



# Validação de método para determinação de 2,4,6-tricloroanisol em rolhas por HS-SPME-GC-ECD

**FILIPE DE AZEVEDO PINHO**

julho de 2018

# Validação de método para determinação de 2,4,6-tricloroanisol em rolhas por HS-SPME- GC-ECD

Filipe de Azevedo Pinho

Julho de 2018

**Orientação:** Dr<sup>a</sup>. Cristina Matos (ISEP) | Eng<sup>a</sup>. Cláudia Santos (Symington)  
**Co-Orientação:** Dr<sup>a</sup>. Manuela Correia (ISEP)



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às pessoas que me possibilitaram a realização deste estágio curricular na empresa “Symington Vinhos, S.A.” e desenvolver a tese de mestrado.

À Engenheira Cláudia Santos agradeço o facto de me ter recebido e ter tido a disponibilidade para me ajudar a desenvolver o meu estudo na empresa.

Agradeço às Doutoradas Cristina Matos e Manuela Correia pela ajuda dada quer no planeamento da tese, quer na sua escrita. Agradeço também a sua disponibilidade para me receberem e ajudarem sempre que foi necessário.

Um especial agradecimento ao Aníbal Santos, à Francisca Viana, ao João Magalhães, ao José Teixeira, ao Manuel Santiago, ao Rui Cardoso e à Susana Gonçalves pela integração no ambiente de trabalho, pela ajuda em tudo o que foi preciso, pelos ensinamentos e pela boa disposição diária.

Gostaria de agradecer também a todos os colaboradores da Symington que se disponibilizaram para ajudar sempre que foi necessário.

À Bárbara, por toda a ajuda, paciência e cooperação que me deu ao longo deste período.

Por último, agradeço à minha família e amigos por me terem acompanhado e apoiado em todas as etapas deste ciclo.



## Sumário

O presente relatório traduz o trabalho que foi realizado na Symington Family Estates, S.A., inserido no âmbito da unidade curricular Dissertação/Estágio do 2º ano do Mestrado em Engenharia Química no ramo de Qualidade no Instituto Superior de Engenharia do Porto. Esta tese de mestrado tem o tema “Validação de método para determinação de 2,4,6-tricloroanisol em rolhas por HS-SPME-GC-ECD”.

Os principais objetivos desta dissertação foram implementar o método de análise interno para todos os tipos de rolhas que a empresa recebe e validar o método, garantindo que os resultados obtidos são precisos e exatos.

Para além do desenvolvimento do tema de estágio, também foi dado apoio aos técnicos do laboratório em todas as análises realizadas aos diferentes materiais utilizados no engarrafamento.

Para a validação do método, garantiu-se que a gama de trabalho era adequada, determinaram-se os limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ), a precisão (repetibilidade, precisão intermédia), a exatidão (ensaios de recuperação, ensaios interlaboratoriais), traçaram-se as cartas de controlo e determinou-se a incerteza do resultado.

A gama de trabalho utilizada foi de 0,5 a 10,0 ng/L; o limite de deteção foi de 0,2 ng/L; o limite de quantificação foi de 0,6 ng/L; os coeficientes de variação da repetibilidade foram de 7,0 e 3,3% para as soluções padrão de 0,5 e 10,0 ng/L, respetivamente; o desvio-padrão da precisão intermédia foi de 0,2 ng/L e os coeficientes de variação foram de 5,8 e 6,8% para as soluções padrão de controlo de 2,0 e 4,0 ng/L, respetivamente; as taxas de recuperação obtidas foram entre 93 e 109%; os z-scores obtidos foram de 0, 0,4 e 0,8, sendo todos resultados aceitáveis. Assim, garantiu-se que todos os parâmetros deste método foram validados.

Os pontos das cartas de controlo das soluções padrão de controlo com 2,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA e dos declives das retas de calibração encontram-se dentro dos limites inferior e superior de controlo.

A incerteza expandida foi de 0,3 ng/L, permitindo assim que a empresa tenha segurança quando rejeitar um lote de rolhas por excesso de 2,4,6-TCA.

O valor estimado para cada análise de 2,4,6-TCA em rolhas foi de 5,47 €. A implementação deste método na Symington permite uma poupança de cerca de 17,53 €/amostra para a empresa.

**Palavras chave:** Validação de método; HS-SPME-GC-ECD; 2,4,6-tricloroanisol, rolhas



## Abstract

This report reflects the work that was carried out at Symington Family Estates S.A., inserted in the curricular unit Dissertation / Internship of the 2nd year of the Master in Chemical Engineering at the Instituto Superior de Engenharia do Porto. This thesis has the theme "Validation of method for determination of 2,4,6-trichloroanisol in corks by HS-SPME-GC-ECD".

The main objectives of this dissertation were to implement the internal analysis method for all types of corks that the company receives and validate the method, ensuring that the results obtained are accurate and exact.

In addition to the development of the thesis theme, support was also given to laboratory workers in all analyzes carried out on the different materials used in bottling of wine.

For the validation of the method, it was ensured that the range of work was adequate, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision (repeatability, intermediate precision), accuracy (recovery tests, assays interlaboratory), the charts were drawn and the uncertainty of the result was determined.

The working range was 0,5 to 10,0 ng/L; the detection limit was 0,2 ng/L; the limit of quantification was 0,6 ng/L; the coefficients of variation of the repeatability were of 7,0 and 3,3% for standard solutions of 0,5 and 10,0 ng/L; the standard deviation of the intermediate precision was 0,2 ng/L and the coefficients of variation were 5,8 and 6,8% for standard solutions of 2,0 and 4,0 ng/L; recovery rates were between 93 and 109%; the z-scores obtained were 0, 0,4 and 0,8, all of which were acceptable. Thus, it was ensured that all parameters of this method were validated.

The control chart points of the control standard solutions with 2,0 and 4,0 ng/L of 2,4,6-TCA and the slopes of the calibration lines are within the lower and upper control limits.

The uncertainty of the result was 0,3 ng/L, thus allowing the company to have safety when rejecting a batch of corks for excess of 2,4,6-TCA.

The estimated value for each analysis of 2,4,6-TCA in stoppers was 5,47 €. The implementation of this method at Symington allowed a saving of around € 17.53 €/sample for the company.

**Keywords:** Validation of method; HS-SPME-GC-ECD; 2,4,6-trichloroanisol, corks



## Índice geral

1.	Introdução .....	2
1.1.	Enquadramento .....	2
1.2.	Objectivos .....	2
1.3.	Apresentação da empresa .....	2
1.4.	Organização da dissertação.....	4
2.	Estado da Arte .....	8
2.1.	Cortiça.....	8
2.1.1.	Composição química da cortiça .....	9
2.2.	Produção de rolhas .....	9
2.2.1.	Descortiçamento .....	9
2.2.2.	Rolhas Naturais.....	10
2.2.3.	Rolhas técnicas .....	11
2.3.	2,4,6-tricloroanisol .....	12
2.3.1.	Formação de haloanisóis .....	13
2.3.2.	Contaminação de rolhas com 2,4,6-tricloroanisol .....	13
2.4.	Determinação de 2,4,6-TCA em rolhas por HS-SPME-GC-ECD .....	14
2.4.1.	Microextração em fase sólida .....	14
2.4.2.	Cromatografia em fase Gasosa com Detetor de Captura de Eletrões .....	15
2.5.	Validação de métodos internos de ensaio .....	16
2.5.1.	Curva de calibração .....	17
2.5.2.	Sensibilidade .....	18
2.5.3.	Gama de trabalho.....	18
2.5.4.	Linearidade.....	20
2.5.5.	Limiares analíticos.....	21
2.5.5.1.	Limite de Deteção .....	22
2.5.5.2.	Limite de Quantificação .....	22
2.5.6.	Precisão.....	22
2.5.6.1.	Repetibilidade .....	23
2.5.6.2.	Reprodutibilidade .....	24
2.5.6.3.	Precisão intermédia .....	25
2.5.7.	Exatidão.....	25
2.5.7.1.	Materiais de Referência Certificados.....	25
2.5.7.2.	Ensaio interlaboratoriais .....	26

2.5.7.3.	Ensaio de recuperação .....	27
2.5.8.	Cartas de controlo .....	27
2.5.9.	Algarismos significativos .....	29
2.5.10.	Incerteza .....	29
2.5.10.1.	Incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração.....	30
2.5.10.2.	Incerteza associada à preparação dos padrões .....	30
2.5.10.3.	Incerteza associada à precisão do método de ensaio.....	31
2.5.10.4.	Incerteza combinada.....	31
2.5.10.5.	Incerteza expandida.....	31
3.	Materiais e Métodos.....	34
3.1.	Preparação de soluções.....	34
3.1.1.	Solução de etanol 12% (v/v) .....	34
3.1.2.	Preparação de amostras.....	34
3.1.3.	Solução de 2,3,6-tricloroanisol (10 µg/L).....	35
3.1.4.	Soluções de 2,4,6-tricloroanisol (1 mg/L e 1 µg/L).....	35
3.1.5.	Soluções padrão de 2,4,6-tricloroanisol .....	35
3.2.	Preparação do ensaio .....	36
3.3.	Microextração em fase sólida.....	37
3.4.	Cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões .....	37
4.	Resultados e Discussão .....	40
4.1.	Identificação dos picos de 2,3,6-tricloroanisol e de 2,4,6-tricloroanisol.....	40
4.2.	<i>Carryover</i> .....	43
4.3.	Curvas de Calibração .....	43
4.4.	Limites de Detecção e de Quantificação .....	46
4.5.	Gama de Trabalho.....	47
4.6.	Precisão.....	48
4.6.1.	Repetibilidade.....	48
4.6.2.	Precisão Intermédia .....	50
4.7.	Exatidão .....	51
4.7.1.	Ensaio de Recuperação .....	51
4.7.2.	Ensaio Interlaboratoriais.....	52
4.8.	Cartas de Controlo .....	53
4.8.1.	Solução padrão de Controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-tricloroanisol.....	53
4.8.2.	Solução padrão de Controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-tricloroanisol.....	54
4.8.3.	Declive da Reta de Calibração .....	54

---

4.9. Incerteza do Resultado.....	55
4.10. Análise de Custos .....	56
5. Conclusão .....	58
Referências Bibliográficas.....	60
Anexos.....	64
Anexo A – Exemplos de cálculo.....	64
A.1 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de etanol 12% (v/v) .....	64
A.2 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,3,6-tricloroanisol (10 µg/L). 64	
A.3 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,4,6-tricloroanisol (1 mg/L).. 65	
A.4 - Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,4,6-tricloroanisol (1 µg/L).... 65	
A.5 – Cálculo das concentrações das soluções padrão de 2,4,6-tricloroanisol (0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 4,0; 5,0 e 10,0 ng/L)..... 66	
A.6 – Cálculo do limite de deteção e de quantificação .....	67
A.7 – Cálculo do coeficiente de variação .....	68
A.8 – Cálculo do desvio-padrão da precisão intermédia .....	71
A.9 – Cálculo da taxa de recuperação .....	71
A.10 – Cálculo do z-score.....	71
A.11 – Cálculo dos limites das cartas de controlo .....	72
A.12 – Cálculo das incertezas .....	73
A.13 Cálculo das depreciações de equipamentos e dos consumíveis do cromatógrafo 76	
Anexo B – Número de rolhas utilizadas por macerado .....	77
Anexo C – Curvas de Calibração .....	78



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Cinco dos membros da família que atualmente trabalham na empresa [1].....	3
<b>Figura 1.2</b> - Principais marcas de vinho do Porto produzidos pela <i>Symington Family Estates</i> . .....	4
<b>Figura 2.1</b> - Prancha de cortiça [2].....	8
<b>Figura 2.2</b> - Etapas de produção de rolhas naturais. ....	10
<b>Figura 2.3</b> - Rolha natural.....	11
<b>Figura 2.4</b> - Rolha técnica. ....	12
<b>Figura 2.5</b> - Formação de 2,4,6-TCA [12].....	13
<b>Figura 2.6</b> - Representação esquemática do funcionamento de uma coluna capilar em GC. .....	15
<b>Figura 2.7</b> - Esquema de um cromatógrafo a gás. ....	16
<b>Figura 2.8</b> - Exemplo de uma carta de controlo com os respetivos limites representados [24]. .....	29
<b>Figura 4.1</b> - Excerto de um cromatograma de um branco.....	40
<b>Figura 4.2</b> - Excerto de um cromatograma de um branco com solução de padrão-interno 2,3,6-TCA.....	41
<b>Figura 4.3</b> - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.....	41
<b>Figura 4.4</b> - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 1,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	41
<b>Figura 4.5</b> - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 2,5 ng/L de 2,4,6-TCA.....	42
<b>Figura 4.6</b> - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 5,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	42
<b>Figura 4.7</b> - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	42
<b>Figura 4.8</b> - Curva de calibração A. ....	44
<b>Figura 4.9</b> - Curva de calibração B. ....	44
<b>Figura 4.10</b> - Curva de calibração C. ....	44
<b>Figura 4.11</b> - Curva de calibração D. ....	45
<b>Figura 4.12</b> - Curva de calibração E. ....	45
<b>Figura 4.13</b> - Curva de calibração F. ....	45
<b>Figura 4.14</b> - Carta de controlo para a solução padrão com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	53
<b>Figura 4.15</b> - Carta de controlo para a solução padrão com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	54
<b>Figura 4.16</b> - Carta de controlo para os declives das retas de calibração.....	55



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> - Objetivos de cada etapa de produção de rolhas naturais [9].....	10
<b>Tabela 4.1</b> - Limites de deteção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), em ng/L, para cada curva de calibração. ....	46
<b>Tabela 4.2</b> - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	47
<b>Tabela 4.3</b> - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	48
<b>Tabela 4.4</b> - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	49
<b>Tabela 4.5</b> - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	49
<b>Tabela 4.6</b> - Concentrações obtidas, em ng/L, para as soluções padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	50
<b>Tabela 4.7</b> - Concentrações obtidas, em ng/L, para as soluções padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	51
<b>Tabela 4.8</b> - Valores das concentrações obtidas, em ng/L, para as diferentes amostras, bem como das taxas de recuperação, em percentagem. ....	52
<b>Tabela 4.9</b> - Resultados de cada participante, em ng/L, bem como o z-score obtido. ....	53
<b>Tabela 4.10</b> - Resultados obtidos para cada tipo de incerteza, em ng/L, para cada curva de calibração obtida. ....	55
<b>Tabela 4.11</b> - Custos, em €, associados a cada material e reagente utilizado na realização de um ensaio. ....	56
<b>Tabela A.1</b> - Valores obtidos de concentração da solução padrão de 2,4,6-TCA, expressa em ng/L, de acordo com o respectivo volume de solução stock II, expresso em mL, utilizado... ..	66
<b>Tabela A.2</b> - Valores de LOD e LOQ, expressos em ng/L, obtidos para as diferentes curvas de calibração. ....	67
<b>Tabela A.3</b> – Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da gama de trabalho na concentração de solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.....	68
<b>Tabela A.4</b> - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da gama de trabalho na concentração de solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	69
<b>Tabela A.5</b> - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da repetibilidade na concentração de solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.....	69

<b>Tabela A.6</b> - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da repetibilidade na concentração de solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.....	70
<b>Tabela A.7</b> - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para a solução padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	72
<b>Tabela A.8</b> - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para a solução padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA. ....	72
<b>Tabela A.9</b> - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para o declive. ....	73
<b>Tabela A.10</b> – Resultados base para o cálculo da incerteza associada à curva de calibração. ....	74
<b>Tabela A.11</b> – Resultados das incertezas, em ng/L, associadas à preparação de cada solução padrão de 2,4,6-TCA.....	75
<b>Tabela A.12</b> - Custo anual e por amostra, em €, do GC-ECD, da micropipeta digital, do desionizador e dos consumíveis do GC. ....	76
<b>Tabela B.1</b> - Rolhas a colocar em cada frasco de maceração em função do calibre.....	77
<b>Tabela C.1</b> - Resultados da curva de calibração A.....	78
<b>Tabela C.2</b> - Resultados da curva de calibração B.....	78
<b>Tabela C.3</b> - Resultados da curva de calibração C. ....	79
<b>Tabela C.4</b> - Resultados da curva de calibração D. ....	79
<b>Tabela C.5</b> - Resultados da curva de calibração E.....	80
<b>Tabela C.6</b> - Resultados da curva de calibração F.....	81

## **Siglas e Acrónimos**

**DOC** – Denominação de Origem Controlada

**ECD** – *Electron Capture Detector*

**GC** – *Gas Chromatography*

**HS** – *Headspace*

**ISO** – *International Standard Organization*

**IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

**LAI** – Limite de Alerta Inferior

**LAS** – Limite de Alerta Superior

**LC** – Limite Central

**LIC** – Limite Inferior de Controlo

**LOD** – *Limit of Detection*

**LOQ** – *Limit of Quantification*

**LSC** – Limite Superior de Controlo

**MRC's** – Materiais de Referência Certificados

**S.A.** – Sociedade Anónima

**SPME** – *Solid Phase Microextraction*

**TCA** – Tricloroanisol

**U.A.** – Unidades arbitrárias



# ***Capítulo 1***

---

## ***Introdução***

# 1. Introdução

Neste capítulo faz-se um enquadramento do trabalho, a definição de objetivos, uma breve apresentação da empresa e, finalmente, a forma como foi organizada esta dissertação.

## 1.1. Enquadramento

Esta dissertação foi realizada no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio do Mestrado em Engenharia Química no ramo de Qualidade do Instituto Superior de Engenharia do Porto. O estágio curricular decorreu na empresa “Symington Family Estates, S.A.”, com o tema “Validação de método para determinação de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em rolhas por microextração em fase sólida no *headspace* e determinação por cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões (HS-SPME-GC-ECD)”. Paralelamente ao tema de estágio, colaborou-se também com o laboratório de análises da empresa, dando apoio em todas as áreas necessárias.

Este estágio teve a duração de, aproximadamente, um ano curricular, tendo-se iniciado em Outubro de 2017 e terminado em Junho de 2018.

## 1.2. Objectivos

Os objetivos específicos deste trabalho foram os seguintes:

- Implementar o método de análise interno para todos os tipos de rolhas que a empresa recebe;
- Validar o método, garantindo que os resultados obtidos são fiáveis.

Como objetivos mais abrangentes, este estágio permitiu:

- Adquirir experiência em ambiente empresarial;
- Testar a capacidade de adaptação pessoal;
- Aplicar, de forma prática, os conteúdos/conhecimentos adquiridos ao longo da licenciatura e do mestrado em engenharia química;
- Estudar e aplicar as várias técnicas e metodologias de análise aplicadas em todo o material associado ao engarrafamento de vinho.

## 1.3. Apresentação da empresa

A família Symington, que tem ascendência escocesa, inglesa e portuguesa, está ligada ao comércio de vinho do Porto desde o século XIX [1].

Atualmente, a empresa possui 2071 hectares de terra no vale do Douro, distribuídos por 27 propriedades vitivinícolas. No entanto, este enorme crescimento da empresa começou em 1882, quando Andrew James Symington chegou a Portugal para trabalhar na Graham's,

tendo na altura apenas 19 anos. Após uns anos, Andrew Symington decide abandonar a Graham's para começar o seu negócio independente como produtor de vinho do Porto e, juntamente com a sua mulher Beatrice, decidem estabelecer a família no vale do Douro, de modo a inculcar nos filhos uma visão a longo prazo do seu negócio de vinho [1].

Em 1912, Andrew já era sócio da Warre's e da Dow's, sendo que esta última possuía 3 quintas vinificadas no Douro, possibilitando aos seus filhos Maurice, John e Rom, estarem mais perto desta região importante para a produção de vinho do Porto. Assim, à medida que iam crescendo, os filhos de Andrew começaram a ficar cada vez mais familiarizados com o negócio da família, estando também envolvidos na gestão das quintas e no tratamento das vinhas. Hoje em dia, a geração da família que está à frente da empresa é constituída por Paul, Johnny, Ruppert, Dominic e Charles, tendo adquirido várias quintas no vale do Douro, local onde as suas gerações anteriores estabeleceram família e os inculcaram a continuar a desenvolver um negócio iniciado há mais de um século [1]. Na **Figura 1.1** apresentam-se os 5 membros da família da geração atual [1].



**Figura 1.1** - Cinco dos membros da família que atualmente trabalham na empresa [1].

Nos dias de hoje, a Symington Family Estates é responsável por cerca de um terço da produção de vinho do Porto de qualidade superior, sendo produtora dos vinhos do Porto de 4 casas históricas: Graham's, Dow's, Warre's e Cockburn's. A empresa também é produtora de vinhos Denominação de Origem Controlada (DOC) Douro, produzindo os vinhos Chryseia, Post Scriptum e Prazo de Roriz, juntamente com a família Prats de Bordéus, e outros vinhos do Douro, apenas produzidos pela empresa, na Quinta do Vesúvio e na Quinta do Ataíde.

Na **Figura 1.2** estão 4 vinhos do Porto produzidos pela Symington Family Estates, um de cada uma das principais casas [1].



**Figura 1.2** - Principais marcas de vinho do Porto produzidos pela *Symington Family Estates*.

Ao longo dos anos a Symington Family Estates tem sido reconhecida com vários prémios pela qualidade dos seus vinhos do Porto e vinhos DOC Douro, sendo uma das empresas de vinhos do mundo com mais distinções. No entanto, estes reconhecimentos não se resumem apenas aos vinhos produzidos pela empresa, mas também aos enólogos da família e à empresa como um todo [1].

Alguns dos prémios mais importantes e gratificantes dos últimos anos são os seguintes [1]:

- Viticultura do ano 2012;
- Decanter personalidade do ano 2012: Paul Symington;
- Enólogos do ano – Vinhos fortificados: Peter e Charles Symington;
- International Wine & Spirits Competition: Produtor português do ano;
- Wine Spectator: Vinho do ano 2014 (Dow's Porto Vintage 2011 – 1ª posição; Chryseia 2011 Porto DOC – 3ª posição);
- 11 medalhas de ouro e 29 medalhas de prata nos Concursos Internacionais de Vinho de 2015.

## 1.4. Organização da dissertação

Esta dissertação está dividida em diferentes capítulos. No capítulo 1, denominado de Introdução, faz-se um enquadramento do trabalho, a definição de objetivos e a apresentação da empresa.

No capítulo 2, denominado de Estado da Arte, será abordada a produção de rolhas de cortiça, a formação de 2,4,6-TCA nas rolhas, a determinação deste composto por HS-SPME-GC-ECD e a validação de métodos internos de ensaio.

No capítulo 3, denominado de Materiais e Métodos, serão enunciados os equipamentos utilizados para obtenção de resultados, bem como os procedimentos utilizados.

No capítulo 4, denominado Resultados e Discussão, serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos.

No capítulo 5, denominado de Conclusão, serão apresentadas as conclusões acerca de todo o trabalho realizado.

Nos anexos encontram-se os diferentes exemplos de cálculo, bem como a quantidade de rolhas utilizadas nos macerados e os dados das curvas de calibração obtidas.



## ***Capítulo 2***

---

### ***Estado da Arte***

## 2. Estado da Arte

Nesta secção, será abordada a validação de métodos internos de ensaio, bem como todos os parâmetros que envolvem este tema.

O método de análise abordado é a cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de eletrões, sendo a preparação da amostra realizada por microextração em fase sólida do *headspace* da amostra.

Para além disso, também é aprofundada a produção de rolhas de cortiça, pois é essa a matéria-prima analisada pelo método em estudo.

Será também explicada a formação do composto 2,4,6-TCA nas rolhas, a importância da sua quantificação nesse material de engarrafamento e a implicação que tem no produto final que é fornecido aos clientes, ou seja, no vinho.

### 2.1. Cortiça

A cortiça é um tecido vegetal natural que é extraído da casca do sobreiro. Este material para além de ser 100% natural, é também completamente reutilizável e reciclável, pois apesar de a cortiça extraída ser totalmente aproveitada para diferentes aplicações, esta pode ser triturada, voltando a ser utilizada no processo produtivo [2].

Esta matéria-prima pode ser utilizada em várias aplicações e adaptar-se a diferentes condições climáticas graças ao facto de ser impermeável, elástica e compressível, resistindo assim a variações de humidade, temperatura e pressão. Para além disso, a cortiça é um excelente isolante térmico e acústico, é um material de combustão lenta, não absorve pó, e resiste ao atrito [2]. Na **Figura 2.1** encontra-se representada uma prancha de cortiça.



**Figura 2.1** - Prancha de cortiça [2].

Relativamente à produção mundial de cortiça, Portugal destaca-se como principal produtor, sendo responsável por 49% desta produção. Para este valor contribuem os produtos destinados à indústria vinícola, constituindo 72% dos produtos de cortiça, nomeadamente os 40 milhões de rolhas que são produzidas diariamente, em média, no país [3].

### 2.1.1. Composição química da cortiça

A composição química da cortiça tem sido amplamente estudada, tendo-se descoberto que varia consoante a sua origem geográfica e genética, o clima e as condições do solo, as dimensões, idade e condições de crescimento do sobreiro [4].

A parede celular da cortiça é composta por três camadas com diferentes composições. A parede primária tem uma estrutura rica em lenhina. A parede secundária é mais espessa, sendo constituída por suberina e lenhina. Por fim, a parede terciária é composta por polissacarídeos. O componente presente em maior percentagem é a suberina (40%), responsável pela impermeabilidade, seguida da lenhina (22%), polissacarídeos (18%), extratáveis (15%) e outros constituintes [4]. Os extratáveis são compostos que não estão quimicamente ligados à estrutura principal da cortiça, sendo por isso facilmente extraíveis com solventes. Entre estes compostos presentes na cortiça, os mais importantes são os compostos fenólicos. Estes compostos são muitos importantes para a qualidade de um vinho, pois afetam o seu sabor e coloração, entre outros parâmetros [4, 5].

Também existem compostos aromáticos presentes na cortiça que são contaminantes responsáveis por alterações organolépticas nos vinhos. Os desvios sensoriais numa rolha provenientes destes compostos, são muitas vezes associados a mofo ou a bolor, e quando se transferem para um vinho são, habitualmente, responsáveis pelo “sabor a rolha”, sendo um sinal da degradação da qualidade sensorial de um vinho [6].

## 2.2. Produção de rolhas

A cortiça utilizada para a obtenção de rolhas passa por vários processos, começando pelo descortiçamento, ou seja, pela extração da cortiça da casca do sobreiro [7].

Após este processo, as pranchas de cortiça passam por diferentes etapas até à obtenção da rolha, dependendo do tipo de rolha pretendido [8].

### 2.2.1. Descortiçamento

O processo de descortiçamento é realizado diversas vezes até se extrair cortiça com qualidade para ser transformada em rolha. Dos dois primeiros descortiçamentos obtém-se cortiça mais irregular e dura, sendo utilizada para outras aplicações [7].

A partir do terceiro descortiçamento já é obtida cortiça com qualidade para ser transformada em rolhas, sendo este processo repetido de 9 em 9 anos, cerca de 15 vezes até ao fim de vida do sobreiro. Este processo é efetuado em seis etapas [7]:

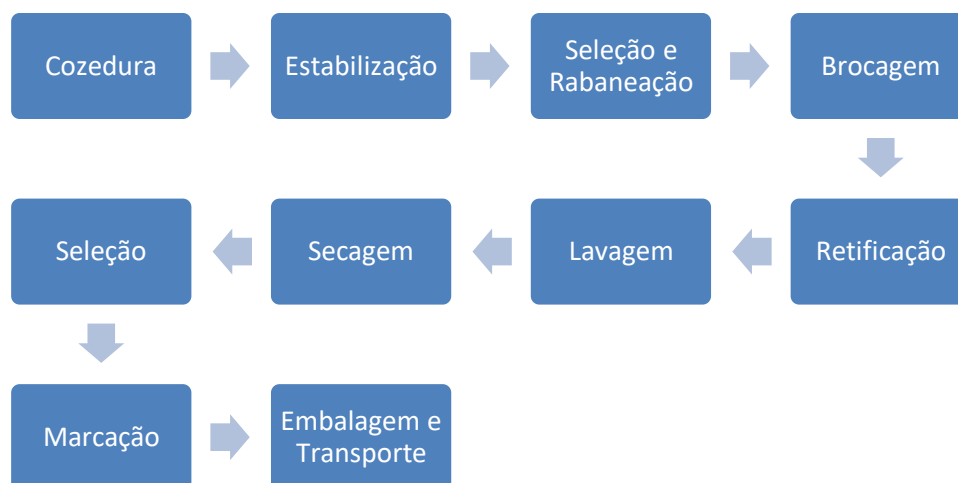
1. Abrir – consiste em golpear a fenda mais profunda do sobreiro com um machado;
2. Separar – consiste em separar a prancha de cortiça do tronco da árvore;

3. Traçar – nesta fase é delimitado o tamanho da prancha de cortiça;
4. Extrair – a prancha é retirada da árvore com cuidado para não se partir;
5. Descalçar – são aplicados alguns golpes na base do sobreiro para eliminar parasitas;
6. Marcar – marca-se a árvore com o último algarismo do ano em que foi feita a extração.

Após o fim desta etapa, as pranchas são colocadas a repousar ao ar livre, permanecendo expostas às condições atmosféricas. Este período não deve ser inferior a seis meses, sendo neste intervalo de tempo que ocorre a maturação da cortiça e a sua estabilização [7].

### 2.2.2. Rolhas Naturais

A produção de rolhas naturais engloba diversas etapas, tal como é demonstrado na **Figura 2.2**.



**Figura 2.2** - Etapas de produção de rolhas naturais.

Cada etapa é realizada com diferentes objetivos, sendo cada uma delas muito importante para a obtenção do produto final com a qualidade desejada. Na **Tabela 2.1** encontram-se descritos os objetivos associados a cada uma das etapas [9].

**Tabela 2.1** - Objetivos de cada etapa de produção de rolhas naturais [9].

Etapa	Objetivo(s)
<b>Cozedura</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limpar a cortiça;</li> <li>• Extrair substâncias hidrossolúveis;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"><li>• Aumentar a espessura e reduzir a densidade;</li><li>• Tornar a cortiça mais macia e elástica.</li></ul>
<b>Estabilização</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adquirir a consistência ideal;</li><li>• Atingir um teor de humidade de 14%.</li></ul>
<b>Seleção e Rabaneação</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Separar as pranchas por qualidade;</li><li>• Cortar as pranchas nas dimensões desejadas.</li></ul>
<b>Brocagem</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Obter rolhas com as dimensões desejadas.</li></ul>
<b>Retificação</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Retificar as dimensões finais da rolha;</li><li>• Regularizar a superfície.</li></ul>
<b>Lavagem</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Limpar e desinfetar as rolhas.</li></ul>
<b>Seleção</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Separar as rolhas por classe visual;</li><li>• Eliminar rolhas defeituosas.</li></ul>
<b>Marcação</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Marcar as rolhas de acordo com as indicações do cliente.</li></ul>
<b>Embalagem e Transporte</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Embalar na presença de dióxido de enxofre para inibir o desenvolvimento microbológico.</li></ul>

Na **Figura 2.3** está representado um exemplo de uma rolha natural.



**Figura 2.3** - Rolha natural.

### 2.2.3. Rolhas técnicas

A produção de rolhas técnicas é dividida em três fases: produção de discos de cortiça natural; fabrico do corpo; montagem da rolha [10].

As pranchas utilizadas para a produção dos discos passam por um cozimento semelhante ao utilizado para a obtenção de rolhas naturais. De seguida, as pranchas são

laminadas, de forma a obter cortiça macia e uniforme. As lâminas são cortadas em círculos com o tamanho dos topos das rolhas que se pretende fabricar. Os diferentes discos são divididos por classes visuais. No final, são lavados com água purificada a cerca de 70°C, são secos e armazenados até serem utilizados. A produção de discos de cortiça não é realizada para todas as rolhas técnicas, podendo ser apenas constituídas por granulados de cortiça natural [10].

O corpo da rolha é produzido a partir dos desperdícios da brocagem das rolhas naturais. Esta cortiça é triturada, obtendo-se grânulos de diferentes granulometrias. De seguida, são aglomerados, sendo cortados para obter as medidas desejadas [10].

Por fim, os discos e os corpos são introduzidos em máquinas de montagem. Os discos são colados no topo dos corpos de cortiça, utilizando-se uma cola aprovada pela *Food and Drug Administration* [10].

No final da montagem, as rolhas passam por um processo de secagem, de forma a garantir que a cola é completamente seca. De seguida, passam pela etapa de retificação para se obterem as dimensões pretendidas para as diferentes rolhas. Por fim, passam por processos de lavagem, seleção, marcação e embalagem semelhantes aos efetuados para as rolhas naturais [10].

Na **Figura 2.4** está representado um exemplo de uma rolha técnica.



**Figura 2.4** - Rolha técnica.

### 2.3. 2,4,6-tricloroanisol

O composto 2,4,6-tricloroanisol (TCA) é o principal responsável pelo, geralmente chamado, “sabor a rolha” num vinho. Assim, é muito importante que seja determinado o seu teor nas rolhas antes destas serem utilizadas num vinho, pois trata-se do principal motivo de reclamações nesta área.

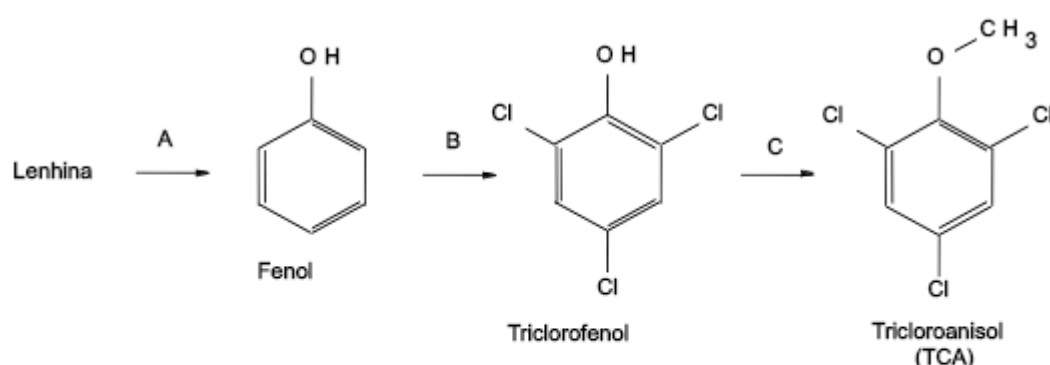
Para combater este problema, os produtores de rolhas e de vinhos têm desenvolvido sistemas de controlo de qualidade cada vez mais rigorosos para que o número de incidências diminua, apesar de os cloroanisóis não serem tóxicos nem existirem limites legais para a sua presença num vinho.

### 2.3.1. Formação de haloanisóis

Os anisóis são compostos orgânicos que têm na sua estrutura um éter ligado a um anel aromático e a um grupo metilo. Assim sendo, os haloanisóis são anisóis com halogéneos na sua estrutura, podendo assim ser constituídos por átomos de cloro, bromo, iodo ou flúor. Estes compostos provêm dos halofenóis, sendo estes altamente tóxicos e formados a partir da reação entre produtos da degradação da lenhina com átomos de cloro ou bromo. Para além disso, os halofenóis também estão presentes em pesticidas, preservantes e desinfetantes utilizados em diferentes indústrias [11].

A formação dos haloanisóis na cortiça, nomeadamente do 2,4,6-TCA, ocorre a partir da biometilação de clorofenóis por parte de fungos, que ao estarem em contacto com clorofenóis desenvolvem mecanismos de auto-defesa, originando a formação de cloroanisóis [6].

Na **Figura 2.5** está representado o mecanismo de formação do 2,4,6-TCA a partir de clorofenóis.



Legenda:

A Processamento da cortiça permite a libertação de monómeros de fenol

B Cloração dos monómeros de fenol

C O-Metilação por via microbiológica do triclorofenol

**Figura 2.5** - Formação de 2,4,6-TCA [12].

### 2.3.2. Contaminação de rolhas com 2,4,6-tricloroanisol

As rolhas de cortiça utilizadas nos vinhos são a principal fonte de contaminação deste produto com 2,4,6-TCA. A formação deste composto pode ocorrer durante o tempo de vida do sobreiro, durante as fases de produção das rolhas, ou até por adsorção do 2,4,6-TCA proveniente do ambiente [6].

O 2,4,6-TCA é o principal responsável pelo odor a mofo nos vinhos. A sua formação ocorre devido à existência de condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos

responsáveis pela sua produção. Uma vez formado nas rolhas, o 2,4,6-TCA acaba por contaminar o vinho ao fim de algum tempo de contacto com a rolha [13].

A contaminação das rolhas proveniente dos sobreiros ocorre devido ao ar e chuva que atingem estas árvores, transportando consigo fungos que ficam alojados na casca dos sobreiros, produzindo haloanisóis que permanecem na estrutura da cortiça, passando depois para as rolhas durante a sua produção [14].

Outra forma de contaminação são as fontes de 2,4,6-TCA provenientes da indústria corticeira. Desta forma, apesar de uma prancha de cortiça poder chegar descontaminada à fábrica, as rolhas obtidas podem possuir 2,4,6-TCA devido à absorção deste composto oriundo de outros materiais contaminados dentro das instalações [14].

Assim, a contaminação de rolhas com 2,4,6-TCA pode ser difícil de controlar, pois apesar de ser possível filtrar as pranchas utilizadas para produção de rolhas, existe sempre a possibilidade de ocorrer uma contaminação durante as etapas de produção.

## 2.4. Determinação de 2,4,6-TCA em rolhas por HS-SPME-GC-ECD

A determinação de 2,4,6-TCA em rolhas é realizada com base na norma ISO 20752:2014 – Rolhas – Determinação de 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) extraível [15].

Segundo esta norma, deve ser colocado um determinado número de rolhas (dependendo do seu calibre) num frasco de maceração preenchido com solução de etanol a 12% (v/v).

Após o período de maceração -  $(24 \pm 2)$  h - a solução resultante é exposta a uma microextração em fase sólida (SPME) e os seus componentes são separados por cromatografia em fase gasosa (GC), de modo a que seja possível quantificar o 2,4,6-TCA presente na amostra através de um detetor de captura de eletrões (ECD).

### 2.4.1. Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de preparação da amostra que envolve a extração de um analito de uma matriz. Este procedimento extrai o analito sem a utilização de qualquer solvente [16].

O principal componente da SPME é uma fibra de sílica coberta por um filme com espessura entre 10 e 100  $\mu\text{m}$ . Esta fibra pode ser introduzida diretamente na solução, ou exposta apenas ao espaço gasoso acima do líquido (*headspace*), durante um determinado intervalo de tempo, sob agitação e aquecimento. A SPME no *headspace* é indicada para analitos de média e elevada volatilidade [16].

Após este processo, a fibra é levada até ao injetor do cromatógrafo, onde se dá a dessorção do analito a ser analisado [16].

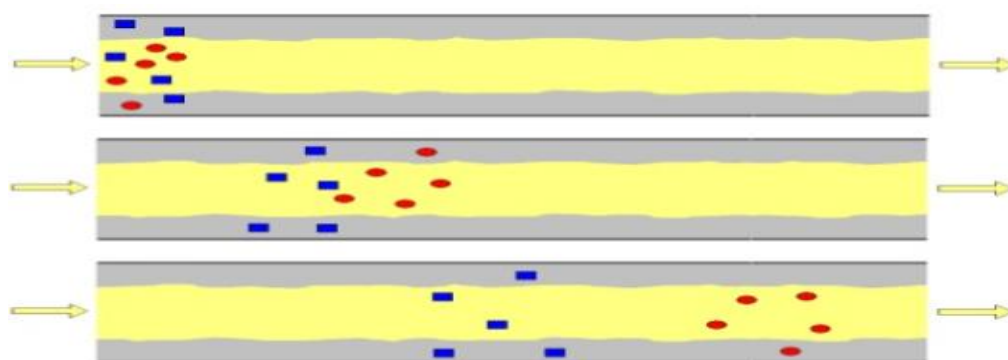
No desenvolvimento de um método de SPME devem ser otimizados diversos parâmetros para garantir que a extração do analito é realizada nas condições ideais, sendo eles: seleção do modo de extração, do tipo de fibra, realizar extração com ou sem aquecimento, técnica de agitação e otimização da dessorção.

#### 2.4.2. Cromatografia em fase Gasosa com Detetor de Captura de Eletrões

A cromatografia é um método de separação que possui uma fase móvel e uma fase estacionária. A fase móvel, que é o solvente que se move pela coluna, pode ser um líquido ou um gás. A fase estacionária é, geralmente, um líquido viscoso que está fixo dentro da coluna, estando ligado quimicamente a esta no caso de ser uma coluna capilar, ou sobre uma superfície de partículas sólidas no caso de ser uma coluna empacotada. Nalguns casos, estas partículas sólidas podem ser a própria fase estacionária [16].

Neste método de separação, um eluente percorre a coluna, arrastando consigo os diferentes componentes presentes na amostra. À medida que a fase móvel vai percorrendo a coluna, os compostos vão emergindo no final desta (eluato), consoante a afinidade que têm com a fase estacionária. Assim, se um soluto for mais facilmente adsorvido pela fase estacionária, demora mais tempo a sair da coluna que os outros solutos. Em suma, a separação por cromatografia em fase gasosa tem por base a afinidade que todos os compostos têm com a fase estacionária [16].

Na **Figura 2.6** está representado o funcionamento de uma coluna cromatográfica. A fase estacionária e a fase móvel estão representadas a cinzento e amarelo, respetivamente. Os pontos azuis representam um soluto com maior afinidade pela fase estacionária do que o soluto representado pelos pontos vermelhos.

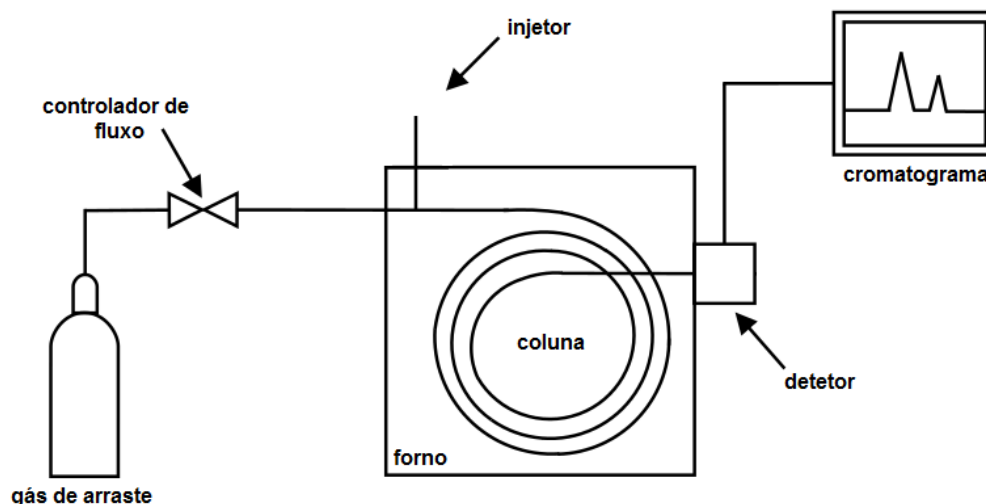


**Figura 2.6** - Representação esquemática do funcionamento de uma coluna capilar em GC.

...aste, sendo normalmente hélio (He), azoto (N<sub>2</sub>) ou hidrogénio (H<sub>2</sub>). Neste método, a amostra (líquido volátil ou gasosa) é introduzida, através de um septo, num injetor aquecido, de modo

a ser rapidamente volatilizada. O vapor que se forma é levado pela coluna através do gás de arraste. Após a separação dos diferentes compostos, os analitos são medidos pelo detetor, observando-se o cromatograma obtido num computador acoplado. De salientar que a temperatura do detetor deve ser superior à temperatura da coluna, de forma a que os analitos permaneçam na fase gasosa [16].

Na **Figura 2.7** está representado um cromatógrafo a gás.



**Figura 2.7** - Esquema de um cromatógrafo a gás.

Um dos detetores que pode ser acoplado a um cromatógrafo a gás é o detetor de captura de eletrões (ECD). Este detetor é seletivo, sendo muito sensível a moléculas com grupos eletronegativos, como os halogéneos ou peróxidos. Por outro lado, não é sensível a hidrocarbonetos, alcoóis e aminas. O ECD tem a vantagem de não introduzir alterações na amostra. Apesar de ser um detetor sensível, a sua gama de resposta linear está limitada a um intervalo de cerca de duas ordens de magnitude [17].

## 2.5. Validação de métodos internos de ensaio

A obtenção de resultados a partir de um método de ensaio envolve diversos fatores com erros associados. A acumulação destes erros faz com que o resultado possa não ser 100% fiável. Assim, quando se opta por implementar um método de análise é necessário demonstrar que os resultados obtidos são fiáveis, ou seja, é necessário validar esse método.

Existem diversos parâmetros de métodos internos de ensaio que devem ser validados, tais como:

- Gama de Trabalho;
- Linearidade;
- Limites de Detecção e Quantificação;

- Precisão;
- Exatidão.

No caso duma análise quantitativa é necessário obter uma curva de calibração, bem como analisar a sensibilidade do método.

### 2.5.1. Curva de calibração

Para realizar uma análise quantitativa é necessário obter uma curva de calibração do equipamento. A curva de calibração é um gráfico que relaciona o sinal do detetor em função de concentrações conhecidas do analito a analisar [18].

Para obter a curva de calibração é necessário preparar soluções padrão do analito a analisar, medindo-se de seguida o sinal destas soluções no equipamento analítico. A norma ISO 8466-1 recomenda a realização de uma curva de calibração com 10 pontos, sendo possível utilizar menos pontos, mas nunca um número inferior a 5. Através da curva de calibração obtém-se uma equação da reta de forma  $y = a + bx$ , em que **a** representa a ordenada na origem e **b** representa o declive da reta [18, 19].

A reta é formada por um conjunto de pares ordenados ( $x_i, y_i$ ) que correspondem a **N** pontos que fazem parte da reta, sendo o primeiro ponto geralmente um branco. O coeficiente de correlação ( $r$ ) é um dos parâmetros que permite avaliar a qualidade de uma curva de calibração, sendo obtido pela equação 2.1 [18]:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{Y})^2]}} \quad (2.1)$$

sendo:

$x_i$  - valores individuais de concentração;

$y_i$  - valores individuais de sinal instrumental;

$\bar{x}$  - média de valores das concentrações dos padrões utilizados;

$\bar{Y}$  - média dos valores de sinais instrumentais.

Este parâmetro pode assumir valores entre 1 e -1, conforme o declive da reta seja positivo ou negativo. O coeficiente de correlação deve ser superior a 0,995, dependendo, no entanto, dos critérios internos de cada laboratório [18].

Para além dos procedimentos que devem ser seguidos para se obter uma curva de calibração aceitável, existem outras considerações a ter em conta [18]:

- A curva de calibração deve ser obtida no momento da realização da análise. Aceita-se esta curva se forem cumpridos os critérios estabelecidos pelo laboratório, devendo-se traçar uma nova curva caso isso não aconteça. Para regressões lineares obtidas pelo método dos mínimos quadrados recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 [19];
- Quando não é realizada uma calibração diária é necessário garantir que a curva de calibração utilizada continua a cumprir os critérios de aceitação. Um dos métodos de verificação pode ser a utilização de padrões de controlo;
- Os padrões de calibração devem estar distribuídos equitativamente pela gama de trabalho;
- O branco de calibração deve ser incluído na curva de calibração;
- Quando se utiliza o método dos mínimos quadrados, o eixo vertical (Y) representa o sinal instrumental do equipamento e o eixo horizontal (X) representa as concentrações do analito;
- Quando a curva de calibração é representada por uma reta, utilizando-se o método dos mínimos quadrados, assume-se que existe uma homogeneidade de variâncias ao longo da reta.

### 2.5.2. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um instrumento para distinguir pequenas variações de concentração de um analito, ou seja, representa o quociente entre a variação do sinal obtido e a variação da concentração do analito. Este parâmetro é definido como a derivada de primeira ordem da curva de calibração obtida. No caso de se usar um modelo linear, a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração, sendo constante na gama de trabalho definida [18].

A sensibilidade deve ser avaliada ao longo do tempo, de forma a estudar a sua variação. Para além disso, também é um parâmetro bastante importante para ser avaliado quando se quer comparar dois métodos que podem ser utilizados para determinar o mesmo analito. A sensibilidade também pode ser estudada para avaliar um equipamento, ou seja, pode-se obter este parâmetro para diferentes analitos, comparando-se os valores obtidos, permitindo descobrir qual o analito a que o equipamento em questão é mais sensível [18].

Outro procedimento para comparar o desempenho de dois métodos pode ser através da comparação dos limites de deteção e de quantificação.

### 2.5.3. Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método consiste no intervalo de concentrações no qual um analito pode ser quantificado com boa exatidão e precisão. Para confirmar que uma

determinada gama de trabalho foi bem definida, é necessário avaliar as variâncias dos sinais obtidos para os padrões, nos limites do intervalo de trabalho, de maneira a averiguar se existem diferenças significativas entre elas [18, 20].

O teste de homogeneidade de variâncias é utilizado para estudar as variâncias dos sinais obtidos associadas ao primeiro e último padrão da curva de calibração. Neste teste são analisadas 10 réplicas independentes do primeiro e último padrão, determinando-se assim as variâncias associadas aos limites da curva de calibração [18].

Para determinar as variâncias dos sinais do primeiro ( $S_1$ ) e do último padrão ( $S_N$ ), são utilizadas as equações **2.2 e 2.3** [18]:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (Y_{i,j} - \bar{Y}_i)^2}{10 - 1} \quad (2.2)$$

em que:

$$\bar{Y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} (Y_{i,j})}{10} \quad (2.3)$$

sendo:

i – número do padrão;

j – repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são comparadas através da determinação do valor teste PG, utilizando-se as equações **2.4 e 2.5** [18]:

$$PG = \frac{S_N^2}{S_1^2} \quad (2.4)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_N^2} \quad (2.5)$$

utilizando-se:

equação 2.4 se  $S_N^2 > S_1^2$

equação 2.5 se  $S_1^2 > S_N^2$

O valor de PG obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade [18]:

- Se  $PG \leq F$ , as diferenças entre as variâncias não são significativas e considera-se que a gama de trabalho é adequada.

- Se  $PG > F$ , as diferenças entre as variâncias são significativas, devendo-se reduzir a gama de trabalho até que a diferença das variâncias entre o primeiro e o último padrão permita obter  $PG \leq F$ .

Outra possibilidade de avaliar a gama de trabalho de um método é determinar os coeficientes de variação de 10 réplicas do padrão mais pequeno e o do padrão maior do intervalo definido. Se o coeficiente de variação destes dois padrões for inferior a 10% pode-se considerar que a gama de trabalho utilizada é válida [6].

#### 2.5.4. Linearidade

A linearidade consiste na capacidade de um método em reproduzir sinais do analito diretamente proporcionais à sua concentração, numa determinada gama de trabalho. Este parâmetro pode ser avaliado através da representação gráfica da função e da análise do coeficiente de correlação ( $r$ ) [21].

A análise da linearidade de um método deve ser realizada durante a fase de validação e sempre que necessário, de acordo com a rotina do laboratório, avaliando-se sempre a sua representação gráfica juntamente com o coeficiente de correlação [18].

Através do método dos mínimos quadrados, obtém-se uma equação da reta com  $y$  em função de  $x$ , determinando-se os coeficientes  $a$  (ordenada na origem) e  $b$  (declive da reta), sendo  $y = a + bx$ . Os coeficientes  $a$  e  $b$  são calculados através das equações 2.6 e 2.7 [18]:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{Y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.6)$$

$$a = \bar{Y} - b \times \bar{x} \quad (2.7)$$

sendo:

$x_i$  - valores individuais de concentração;

$y_i$  - valores individuais de sinal instrumental;

$\bar{x}$  - média de valores das concentrações dos padrões utilizados;

$\bar{Y}$  - média dos valores de sinais instrumentais.

A equação da reta obtida é afetada pela dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração do método. Esta dispersão é expressa pelo desvio-padrão residual da reta de regressão ( $S_{y/x}$ ), determinado pela equação 2.8 [18]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [Y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N - 2}} \quad (2.8)$$

Para determinar os limites de confiança de **a** e de **b** usam-se as equações 2.9 e 2.10 [18]:

$$a = a \pm t \times S_a \quad (2.9)$$

$$b = b \pm t \times S_b \quad (2.10)$$

sendo *t* o valor da variável de Student para o nível de confiança desejado com (N-2) graus de liberdade e os desvios-padrão de **a** (*S<sub>a</sub>*) e de **b** (*S<sub>b</sub>*) são calculados pelas equações 2.11 e 2.12 [18]:

$$S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N * \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.11)$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.12)$$

O desvio-padrão do método (*S<sub>m</sub>*) e o seu coeficiente de variação (*CV<sub>m</sub>*) são dois parâmetros que servem para avaliar a dispersão do método instrumental, sendo calculados pelas equações 2.13 e 2.14 [18]:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b} \quad (2.13)$$

$$CV_m(\%) = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.14)$$

### 2.5.5. Limiares analíticos

Quando um método é utilizado para determinar baixas concentrações de um analito numa amostra é necessário considerar dois limiares analíticos – limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

Estes limiares devem ser atualizados sempre que se verificarem alterações no equipamento, reagentes, entre outros, ou sempre que se traçarem novas curvas de calibração, sendo apresentados resultados individuais de cada limite [18].

### 2.5.5.1. Limite de Detecção

O LOD é o teor mínimo do analito que pode ser detetado numa amostra, com determinado nível de confiança. No entanto, esse valor obtido não pode ser dado como exato [18].

Qualitativamente, o LOD corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, numa amostra que possui a mesma matriz, mas que não possui o analito. Assim, uma concentração obtida que seja inferior ao LOD não implica que um analito não esteja presente na amostra, podendo-se apenas concluir que a concentração do analito é inferior ao valor do LOD, com uma determinada probabilidade definida [18].

Sendo assim, para definir o LOD é necessário introduzir dois tipos de erros estatísticos: erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I (risco  $\alpha$ ) é a probabilidade de se concluir que um analito está presente numa amostra quando na verdade não está presente. O erro do tipo II (risco  $\beta$ ) é a probabilidade de se concluir que um analito não está presente numa amostra quando na verdade está presente. Assim, para uma análise correta dos limiares analíticos, a IUPAC recomenda que se assuma que  $\alpha = \beta = 5\%$  [18].

Através de uma calibração linear é possível determinar o LOD, utilizando-se a equação 2.15 [11]:

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.15)$$

### 2.5.5.2. Limite de Quantificação

O LOQ é a mínima quantidade a partir da qual é possível quantificar um analito, com determinada exatidão e precisão [22].

Após a sua determinação, este parâmetro deve ser testado para confirmar que é exato e preciso. Para isso, devem ser analisados uma série de padrões de concentração próxima à do LOQ. Segundo a IUPAC, estes padrões devem possuir um coeficiente de variação inferior a 10% [18].

Através de uma calibração linear é possível determinar o LOQ, utilizando-se a equação 2.16 [18]:

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.16)$$

### 2.5.6. Precisão

A precisão de um método avalia a dispersão de resultados obtidos de ensaios independentes numa mesma amostra ou de um padrão, em determinadas condições [18].

Este parâmetro pode ser analisado de três maneiras diferentes: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia [18].

### 2.5.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método efetuado em condições semelhantes, isto é, representa a precisão para diferentes ensaios efetuados para uma mesma amostra ou padrão, nas mesmas condições, sendo estas [18]:

- mesmo laboratório;
- mesmo analista;
- mesmo equipamento;
- mesmos reagentes;
- curto intervalo de tempo.

Nestas condições, é possível definir o limite de repetibilidade ( $r$ ). Este limite é o valor abaixo do qual, geralmente com uma probabilidade de 95%, se deve situar a diferença entre dois ensaios,  $X_i$  e  $X_{i-1}$ , obtidos em determinadas condições idênticas [18].

Assim sendo, aceitam-se os resultados para dois ensaios, efetuados em condições de repetibilidade, se  $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ . No caso de a amplitude dos resultados ser superior ao limite de repetibilidade, deve-se fazer uma análise crítica, de modo a perceber o que pode ter corrido fora do previsto, e, em último caso, repetir os ensaios [18].

Para determinar a repetibilidade de um método devem-se efetuar mais de dez ensaios sobre a mesma amostra ou padrão, nas condições definidas. Este procedimento pode ser repetido para vários níveis de concentração, de modo a abranger toda a gama de trabalho do método [11].

O limite de repetibilidade pode ser calculado pela equação **2.17** [20]:

$$r = t \times \sqrt{2 \times S_r} \quad (2.17)$$

sendo:

$t$  – valor da variável de Student para 95% de confiança e com  $(n-1)$  graus de liberdade;

$S_r$  – desvio-padrão associado aos resultados obtidos.

Para além do limite de repetibilidade, também é importante determinar o coeficiente de variação de repetibilidade,  $CV_r$ , dado pela equação **2.18** [20]:

$$CV_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.18)$$

sendo:

$\bar{X}$  – média dos resultados obtidos.

### 2.5.6.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade representa a precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, tais como [18]:

- diferente laboratório;
- diferente analista;
- diferentes equipamentos;
- diferentes reagentes;
- diferentes alturas do ano.

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual, geralmente com uma probabilidade de 95%, se deve situar a diferença entre dois ensaios,  $X_i$  e  $X_{i-1}$ , obtidos em condições de reprodutibilidade [18].

Este parâmetro é estudado a partir de ensaios interlaboratoriais. Para isso, são enviadas uma série de amostras aos laboratórios participantes, que devem realizar ensaios para cada amostra. O desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ) é dado pela equação **2.19** [20]:

$$S_{Ri} = \sqrt{S_{Li}^2 + S_{ri}^2} \quad (2.19)$$

sendo:

$S_{Li}^2$  – variância interlaboratorial;

$S_{ri}^2$  – variância da repetibilidade.

O limite de reprodutibilidade é calculado pela equação **2.20** [20]:

$$R = t \times \sqrt{2} \times S_{Ri} \quad (2.20)$$

sendo:

t – valor da variável de Student para 95% de confiança e com (n-1) graus de liberdade;

$S_{Ri}$  – desvio-padrão da reprodutibilidade.

Para além do limite de reprodutibilidade, também é importante determinar o coeficiente de variação de reprodutibilidade,  $CV_R$ , dado pela equação **2.21** [20]:

$$CV_R(\%) = \frac{S_{Ri}}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.21)$$

sendo:

$\bar{X}$  – média dos resultados obtidos.

### 2.5.6.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia encontra-se entre a repetibilidade e a reprodutibilidade, ou seja, é a precisão referente a amostras ou padrões, mas variando apenas algumas das condições de ensaio, sendo estas exatamente estabelecidas, tais como [18]:

- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos;
- diferentes alturas do ano.

Este parâmetro é considerado o mais representativo da variabilidade dos resultados. Para se determinar a precisão intermédia de um método é necessário efetuar várias medições em replicado, para diferentes amostras ou padrões. Assim, a precisão intermédia pode ser determinada através da equação 2.22 [20]:

$$S_{Pint} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - \bar{Y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (2.22)$$

sendo:

$S_{Pint}$  - Desvio-padrão da precisão intermédia;

$t$  – número de amostras;

$n$  – número de ensaios por amostra;

$j$  – número da amostra;

$k$  – número do resultado obtido para a amostra  $j$ ;

$Y_{jk}$  – resultado individual  $k$  da amostra  $j$ ;

$\bar{Y}_j$  – média de resultados obtidos para a amostra  $j$ .

### 2.5.7. Exatidão

A exatidão de um método é definida como a concordância entre um valor obtido para um analito numa amostra, através de um ensaio, e o valor definido como verdadeiro para o analito nessa amostra [18].

Este parâmetro pode ser avaliado de diferentes formas [20]:

- Materiais de Referência Certificados (MRC's);
- Ensaio interlaboratoriais;
- Ensaio de recuperação.

#### 2.5.7.1. Materiais de Referência Certificados

Os MRC's são utilizados para verificar a exatidão de um método analítico, de modo a garantir que os resultados obtidos por esse método são fiáveis. O valor de um analito definido

para um MRC é baseado na exatidão de todo o processo experimental de obtenção desse material. Para além disso, a incerteza associada ao valor declarado leva em conta todos os erros aleatórios e sistemáticos associados às diferentes medições, assim como a variabilidade entre amostras e o tempo de validade desse material [23].

A aquisição de um MRC deve ser feita a um fornecedor certificado, ou seja, com credibilidade. Assim, para avaliar o desempenho de um método deve ser realizada uma análise ao MRC, comparando-se o valor obtido com o valor de referência, determinando-se depois a exatidão do método. Quando o resultado se encontra fora do intervalo de aceitação, deve-se tentar procurar as causas do desvio, tentando depois reduzi-las ou eliminá-las [18].

A avaliação dos resultados pode ser feita de diferentes formas [18]:

- Erro relativo;
- Erro normalizado;
- Teste de hipóteses;
- Fator de desempenho.

#### 2.5.7.2. Ensaio interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais têm como objetivo comparar resultados obtidos por um laboratório e o valor aceite como verdadeiro. Estes ensaios podem ser de dois tipos, conforme o objetivo pretendido pelo laboratório [18]:

- Ensaio interlaboratorial de aptidão - quando o objetivo é avaliar a exatidão de um método, podendo cada laboratório utilizar o método que preferir.
- Ensaio interlaboratorial de normalização - quando o objetivo é estudar a reprodutibilidade e repetibilidade, sendo obrigatório utilizar o método definido.

Para avaliar os resultados obtidos por cada laboratório determina-se o fator de desempenho (z-score), calculado através da equação **2.23** [20]:

$$Z = \frac{|X_{lab} - X_v|}{S} \quad (2.23)$$

sendo:

$X_{lab}$  – Resultado obtido pelo laboratório;

$X_v$  – Resultado aceite como verdadeiro;

$S$  – Desvio-padrão dos resultados obtidos por todos os laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial.

O desempenho de cada laboratório é avaliado de acordo com uma escala de pontuação [18]:

- $|Z| \leq 2 \rightarrow$  resultado aceitável ou satisfatório;

- $2 < |Z| < 3 \rightarrow$  resultado questionável;
- $|Z| \geq 3 \rightarrow$  resultado incorreto.

### 2.5.7.3. Ensaio de recuperação

A exatidão de um método pode ser avaliada através de ensaios de recuperação. Estes ensaios consistem em analisar uma solução padrão de um determinado analito, ou uma amostra, registando-se o valor obtido. De seguida, adiciona-se uma determinada quantidade do analito, de forma a se obter uma concentração mais elevada. Por fim, analisa-se a solução com a nova concentração, para verificar se a concentração obtida corresponde ao que se esperava. A percentagem de recuperação (%R) é calculada pela equação **2.24** [22]:

$$R(\%) = \frac{C_2 - C_1}{C_{ad}} \times 100 \quad (2.24)$$

sendo:

$C_1$  – Concentração inicial da amostra;

$C_2$  – Concentração final da amostra;

$C_{ad}$  – Concentração adicionada.

Os valores obtidos para os testes de recuperação devem estar situados entre 80 e 120%. No entanto, estes limites de aceitação dependem do critério interno do laboratório [20].

### 2.5.8. Cartas de controlo

As cartas de controlo fazem parte de um sistema de controlo de qualidade interno, sendo um dos métodos mais eficazes para visualizar o controlo contínuo que é efetuado sobre os resultados obtidos, permitindo detetar anomalias durante a realização de um método de ensaio [24, 25].

Existem 3 tipos de cartas de controlo [24]:

- Cartas de Controlo de Médias ou Indivíduos;
- Cartas de Controlo de Amplitudes;
- Cartas de Controlo de Somas Cumulativas.

Cada tipo de carta de controlo tem as suas vantagens e desvantagens. Assim, para escolher o tipo de carta a utilizar deve-se perceber quais os objetivos associados ao controlo que se vai realizar, bem como o material que será controlado [24].

Estas cartas são utilizadas para controlar diversos materiais definidos e estáveis, tais como [25]:

- Padrões de Calibração;

- Materiais de Referência Certificados;
- Materiais de Referência Internos;
- Duplicados de amostras.

Relativamente aos possíveis objetivos associados a estas cartas, estes podem ser [25]:

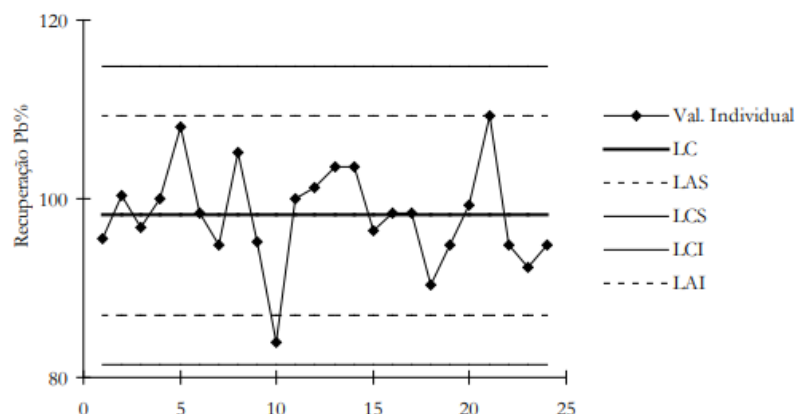
- Controlo de equipamentos;
- Verificação de calibrações;
- Controlo da precisão e exatidão;
- Controlo das operações associadas ao método de ensaio.

Para cada carta de controlo utilizada num laboratório deve existir uma ficha de registo associada, onde seja indicado o método de ensaio, equipamento, material a ser controlado, data de elaboração e a periodicidade da realização do ensaio [25].

Apesar de existirem diferentes tipos de cartas de controlo, todas elas possuem um conjunto de linhas que têm como objetivo permitir que um operador perceba que o processo que está a acompanhar se encontra sob controlo. As linhas marcadas numa carta de controlo são [21]:

- Linha Central (LC) – corresponde à média dos valores obtidos ou das amplitudes, relativamente à variável em estudo;
- Limite Superior de Controlo (LSC) – valores acima desta linha encontram-se fora do controlo. Corresponde ao valor da linha central, acrescentando-se o valor de três desvios-padrão associado aos diferentes resultados obtidos;
- Limite Inferior de Controlo (LIC) – valores abaixo desta linha encontram-se fora do controlo. Corresponde ao valor da linha central, subtraindo-se o valor de três desvios-padrão associado aos diferentes resultados obtidos;
- Limite Superior de Alerta (LAS) – linha de alerta para o operador, permitindo verificar quando os resultados começam a aproximar-se da zona fora do controlo. Corresponde ao valor da linha central, acrescentando-se o valor de dois desvios-padrão associado aos diferentes resultados obtidos;
- Limite Inferior de Alerta (LAI) - linha de alerta para o operador, permitindo verificar quando os resultados começam a aproximar-se da zona fora do controlo. Corresponde ao valor da linha central, subtraindo-se o valor de dois desvios-padrão associado aos diferentes resultados obtidos.

Na **Figura 2.8** encontra-se representado um exemplo de uma carta de controlo [25].



**Figura 2.8** - Exemplo de uma carta de controlo com os respetivos limites representados [25].

### 2.5.9. Algarismos significativos

Um resultado deve ser apresentado de maneira correta, de acordo com os passos seguidos até à sua obtenção. Assim, o número de algarismos significativos utilizados na apresentação de um resultado depende de vários fatores, nomeadamente: indicações dadas na norma utilizada para a análise, incerteza do resultado, entre outros [24].

Relativamente à apresentação de um resultado, não faz sentido registar um resultado com mais algarismos significativos do que a resolução dos equipamentos utilizados. Por exemplo, se um aparelho só apresentar resolução até às centésimas, não é suposto apresentar um resultado com algarismos significativos até às milésimas [24].

No caso do resultado ser apresentado com uma incerteza associada, este só deve ser apresentado até aos dois últimos algarismos significativos afetados por essa incerteza. Por exemplo, num resultado com uma incerteza de 0,032 ng/L, o resultado deve ser 2,154 ± 0,032 ng/L [24].

No caso de uma análise quantitativa, se for obtido um resultado inferior a algum dos limiares analíticos, limite de deteção ou quantificação, este deve ser indicado como inferior ao valor desse limite, por exemplo, inferior a 0,5 ng/L. No caso de o resultado ser superior à concentração da solução padrão de maior concentração, este deve ser indicado como superior a esse valor, por exemplo, superior a 10,0 ng/L [24].

### 2.5.10. Incerteza

A incerteza de uma medição é um intervalo, associado a um resultado, que expressa a gama de valores que podem ser atribuídos a um resultado. Este é um parâmetro que confere confiança e fiabilidade a um método analítico [22, 26].

A base para a determinação deste parâmetro consiste em conhecer todas as fontes de incerteza que afetam uma medição, estimando o valor de cada uma, associando-as para se obter um valor de incerteza combinada [27, 28].

No caso da determinação de uma concentração numa amostra é necessário considerar diversas fontes de incerteza que contribuem para o cálculo da incerteza expandida, tais como [29]:

- Incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração;
- Incerteza associada à preparação dos padrões;
- Incerteza associada à precisão do método de ensaio.

#### 2.5.10.1. Incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração

A incerteza associada à concentração da amostra resulta da incerteza associada à interpolação feita na reta de calibração pelo método dos Mínimos Quadrados, sendo determinada através da equação **2.25** [29]:

$$u(C) = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{Y}_0 - \bar{Y})^2}{b^2 * \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.25)$$

sendo:

$S_{y/x}$  – Desvio-padrão residual da curva de calibração;

$b$  – Declive da reta de calibração;

$N$  – Número de padrões utilizados para traçar a curva de calibração;

$n$  – número de réplicas da amostra;

$\bar{Y}_0$  – Média dos sinais emitidos pelo equipamento para os replicados da amostra;

$\bar{Y}$  – Média dos sinais emitidos pelo equipamento para os padrões de calibração;

$x_i$  – Concentração dos padrões de calibração;

$\bar{x}$  – Média das concentrações dos padrões de calibração.

#### 2.5.10.2. Incerteza associada à preparação dos padrões

A obtenção de uma curva de calibração implica a preparação de diferentes soluções padrão do analito em questão. Assim, para determinar a incerteza associada à preparação dos padrões é necessário considerar a incerteza associada à preparação de cada padrão individualmente, sendo dada pela equação **2.26** [29]:

$$u(\text{Padrões}) = \sqrt{u(C1)^2 + u(C2)^2 + u(C3)^2 + \dots + u(Ci)^2} \quad (2.26)$$

Para determinar a incerteza associada à concentração de cada padrão é necessário fazer um levantamento prévio de todas as grandezas que contribuem para este parâmetro [24].

### 2.5.10.3. Incerteza associada à precisão do método de ensaio

Para determinar a incerteza associada à variabilidade de um método de ensaio é necessário optar por um estudo da precisão intermédia ou da repetibilidade, podendo esse estudo ser realizado através de padrões de controlo ou de ensaios em replicado. Para ambos os casos esta incerteza é calculada através da equação **2.27** [29]:

$$u(\text{precisão}) = \frac{S_n}{\sqrt{n}} \quad (2.27)$$

sendo:

$S_n$  – Desvio-padrão associado aos resultados;

$n$  – Número de réplicas analisadas.

### 2.5.10.4. Incerteza combinada

A incerteza combinada integra todas as fontes de incerteza, sendo dada pela equação **2.28** [29]:

$$u_c(C) = \sqrt{[u(C)]^2 + [u(\text{Padrões})]^2 + [u(\text{precisão})]^2} \quad (2.28)$$

### 2.5.10.5. Incerteza expandida

A incerteza final que é apresentada num resultado é denominada de incerteza expandida,  $U$ , sendo obtida através do produto da incerteza padrão combinada e o fator de expansão,  $k$ , de valor igual a 2, para uma confiança de 95%, como é demonstrado na equação **2.29** [29]:

$$U(C) = k \times u_c(C) = 2 \times u_c(C) \quad (2.29)$$



## ***Capítulo 3***

---

### ***Materiais e Métodos***

### 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão enunciados os procedimentos utilizados na preparação de todas as soluções utilizadas neste trabalho. Para além disso, também serão descritas as condições de trabalho da microextração em fase sólida, bem como do cromatógrafo e do detetor de captura de eletrões.

#### 3.1. Preparação de soluções

Para validar a determinação de 2,4,6-TCA em rolhas por HS-SPME-GC-ECD, foi necessário preparar diversas soluções a serem utilizadas em cada ensaio, sendo elas:

- Solução de etanol 12% (v/v);
- Amostras;
- Solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L);
- Soluções de 2,4,6-TCA (1 mg/L e 1 µg/L);
- Soluções padrão de 2,4,6-TCA.

##### 3.1.1. Solução de etanol 12% (v/v)

As soluções de etanol 12% (v/v) foram preparadas em bidões de 10 e 20 litros. Como não se trata de uma preparação de uma solução com concentração rigorosa, utilizou-se um recipiente de plástico para medir o volume de etanol a introduzir nos bidões. Partindo de etanol absoluto (P.A., AGA), mediram-se 1,2 e 2,4 litros para os bidões de 10 e 20 litros, respetivamente. De seguida, perfazem-se os bidões com água desionizada até se atingir o volume total.

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

##### 3.1.2. Preparação de amostras

As amostras foram preparadas de acordo com a norma ISO 20752:2014 [15]. Assim, introduz-se o número de rolhas correspondente ao calibre em análise para um frasco de maceração de 500 ou 1000 mL. Após a introdução das rolhas, preenche-se o resto do frasco de maceração com solução de etanol 12% (v/v) até as rolhas estarem totalmente submersas. Por fim, deixa-se o frasco em repouso à temperatura ambiente durante (24 ± 2) horas. No **Anexo B** encontra-se referido o número de rolhas utilizadas por macerado, dependendo do calibre do lote de rolhas em análise [15].

A quantidade de macerados preparados por lote depende do número de rolhas que formam o lote, sendo sempre preparados no mínimo dois macerados por lote. Cada lote é

analisado quando é recebido pela empresa como pré-lote e como lote final, com exceção das rolhas *bartop*, que só são analisadas como pré-lote.

### 3.1.3. Solução de 2,3,6-tricloroanisol (10 µg/L)

A solução de 2,3,6-TCA de concentração 10 µg/L é utilizada como padrão interno no método de análise por cromatografia em fase gasosa. Esta solução é preparada a partir de uma solução de compra de 2,3,6-TCA de concentração 10 mg/L em ciclohexano (P.A., Dr. Ehrenstorfer), estando o exemplo de cálculo do volume a utilizar da solução comercial de 2,3,6-TCA no **Anexo A.2**.

Assim, começou-se por encher praticamente a totalidade de um balão volumétrico de 100,00 mL com solução de etanol 12% (v/v). De seguida, utilizou-se uma micropipeta para introduzir 100 µL da solução de compra de 2,3,6-TCA de concentração 10 mg/L no balão volumétrico. Por fim, perfez-se o volume do balão com solução de etanol 12% (v/v).

### 3.1.4. Soluções de 2,4,6-tricloroanisol (1 mg/L e 1 µg/L)

A solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L foi preparada a partir de uma solução de compra de 2,4,6-TCA de concentração 100 mg/L em metanol (P.A., Sigma-Aldrich). O exemplo de cálculo do volume a utilizar da solução comercial de 2,4,6-TCA encontra-se no **Anexo A.3**.

Inicialmente, encheu-se quase na totalidade um balão volumétrico de 100,00 mL com solução de etanol 12% (v/v). De seguida, transferiu-se a ampola com 1 mL da solução comercial de 2,4,6-TCA de concentração 100 mg/L para o balão volumétrico. Por fim, perfez-se o volume do balão com solução de etanol 12% (v/v).

A solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 µg/L foi preparada a partir da solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L. O exemplo de cálculo do volume a utilizar da solução com 1 mg/L de 2,4,6-TCA encontra-se no **Anexo A.4**.

Após se encher quase na totalidade um balão volumétrico de 100,00 mL com solução de etanol 12% (v/v), pipetou-se 100 µL da solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L. Por fim, perfez-se o volume do balão com solução de etanol 12% (v/v).

### 3.1.5. Soluções padrão de 2,4,6-tricloroanisol

Para obter a curva de calibração foi necessário preparar uma série de soluções padrão de 2,4,6-TCA com concentrações de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 ng/L. Estas soluções padrão foram preparadas diretamente em *vials* de 20 mL que foram analisados no cromatógrafo, de forma a não haver desperdício de solução, como aconteceria se fossem preparadas em balões volumétricos de volumes superiores a 10,00 mL. Assim, começou-se por pipetar 10,00 mL (Gilson P10 mL ± 11 µL) de solução de etanol 12% (v/v). Adicionaram-se 3 g de NaCl em

cada *vial* para facilitar a extração do analito, pois este composto é um sal inorgânico que aumenta a força iônica da solução, diminuindo a solubilidade dos analitos na fase líquida e favorecendo a sua transferência da fase líquida para o *headspace*. De seguida pipetam-se os volumes correspondentes de 2,4,6-TCA (1 µg/L) para se obter a concentração pretendida para a solução padrão. Por fim adicionaram-se 20 µL da solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L). Como estas soluções padrão não são preparadas em balões volumétricos, as suas concentrações não são exatamente de 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 4,0, 5,0 e 10,0 ng/L. O exemplo de cálculo da concentração das soluções padrão de 2,4,6-TCA encontra-se no **Anexo A.5**.

### 3.2. Preparação do ensaio

Após se obter todas estas soluções foi necessário preparar os *vials* que serão utilizados no decorrer do ensaio.

Cada ensaio preparado contém *vials* compostos por diferentes soluções, sendo elas:

- Brancos de limpeza;
- Brancos com padrão interno;
- Soluções padrão de 2,4,6-TCA;
- Amostras.

Os brancos de limpeza foram apenas constituídos por 10 mL de solução de etanol 12% (v/v), servindo para limpar a fibra no início e no fim de cada ensaio e para verificar que esta solução não se encontra contaminada com 2,4,6-TCA ou 2,3,6-TCA.

Os brancos com padrão interno foram semelhantes aos brancos de limpeza, mas possuem cerca de 3 g de cloreto de sódio (NaCl), de acordo com a norma ISO 20752:2014 [15], e 20 µL de solução de 2,3,6-TCA (10 µg/L). Este branco é colocado em cada ensaio a seguir ao primeiro branco de limpeza, servindo para distinguir o pico de 2,3,6-TCA do pico de 2,4,6-TCA que aparecerá nas amostras e nas soluções padrão deste composto.

As soluções padrão de 2,4,6-TCA foram preparadas da mesma forma que o branco com padrão interno, mas são lhes adicionados volumes de 2,4,6-TCA (1 µg/L), de forma a se obter a concentração pretendida. Cada uma destas soluções padrão é preparada em triplicado quando se pretende traçar uma nova curva de calibração. Para além disso, as soluções padrão de 2,4,6-TCA com concentrações de 2,0 e 4,0 ng/L são utilizadas como soluções de controlo, sendo colocadas a cada 10 amostras e no fim de cada corrida, por forma a verificar que a curva de calibração continua válida quando estas são obtidas em dias anteriores ao ensaio a decorrer.

As amostras preparadas possuíam igualmente 3 g de NaCl e 20 µL de 2,3,6-TCA (10 µg/L). No entanto, em vez de possuírem 10,00 mL de solução de etanol 12% (v/v) possuíam 10,00 mL do macerado obtido previamente.

### 3.3. Microextração em fase sólida

A SPME é utilizada como método de preparação da amostra, servindo para extrair os compostos presentes na sua matriz. O equipamento utilizado (Supelco, *Triplus RSH AutoSampler*) possuía uma fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 µm.

A incubação é realizada com agitação a uma temperatura de 40 °C. Esta agitação é ativada por ciclos, estando 20 segundos ligada e 1 minuto desligada.

A fibra é introduzida até 40 mm dentro do *vial* a uma velocidade de 20 mm/s, sendo a adsorção realizada no *headspace*.

A extração tem um tempo de 15 minutos e a dessorção dura 2 minutos.

Estas condições são adaptadas da norma ISO 20752:2014 [15].

### 3.4. Cromatografia em fase gasosa com detetor de captura de elétrões

O cromatógrafo utilizado (ThermoUnicam, Trace 1300 Series GC) é acoplado a um detetor de captura de elétrões.

O método de quantificação foi o método do padrão interno. Assim, o sinal instrumental vem expresso pelo quociente entre a área do pico de 2,4,6-TCA e a área do pico de 2,3,6-TCA. As concentrações obtidas eram expressas em ng/L. Este método de análise consiste em adicionar uma quantidade conhecida de um composto, neste caso o 2,3,6-TCA, a todas as amostras e soluções padrão. O objetivo deste método é eliminar possíveis variações no sinal do equipamento devido a alterações nas condições de análise. Neste caso, a concentração de padrão interno em cada *vial* foi de 20 ng/L.

A coluna capilar tem 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de 0,25 µm. Esta coluna (TG-5MS) tem uma fase estacionária com 5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano.

O forno do cromatógrafo utiliza um programa de temperaturas. A temperatura inicial é de 50 °C, permanecendo 2 minutos a esta temperatura. A primeira rampa de temperaturas permitia atingir os 160 °C, a uma velocidade de 10 °C/min, permanecendo 1 minuto a esta temperatura. De seguida, a temperatura aumentou até aos 260 °C, a uma velocidade de 50 °C/min, permanecendo a esta temperatura durante 2 minutos.

O injetor estava a uma temperatura de 250 °C. O gás de arraste foi Hélio com um caudal 1 mL/min. A injeção foi realizada em modo *splitless* durante 2 minutos, com um caudal de *split* de 15 mL/min.

O ECD estava a uma temperatura de 280 °C. O gás de make-up foi Azoto, com um caudal de 20 mL/min.

O tempo total da corrida foi de 38,5 minutos.

Estas condições são adaptadas da norma ISO 20752:2014 [15].

## ***Capítulo 4***

---

### ***Resultados e Discussão***

## 4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos para a validação do método de análise de 2,4,6-TCA. Para além dos parâmetros de validação também serão apresentadas diversas cartas de controlo efetuadas, bem como o cálculo da incerteza do método.

Na implementação deste método de análise não foram otimizados os parâmetros associados à SPME e ao cromatógrafo, sendo adaptados da norma ISO 20752:2014 [15].

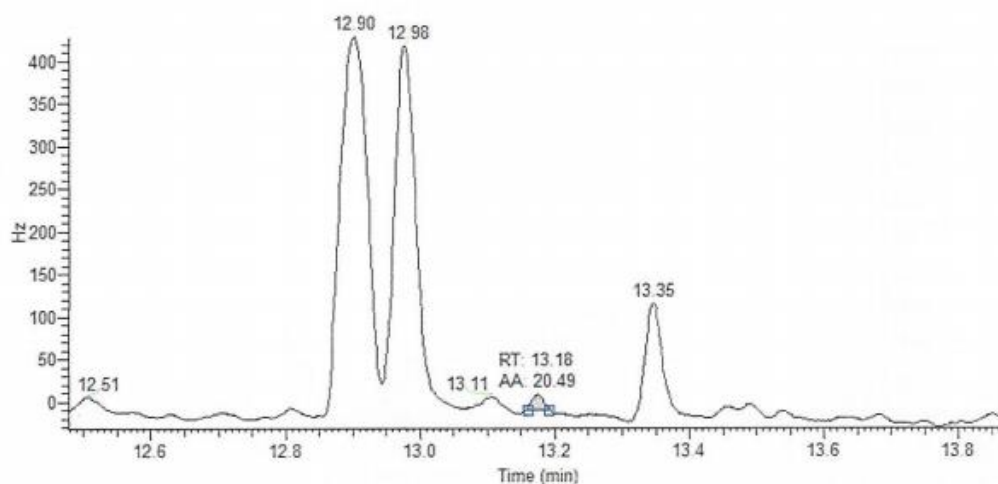
Antes da implementação deste método de análise, a Symington subcontractava outra empresa para realização da análise de 2,4,6-TCA nas rolhas. Assim sendo, também será apresentada uma análise dos custos associados ao equipamento e à preparação dos ensaios.

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

Como não foi realizada uma otimização das condições de trabalho da SPME e de separação do cromatógrafo, o primeiro passo na análise de um cromatograma é a identificação do tempo de retenção do analito. Neste caso, como se trata de uma análise pelo método do padrão interno, é necessário identificar não só o tempo de retenção do analito, 2,4,6-TCA, mas também o tempo de retenção do padrão interno, 2,3,6-TCA.

Para determinar estes dois tempos de retenção analisaram-se os cromatogramas de um branco de limpeza, um branco com padrão interno e das soluções padrão de 2,4,6-TCA que compõem a curva de calibração.

Nas **Figuras 4.1 a 4.7**, estão representados excertos dos cromatogramas de um branco e das soluções padrão com concentração de 2,4,6-TCA de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 ng/L, respetivamente, com concentração de padrão-interno 2,3,6-TCA de 20 ng/L.



**Figura 4.1** - Excerto de um cromatograma de um branco.

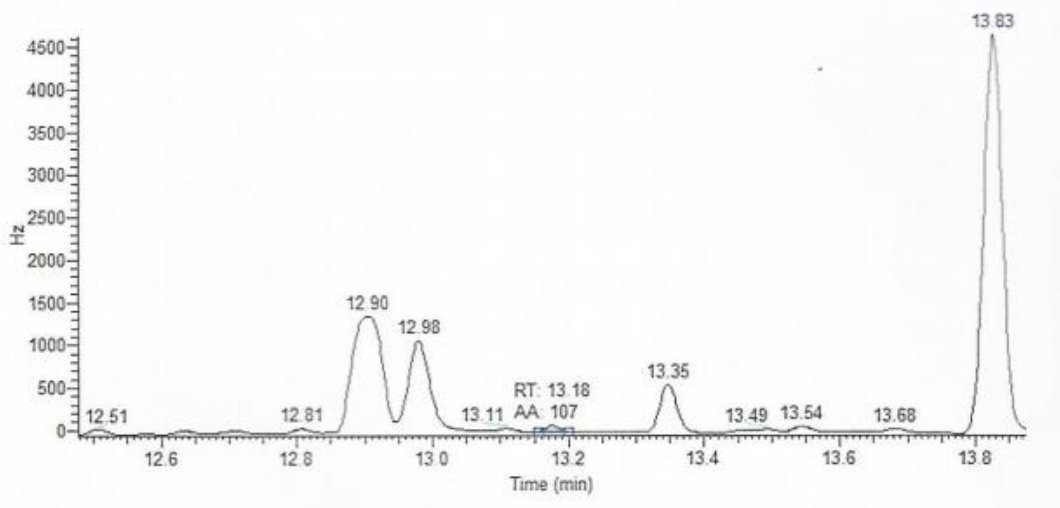


Figura 4.2 - Excerto de um cromatograma de um branco com solução de padrão-interno 2,3,6-TCA.

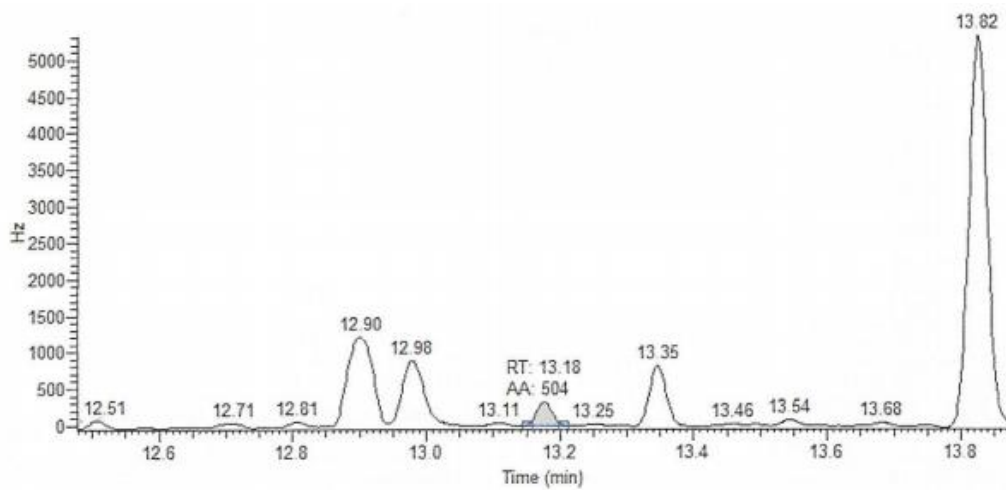


Figura 4.3 - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

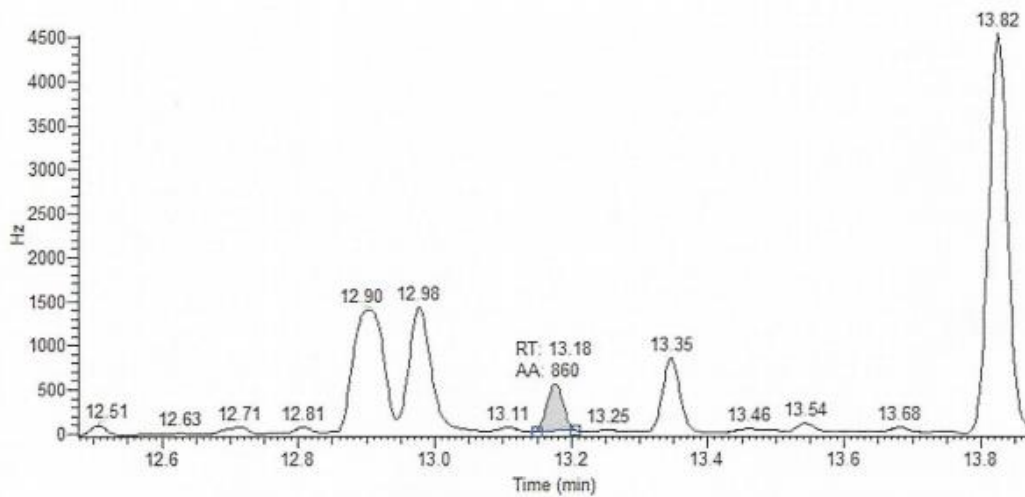


Figura 4.4 - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 1,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

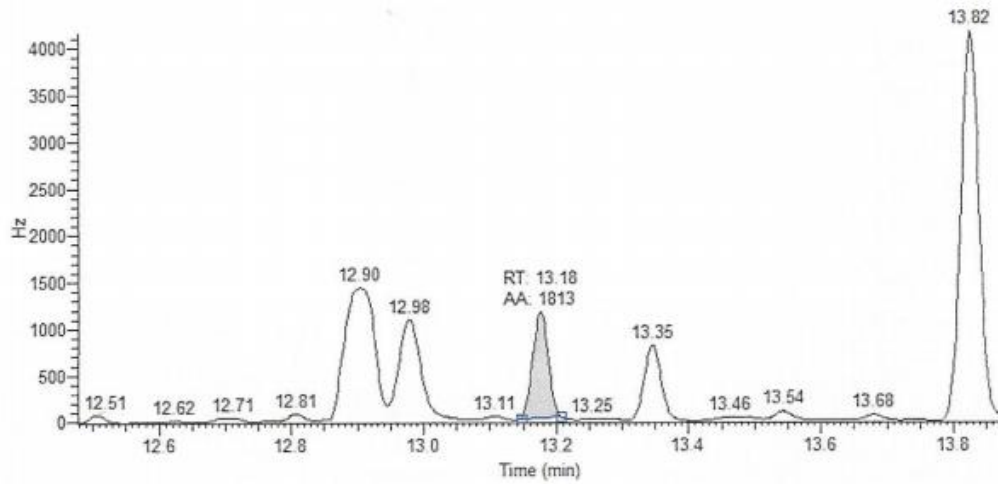


Figura 4.5 - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 2,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

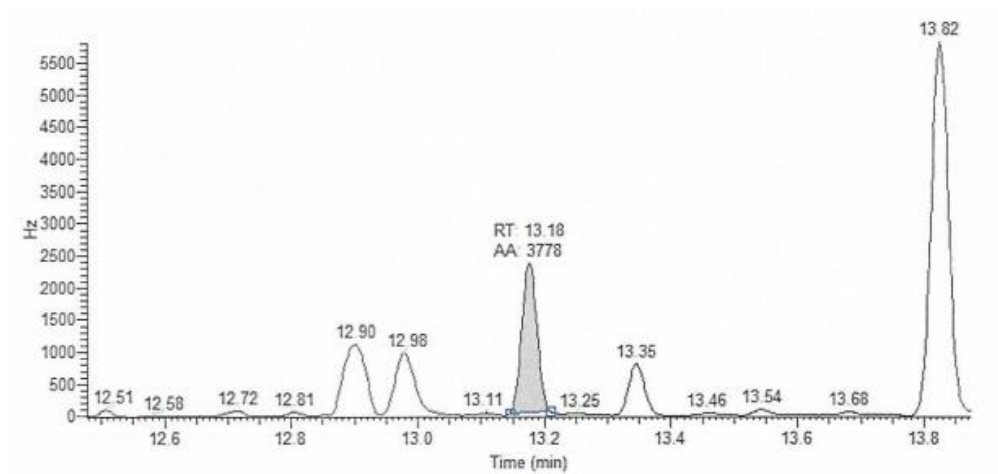


Figura 4.6 - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 5,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

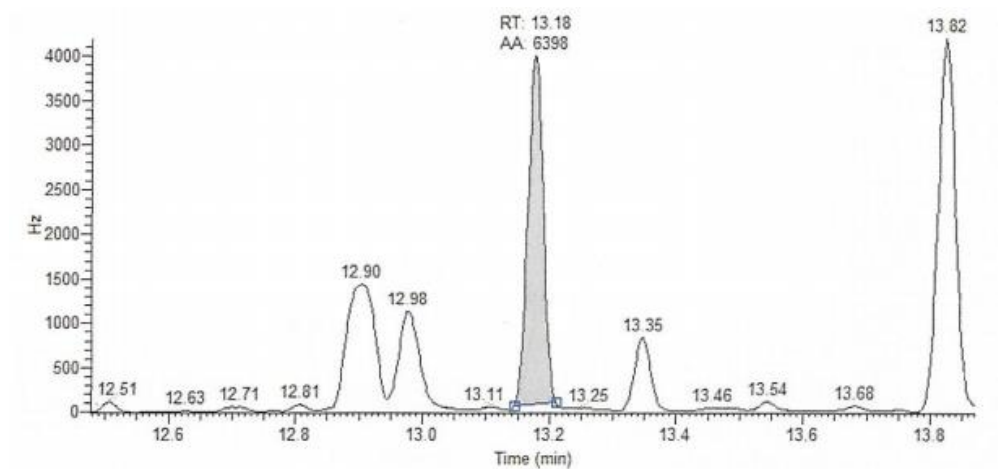


Figura 4.7 - Excerto de um cromatograma de uma solução padrão com 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Como se pode observar nas **Figuras 4.1 a 4.7**, o pico de 2,4,6-TCA aparece aos 13,18 minutos. Pode-se confirmar que este é o tempo de retenção deste composto, pois no cromatograma do branco de limpeza e do branco com padrão-interno (**Figuras 4.1 e 4.2**)

apenas aparece um pico residual, com valor de área correspondente ao ruído da linha de base. Analisando os restantes cromatogramas, verifica-se que as áreas do pico de 2,4,6-TCA aumentam gradualmente, tal como era esperado, pois tratam-se de cromatogramas de soluções padrão de concentração crescente do analito.

O pico de 2,3,6-TCA aparece aos 13,82 min, aproximadamente. Pode-se confirmar que este é o tempo de retenção deste composto, pois no cromatograma do branco (**Figura 4.1**) não aparece nenhum pico, ou seja, verifica-se que esta amostra não possui 2,3,6-TCA, tal como era esperado. Nas restantes figuras verifica-se que as áreas dos picos são semelhantes, tendo um coeficiente de variação inferior a 20%, pois este composto é adicionado em quantidades iguais a cada solução padrão de 2,4,6-TCA.

## 4.2. *Carryover*

Para verificar que a fibra não arrastava 2,4,6-TCA dum as amostras para as outras, realizou-se um teste em que foram preparados dez ensaios em branco e analisados no final de uma corrida. Este teste é denominado de *carryover*.

Assim, verificou-se que todos os resultados obtidos foram inferiores ao limite de deteção, comprovando que não ocorre arrastamento de 2,4,6-TCA.

## 4.3. **Curvas de Calibração**

Para traçar uma curva de calibração prepararam-se brancos e soluções padrão com concentrações de 2,4,6-TCA de 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 ng/L, preparados e analisados em triplicado.

Apesar de se dever traçar uma curva de calibração para cada corrida, optou-se por se traçar uma nova curva de calibração no início de cada mês.

Nas **Figuras 4.8 a 4.13**, encontram-se representadas as seis curvas de calibração traçadas ao longo do tempo de validação do método, sendo que no **Anexo C** se encontram os resultados obtidos para cada curva de calibração.

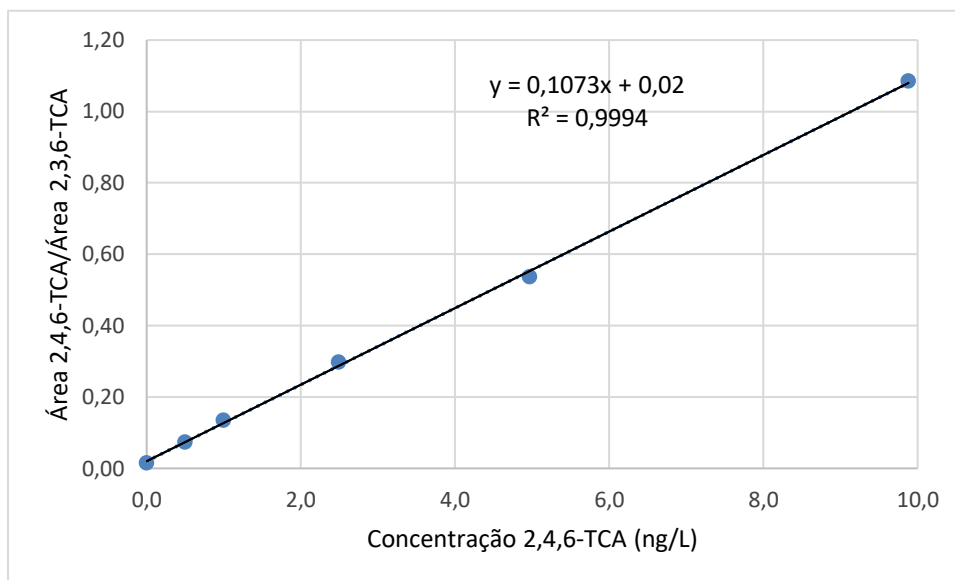


Figura 4.8 - Curva de calibração A.

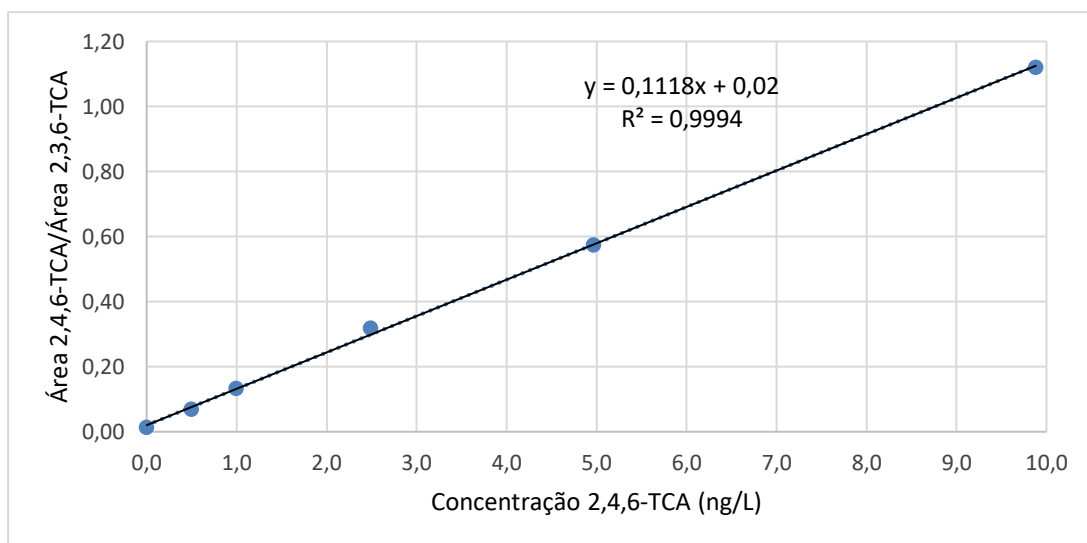


Figura 4.9 - Curva de calibração B.

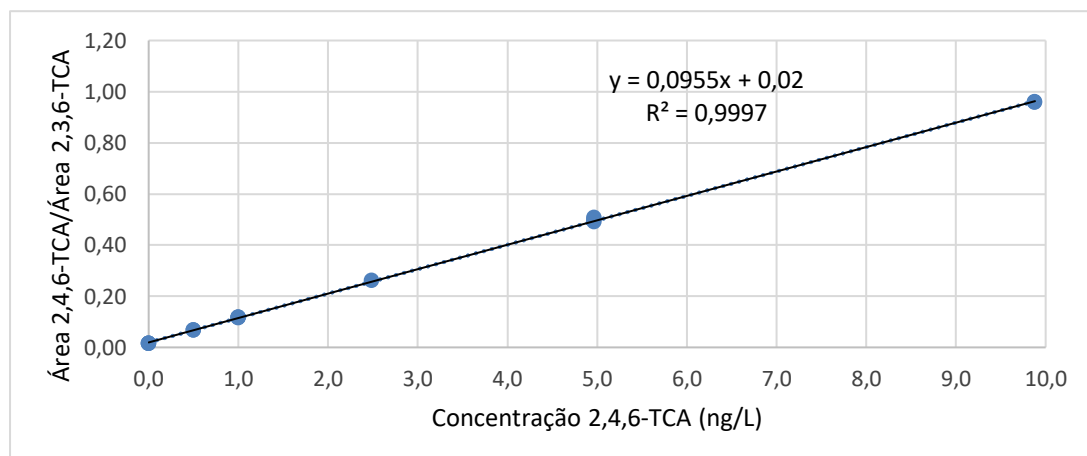


Figura 4.10 - Curva de calibração C.

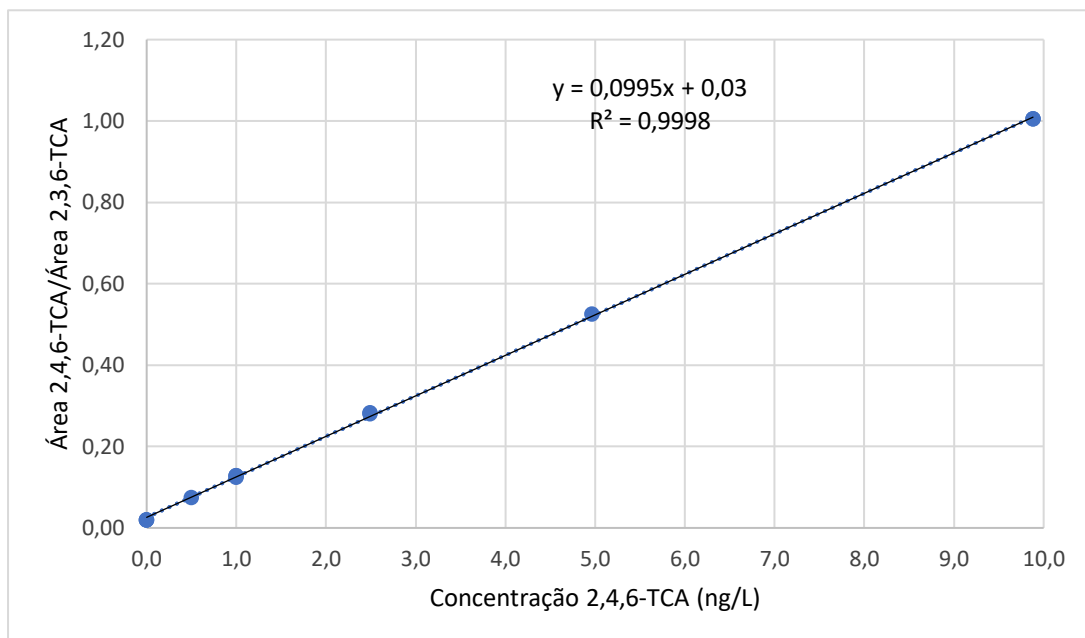


Figura 4.11 - Curva de calibração D.

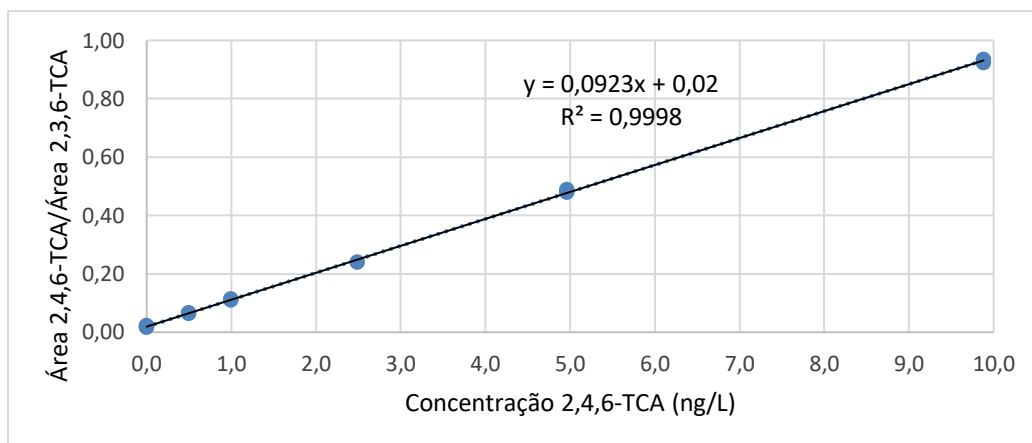


Figura 4.12 - Curva de calibração E.

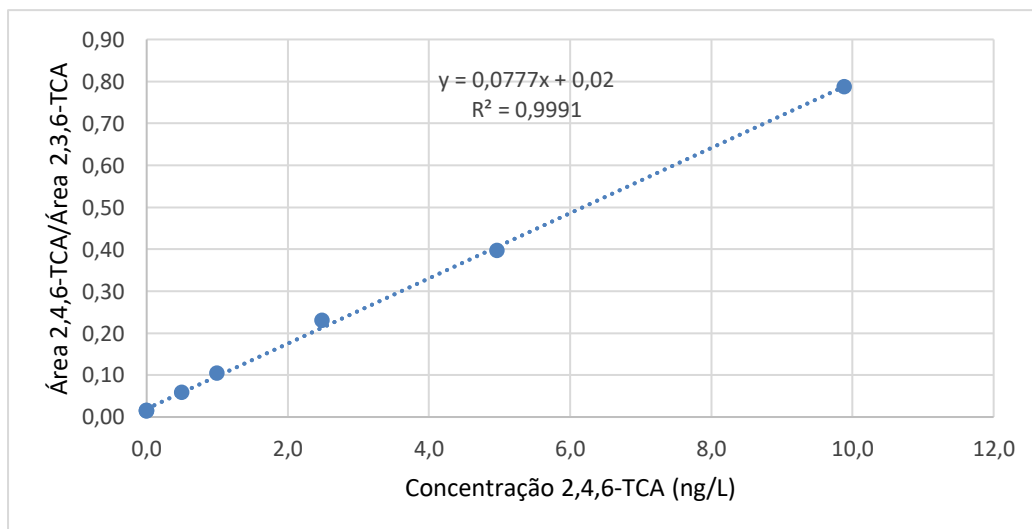


Figura 4.13 - Curva de calibração F.

Pela análise das **Figuras 4.8 a 4.13**, pode-se observar que todos os coeficientes de determinação,  $r^2$ , são superiores a 0,999, o que permite concluir que o critério de aceitação para uma curva de calibração é verificado ( $r$  superior a 0,995).

Para além disso, os valores dos declives obtidos são todos semelhantes, cerca de 0,1, com exceção da última curva de calibração que possui um declive de 0,0777.

Relativamente às ordenadas na origem, os valores obtidos também são todos semelhantes, cerca de 0,02.

De salientar que apenas a partir da curva C se começou a preparar o branco e as soluções padrão de 2,4,6-TCA em triplicado.

#### 4.4. Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de deteção e de quantificação são calculados com base nas curvas de calibração obtidas. Assim, o LOD e o LOQ foram determinados cada vez que se traçou uma curva de calibração. O exemplo de cálculo do LOD e do LOQ encontra-se no **Anexo A.6**.

Na **Tabela 4.1** encontram-se os limites de deteção e de quantificação associados a cada curva de calibração.

**Tabela 4.1** - Limites de deteção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), em ng/L, para cada curva de calibração.

Curva de calibração	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
A	0,3	1,0
B	0,3	1,0
C	0,2	0,6
D	0,2	0,6
E	0,2	0,6
F	0,4	1,2

Observando a **Tabela 4.1**, verifica-se a diminuição significativa do LOQ a partir da curva C. Tal facto coincide com a altura em que se passou a preparar as soluções integrantes das curvas de calibração em triplicado, mostrando que essa alteração no método provocou a diminuição dos limiares analíticos. Esta diminuição era esperada, pois com mais pontos a representar a mesma concentração de 2,4,6-TCA, maior é a certeza estatística de que a reta de calibração obtida corresponde ao aumento linear do sinal do equipamento em função da concentração de 2,4,6-TCA.

De realçar que na curva de F os limites de deteção e de quantificação voltam a aumentar.

#### 4.5. Gama de Trabalho

Para avaliar a gama de trabalho prepararam-se dez soluções padrão independentes com 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA e dez soluções padrão independentes com 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA, pois estas concentrações correspondem aos limites, inferior e superior, da gama de trabalho adotada.

O objetivo foi verificar se o coeficiente de variação para cada uma destas concentrações era inferior a 10%, por forma a garantir que não havia flutuações significativas nos sinais obtidos. O exemplo de cálculo do coeficiente de variação encontra-se no **Anexo A.7**.

Nas **Tabelas 4.2 e 4.3** encontram-se os resultados obtidos para as dez repetições das soluções padrão com 0,5 e 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA, respetivamente.

**Tabela 4.2** - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

Solução padrão	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)
0,5 A	1455,23	17764,49	0,0819	0,553
0,5 B	1288,45	17608,57	0,0732	0,474
0,5 C	1351,90	17633,43	0,0767	0,506
0,5 D	1511,69	19857,50	0,0761	0,501
0,5 E	1425,83	18505,27	0,0770	0,509
0,5 F	1362,15	17977,05	0,0758	0,498
0,5 G	1579,85	20991,62	0,0753	0,493
0,5 H	1446,81	18746,33	0,0772	0,510
0,5 I	1379,60	18372,26	0,0751	0,492
0,5 J	1487,40	19706,93	0,0755	0,495

**Tabela 4.3** - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Solução padrão	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)
10,0 A	18697,44	17740,40	1,05	9,24
10,0 B	19274,62	17192,46	1,12	9,85
10,0 C	22623,70	20010,50	1,13	9,93
10,0 D	21339,03	19767,86	1,08	9,47
10,0 E	19776,27	19128,88	1,03	9,07
10,0 F	18891,58	16710,12	1,13	9,93
10,0 G	20676,93	18358,52	1,13	9,89
10,0 H	23136,46	20555,72	1,13	9,89
10,0 I	20683,95	19282,35	1,07	9,41
10,0 J	19917,02	19777,76	1,01	8,83

Os coeficientes de variação obtidos para as soluções padrão de 0,5 e 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA foram de 4,0 e de 4,3 %, respetivamente. Assim, ficou confirmado que a gama de trabalho utilizada é viável, pois ambos os coeficientes de variação são inferiores a 10%.

## 4.6. Precisão

Para avaliar a precisão do método estudou-se a repetibilidade e a precisão intermédia.

No caso da repetibilidade, avaliou-se a capacidade do método em responder de forma semelhante para réplicas de amostras ou soluções padrão analisadas de forma consecutiva.

Relativamente à precisão intermédia, o seu objectivo foi avaliar a capacidade do método em responder de forma semelhante para réplicas de amostras ou soluções padrão analisadas em dias diferentes.

### 4.6.1. Repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade do método prepararam-se dez soluções padrão independentes com 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA e dez soluções padrão independentes com 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA. Foram utilizadas estas concentrações por forma a avaliar a resposta do método para valores de baixa e de elevada concentração de 2,4,6-TCA.

Com os resultados obtidos calculou-se o coeficiente de variação associado a cada um dos ensaios de repetibilidade, esperando-se obter valores inferiores a 10%, por forma a confirmar que o método é preciso.

Nas **Tabelas 4.4 e 4.5** encontram-se os resultados obtidos para as dez soluções padrão com 0,5 e 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA, respetivamente.

**Tabela 4.4** - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

<b>Solução padrão</b>	<b>Área 2,4,6-TCA (U.A.)</b>	<b>Área 2,3,6-TCA (U.A.)</b>	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	<b>Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)</b>
<b>0,5 A</b>	1502,86	18676,56	0,0805	0,563
<b>0,5 B</b>	1483,02	19988,81	0,0742	0,505
<b>0,5 C</b>	1426,23	19651,29	0,0726	0,490
<b>0,5 D</b>	1661,98	19167,66	0,0867	0,622
<b>0,5 E</b>	1418,63	18612,27	0,0762	0,524
<b>0,5 F</b>	1646,57	19583,36	0,0841	0,597
<b>0,5 G</b>	1544,14	19956,45	0,0774	0,535
<b>0,5 H</b>	1547,81	19902,72	0,0778	0,538
<b>0,5 I</b>	1612,46	20014,05	0,0806	0,564
<b>0,5 J</b>	1523,07	19576,99	0,0778	0,539

**Tabela 4.5** - Resultados obtidos para as dez repetições da solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

<b>Solução padrão</b>	<b>Área 2,4,6-TCA (U.A.)</b>	<b>Área 2,3,6-TCA (U.A.)</b>	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	<b>Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)</b>
<b>10,0 A</b>	19035,52	16951,41	1,12	10,3
<b>10,0 B</b>	20356,56	17704,56	1,15	10,5
<b>10,0 C</b>	20458,72	18375,59	1,11	10,2
<b>10,0 D</b>	20012,60	19310,45	1,04	9,48
<b>10,0 E</b>	20346,22	17480,50	1,16	10,7
<b>10,0 F</b>	20392,91	18460,63	1,11	10,1

<b>10,0 G</b>	19992,81	17897,14	1,12	10,2
<b>10,0 H</b>	20676,27	18432,26	1,12	10,3
<b>10,0 I</b>	20452,00	17800,87	1,15	10,5
<b>10,0 J</b>	20745,86	18508,54	1,12	9,84

Os coeficientes de variação obtidos para as soluções padrão de 0,5 e 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA foram de 7,0 e de 3,3 %, respetivamente. Assim, pode-se afirmar que o método é preciso para valores de baixa e elevada concentração de 2,4,6-TCA, pois ambos os coeficientes de variação são inferiores a 10%.

#### 4.6.2. Precisão Intermédia

Para o estudo da precisão intermédia utilizaram-se os resultados das soluções padrão de controlo com 2,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Utilizaram-se os resultados de dez ensaios destas duas soluções padrão, pois são analisadas sempre que se faz um ensaio, ou seja não são analisadas consecutivamente, servindo por isso para avaliar a precisão intermédia.

Nas **Tabelas 4.6** e **4.7** encontram-se as concentrações de 2,4,6-TCA obtidas para as soluções padrão de controlo de 2,0 e 4,0 ng/L, respetivamente. O exemplo de cálculo do desvio-padrão da precisão intermédia encontra-se no **Anexo A.8**.

**Tabela 4.6** - Concentrações obtidas, em ng/L, para as soluções padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

<b>Data</b>	<b>Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)</b>
01/02/2018	2,3
06/02/2018	2,0
15/02/2018	2,2
20/02/2018	2,2
27/02/2018	2,0
14/03/2018	2,1
22/03/2018	2,2
28/03/2018	2,3
06/04/2018	2,0
12/04/2018	2,0

**Tabela 4.7** - Concentrações obtidas, em ng/L, para as soluções padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

<b>Data</b>	<b>Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)</b>
01/02/2018	4,2
06/02/2018	3,7
15/02/2018	4,0
07/03/2018	4,0
14/03/2018	4,1
28/03/2018	3,3
06/04/2018	3,8
12/04/2018	3,6
19/04/2018	4,1
19/04/2018	4,0

O desvio-padrão da precisão intermédia obtido foi de 0,2 ng/L, sendo este o erro associado a cada réplica de uma amostra ou solução padrão que seja analisada em dias diferentes.

Também foram calculados os coeficientes de variação para as solução-padrão de controlo de 2,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA, sendo de 5,8 e 6,8%, respetivamente. Ambos os coeficientes de variação são inferiores a 10%, logo o método é preciso.

## 4.7. Exatidão

Para avaliar a exatidão do método recorreu-se a ensaios de recuperação e a ensaios interlaboratoriais.

### 4.7.1. Ensaio de Recuperação

Para avaliar a exatidão do método através de ensaios de recuperação, adicionaram-se diferentes volumes da solução com 1 µg/L de 2,4,6-TCA a diferentes amostras. Assim, no ensaio analisou-se cada amostra sem a fortificação com 2,4,6-TCA e, de seguida, a mesma amostra fortificada com 2,4,6-TCA. As amostras foram fortificadas com volumes da solução com 1 µg/L de 2,4,6-TCA, por forma a se obter soluções com 0,5, 2,5 e 5,0 ng/L.

Para considerar que o método é exato, as taxas de recuperação devem estar situadas entre 80 e 120% para as diferentes concentrações.

Na **Tabela 4.8** encontram-se os resultados obtidos para os ensaios de recuperação de três amostras diferentes. O exemplo de cálculo das percentagens de recuperação encontra-se no **Anexo A.9**.

**Tabela 4.8** - Valores das concentrações obtidas, em ng/L, para as diferentes amostras, bem como das taxas de recuperação, em percentagem.

Ensaio	Concentração inicial 2,4,6-TCA (ng/L)	Concentração final 2,4,6-TCA (ng/L)	Taxa Recuperação (%)
A	0,121	0,587	93,4
		0,654	106,8
		0,664	108,8
B	0,197	2,898	108,5
		2,889	108,2
		2,870	107,4
C	0,076	5,319	105,6
		5,276	104,7
		5,243	104,1

Através da observação da **Tabela 4.8**, observa-se que as taxas de recuperação obtidas se encontram entre 93 e 109%, para as três concentrações estudadas. Estes resultados encontram-se dentro do intervalo de aceitação (80-120%), logo, considera-se que o método permite obter resultados exatos.

De salientar que os resultados das amostras iniciais se encontram abaixo do limite de quantificação. No entanto, consideraram-se estes valores porque eram necessários para calcular as taxas de recuperação.

#### 4.7.2. Ensaio Interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais foram realizados em conjunto com outros laboratórios, por forma a validar a exatidão do método.

Assim, foram preparadas soluções padrão com 1,5, 3,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA e distribuídas pelos participantes.

Para verificar o êxito deste método foi necessário calcular o *z-score* para cada ensaio, devendo este valor ser inferior a 2 para o resultado ser satisfatório. O exemplo de cálculo do *z-score* encontra-se no **Anexo A.10**.

Na **Tabela 4.9** encontram-se os resultados obtidos por cada laboratório para cada solução padrão analisada, bem como o *z-score* obtido em cada ensaio.

**Tabela 4.9** - Resultados de cada laboratório, em ng/L, bem como o z-score obtido.

Concentração solução padrão (ng/L)	Symington (ng/L)	Laboratório A (ng/L)	Laboratório B (ng/L)	Z-score
1,5	1,5	1,9	< 0,5	0
3,0	2,9	2,4	2,3	0,4
4,0	3,6	3,3	4,5	0,8

Como se pode verificar pela observação da **Tabela 4.9**, os z-score obtidos são de 0, 0,4 e 0,8, sendo todos eles inferiores a 2. Assim, este método teve um resultado aceitável nos três ensaios interlaboratoriais realizados.

## 4.8. Cartas de Controlo

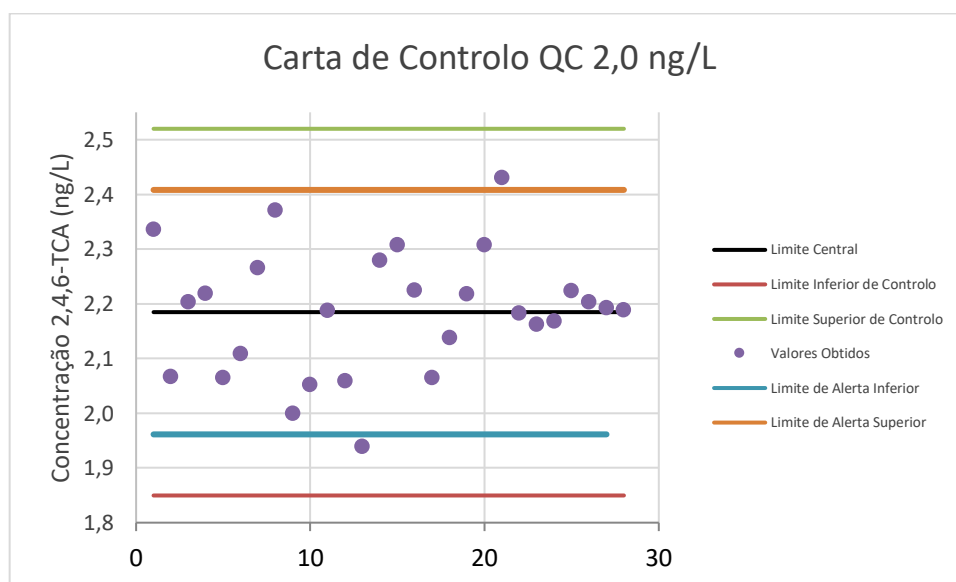
Internamente optou-se por traçar cartas de controlo de indivíduos para as soluções padrão de controlo com 2,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA e para os declives das retas de calibração.

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 A.11**.

### 4.8.1. Solução padrão de Controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-tricloroanisol

A carta de controlo de indivíduos relativa à solução padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA foi construída a partir dos resultados obtidos quando esta solução foi colocada no ensaio para verificar que a curva de calibração continuava válida.

Na **Figura 4.14** encontra-se a carta de controlo obtida para a solução padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

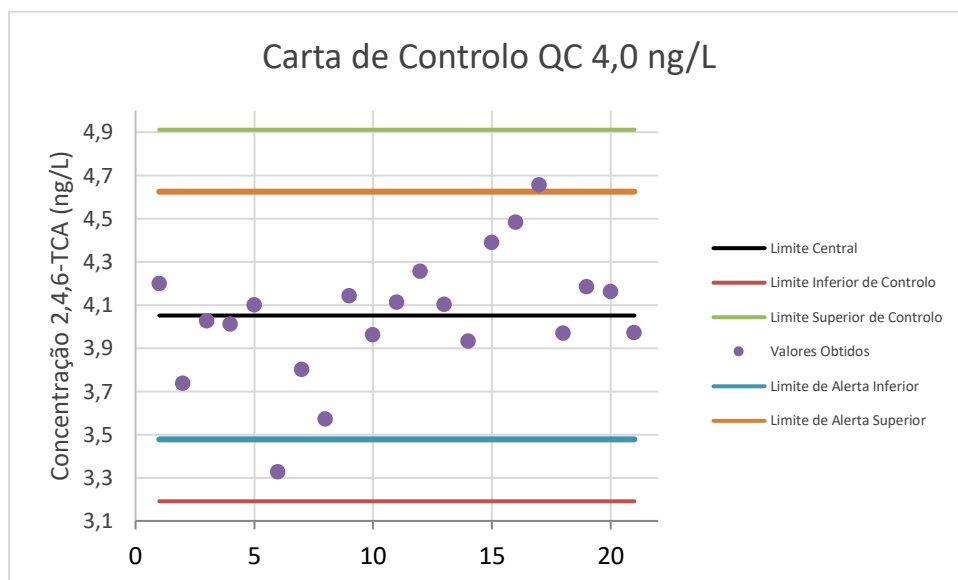
**Figura 4.14** - Carta de controlo para a solução padrão com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Analisando a **Figura 4.14**, pode-se observar que todos os pontos se encontram dentro dos limites de controlo.

#### 4.8.2. Solução padrão de Controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-tricloroanisol

A carta de controlo de indivíduos relativa à solução padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA foi construída a partir dos resultados obtidos quando esta solução foi colocada no ensaio para verificar que a curva de calibração continuava válida.

Na **Figura 4.15** encontra-se a carta de controlo obtida para a solução padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.



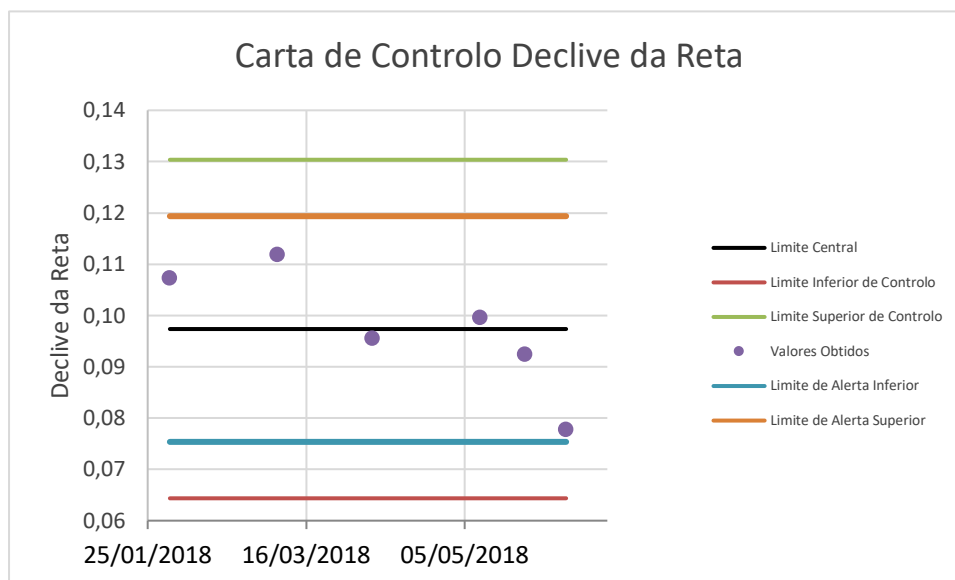
**Figura 4.15** - Carta de controlo para a solução padrão com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Analisando a **Figura 4.15**, pode-se observar que todos os pontos se encontram dentro dos limites de controlo.

#### 4.8.3. Declive da Reta de Calibração

A carta de controlo de indivíduos relativa ao declive da reta de calibração foi construída a partir dos declives da reta obtidos de cada curva de calibração.

Na **Figura 4.16** encontra-se a carta de controlo obtida para os declives da reta de calibração.



**Figura 4.16** - Carta de controllo para os declives das retas de calibração.

Analisando a **Figura 4.16**, pode-se observar que todos os pontos se encontram dentro dos limites de controllo.

#### 4.9. Incerteza do Resultado

A incerteza do resultado, ou incerteza expandida, foi determinada com base em todas as grandezas que fazem parte do ensaio. Assim, foi determinada a incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração ( $u(C)$ ), a incerteza associada à preparação das soluções padrão ( $U(\text{padrões})$ ), a incerteza associada à precisão do método ( $u(\text{precisão})$ ), a incerteza combinada ( $U_c(C)$ ) e a incerteza expandida ( $U(C)$ ). O exemplo de cálculo destas incertezas encontra-se no **Anexo A.12**.

Na **Tabela 4.10** encontram-se os resultados obtidos para cada tipo de incerteza e para cada curva de calibração.

**Tabela 4.10** - Resultados obtidos para cada tipo de incerteza, em ng/L, para cada curva de calibração obtida.

Curva de calibração	$u(C)$ (ng/L)	$U(\text{padrões})$ (ng/L)	$u(\text{precisão})$ (ng/L)	$U_c(C)$ (ng/L)	$U(C)$ (ng/L)
A	0,061	0,565	0,012	0,569	<b>1,138</b>
B	0,061	0,565	0,006	0,569	<b>1,138</b>
C	0,038	0,565	0,004	0,567	<b>1,134</b>
D	0,037	0,565	0,010	0,567	<b>1,134</b>
E	0,046	0,565	0,010	0,567	<b>1,134</b>
F	0,084	0,565	0,003	0,572	<b>1,144</b>

Como se pode verificar pela observação da **Tabela 4.10**, a incerteza expandida obtida foi de cerca de 1,1 ng/L, tratando-se de um valor elevado.

Como a incerteza obtida abrange toda a gama de trabalho do método, optou-se por determinar esta incerteza num intervalo mais curto da gama de trabalho. Assim, optou-se por calcular a incerteza até 2,5 ng/L. O valor obtido para a incerteza expandida neste intervalo da gama de trabalho foi de 0,3 ng/L.

Assim, pode-se considerar esta a incerteza do resultado para valores de amostras inferiores a 2,5 ng/L de 2,4,6-TCA. Um lote de rolhas pode então ser rejeitado com segurança, para valores inferiores a 2,5 ng/L.

#### 4.10. Análise de Custos

Para analisar o custo que cada ensaio tem para a empresa foi necessário avaliar os custos de cada material e reagente utilizado. De realçar que foram desprezados os custos associados à água desionizada, ao detergente de lavagem e às soluções de compra de 2,3,6-TCA e de 2,4,6-TCA por apresentarem custos por amostra inferiores a um cêntimo.

O exemplo de cálculo do custo associado à depreciação de equipamentos e consumíveis do cromatógrafo encontra-se no **Anexo A.13**.

Na **Tabela 4.11** encontram-se os custos associados a cada ensaio.

**Tabela 4.11** - Custos, em €, associados a cada material e reagente utilizado na realização de um ensaio.

Reagente/Material	Custo/Amostra (€)
Cloreto de sódio	0,02
Etanol absoluto	0,10
Pontas micropipeta	0,21
Tampas <i>vials</i>	0,25
Hélio	0,06
Azoto	0,03
Mão de obra	1,04
Depreciação de equipamentos	3,08
Consumíveis do cromatógrafo	0,20
Contrato de manutenção	0,48

No total, a empresa gasta cerca de 5,47 €/amostra. Anteriormente, a empresa pagava 23 €/amostra à empresa que subcontractava para realizar os ensaios. Sendo assim, a implementação deste método permite uma poupança de cerca de 17,53 €/amostra para a empresa.

# ***Capítulo 5***

---

## ***Conclusão***

## 5. Conclusão

Os principais objetivos desta tese de mestrado foram implementar o método de análise de 2,4,6-TCA por HS-SPME seguido de análise por GC-ECD para todos os calibres de rolhas e validar o método, garantindo que os resultados obtidos são precisos e exatos.

O primeiro passo consistiu na adaptação do método de preparação de amostra SPME em módulo HS, seguido pela análise cromatográfica do 2,4,6-TCA, baseando-se na norma ISO 20752:2014 – Rolhas – Determinação de 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) extraível, utilizando-se o 2,3,6-TCA como padrão interno.

Para a validação do método, garantiu-se que a gama de trabalho era adequada, determinaram-se os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ), a precisão (repetibilidade, precisão intermédia), a exatidão (ensaios de recuperação, ensaios interlaboratoriais), traçaram-se as cartas de controlo e determinou-se a incerteza do resultado.

Assim, a gama de trabalho utilizada foi de 0,5 a 10,0 ng/L; o limite de deteção foi de 0,2 ng/L; o limite de quantificação foi de 0,6 ng/L; os coeficientes de variação da repetibilidade foram de 7,0 e 3,3% para soluções padrão de 0,5 e 10,0 ng/L, respetivamente; o desvio-padrão da precisão intermédia foi de 0,2 ng/L e os coeficientes de variação foram de 5,8 e 6,8% para as soluções padrão de controlo de 2,0 e 4,0 ng/L, respetivamente; as taxas de recuperação obtidas foram entre 93 e 109%; os z-scores obtidos foram de 0, 0,4 e 0,8, sendo todos os resultados aceitáveis. Concluindo, todos os parâmetros deste método foram validados.

Os pontos das cartas de controlo das soluções padrão de controlo com 2,0 e 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA e dos declives das retas de calibração encontram-se dentro dos limites inferior e superior de controlo.

A incerteza do resultado foi calculada, sendo de 0,3 ng/L, permitindo assim que a empresa tenha segurança quando rejeitar um lote de rolhas por excesso de 2,4,6-TCA.

O valor estimado para cada análise de 2,4,6-TCA em rolhas foi de 5,47€. A implementação deste método na Symington permite uma poupança de cerca de 17,53 €/amostra para a empresa.

Concluindo, conseguiu-se alcançar o objetivo de comprovar que o método para determinação de 2,4,6-TCA em rolhas por HS-SPME-GC-ECD permite obter resultados exatos e precisos, tendo sido o método implementado na empresa e podendo vir a ser utilizado no futuro nas análises de rotina.

No futuro, poderá ser validado este método para água ou vinho, verificando se é necessário alterar algumas condições dos equipamentos.

# ***Referências Bibliográficas***

---

## Referências Bibliográficas

- [1] – Symington Family Estates – [www.symington.com](http://www.symington.com) (Consultado a 3 de Março de 2018)
- [2] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Cortiça – O que é?”. <https://www.apcor.pt/cortica/o-que-e/> (Consultado a 2 de Abril de 2018)
- [3] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Media Center – Estatísticas”. <https://www.apcor.pt/media-center/estatisticas/> (Consultado a 2 de Abril de 2018)
- [4] S. P. Silva, M. A. Sabino, E. M. Fernandes, V. M. Correlo, L. F. Boesel, R. L. Reis, 2005. *Cork: properties, capabilities and applications*. International Materials Reviews 2005 Vol. 50 Nº 6
- [5] Gomes, J., 2012. *Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por Brettanomyces/Dekkera*. Tese em Microbiologia Aplicada. Universidade Católica Portuguesa – Escola Superior de Biotecnologia
- [6] Fonseca, M., 2013. *2,4,6 – Tricloroanisol: validação do método de análise e estudos de adsorção e dessorção em rolhas de cortiça*. Dissertação de Mestrado em Enologia. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- [7] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Cortiça – Descortiçamento”. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/descorticamento/> (Consultado a 3 de Abril de 2018)
- [8] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Cortiça – Percurso Industrial”. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/> (Consultado a 3 de Abril de 2018)
- [9] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Cortiça – Rolhas Naturais”. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/rolhas-naturais/> (Consultado a 3 de Abril de 2018)
- [10] APCOR – Associação Portuguesa da Cortiça. “Cortiça – Rolhas Técnicas”. <https://www.apcor.pt/cortica/processo-de-transformacao/percurso-industrial/rolhas-tecnicas/> (Consultado a 3 de Abril de 2018)
- [11] Pimenta, M., 2009. *Migração de compostos voláteis através de diferentes vedantes e embalagem*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

- [12] *Cork taint in wine produced by 2,4,6-trichloroanisole (TCA)*. [www.winesignofindia.wordpress.com](http://www.winesignofindia.wordpress.com) (Consultado a 7 de Abril de 2018)
- [13] Faria, S., 2012. *Implementação e Validação de um Método para Determinação de Contaminantes em Vinho por Microextração em Fase Sólida E GC-MS/MS e sua Correlação com a Análise Sensorial*. Mestrado em Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- [14] Lopes, T., 2008. *Estudos de Migração do 2,4,6-tricloroanisol através de Vedantes*. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
- [15] ISO 20752:2014 – Cork stoppers – Determination of releasable 2,4,6–trichloroanisol (TCA)
- [16] Harris, D., 2012. *Análise Química Quantitativa*. 8ª Edição. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora Lda. ISBN 978-85-216-2042-6.
- [17] Skoog, D. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7ª Edição. Thomson Learning, Inc. USA, 1996.
- [18] Guia Relacre 13. *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Edição: Fevereiro de 2010. ISBN: 972-8574-02-9
- [19] ISO 8466-1:2016 - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function
- [20] Martins, A., 2016. *Implementação e validação de métodos analíticos*. Tese de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- [21] Brito N., Junior O., Polese L., Ribeiro M., 2003. *Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão*. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003
- [22] Eurachem Guide. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Second edition 2014.
- [23] Cardoso M., Nóbrega A., Vital H., Abrantes S., 2010. *Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 30(2): 429-438, abr.-jun. 2010.
- [24] Guia Relacre 3. *Validação de resultados em laboratórios químicos*. Edição: Janeiro 1996. ISBN: 972-96727-2-5.

[25] Guia Relacre 9. *Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análise química*. Edição: Julho 1998. ISBN: -972-96727-8-4.

[26] Eurachem/CITAC Guide. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Third Edition 2012.

[27] Eurachem/CITAC Guide. *Measurement uncertainty arising from sampling - A guide to methods and approaches*. First Edition 2007.

[28] Instituto Português de Acreditação. *Avaliação da Incerteza de Medição em Calibração*. Junho de 2015.

[29] Guia Eurachem/Relacre 1. *Exemplos de Cálculos de Incertezas*. Edição: Setembro 2002.

## ***Anexos***

---

## Anexos

### Anexo A – Exemplos de cálculo

#### A.1 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de etanol 12% (v/v)

Partindo de etanol absoluto (100%), e uma vez que se pretende preparar uma solução de etanol 12% (v/v), a determinação do volume a utilizar de etanol absoluto está expressa na equação **A.1**.

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

sendo que:

$C_{\text{etanol absoluto}}$  – concentração de etanol absoluto, em % (v/v)

$V_{\text{etanol absoluto}}$  – volume utilizado de etanol absoluto, em L

$C_{\text{solução etanol}}$  – concentração da solução de etanol, em % (v/v)

$V_{\text{solução etanol}}$  – volume preparado da solução de etanol 12% (v/v), em L

$$100 \times V_{\text{etanol absoluto}} = 12 \times 10$$

$$V_{\text{etanol absoluto}} = 1,2 \text{ L}$$

#### A.2 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,3,6-tricloroanisol (10 µg/L)

Para poder preparar a solução de 2,3,6-TCA de concentração 10 µg/L, teve que se determinar o volume necessário da solução comercial de 2,3,6-TCA de concentração 10 mg/L. Esse cálculo encontra-se na equação **A.2**.

$$C_{\text{solução comercial 2,3,6-TCA}} \times V_{\text{solução comercial 2,3,6-TCA}} = C_{\text{solução 2,3,6-TCA}} \times V_{\text{solução 2,3,6-TCA}} \quad (\text{A.2})$$

sendo que:

$C_{\text{solução comercial 2,3,6-TCA}}$  – concentração da solução comercial 2,3,6-TCA, em µg/L

$V_{\text{solução comercial 2,3,6-TCA}}$  – volume utilizado da solução comercial 2,3,6-TCA, em mL

$C_{\text{solução 2,3,6-TCA}}$  – concentração da solução preparada de 2,3,6-TCA, em µg/L

$V_{\text{solução 2,3,6-TCA}}$  – volume do balão volumétrico onde é preparada a solução, em mL

$$10000 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times V_{\text{solução comercial } 2,3,6\text{-TCA}} = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times 100,00 \text{ mL}$$

$$V_{\text{solução comercial } 2,3,6\text{-TCA}} = 0,1 \text{ mL}$$

### A.3 – Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,4,6-tricloroanisol (1 mg/L)

Para poder preparar a solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L, teve que se determinar o volume necessário da solução comercial de 2,4,6-TCA de concentração 100 mg/L. Esse cálculo encontra-se na equação **A.3**.

$$C_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}} = C_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}} \quad (\text{A.3})$$

sendo que:

$C_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}}$  – concentração da solução comercial 2,4,6-TCA, em mg/L

$V_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}}$  – volume utilizado da solução comercial 2,4,6-TCA, em mL

$C_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}}$  – concentração da solução preparada de 2,4,6-TCA, em mg/L

$V_{\text{solução stock I } 2,3,6\text{-TCA}}$  – volume do balão volumétrico onde é preparada a solução, em mL

$$100 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times V_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}} = 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 100,00 \text{ mL}$$

$$V_{\text{solução comercial } 2,4,6\text{-TCA}} = 1,00 \text{ mL}$$

### A.4 - Cálculo utilizado para a preparação da solução de 2,4,6-tricloroanisol (1 µg/L)

Para poder preparar a solução de 2,4,6-TCA de concentração 1 µg/L, teve que se determinar qual o volume necessário da solução *stock I* de 2,4,6-TCA de concentração 1 mg/L. Esse cálculo encontra-se na equação **A.4**.

$$C_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}} = C_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}} \quad (\text{A.4})$$

sendo que:

$C_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}}$  – concentração da solução *stock I* de 2,4,6-TCA, em µg/L

$V_{\text{solução stock I } 2,4,6\text{-TCA}}$  – volume utilizado da solução *stock I* 2,4,6-TCA, em mL

$C_{\text{solução stock II 2,4,6-TCA}}$  – concentração da solução preparada de 2,4,6-TVA, em  $\mu\text{g/L}$

$V_{\text{solução stock II 2,3,6-TCA}}$  – volume do balão volumétrico onde é preparada a solução, em mL

$$1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times V_{\text{solução stock I 2,4,6-TCA}} = 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times 100,00 \text{ mL}$$

$$V_{\text{solução stock I 2,4,6-TCA}} = 0,100 \text{ mL}$$

### A.5 – Cálculo das concentrações das soluções padrão de 2,4,6-tricloroanisol (0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 4,0; 5,0 e 10,0 ng/L)

O cálculo das concentrações das soluções padrão de 2,4,6-TCA, cujos valores estão registados na **Tabela A.1**, foi determinado pela equação **A.5**.

**Tabela A.1** - Valores obtidos de concentração da solução padrão de 2,4,6-TCA, expressa em ng/L, de acordo com o respectivo volume de solução stock II, expresso em mL, utilizado.

Volume da solução stock II ( $\mu\text{L}$ )	Concentração da solução padrão de 2,4,6-TCA (ng/L)
5	0,499
10	0,997
20	1,992
25	2,489
40	3,976
50	4,965
100	9,881

O exemplo de cálculo da determinação das concentrações das soluções padrão de 2,4,6-TCA apresentado foi baseado no volume de solução stock II de 5  $\mu\text{L}$ .

Uma vez que as soluções padrão não são preparadas em balão volumétrico de 10,00 mL, o volume de solução padrão preparado é igual à soma dos 10,00 mL de solução de etanol 12% (v/v), do volume de solução stock II de 2,4,6-TCA adicionado e dos 20  $\mu\text{L}$  da solução de 2,3,6-TCA com concentração de 10  $\mu\text{g/L}$ .

$$C_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}} = C_{\text{solução-padrão } 2,4,6\text{-TCA}} \times V_{\text{solução-padrão } 2,4,6\text{-TCA}} \quad (\text{A.5})$$

sendo que:

$C_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}}$  – concentração da solução *stock* II de 2,4,6-TCA, em ng/L

$V_{\text{solução stock II } 2,4,6\text{-TCA}}$  – volume da solução *stock* II, em  $\mu\text{L}$

$C_{\text{solução padrão } 2,4,6\text{-TCA}}$  – concentração da solução padrão de 2,4,6-TCA, em ng/L

$V_{\text{solução padrão } 2,4,6\text{-TCA}}$  – volume da solução padrão de 2,4,6-TCA, em  $\mu\text{L}$

$$1000 \frac{\text{ng}}{\text{L}} \times 5 \mu\text{L} = C_{\text{solução-padrão } 2,4,6\text{-TCA}} \times (10000 + 5 + 20) \mu\text{L}$$

$$C_{\text{solução-padrão } 2,4,6\text{-TCA}} = 0,499 \text{ ng/L}$$

## A.6 – Cálculo do limite de detecção e de quantificação

O cálculo do limite de detecção e de quantificação do método, cujos valores estão registados na **Tabela A.2**, foram determinados pelas equações **2.15** e **2.16**, respetivamente.

**Tabela A.2** - Valores de LOD e LOQ, expressos em ng/L, obtidos para as diferentes curvas de calibração.

Curva de calibração	$S_{y/x}$	b	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
A	0,011	0,107253	0,3	1,0
B	0,011	0,111832	0,3	1,0
C	0,006	0,0954828	0,2	0,6
D	0,006	0,0995232	0,2	0,6
E	0,005	0,0923463	0,2	0,6
F	0,009	0,0777268	0,4	1,2

O exemplo de cálculo das determinações do limite de detecção e do limite de quantificação apresentados foram baseados na curva de calibração de A.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (\text{2.30})$$

$$LOD = \frac{3,3 \times 0,011}{0,107253} = 0,3 \frac{ng}{L}$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.31)$$

$$LOQ = \frac{10 \times 0,011}{0,107253} = 1,0 \frac{ng}{L}$$

### A.7 – Cálculo do coeficiente de variação

O cálculo do coeficiente de variação, cujos valores estão registados nas **Tabelas A.3, A.4, A.5 e A.6**, foi determinado pela equação 2.18.

**Tabela A.3** – Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da gama de trabalho na concentração de solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Média das concentrações (ng/L)	Desvio-padrão das concentrações (ng/L)	Coeficiente de variação (%)
0,5 A	0,553	0,503	0,020	4,0
0,5 B	0,474			
0,5 C	0,506			
0,5 D	0,501			
0,5 E	0,509			
0,5 F	0,498			
0,5 G	0,493			
0,5 H	0,510			
0,5 I	0,492			
0,5 J	0,495			

**Tabela A.4** - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da gama de trabalho na concentração de solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Média das concentrações (ng/L)	Desvio-padrão das concentrações (ng/L)	Coeficiente de variação (%)
10,0 A	9,244	9,55	0,41	4,3
10,0 B	9,845			
10,0 C	9,930			
10,0 D	9,473			
10,0 E	9,065			
10,0 F	9,929			
10,0 G	9,891			
10,0 H	9,885			
10,0 I	9,412			
10,0 J	8,825			

**Tabela A.5** - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da repetibilidade na concentração de solução padrão de 0,5 ng/L de 2,4,6-TCA.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Média das concentrações (ng/L)	Desvio-padrão das concentrações (ng/L)	Coeficiente de variação (%)
0,5 A	0,563	0,548	0,038	7,0
0,5 B	0,505			
0,5 C	0,490			
0,5 D	0,622			
0,5 E	0,524			
0,5 F	0,597			

<b>0,5 G</b>	0,535			
<b>0,5 H</b>	0,538			
<b>0,5 I</b>	0,564			
<b>0,5 J</b>	0,539			

**Tabela A.6** - Valores de concentração de 2,4,6-TCA, média e desvio-padrão (ng/L) e coeficiente de variação (%) obtido, para o estudo da repetibilidade na concentração de solução padrão de 10,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

<b>Solução padrão</b>	<b>Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)</b>	<b>Média das concentrações (ng/L)</b>	<b>Desvio-padrão das concentrações (ng/L)</b>	<b>Coeficiente de variação (%)</b>
<b>10,0 A</b>	10,283	10,213	0,332	3,3
<b>10,0 B</b>	10,534			
<b>10,0 C</b>	10,194			
<b>10,0 D</b>	9,476			
<b>10,0 E</b>	10,665			
<b>10,0 F</b>	10,113			
<b>10,0 G</b>	10,229			
<b>10,0 H</b>	10,272			
<b>10,0 I</b>	10,526			
<b>10,0 J</b>	9,843			

O exemplo de cálculo da determinação do coeficiente de variação apresentado foi baseado nos valores da **Tabela A.3**.

$$CV_r(\%) = \frac{S_r}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.32)$$

$$CV_r = \frac{0,020}{0,503} \times 100 = 4,0\%$$

### A.8 – Cálculo do desvio-padrão da precisão intermédia

O exemplo de cálculo do desvio-padrão da precisão intermédia foi baseado nas Tabelas 4.6 e 4.7, tendo sido utilizada a equação 2.22.

$$S_{pint} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - \bar{Y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (2.33)$$

$$S_{pint} = \sqrt{\frac{(2,286 - 2,119)^2 + \dots + (2,003 - 2,119)^2 + (4,198 - 3,887)^2 + \dots + (3,960 - 3,887)^2}{2 \times (10 - 1)}}$$

$$S_{pint} = 0,216 \text{ ng/L}$$

### A.9 – Cálculo da taxa de recuperação

O exemplo de cálculo da determinação da taxa de recuperação foi baseado nos dados da Tabela 4.8 referente ao lote 18100742L1, tendo sido utilizada a equação 2.24.

$$R(\%) = \frac{C_2 - C_1}{C_{ad}} \times 100 \quad (2.34)$$

$$R(\%) = \frac{0,587 - 0,121}{0,499} \times 100 = 93,4\%$$

### A.10 – Cálculo do z-score

O exemplo de cálculo do z-score tem por base os resultados apresentados na Tabela 4.9 para a solução padrão de 3,0 ng/L, utilizando-se a equação 2.23.

$$Z = \frac{|X_{lab} - X_v|}{S} \quad (2.35)$$

$$Z = \frac{|2,9 - 3,0|}{0,3} = 0,4$$

### A.11 – Cálculo dos limites das cartas de controlo

O exemplo de cálculo para a determinação dos limites centrais, limites inferiores de controlo e limites superiores de controlo, cujos valores estão registados nas **Tabelas A.7, A.8 e A.9**, foi baseado na **Tabela A.7**.

**Tabela A.7** - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para a solução padrão de controlo com 2,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Data	Concentração (ng/L)	Desvio-padrão ( $\sigma$ )(ng/L)	Limite central (LC) (ng/L)	Limite inferior de controlo (ng/L)	Limite superior de controlo (ng/L)
01-02-2018	2,3	0,11	2,1	1,8	2,5
06-02-2018	2,0				
15-02-2018	2,2				
20-02-2018	2,2				
27-02-2018	2,0				
14-03-2018	2,1				
22-03-2018	2,2				
28-03-2018	2,3				
06-04-2018	2,0				
12-04-2018	2,0				
12-04-2018	2,1				
19-04-2018	2,0				
19-04-2018	1,9				
24-04-2018	2,2				
03-05-2018	2,3				
03-05-2018	2,2				
09-05-2018	2,0				
17-05-2018	2,1				
17-05-2018	2,2				
21-05-2018	2,3				
21-05-2018	2,4				
21-05-2018	2,1				
22-05-2018	2,1				
22-05-2018	2,1				
30-05-2018	2,2				
06-06-2018	2,2				
14-06-2018	2,1				
14-06-2018	2,1				

**Tabela A.8** - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para a solução padrão de controlo com 4,0 ng/L de 2,4,6-TCA.

Data	Concentração (ng/L)	Desvio-padrão ( $\sigma$ )(ng/L)	Limite central (LC) (ng/L)	Limite inferior de controlo (ng/L)	Limite superior de controlo (ng/L)
01-02-2018	4,2	0,286	4,1	3,2	4,9
06-02-2018	3,7				
15-02-2018	4,0				
07-03-2018	4,0				
14-03-2018	4,1				
28-03-2018	3,3				
06-04-2018	3,8				

12-04-2018	3,6				
19-04-2018	4,1				
19-04-2018	4,0				
24-04-2018	4,1				
03-05-2018	4,3				
03-05-2018	4,1				
09-05-2018	3,9				
17-05-2018	4,4				
17-05-2018	4,5				
21-05-2018	4,7				
21-05-2018	4,0				
22-05-2018	4,2				
24-05-2018	4,2				
14-06-2018	4,0				

**Tabela A.9** - Resultados obtidos de limite central, inferior de controlo e superior de controlo para o declive.

Curva de calibração	Declive	Desvio-padrão ( $\sigma$ )(ng/L)	Limite central (LC) (ng/L)	Limite inferior de controlo (ng/L)	Limite superior de controlo (ng/L)
A	0,1073	0,0110	0,0974	0,0644	0,1304
B	0,1118				
C	0,0955				
D	0,0995				
E	0,0923				
F	0,0777				

O limite central corresponde à média das concentrações. Assim sendo, este limite é 2,1.

O limite inferior de controlo é dado pela expressão  $LCI = \text{média das concentrações} - 3 \times \sigma$ , em que  $\sigma$  corresponde ao desvio-padrão. Assim sendo, o limite inferior de controlo é  $LCI = 2,1 - 3 \times 0,112 = 1,8 \text{ ng/L}$ .

O limite superior de controlo é dado pela expressão  $LCS = \text{média das concentrações} + 3 \times \sigma$ , em que  $\sigma$  corresponde ao desvio-padrão. Assim sendo, o limite superior de controlo é  $LCS = 2,1 + 3 \times 0,112 = 2,50 \text{ ng/L}$ .

### A.12 – Cálculo das incertezas

O exemplo de cálculo da incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração ( $u(C)$ ), a incerteza associada à preparação das soluções padrão ( $U(\text{padrões})$ ), a incerteza associada à precisão do método ( $u(\text{precisão})$ ), a incerteza combinada ( $U_c(C)$ ) e a incerteza expandida ( $U(C)$ ), foi baseado **Tabela 4.9** e foi determinado pelas equações **2.25**, **2.26**, **2.27**, **2.28** e **2.29**.

$$u(C) = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\hat{Y}_0 - \bar{Y})^2}{b^2 * \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.36)$$

$$u(\text{Padrões}) = \sqrt{u(C1)^2 + u(C2)^2 + u(C3)^2 + \dots + u(Ci)^2} \quad (2.37)$$

$$u(\text{precisão}) = \frac{S_n}{\sqrt{n}} \quad (2.38)$$

$$u_c(C) = \sqrt{[u(C)]^2 + [u(\text{Padrões})]^2 + [u(\text{precisão})]^2} \quad (2.39)$$

$$U(C) = k \times u_c(C) = 2 \times u_c(C) \quad (2.40)$$

Na **Tabela A.10** encontram-se os valores necessários para a realização do cálculo da incerteza associada à leitura da amostra na curva de calibração.

**Tabela A.10** – Resultados base para o cálculo da incerteza associada à curva de calibração.

Curva de calibração	$S_{y/x}$	b	Nº padrões	Nº réplicas	$\bar{Y}_0$	$\bar{Y}$	Média concentração dos padrões
A	0,0109	0,1073	6	10	0,08	0,357	3,139
B	0,0112	0,1118	6	10	0,08	0,371	3,139
C	0,0056	0,0955	14	3	0,12	0,300	2,938
D	0,0056	0,0995	12	3	0,13	0,301	2,766
E	0,0054	0,0923	12	2	0,11	0,290	2,931
F	0,0090	0,0777	8	3	0,01	0,203	2,354

O exemplo de cálculo da incerteza associada à curva de calibração para a data 01/02/2018 é:

$$u(C) = \frac{0,01087}{0,107253} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{10} + \frac{(0,08 - 0,357)^2}{0,107253^2 \times [(0,000 - 3,139)^2 + \dots + (9,881 - 3,139)^2]}}$$

$$u(C) = 0,061 \text{ ng/L}$$

Na **Tabela A.11** encontram-se os valores necessários para a realização do cálculo da incerteza associada à preparação das soluções padrão.

**Tabela A.11** – Resultados das incertezas, em ng/L, associadas à preparação de cada solução padrão de 2,4,6-TCA.

Concentração da solução padrão (ng/L)	Incerteza (ng/L)
0,5	0,025
1,0	0,049
2,5	0,123
5,0	0,246
10,0	0,491

Para determinar a incerteza associada a cada padrão houve necessidade de determinar também a incerteza associada à solução *stock I* e solução *stock II*.

Cálculo da determinação da incerteza da solução *stock I*:

$$Incerteza_{solução\ stock\ I} = \sqrt{\left(\frac{\Delta C_{sol.com.} \times V_{sol.com.}}{V_{sol.stock\ I}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{balão\ vol.} \times C_{sol.com.} \times V_{sol.com.}}{V_{balão\ vol.}^2}\right)^2}$$

$$Incerteza_{solução\ stock\ I} = \sqrt{\left(\frac{4,9 \times 10^6 \times 1}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,1 \times 100 \times 10^6 \times 1}{100^2}\right)^2} = 49010\ ng/L$$

Cálculo da determinação da incerteza da solução *stock II*:

$$Incerteza_{sol.\ stock\ II} = \sqrt{A + B + C}$$

$$A = \left(\frac{\Delta V_{stock\ I} \times C_{stock\ I}}{V_{balão\ vol.}}\right)^2$$

$$B = \left(\frac{Incerteza_{sol.stock\ I} \times V_{sol.stock\ I}}{V_{balão\ vol.}}\right)^2$$

$$C = \left(\frac{\Delta_{balão\ vol.} \times C_{stock\ I} \times V_{stock\ I}}{V_{balão\ vol.}^2}\right)^2$$

$Incerteza_{solução\ stock\ II}$

$$= \sqrt{\left(\frac{0,002 \times 100 \times 1,0 \times 10^6}{100 \times 10^3}\right)^2 + \left(\frac{49010 \times 0,1}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,1 \times 1,0 \times 10^6 \times 0,1}{100^2}\right)^2}$$

$$Incerteza_{solução\ stock\ II} = 49\ ng/L$$

Exemplo de cálculo da incerteza associada ao padrão de 0,5 ng/L:

$$Incerteza = \sqrt{\left(\frac{\Delta V_{stock II} \times C_{stock II}}{V_{vial}}\right)^2 + \left(\frac{Incerteza_{stock II} \times V_{stock II}}{V_{vial}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{vial} \times V_{stock II} \times C_{stock II}}{V_{vial}^2}\right)^2}$$

$$Incerteza = \sqrt{\left(\frac{0,002 \times 5 \times 1,0 \times 10^3}{10 \times 10^3}\right)^2 + \left(\frac{49 \times 5}{10 \times 10^3}\right)^2 + \left(\frac{11 \times 5 \times 1,0 \times 10^3}{10000^2}\right)^2} = 0,025 \text{ ng/L}$$

Cálculo da determinação da incerteza associada às soluções padrão:

$$u(\text{Padrões}) = \sqrt{0,025^2 + 0,049^2 + 0,123^2 + 0,246^2 + 0,491^2} = 0,565 \text{ ng/L}$$

Cálculo da incerteza associada à precisão do método:

$$u(\text{precisão}) = \frac{0,038}{\sqrt{10}} = 0,012 \text{ ng/L}$$

Cálculo da incerteza combinada:

$$u_c(C) = \sqrt{0,061^2 + 0,565^2 + 0,012^2} = 0,569 \text{ ng/L}$$

Cálculo da incerteza expandida:

$$U(C) = 2 \times 0,569 = 1,138 \text{ ng/L}$$

### A.13 Cálculo das depreciações de equipamentos e dos consumíveis do cromatógrafo

O exemplo de cálculo das depreciações dos equipamentos e dos consumíveis do cromatógrafo foi baseado na **Tabela A.12**, tendo por base a análise de 2500 amostras anuais.

**Tabela A.12** - Custo anual e por amostra, em €, do GC-ECD, da micropipeta digital, do desionizador e dos consumíveis do GC.

Equipamentos	Custo anual (€)	Custo/Amostra (€)
GC-ECD	6499,71	2,60
Micropipeta digital	208,48	0,08
Desionizador	1000,00	0,40
Consumíveis GC	506,99	0,20

Cálculo do custo por amostra associado ao GC-ECD:

$$\text{Custo por amostra} = \frac{6499,71}{2500} = 2,60\text{€}$$

## Anexo B – Número de rolhas utilizadas por macerado

Na **Tabela B.1** encontra-se a quantidade de rolhas que se coloca num macerado com base no seu calibre. Estas quantidades são determinadas para frascos de maceração de 500 mL e baseiam-se na norma ISO 20752:2014 – Rolhas – Determinação de 2,4,6 – tricloroanisol (TCA) extraível, que indica que se devem usar 20 rolhas num frasco de maceração com 1 L para rolhas de calibre 45 x 24 mm.

**Tabela B.1** - Rolhas a colocar em cada frasco de maceração em função do calibre.

Calibre (mm)	Rolhas/frasco
27x18,5	20
27x19	20
27x19,5	19
27x19,7	19
27x20	18
27x20,5	18
27x23	15
27x31	10
28x20	18
32x25	12
38x24	11
39x25	11
39x26	10
44x24	10
45x24	10
45x25	10
45x26	9
45x28	8
45x29	8
45x32	7
46x25	9
49x24	9
49x25	9
49x26	8
49x32	7
49x40	5
49x42	5
50x25	9
54x24	9

54x25	8
54x26	8

## Anexo C – Curvas de Calibração

Nas Tabelas C.1 a C.6 encontram-se os resultados usados no traçado de cada curva de calibração.

Tabela C.1 - Resultados da curva de calibração A.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2,4,6-TCA}}{\text{Área 2,3,6-TCA}}$	Equação da reta
Branco	0,000	220,49	14632,92	0,015	Y = 0,1725X + 0,0200
0,5	0,499	1234,77	16790,09	0,074	
1,0	0,997	1891,49	14155,31	0,134	
2,5	2,489	4219,97	14219,01	0,297	
5,0	4,965	7618,68	14218,83	0,536	
10,0	9,881	13943,58	12850,35	1,085	

Tabela C.2 - Resultados da curva de calibração B.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2,4,6-TCA}}{\text{Área 2,3,6-TCA}}$	Equação da reta
Branco	0,000	219,43	17258,61	0,013	Y = 0,1118X + 0,0201
0,5	0,499	1452,20	21270,94	0,068	
1,0	0,997	2702,02	20442,56	0,132	
2,5	2,489	6193,20	19489,12	0,318	
5,0	4,965	11186,88	19462,23	0,575	
10,0	9,881	20745,86	18508,54	1,121	

Tabela C.3 - Resultados da curva de calibração C.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	Equação da reta
Branco A	0,000	397,95	27163,33	0,015	$Y = 0,0955X + 0,0194$
Branco B	0,000	361,41	25736,48	0,014	
Branco C	0,000	365,85	24889,07	0,015	
0,5 A	0,499	1687,80	25076,29	0,067	
0,5 C	0,499	1776,86	26437,57	0,067	
1,0 A	0,997	3169,84	27277,30	0,116	
1,0 B	0,997	3084,38	26821,67	0,115	
1,0 C	0,997	3091,75	26495,61	0,117	
2,5 B	2,489	6794,65	26086,03	0,260	
5,0 A	4,965	13660,87	26896,71	0,508	
5,0 B	4,965	12655,85	25767,47	0,491	
5,0 C	4,965	12816,68	25742,33	0,498	
10,0 A	9,881	24013,22	25041,16	0,959	
10,0 B	9,881	23185,34	24221,83	0,957	

Tabela C.4 - Resultados da curva de calibração D.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2, 4, 6 - TCA}}{\text{Área 2, 3, 6 - TCA}}$	Equação da reta
Branco A	0,000	722,05	36886,68	0,020	$Y = 0,0995X + 0,0260$
Branco B	0,000	733,07	36880,03	0,020	
Branco C	0,000	758,24	37848,76	0,020	

0,5 B	0,499	2904,59	38670,49	0,075
1,0 A	0,997	4936,55	38523,50	0,128
1,0 B	0,997	4766,40	37210,31	0,128
1,0 C	0,997	4868,00	39103,55	0,124
2,5 A	2,489	10258,94	36274,25	0,283
2,5 B	2,489	9455,61	33716,67	0,280
5,0 B	4,965	20233,95	38498,84	0,526
10,0 A	9,881	37140,79	36923,06	1,006
10,0 C	9,881	35686,89	35484,71	1,006

Tabela C.5 - Resultados da curva de calibração E.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2,4,6-TCA}}{\text{Área 2,3,6-TCA}}$	Equação da reta
Branco A	0,000	162,18	7329,65	0,022	Y = 0,0923X + 0,0190
Branco B	0,000	188,90	10485,13	0,018	
Branco C	0,000	210,66	13034,08	0,016	
0,5 A	0,499	1074,05	16590,57	0,065	
0,5 B	0,499	996,60	15139,73	0,066	
1,0 A	0,997	1647,48	14582,83	0,113	
1,0 C	0,997	1804,60	16349,79	0,110	
2,5 A	2,489	3675,34	15312,23	0,240	
5,0 A	4,965	6814,42	13941,40	0,489	
5,0 C	4,965	6611,34	13816,52	0,479	
10,0 B	9,881	12023,09	13009,67	0,924	

10,0 C	9,881	11985,18	12821,06	0,935	
--------	-------	----------	----------	-------	--

Tabela C.6 - Resultados da curva de calibração F.

Solução padrão	Concentração 2,4,6-TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (U.A.)	Área 2,3,6-TCA (U.A.)	$\frac{\text{Área 2,4,6-TCA}}{\text{Área 2,3,6-TCA}}$	Equação da reta
Branco A	0,000	240,05	15646,64	0,015	Y = 0,0777X + 0,0196
Branco B	0,000	251,16	16569,98	0,015	
Branco C	0,000	242,42	16932,80	0,014	
0,5 B	0,499	1074,16	18539,25	0,058	
1,0 A	0,997	1840,63	17697,09	0,104	
2,5 A	2,489	4146,39	18030,93	0,230	
5,0 B	4,965	7026,52	17742,01	0,396	
10,0 B	9,881	12938,91	16433,16	0,787	