 10 mL \\ &\leftrightarrow V_{stock II} = 5 \times 10^{-3} mL = 5,0 \mu L \end{aligned}$$

Para obter a concentração real dos padrões nos *viais* é necessário o seguinte cálculo:

$$C_{final} \left[\frac{ng}{L} \right] = \frac{C_{stock II} \times V_{stock II}}{V_{final}} = \frac{1000 \left[\frac{ng}{L} \right] \times V_{stock II} [L]}{10 \times 10^{-3} + V_{stock II} + 20 \times 10^{-6} [L]}$$

Na tabela A.1 encontram-se as concentrações reais dos padrões de calibração.

Tabela A.1: Concentrações dos padrões de calibração

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)	Concentração real (ng/L)
1,5	15,0	1,49
3,5	35,0	3,48
4,5	45,0	4,47
5,5	55,0	5,46
7,5	75,0	7,43
9,5	95,0	9,39

Anexo B: Resultados

– Resultados do Ensaio 1

Na tabela B.1 encontram-se os valores para a construção da curva de calibração.

Tabela B.1: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 1

Concentração do vial (ng/L)	Concentração real do vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a)	Área do 2,3,6-TCA (ISTD) (u.a)	A_{TCA}/A_{ISTD}
0,0	0,000	2967	12195	0,243
1,5	1,495	6601	11660	0,566
4,5	4,471	13056	10691	1,221
9,5	9,392	25553	11416	2,238

• Cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção

Na tabela B.2 encontram-se os valores dos limites de detecção e quantificação, calculados com a equação 2.11 e 2.12.

Tabela B.2 Valores do LD e LQ do ensaio 1.

S_{y/x}	0,0165
Declive	0,213
LD	0,233
LQ	0,775

– **Resultados do Ensaio 2**

Na tabela B.3 encontram-se apresentados os resultados do ensaio 2.

Tabela B.3: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 2

Concentração do vial (ng/L)	Concentração real do vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a)	Área do 2,3,6-TCA (ISTD) (u.a)	A_{TCA}/A_{ISTD}
0,0	0,000	622	14154	0,04
1,5	1,495	4961	13162	0,38
4,5	4,471	15287	14773	1,03
7,5	7,429	23999	13648	1,76
9,5	9,392	32823	15328	2,14

• **Cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção**

Na tabela B.4 encontram-se os valores dos limites, calculados com a equação 2.11 e 2.12.

Tabela B.4: Valores do LD e LQ do ensaio 2.

S_{y/x}	0,0274
Declive	0,212
LD	0,387
LQ	1,29

– **Resultados do Ensaio 3**

Na tabela B.5 encontram-se apresentados os resultados do ensaio 3.

Tabela B.5: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 3

Concentração do vial (ng/L)	Concentração real do vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a)	Área do 2,3,6-TCA (ISTD) (u.a)	A _{TCA} /A _{ISTD}
0,0	0,00	1796	7740	0,23
1,5	1,50	6248	11170	0,56
3,5	3,60	10786	10872	0,99
7,5	7,48	22532	12565	1,79
9,5	9,31	28380	13064	2,17

- **Cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção**

Na tabela B.6 encontram-se os valores dos limites, calculados com a equação 2.11 e 2.12.

Tabela B.6: Valores do LD e LQ do ensaio 3.

S_{y/x}	0,0203
Declive	0,206
LD	0,294
LQ	0,98

– **Resultados do Ensaio 4**

Na tabela B.7 encontram-se apresentados os resultados do ensaio 4.

Tabela B.7: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 4

Concentração do vial (ng/L)	Concentração real do vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a)	Área do 2,3,6-TCA (ISTD) (u.a)	A _{TCA} /A _{ISTD}
0,0	0,07	1993	12567	0,16
1,5	1,43	6265	12099	0,52
3,5	3,47	13962	13221	1,06
5,5	5,51	18402	11541	1,59
7,5	7,34	24345	11714	2,08
9,5	9,45	33869	12842	2,64

- **Cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção**

Na tabela B.8 encontram-se os valores dos limites, calculados com a equação 2.11 e 2.12.

Tabela B.8: Valores do LD e LQ do ensaio 4.

S_{y/x}	0,0202
Declive	0,265
LD	0,229
LQ	0,762

- **Resultados do Ensaio 5**

Na tabela B.9 encontram-se apresentados os resultados do ensaio 5.

Tabela B.9: Valores da curva de calibração referente ao ensaio 5

Concentração do vial (ng/L)	Concentração real do vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a)	Área do 2,3,6-TCA (ISTD) (u.a)	A_{TCA}/A_{ISTD}
0,0	0,00	1650	19179	0,09
1,5	1,59	9789	19193	0,51
3,5	3,51	21806	21989	0,99
5,5	5,43	33387	22665	1,47
7,5	7,47	33412	16819	1,99
9,5	9,35	57930	23577	2,46

- **Cálculo dos Limites de Quantificação e Detecção**

Na tabela B.10 encontram-se os valores dos limites, calculados com a equação 2.11 e 2.12.

Tabela B.10: Valores do LD e LQ do ensaio 5.

S_{y/x}	0,0200
Declive	0,251
LD	0,239
LQ	0,797

B.1 Resultados Curva de Calibração

Nas Tabela B.11, Tabela B.12, Tabela B.13 apresentam-se os valores de áreas obtidas nas 3 curvas de calibração.

Tabela B.11: Valores da 1ª curva de calibração

Descritivo	Concentração Teórica (ng/L)	Concentração Obtida (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Razão de Áreas (u.a)
Padrão_0	0,00	0,00	1650,22	19179,34	0,09
Padrão_1,5	1,49	1,59	9788,78	19193,20	0,51
Padrão_3,5	3,48	3,51	21806,15	21989,10	0,99
Padrão_5,5	5,46	5,43	33386,70	22665,25	1,47
Padrão_7,5	7,43	7,47	33412,47	16819,05	1,99
Padrão_9,5	9,39	9,35	57930,18	23576,71	2,46

Nas Figuras B.1, B.2 e B.3 são apresentadas as curvas de calibração.

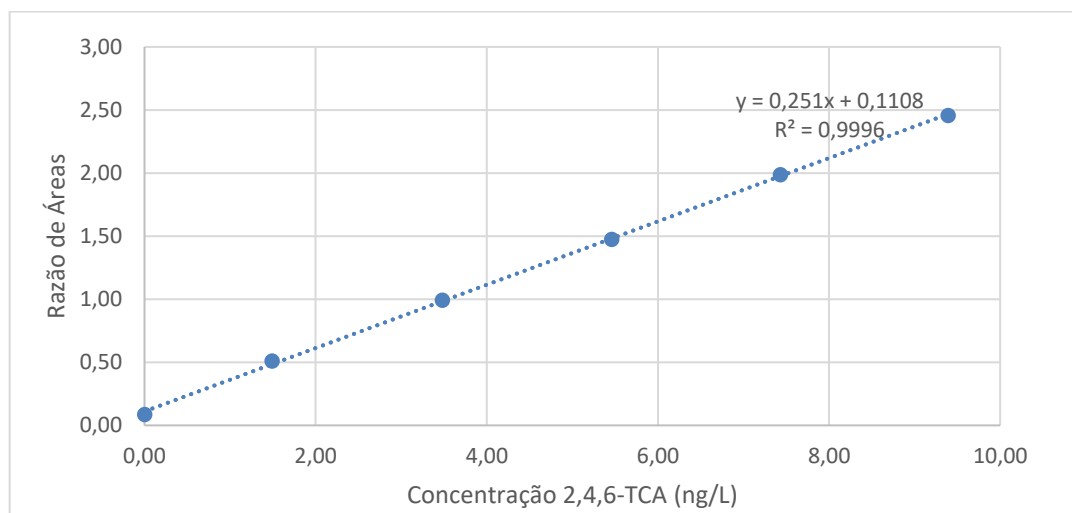


Figura B.1: Curva de calibração realizada no dia 16/07/2021

Tabela B.12: Valores da 2ª curva de calibração

Descritivo	Concentração Teórica (ng/L)	Concentração Obtido (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Razão de Áreas (u.a)
Padrão_0	0,00	0,00	2517,96	19155,63	0,13
Padrão_1,5	1,49	1,57	12374,37	22651,81	0,55
Padrão_3,5	3,48	3,48	22829,17	21950,48	1,04
Padrão_5,5	5,46	5,34	39961,80	26298,31	1,52
Padrão_7,5	7,43	7,50	55277,01	26590,01	2,08
Padrão_9,5	9,39	9,39	62297,60	24273,13	2,57

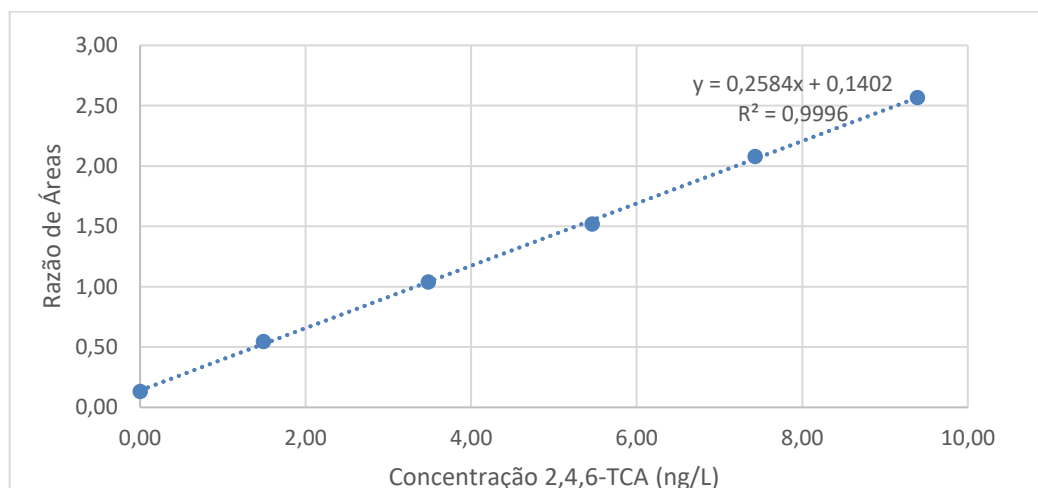


Figura B.2: Curva de calibração realizada no dia 19/07/2021

Tabela.B.13: Valores da 3ª curva de calibração

Descritivo	Concentração Teórica (ng/L)	Concentração Obtida (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a)	Área 2,3,6-TCA (u.a)	Razão de Áreas (u.a)
Padrão_0	0,00	0,01	979,76	5644,38	0,17
Padrão_1,5	1,49	1,55	3276,12	5834,66	0,56
Padrão_3,5	3,48	3,48	6044,81	5829,98	1,04
Padrão_5,5	5,46	5,41	9034,01	5882,69	1,54
Padrão_7,5	7,43	7,41	12372,35	6067,72	2,04
Padrão_9,5	9,39	9,44	14395,54	5642,95	2,55

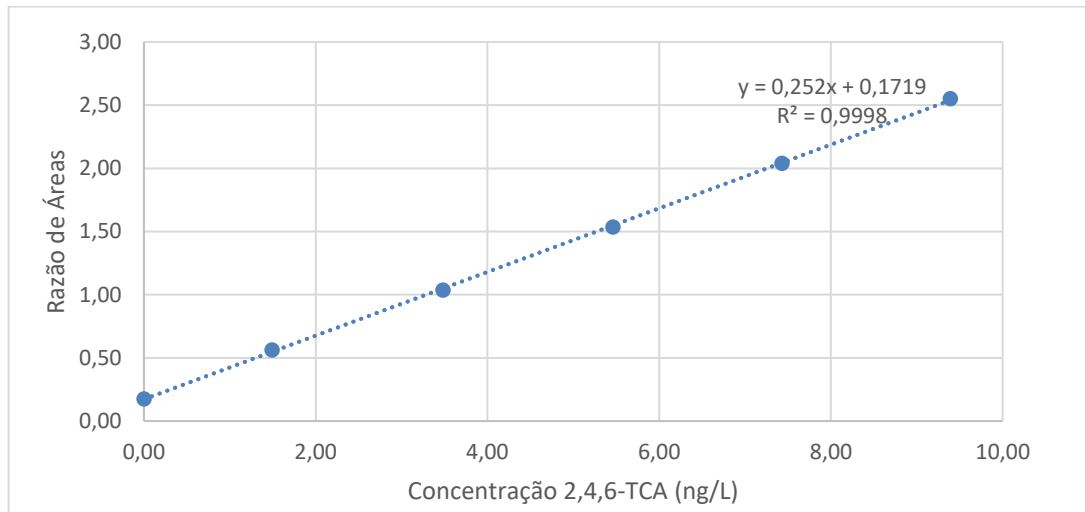


Figura B.3: Curva de calibração realizada no dia 21/07/2021

B.2 Resultados do estudo da gama de trabalho

Na tabela B.14 e B.15 encontram-se os resultados do estudo da gama de trabalho, para a concentração de 1,5 ng/L e 9,5 ng/L, respetivamente.

Tabela B.14: Resultados do ensaio de precisão para o padrão de concentração 1,5 ng/L

Descritivo	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)
Padrão 1,5 ng/L	1,51	4524	6668	1,519	5150	8378	1,535	6023	9498
	1,47	5877	8794	1,439	5544	9101	1,497	6643	10650
	1,54	5491	8031	1,442	5153	8456	1,542	6048	9510
	1,51	5628	8306	1,477	5503	8995	1,508	6235	9947
	1,48	6130	9132	1,516	4730	7696	1,424	6263	10370
	1,49	5822	8646	1,524	5992	9742	1,482	6569	10598
	1,52	5851	8612	1,533	5308	8620	1,473	6763	10956
	1,46	5682	8528	1,534	5966	9688	1,484	6306	10166
	1,51	5774	8526	1,421	5852	9626	1,499	6317	10119
	1,45	5594	8425	1,543	5307	8610	1,504	6378	10195
Média	1,49	5637	8367	1,49	5451	8891	1,49	6355	10201
Desvio-Padrão	0,027	430	664	0,046	404	666	0,033	242	471
Coefficiente de Variação	1,8%	7,6%	7,9%	3,1%	7,4%	7,5%	2,2%	3,8%	4,6%

Tabela B.15: Resultados do ensaio de precisão para o padrão de concentração 9,5 ng/L

Descritivo	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)
Padrão 9,5 ng/L	9,53	22804	8856	9,305	9578	8270	9,310	26612	9725
	9,22	21395	8557	9,298	10233	8840	9,269	29576	10853
	9,39	20977	8256	9,528	10922	9305	9,524	29774	10656
	9,32	20739	8211	9,149	10901	9501	9,219	26676	9837
	9,49	21628	8435	9,277	11460	9911	9,262	28204	10356
	9,40	21530	8464	9,375	9830	8452	9,428	26703	9646
	9,29	21085	8371	9,499	9748	8319	9,500	29483	10576
	9,46	22756	8899	9,321	9919	8556	9,378	26698	9692
	9,41	23800	9349	9,528	9780	8332	9,569	28565	10178
	9,41	24381	9572	9,640	11401	9649	9,460	28503	10265
Média	9,39	22109	8697	9,39	10377	8914	9,39	28079	10178
Desvio-Padrão	0,09	1256,47	463,94	0,151	724	622	0,123	1310	437
Coefficiente de Variação	1,0%	5,7%	5,3%	1,6%	7,0%	7,0%	1,3%	4,7%	4,3%

B.3 Resultados da Precisão

A tabela B.16 apresenta os coeficiente de repetibilidade para o padrão de concentração 1,5 ng/L.

Tabela B.16: Valores obtidos do coeficiente de repetibilidade

Ensaio	Coefficiente de Repetibilidade
1	0,08
2	0,13
3	0,09

- **Exemplo de cálculo do Coeficiente de Repetibilidade para o ensaio 1 do padrão 1,5 ng/L utilizando a equação 2.17.**

Desvio padrão médio=0,027

$$r = 2,8 \times \text{Desvio Padrão} = 2,8 \times 0,027 = 0,08$$

A tabela B.17 apresenta os coeficiente de repetibilidade para o padrão de concentração 9,5 ng/L.

Tabela B.17:Valores obtidos do coeficiente de repetibilidade

Ensaio	Coefficiente de Repetibilidade
1	0,262
2	0,422
3	0,344

B.4 Resultados da Exatidão

A tabela B.18 apresenta os resultados obtidos no ensaio de recuperação.

Tabela B.18: Resultados ensaio de recuperação

Concentração do analito na amostra fortificada (ng/L)	Concentração do analito na amostra não fortificada (ng/L)	Concentração do analito na amostra não fortificada (ng/L)	%Recuperação
1,53	0,00	1,50	102%
3,42	0,00	3,48	98%
5,49	0,07	5,46	99%

- Exemplo de cálculo da % de recuperação utilizando a equação 2.22 para o padrão 1,5 ng/L

$$\%R = \frac{1,53 - 0,00}{1,50} \times 100 = 102\%$$

B.5 Resultados do Efeito “*Carry-Over*”

Na tabela B.19 é apresentada a concentração obtida e as áreas do 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA do ensaio do *carry over*.

Tabela B.19: Resultados do ensaio *carry over*

Vial	Concentração Obtida (ng/L)	Área do 2,4,6 TCA (u.a.)	Área do 2,3,6 TCA (PI) (u.a.)
1	0,0	2568	8130
2	0,2	7630	12706
3	0,2	6072	10150
4	0,0	5677	10362
5	0,0	6442	11958
6	0,0	5342	10389
7	0,0	5612	11792
8	0,6	11484	15873
9	0,0	3119	9718
10	0,4	7757	11624

B.6 Cálculo da Incerteza do método

Na tabela B.20 são apresentados os declives, os limites centrais, limites inferiores de controlo e limites superiores de controlo.

Tabela B.20: Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para o declive

Dia da Curva de Calibração	Declive	Desvio-padrão (σ) (ng/L)	Limite central (ng/L)	Limite inferior de controlo (ng/L)	Limite superior de controlo (ng/L)
16/09/2021	0,251	0,013	0,261	0,222	0,300
19/07/2021	0,258				
21/07/2021	0,252				
20/09/2021	0,283				

De seguida é apresentado o exemplo de cálculo dos limites.

$$\text{Limite inferior de controlo} = \text{Limite central} - 3 \times \sigma$$

$$\text{Limite superior de controlo} = \text{Limite central} + 3 \times \sigma$$

O limite central corresponde à média dos declives, que neste caso corresponde a 0,261 ng/L.

Logo:

$$\text{Limite inferior de controlo} = 0,261 - 3 \times 0,013 = 0,222 \text{ ng/L}$$

$$\text{Limite superior de controlo} = 0,261 + 3 \times 0,013 = 0,300 \text{ ng/L}$$

B.7 Cálculo da Incerteza do método

Como já foi referido, para o cálculo da incerteza combinada do método é necessário calcular de forma intermédia as incertezas dos padrões, das diluições de soluções comerciais, da curva de calibração e da precisão. Na tabela B.21 é demonstrado o valor da incerteza para cada curva de calibração.

Tabela B.21: Incerteza associada a cada curva de calibração da validação do método.

Curva de calibração	Incerteza associada
16/07/2021	0,11
19/07/2021	0,22
21/07/2021	0,07
Média	0,14

De seguida é apresentada um exemplo de cálculo, para a curva calibração do dia 16/07/2021, relativamente à incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração, incerteza da precisão, incerteza combinada e da incerteza expandida.

- **Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração:**

$$u(\text{reta}) = \frac{0,02001}{0,2510}$$

$$\times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{3} + \frac{(1 - 1,25)^2}{(-0,10^2 + 1,59^2 + \dots + 9,35^2) - \frac{(-0,10 + 1,59)^2}{6}}}$$

$$u(\text{reta}) = 0,057 \text{ ng/L}$$

- **Incerteza associada ao volume da amostra:**

$$u(C) = 3,7 \times \sqrt{\left(\frac{0,057}{3,7}\right)^2 + \left(\frac{9,8 \times 10^{-6}}{10}\right)^2} \times 3 = 0,1 \text{ ng/L}$$

- **Incerteza da precisão**

$$u(\text{Precisão}) = \frac{\text{desvio padrão resultado 10 réplica}}{\sqrt{10}} = 0,002 \text{ ng/L}$$

- **Incerteza combinada**

$$u(\text{combinada}) = \sqrt{(u \text{ reta})^2 + (u \text{ precisão})^2} = \sqrt{(0,057)^2 + (0,002)^2}$$

$$u(\text{combinada}) = 0,06 \text{ ng/L}$$

- **Incerteza expandida**

$$u(\text{expandida}) = 2 \times u(\text{combinada}) = 0,1 \text{ ng/L}$$