



Validação Técnica do Método de Análise de 2,4,6-Tricloroanisol em Vinhos

ANA FRANCISCA FERNANDES VIANA

novembro de 2018

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RAMO QUALIDADE



Orientação:
Co-Orientação:



Agradecimentos

À Engenheira Cláudia Santos, que possibilitou a realização deste estágio, oferecendo-me todas as condições de trabalho, dedicação, empenho e força de acreditar.

À equipa que em todos os momentos me fez sentir à vontade, e possibilitou a minha disponibilidade para este trabalho.

Às orientadoras Doutora Cristina Matos e Doutora Manuela Correia, por todo o apoio e orientação durante este percurso.

Ao cromatógrafo, por todas as avarias técnicas nos momentos em que eu menos precisava, e pela ajuda incondicional no final deste percurso.

À minha mãe que possibilitou que este sonho fosse cumprido.

Ao João pela paciência e apoio.

Aos meus amigos e colegas de casa que viveram todas as minhas angústias.

Resumo

Esta dissertação descreve o trabalho desenvolvido no estágio realizado no âmbito da unidade curricular “Dissertação/Estágio” do Mestrado em Engenharia Química – Ramo Qualidade na Symington Family Estates Vinhos, S.A..

O presente trabalho teve como objetivo a implementação e validação de um método de análise de 2,4,6-tricloroanisol em vinhos de mesa tintos por microextração em fase sólida (SPME) no *headspace* (HS) e análise por cromatografia gasosa com detecção por captura de eletrões (GC-ECD).

Foram realizados estudos de otimização das condições de extração, comparando o comportamento da metodologia para diferentes tempos de extração e dessorção, e diferentes percentagens de álcool, nomeadamente, vinho sem diluição (13% (v/v)) ou com diluição 1:2 (6,5% (v/v)). Utilizando a fibra de SPME de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm , obtiveram-se resultados satisfatórios com 25 minutos de extração, 5 minutos de dessorção e um teor alcoólico de 6,5 % (v/v).

Para validar o método realizaram-se estudos de linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão (repetibilidade), exatidão e incerteza. Os resultados obtidos demonstram boa linearidade do método, na gama de 1,0 ng/L a 8,0 ng/L, com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,995, limite de deteção de 0,47 ng/L e limite de quantificação 1,57 ng/L.

PALAVRAS CHAVE: 2,4,6-TCA, Vinho, SPME, Otimização, Validação

Abstract

This dissertation describes the work carried out in the internship of the curricular unit "Dissertation/Internship" of the Master in Chemical Engineering – Quality at Symington Family Estates Vinhos, S.A..

The purpose of this work was to implement and validate a method for the analysis of 2,4,6-Trichloroanisol in red wines by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and analysis by gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD).

Studies on the optimization of the extraction conditions were performed, comparing the behavior of the methodology for different extraction and desorption times, and different percentages of alcohol, namely, wine without dilution (13% (v/v)) or with dilution 1:2 (6.5% (v/v)). Using the SPME fiber of Polydimethylsiloxane (PDMS) of 100 μm , satisfactory results were obtained with 25 minutes of extraction, 5 minutes of desorption and an alcoholic content of 6.5% (v/v).

To validate the method, studies of linearity, concentration range, analytical thresholds, precision (repeatability), accuracy and uncertainty were performed. The results obtained demonstrate good linearity of the method, in the range of 1.0 ng/L to 8.0 ng/L, with coefficients of determination (R^2) higher than 0.995, detection limit of 0.47 ng/L and limit of quantification of 1.57 ng/L.

Keywords: 2,4,6-TCA, wine, SPME, optimization, validation.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Nomenclatura	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento	1
1.2. Objetivos	1
1.3. Apresentação da Empresa	1
1.4. Organização da dissertação	2
2. Estado da Arte	3
2.1. Os Vinhos DOC Douro e Vinhos do Porto	3
2.2. O 2,4,6-TCA	4
2.3. Determinação de TCA em vinhos	6
2.3.1. Microextração em Fase Sólida	6
2.3.2. Cromatografia Gasosa.....	11
2.3.3. Métodos analíticos para determinação de TCA	13
2.4. Validação do Método	18
2.4.1. Linearidade.....	18
2.4.2. Gama de trabalho.....	19
2.4.3. Limiares Analíticos	20
2.4.4. Sensibilidade	21
2.4.5. Precisão	22
2.4.6. Exatidão	25
2.4.7. Incerteza.....	26
2.4.8. Controlo da Qualidade.....	28

1.	Materiais e Métodos.....	31
1.1.	Reagentes.....	31
1.2.	Equipamentos	31
1.3.	Microextração em fase sólida	33
1.4.	Preparação de soluções stock de 2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA	34
1.5.	Preparação de soluções padrão e padrões de controlo.....	35
1.6.	Preparação das Amostras	37
2.	Resultados e Discussão.....	38
2.1.	Estudo da viabilidade de uso de matriz etanólica 12% (v/v)	40
2.2.	Otimização do Método	43
2.3.	Curvas de Calibração.....	54
2.4.	Validação da Gama de Trabalho	55
2.5.	Precisão	55
2.6.	Exatidão	56
2.7.	Estudo do efeito “carry over”	57
2.8.	Incerteza	57
3.	Conclusões e Sugestões de Trabalho Futuro.....	58
	Bibliografia.....	60
	Anexos.....	65

Índice de Figuras

FIGURA 2. 1 - MOLÉCULA DE 2,4,6-TRICLOROANISOL	5
FIGURA 2. 2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO SPME [13]	7
FIGURA 2. 3 - ETAPAS DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA. (A) EXTRAÇÃO NO MODO HEADSPACE (B) EXTRAÇÃO NO MODO DIRETO (C) DESSORÇÃO DOS ANALITOS NO CROMATÓGRAFO [12]	8
FIGURA 2. 4 - ESCALA DE AVALIAÇÃO DO FATOR DE DESEMPENHO	25
FIGURA 2. 5 - PRINCÍPIOS ESTATÍSTICOS DAS CARTAS DE CONTROLO (ADAPTADO DE [47])	29
FIGURA 3. 1 – MICROPIPETA SCIENTIFIC eVOL	31
FIGURA 3. 2 - CROMATÓGRAFO E “AUTOSAMPLER” SPME	32
FIGURA 3. 3 -- GRÁFICO REPRESENTATIVO DO PROGRAMA DE TEMPERATURA DO FORNO	32
FIGURA 3. 4 - VIAIS DE ARMAZENAMENTO DE SOLUÇÕES: (A) SOLUÇÃO STOCK II DE 2,4,6-TCA E (B) SOLUÇÃO DE 2,3,6-TCA.	34
FIGURA 3. 5 - EMBALAGEM DE ARMAZENAMENTO DO VINHO	35
FIGURA 3. 6 - FRASCO ÂMBAR USADO PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DE VINHO	37
FIGURA 4. 1 - EXTRATO DE UM CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE A UM VIAL BRANCO (VINHO, SAL E PADRÃO INTERNO) ENTRE 12 E 14 MINUTOS DE TEMPO DE RETENÇÃO	38
FIGURA 4. 2 - EXTRATO DE UM CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE A UM VIAL DE 2,4,6-TCA 0,5 NG/L ENTRE 12 E 14 MINUTOS DE TEMPO DE RETENÇÃO	38
FIGURA 4. 3 - EXTRATO DE UM CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE A UM VIAL DE 2,4,6-TCA 9,5 NG/L ENTRE 12 E 14 MINUTOS DE TEMPO DE RETENÇÃO	39
FIGURA 4. 4 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS ÁREAS DOS PICOS DO ANALITO E DO PADRÃO INTERNO PARA AMOSTRAS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES	39
FIGURA 4. 5 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE DE 10 ML DE SOLUÇÃO ETANÓLICA COM 3 G DE SAL E 20 µL DE PADRÃO INTERNO	40
FIGURA 4. 6 - CROMATOGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE DE 10 ML DE VINHO COM 3 G DE SAL E 20 µL DE PADRÃO INTERNO ...	40
FIGURA 4. 7 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DO ANALITO EM DIFERENTES PADRÕES EM BASE ETANÓLICA E EM BASE VÍNICA.....	42
FIGURA 4. 8 - GRÁFICO COMPARATIVO DA RAZÃO DE ÁREAS DE MATRIZ ETANÓLICA E MATRIZ VÍNICA.....	42
FIGURA 4. 9 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO DE 0,5 NG/L 2,4,6-TCA NO ENSAIO A.....	44
FIGURA 4. 10 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO DE 9,5 NG/L 2,4,6-TCA NO ENSAIO A.....	44
FIGURA 4. 11 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE AO ENSAIO A.....	45
FIGURA 4. 12 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO 0,5 NG/L 2,4,6-TCA NO ENSAIO B	46
FIGURA 4. 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO 9,5 NG/L 2,4,6-TCA NO ENSAIO B	46
FIGURA 4. 14 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE AO ENSAIO B	47
FIGURA 4. 15 - EXTRATO DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O BRANCO NO ENSAIO C	48
FIGURA 4. 16- EXTRATO DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO 0,5 NG/L NO ENSAIO C.....	48
FIGURA 4. 17 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE AO ENSAIO C	49

FIGURA 4. 18 - COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE 2,4,6-TCA OBTIDAS NOS DIFERENTES PADRÕES PARA 20, 25 E 30 MINUTOS DE EXTRAÇÃO	50
FIGURA 4. 19 - EXTRATO DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O BRANCO NO ENSAIO F	51
FIGURA 4. 20 - GRÁFICO COMPARATIVO DAS ÁREAS DE ANALITO OBTIDAS EM FUNÇÃO DA DILUIÇÃO	52
FIGURA 4. 21 -EXTRATO DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO 0,5 NG/L NO ENSAIO F	52
FIGURA 4. 22 – CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE AO ENSAIO F	53
FIGURA 4. 23 -EXTRATO DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O PADRÃO DE CONCENTRAÇÃO 1,0 NG/L	54
FIGURA 4. 24 - CURVA DE CALIBRAÇÃO CORRESPONDENTE AO ENSAIO G	54
FIGURA B. 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº 1	72
FIGURA B. 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº 2	73
FIGURA B. 3 – CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº3	74
FIGURA B. 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº 4	74

Índice de Tabelas

TABELA 2. 1 - LIMITES DE DETEÇÃO HUMANA DE HALOANISÓIS EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA (ADAPTADA DE [9])	4
TABELA 2. 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO 2,4,6-TCA [11]	5
TABELA 2. 3 - FIBRAS PARA SPME DISPONÍVEIS NO MERCADO E RESPECTIVAS PROPRIEDADES [13]	11
TABELA 2. 4 -. - MÉTODOS REPORTADOS NA LITERATURA PARA A ANÁLISE DE 2,4,6-TCA E OUTROS COMPOSTOS RELACIONADOS COM DEFEITOS DO AROMA EM VINHOS POR SPME (ADAPTADO [26])	16
TABELA 3. 1 – CONDIÇÕES SPME UTILIZADAS NOS DIFERENTES ENSAIOS DE OTIMIZAÇÃO	33
TABELA 3. 2- VOLUMES DE SOLUÇÃO STOCK II DE 2,4,6-TCA EM FUNÇÃO DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO	35
TABELA 3. 3 - VOLUMES DE SOLUÇÃO STOCK II DE 2,4, 6-TCA EM FUNÇÃO DOS PADRÕES DE CONTROLO	36
TABELA 3. 4– DILUIÇÕES EM FUNÇÃO DO GRAU ALCOÓLICO DAS AMOSTRAS	37
TABELA 4. 1 - RESULTADOS OBTIDOS PARA AS ÁREAS DE ANALITO E PADRÃO INTERNO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PADRÕES DE CALIBRAÇÃO DE MATRIZ ETANÓLICA	41
TABELA 4. 2 - RESULTADOS OBTIDOS PARA AS ÁREAS DE ANALITO E PADRÃO INTERNO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANALITO EM MATRIZ VÍNICA	41
TABELA 4. 3 – RESUMO DAS CONDIÇÕES DOS ENSAIOS DE A A G	43
TABELA 4. 4 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E RESPECTIVOS COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO, DESVIOS PADRÃO, LIMITES DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	55
TABELA 4. 5 – RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO INTERLABORATORIAL	56
TABELA A. 1. – CONCENTRAÇÕES REAIS DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO NOS VIAIS	66
TABELA A. 2 - CONCENTRAÇÕES REAIS DOS PADRÕES DE CONTROLO NOS VIAIS	66
TABELA B. 1. - VALORES OBTIDOS PARA AS RAZÕES DE ÁREAS DE DIFERENTES PADRÕES DE CONCENTRAÇÃO EM MATRIZ VÍNICA E MATRIZ ETANÓLICA	67
TABELA B. 2. RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO A E RESPECTIVA REPETIÇÃO	68
TABELA B. 3. – RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO B	69
TABELA B. 4. – RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO C	69
TABELA B. 5. - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO D	70
TABELA B. 6. - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO E	70
TABELA B. 7. - RESULTADOS ENSAIO F	71
TABELA B. 8 – RESULTADOS ENSAIO G	71
TABELA B. 9 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº1	72
TABELA B. 10 - DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº2	73
TABELA B. 11 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº 3	73
TABELA B. 12 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO Nº 4	74
TABELA B. 13 – DADOS VALIDAÇÃO GAMA DE TRABALHO PARA O PADRÃO 1,0 NG/L	75
TABELA B. 14 - DADOS VALIDAÇÃO GAMA DE TRABALHO PARA O PADRÃO 8,0 NG/L	76

TABELA B. 15 – RESULTADOS ENSAIO DE RECUPERAÇÃO	77
TABELA B. 16 – RESULTADOS DO ESTUDO EFEITO “ <i>CARRY OVER</i> ”	77

Nomenclatura

CAR – Carboxen

CC – Carta de controlo

CV - Coeficiente de variação

DOC – Denominação de origem controlada

DS² – Diferença das variâncias

DVB – divinilbenzeno

ECD – Detetor de captura de eletrões

GC – Cromatografia em fase gasosa

HS – *Headspace*

ISO - *International Organization for Standardization*

LBV – *Late Bottled Vintage*

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MS – Espetrometria de massa

MS – Espetrometria de massa

PA – Poliacrilato

PCA - Pentacloroanisol

PCP – Pentaclorofenol

PDMS – Polidimetilsiloxano

PI – Padrão interno

PG – Valor teste

QC – Controlo de qualidade

R- Coeficiente de correlação

R² – Coeficiente de Determinação

$S_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração linear

SPME – Microextração em fase sólida

TBA – Tribromoanisol

TCA – tricloroanisol

TCP – Triclorofenol

TeCA - 2,3,4,6 – Tetracloroanisol

u.a. – unidades arbitrárias

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Um dos principais problemas responsáveis pela diminuição da qualidade de um vinho é a alteração dos aromas, decorrente da utilização de rolhas de cortiça. A presença de determinados compostos nestes vedantes, causa a passagem de odor a mofo para o vinho, provocando o chamado “gosto a rolha”, o que representa um importante problema económico não só para a indústria vitivinícola como também para a indústria corticeira.

O “gosto a rolha” é o defeito mais temido pelos produtores de vinho. Este defeito é causado pela presença de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), um composto que não causa nenhum problema à saúde humana, mas que apresenta um limite de perceção sensorial muito baixo. Este limite é variável de acordo com o consumidor, o tipo de vinho, a ocasião em que o vinho é consumido, entre outros fatores. A contaminação por TCA é o maior motivo de reclamações na indústria vinícola, tornando-se necessário quantificar este composto para análise das reclamações.

1.2. Objetivos

O estágio curricular integrado no plano de estudos do Mestrado em Engenharia Química, ramo Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto, tem como objetivo permitir aos alunos terem uma experiência profissionalizante em ambiente empresarial, realizando um trabalho de projeto.

Os objetivos do presente estágio são a validação e implementação de um método de análise de 2,4,6-tricloroanisol em vinhos mesa por cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões (GC-ECD). Para esse efeito, torna-se necessário o estudo do método, baseado na Norma ISO 20752:2014 – Rolhas- Determinação de 2,4,6-TCA, a otimização de algumas condições experimentais e posterior validação através de ensaios que permitam demonstrar a linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão do método.

1.3. Apresentação da Empresa

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

A Symington Family Estates Vinhos, S.A. é uma empresa de vinhos de consumo e vinhos do Porto, que possui e opera em diversas quintas e adegas, sendo detentora de várias marcas de Vinho do Porto e vinhos DOC Douro, incluindo algumas das mais antigas e mais conhecidas marcas de vinho do Porto. A família Symington, com ascendência escocesa, inglesa e portuguesa, está presente no Douro há cinco gerações.

A Symington Family Estates é um dos principais produtores de vinhos do Porto, responsável por cerca de 32% do total da produção de vinho do Porto de categorias especiais. Recentemente a laborar também no Alto Alentejo, os valores da empresa assentam na tradição, inovação e qualidade, paixão e orgulho no trabalho e ainda no respeito pelas pessoas [1]

1.4. Organização da dissertação

A presente dissertação está organizada em cinco capítulos. O primeiro capítulo inicia a abordagem ao tema, especifica o objetivo do trabalho e faz uma breve apresentação da instituição de acolhimento do estágio.

No capítulo 2, faz-se uma apresentação dos tipos de vinho em que se pretende validar a metodologia e indicam-se algumas das características principais do TCA, assim como da técnica de extração (SPME) e do método de análise (GC-ECD). As metodologias analíticas descritas na bibliografia são apresentadas e discutidas. Por último, apresenta-se a validação de métodos internos de ensaio.

O terceiro capítulo é dedicado à descrição dos métodos utilizados e equipamentos necessários à execução do trabalho.

O quarto e quinto capítulos baseiam-se, respetivamente, na apresentação e análise dos resultados obtidos, conclusões obtidas e sugestões de trabalhos futuros.

2. Estado da Arte

A presença de contaminantes na cortiça é um dos problemas mais críticos na indústria do vinho. Os principais responsáveis por este defeito são alguns anisóis, tal como o 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Assim, mesmo em concentrações muito reduzidas, a sua presença causa um problema de qualidade do vinho [2–4].

Em 1981, o TCA foi identificado no vinho pela primeira vez e descrito como “odor a mofo”. Em 1989, foram identificados outros compostos que produziram o mesmo tipo de odor, sendo, no entanto, o TCA considerado o principal contaminante [5].

Em 1996, um estudo realizado pela Confederação Europeia da Cortiça, o projeto QUERCUS, investigou as causas e origens das impurezas nas rolhas. Constatou-se que o TCA era responsável pela contaminação de mofo em pelo menos 80% dos casos em que foi detetado o “gosto a rolha” em vinhos engarrafados [3].

Um ano depois, com o intuito de avaliar os problemas causados pelo defeito da cortiça, foi desenvolvido um método de análise de 2,4,6-TCA em amostras de vinho baseado na microextração em fase sólida (SPME) acoplada à cromatografia em fase gasosa com deteção por espetrometria de massa (GC-MS). Este método permitiu a quantificação do composto de forma rápida, e sem o uso de grandes quantidades de solventes [6].

A técnica de SPME associada a GC-ECD foi o método selecionado para a realização deste trabalho.

2.1. Os Vinhos DOC Douro e Vinhos do Porto

Os Vinhos do Douro são produzidos a partir de castas autóctones e resultam de um lote de várias castas, com uma complexidade e riqueza ímpares que lhes imprimem um perfil característico do Douro [7].

O Vinho do Porto é um vinho licoroso, produzido na acidentada zona montanhosa do Alto Douro, no nordeste de Portugal, sob condições peculiares derivadas de fatores naturais e de fatores humanos. O processo de fabrico, baseado na tradição, inclui a paragem da fermentação do mosto pela adição de aguardente vínica, a lotação de vinhos e o envelhecimento.

Os vinhos do Porto podem ser divididos em diferentes categorias consoante o tipo de envelhecimento: Ruby, Tawny, Branco e Rosé. O estilo Ruby caracteriza-se pelo

envelhecimento em garrafa e neste inserem-se as categorias Ruby, Reserva, *Late Bottled Vintage* (LBV) e Vintage. O estilo LBV é um vinho de qualidade, de um único ano, com capacidade de envelhecimento em garrafa. Estes vinhos permanecem seis anos em tonéis de madeira, antes de serem engarrafados, e envelhecem pelo menos três anos em garrafa. Define-se por Vintage o Vinho do Porto de uma só colheita produzido num ano de excepcional qualidade. Os Tawny envelhecem por períodos mais longos em cascos de carvalho. Vinhos Brancos são vinhos do Porto feitos a partir de castas de uvas brancas que amadurecem dois ou três anos em vasilhas de madeira [7,8]. Assim, o vinho do Porto é um vinho naturalmente doce, visto que o açúcar natural das uvas não se transforma completamente em álcool, e com um teor alcoólico mais elevado do que os restantes vinhos, entre 19 e 22°.

2.2. O 2,4,6-TCA

Os haloanisóis são anisóis com pelo menos um halogénio na sua composição. Estes compostos são os principais responsáveis pela alteração do aroma dos vinhos, conferindo-lhes aroma a mofo. Apesar de não apresentarem risco para a saúde humana, são compostos extremamente voláteis, apresentando um limiar de deteção reduzido em soluções alcoólicas, na ordem dos nanogramas por litro, variando com o tipo de composto [9]. A Tabela 2. 1 apresenta os limiares de deteção humana para os diferentes haloanisóis.

Tabela 2. 1 - Limites de deteção humana de haloanisóis em solução alcoólica (adaptada de [9])

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

O 2,4,6-TCA é o composto que apresenta limite de perceção sensorial mais baixo, sendo o composto que mais contribui para o odor desagradável encontrado em alguns vinhos. Este é um composto de ocorrência natural, na água, na terra, em legumes e frutas, na madeira e cortiça, entre outros. De fórmula molecular $C_7H_5Cl_3O$, é um composto orgânico, com elevada estabilidade devido à aromaticidade do anel benzénico (Figura 2. 1)[10, 11].

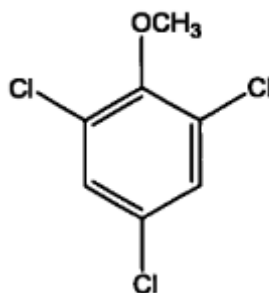


Figura 2. 1 - Molécula de 2,4,6-tricloroanisol

O TCA é um composto apolar, com grande afinidade para os lípidos e volátil. Algumas das suas propriedades físico-químicas são apresentadas na Tabela 2. 2

Tabela 2. 2 - Propriedades físico-químicas do 2,4,6-TCA [11]

Propriedade	Valor
Pressão de Vapor	$22,8 \times 10^{-3}$ mmHg
Constante de Henry	$130 \text{ atm cm}^3\text{mol}^{-1}$
Solubilidade em Água	10 mg L^{-1}
Massa Molar	$211,47 \text{ g mol}^{-1}$
Ponto de Fusão	60 a 62 °C
Ponto de Ebulição	216 °C (a 760 mmHg)

Há diversas causas que explicam a presença de TCA no vinho: o uso de fungicidas, biocidas, herbicidas, conservantes da madeira que contêm clorofenóis, como por exemplo, o pentaclorofenol (PCP) e a contaminação vinda da cortiça [3].

A formação de haloanisóis é um mecanismo de sobrevivência para muitos microrganismos quando expostos a ambientes contaminados com halofenóis. Existem várias hipóteses para a formação de cloroanisóis, sendo a mais aceite a síntese direta por biometilação (o-metilação) de clorofenóis por microrganismos. Esta reação ocorre quando os referidos microrganismos entram em contacto com os seus precursores, os halofenóis, de onde se destacam os clorofenóis. Estes últimos são usados de forma intensiva como pesticidas e fungicidas com um nível de toxicidade elevado. O clorofenol precursor do TCA é o 2,4,6-triclorofenol (TCP), o qual pode ser um contaminante do ambiente em que a cortiça se encontra, ou pode formar-se na cortiça por ação de fungos na presença de cloro [10].

As moléculas de TCA encontram-se ligadas à matriz da cortiça através de dois tipos de ligações: forças de Van der Waals e pontes de hidrogénio. Apesar das ligações

entre a molécula e matriz serem relativamente estáveis devido às suas características, o TCA apresenta mais afinidade para o etanol do que para a cortiça, motivo que o fará migrar da rolha para o vinho, por questões de polaridade. Quando a superfície contaminada da rolha de cortiça entra em contacto direto com o vinho (ou com a câmara de expansão acima do vinho), dá-se a transferência de 2,4,6-TCA a partir da rolha de cortiça para o vinho [11].

2.3. Determinação de TCA em vinhos

Todas as etapas de um método analítico são fundamentais para a correta determinação de substâncias químicas presentes numa determinada matriz: colheita e preparação da amostra, separação dos analitos da matriz e quantificação do analito alvo, tratamento dos resultados obtidos e respetiva interpretação dos dados [12].

A preparação da amostra é um passo essencial na análise por cromatografia gasosa, influenciando a precisão e exatidão do resultado, o tempo e o custo da análise [13]. A preparação da amostra é necessária pois, de um modo geral, a matriz não pode ser diretamente injetada no cromatógrafo.

2.3.1. Microextração em Fase Sólida

As técnicas tradicionais de preparação da amostra empregam solventes orgânicos que são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Por outro lado, envolvem normalmente um grande número de etapas, o que aumenta a possibilidade de erros, além de aumentar o tempo de análise [12].

No início da década de 1990, Janusz Pawliszyn e os seus colaboradores da Universidade de Waterloo, no Canadá, desenvolveram a técnica de microextração em fase sólida [13–15]. A SPME, sigla para *solid-phase microextraction*, foi criada com o intuito de simplificar a etapa de preparação das amostras, diminuindo o tempo envolvido nas análises. É utilizada para uma ampla variedade de matrizes nos mais diferentes tipos de análises, sendo facilmente adaptável a analitos polares, apolares, voláteis e semi-voláteis [12].

A técnica de SPME consiste na captura dos analitos numa fibra capilar de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero apropriado, para posterior dessorção térmica no injetor de um cromatógrafo. A fibra encontra-se posicionada dentro da agulha que tem a finalidade de protegê-la quando não está em uso, bem como de perfurar o septo de borracha, momentos antes da exposição da fibra à amostra, ou na dessorção dos analitos no interior do cromatógrafo [12]. A Figura 2. 2 representa uma fibra comercial no seu suporte.

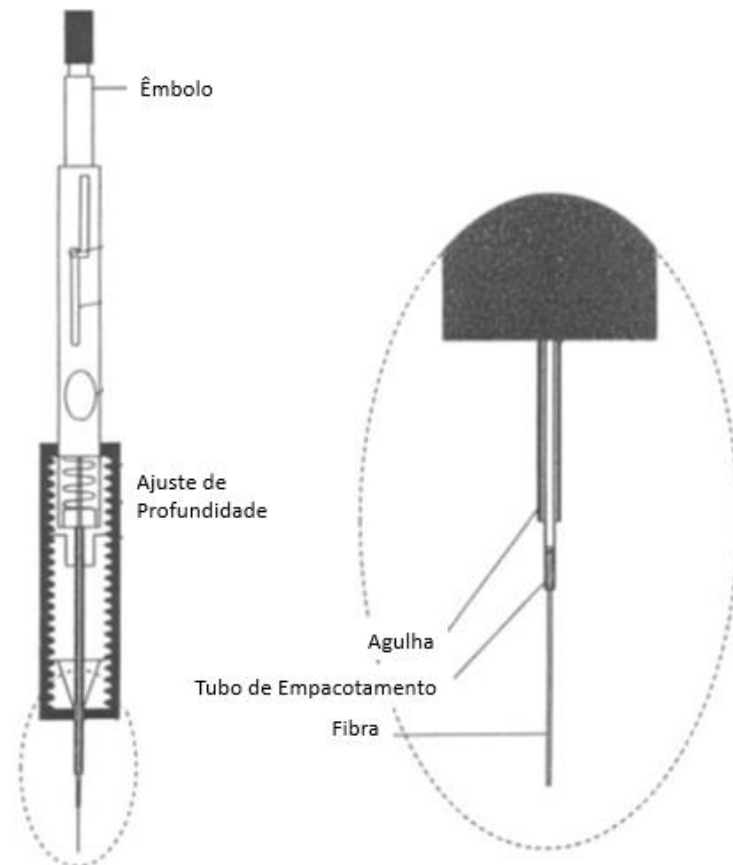


Figura 2. 2 - Diagrama Esquemático do Equipamento SPME [13]

Há dois modos de extração em SPME: a extração direta e a extração indireta. A extração direta é indicada para analitos pouco voláteis e, neste modo, a fibra é mergulhada diretamente na amostra líquida. A desvantagem existente é a possibilidade de adsorção de interferentes e de compostos de alta massa molecular que possam encurtar a vida útil da fibra. O modo de extração indireta, habitualmente conhecida por extração por *headspace* (HS), consiste em expor a fibra à atmosfera confinada dentro do frasco que contém a amostra [15]. É indicado para análise de compostos de média e alta volatilidade, tendo como vantagem o prolongamento da vida útil da fibra, já que esta não entra em contacto mecânico com a amostra, possui tempos de extração curtos, e a seletividade ser melhorada [13,15].

A fibra revestida é imersa na amostra ou no *headspace* da amostra, onde os analitos são concentrados [13]. Após atingir o equilíbrio, ou um tempo definido, a fibra é retirada e transferida para o injetor do GC, conforme exemplificado na Figura 2. 3.

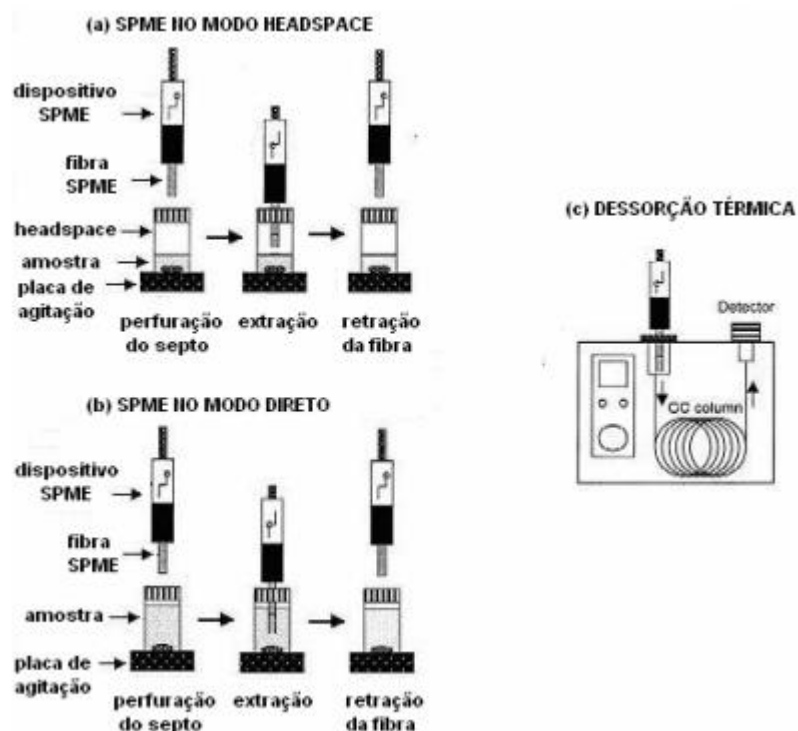


Figura 2. 3 - Etapas da microextração em fase sólida. (a) extração no modo headspace (b) extração no modo direto (c) dessorção dos analitos no cromatógrafo [12]

A dessorção térmica eficiente do analito, no injetor do GC, é dependente da volatilidade do analito, da espessura do revestimento da fibra, da profundidade da injeção, da temperatura do injetor e do tempo de exposição. Geralmente, a temperatura de dessorção ideal é aproximadamente igual ao ponto de ebulição do analito menos volátil [13].

A microextração em fase sólida é um método de extração que apresenta inúmeras vantagens relativamente às técnicas convencionais, das quais se destacam [14, 15]:

- Livre de solventes;
- Fácil manipulação;
- Tempo de extração relativamente curto, normalmente na ordem dos minutos;
- Não requer etapas prévias de limpeza;
- Elevada versatilidade, pois, existem disponíveis no mercado várias fases estacionárias;
- Aplicada na análise da composição volátil de matrizes sólidas, líquidas ou gasosas;

- Fornece resultados lineares para uma ampla gama de concentração dos analitos;
- Permite que a análise seja automatizada em combinação com diversos equipamentos como GC ou HPLC.

O mecanismo de HS-SPME baseia-se no equilíbrio do analito entre três fases – a amostra líquida, a fase de vapor sobre a amostra líquida e a fase extrativa (líquido polimérico ou sólido adsorvente). Logo, a análise de compostos voláteis do *headspace* é fortemente influenciada pela pressão de vapor dos voláteis no vial [12,16].

A quantidade total do analito nas três fases pode ser dada pelo balanço de massa [12]:

$$C_0 * V_A = C_F^\infty * V_F + C_H^\infty * V_H + C_A^\infty * V_A \quad \text{Equação 1}$$

sendo:

C_0 a concentração inicial do analito na amostra;

C_F^∞ a concentração no equilíbrio do analito na fibra extrativa;

C_H^∞ a concentração no equilíbrio do analito no *headspace*;

C_A^∞ a concentração no equilíbrio do analito na amostra;

V_F o volume da película de recobrimento da fibra;

V_H o volume do *headspace*;

V_A o volume da película de recobrimento da amostra.

A constante de distribuição do analito entre as fases fibra – *headspace*, K_{FH} , e *headspace* – amostra, K_{HA} , são definidas pelas equações 2 e 3.

$$K_{FH} = \frac{C_F^\infty}{C_H^\infty} \quad \text{Equação 2}$$

$$K_{HA} = \frac{C_H^\infty}{C_A^\infty} \quad \text{Equação 3}$$

A quantidade do analito recolhido na fibra extrativa, n , é calculada pela expressão [12]:

$$n = \frac{K_{FH} * K_{HA} * V_F * C_0 * V_A}{K_{FH} * K_{HA} * V_F + K_{HA} * V_H + V_A} \quad \text{Equação 4}$$

As principais variáveis que influenciam a pressão de vapor e o equilíbrio dos componentes voláteis no *headspace* são a temperatura de extração, o tempo de extração e o tipo de fibra. Outros parâmetros que afetam o processo são a quantidade de sal e o pH [16].

Nas extrações em *headspace* o aquecimento da amostra é uma ferramenta importante para melhorar a eficiência de extração, pois tem efeito significativo na cinética do processo. Temperaturas elevadas aumentam a velocidade de difusão através das fases, diminuindo o tempo necessário para se atingir o equilíbrio, mas provocando uma descida dos valores das constantes de distribuição. O aumento da temperatura provoca um aumento da pressão de vapor dos analitos da amostra, que passam mais rapidamente à fase de vapor. Não obstante, temperaturas muito elevadas podem alterar as propriedades da amostra ou do analito, ou até mesmo favorecer o processo de dessorção dos analitos, efeito contrário ao pretendido [14,16].

A quantidade de analito extraído depende do tempo que o processo demora a atingir o equilíbrio. A transferência de massa entre fases pode ser melhorada através de agitação. Esta facilita a difusão dos analitos na amostra, acelerando a transferência de massa e conseqüentemente a extração ocorre num menor período de tempo [14,17].

A sensibilidade do método de extração aumenta na presença de sal na solução. A adição de um eletrólito forte à amostra, provoca uma diminuição da solubilidade dos compostos pouco polares, promovendo a partição destes para a fase de vapor [4,14,17].

O pH tem uma influência considerável na extração de analitos ácidos ou básicos. Os compostos ácidos são mais facilmente extraídos a valores de pH baixos e vice-versa. Os analitos básicos permanecem na forma ionizada em amostras ácidas, levando à diminuição da sua volatilidade. Em amostras básicas o efeito é inverso [13].

A eficiência da extração depende das constantes de partição dos analitos entre a amostra, o *headspace*, e o revestimento da fibra. O valor que estas constantes assumem é dependente do tipo de fibra. Existem no mercado vários tipos de fases estacionárias para SPME, apresentando diferentes polaridades, espessuras de filme e tipos de interação com o analito. A escolha da fase estacionária mais adequada depende das propriedades físico-químicas dos analitos e da amostra, e as condições

experimentais devem ser otimizadas para cada tipo de analito e de fase estacionária [13]. A Tabela 2. 3 apresenta várias fibras disponíveis comercialmente.

Tabela 2. 3 - Fibras para SPME disponíveis no mercado e respectivas propriedades [13]

Revestimento de Fibra	Espessura do Filme (µm)	Polaridade	Temperatura Máxima de Operação (°C)	Técnica	Compostos a ser analisados
PDMS	100	Apolar	280	GC/HPLC	Voláteis
PDMS	30	Apolar	280	GC/HPLC	Apolares semi voláteis
PDMS	7	Apolar	340	GC/HPLC	Apolares semi voláteis
PDMS-DVB	65	Bipolar	270	GC/HPLC	Polares Voláteis
PDMS-DVB	60	Bipolar	270	HPLC	Propósito Geral
PDMS-DVB	65	Bipolar	270	GC	Polares Voláteis
PA	85	Polar	320	GC/HPLC	Polares Semi Voláteis (Fenóis)
CAR - PDMS	75	Bipolar	320	GC	Gases e Semi Voláteis
CAR- PDMS	85	Bipolar	320	GC	Gases e Semi Voláteis
DVB-PDMS-CAR	50/30	Bipolar	270	GC	Odores e Sabores

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

Por ser uma técnica de absorção/adsorção, a SPME pode estar sujeita aos chamados “efeitos de memória” ou “*carryover*”, que são caracterizados pela dessorção incompleta dos analitos absorvidos/adsorvidos na fibra. Este efeito pode ser mais acentuado no caso de compostos com alta afinidade para o revestimento da fibra [17].

A SPME tem sido usada com sucesso para a pré-concentração de TCA em amostras de cortiça, água e vinho, como será apresentado na secção 2.3.3.

2.3.2. Cromatografia Gasosa

A microextração em fase sólida combinada com a cromatografia gasosa (GC) apresenta um elevado potencial de aplicação, quer no estabelecimento de perfis voláteis globais de uma dada amostra, quer na quantificação dos analitos alvo [15].

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Este método baseia-se na injeção de uma amostra no equipamento, sendo esta vaporizada de imediato e introduzida num fluxo de gás, denominado fase móvel ou gás de arraste. Assim, percorrendo a coluna cromatográfica,

este fluxo com a amostra vaporizada, vai interagindo com a fase estacionária que reveste as paredes da coluna, ocorrendo a separação da mistura [18].

A fase móvel estabelece o transporte do analito na fase de vapor ao longo da coluna. Trata-se de um gás que deve ser inerte relativamente à amostra e à fase estacionária, atóxico, de elevada pureza e com grande eficiência de transporte, com o mínimo alargamento dos picos. O gás de arraste normalmente utilizado é o azoto (N₂) [19].

A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente, ou um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte [18].

Os dois fatores que influenciam a separação dos constituintes de uma amostra são a solubilidade e a volatilidade. Um componente solúvel na fase estacionária leva mais tempo a percorrê-la do que um componente insolúvel. As substâncias com maior afinidade para a fase estacionária são retidas durante mais tempo, logo deslocam-se mais lentamente. Quanto mais volátil a substância (maior pressão de vapor), maior a sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente se desloca ao longo da coluna.

Um sistema de GC é constituído por um injetor, coluna cromatográfica, forno com temperatura programável, detetor e sistema de aquisição de dados [19].

A injeção pode ser realizada em modo *split*, *splitless* ou *on-column*. No modo *split* a amostra é injetada no cromatógrafo e parte desta é purgada antes de entrar na coluna, de forma a injetar um volume menor que o volume total de injeção. No modo *splitless* toda a amostra é injetada no cromatógrafo. A temperatura inicial da coluna pode estar 40 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente de forma a condensar o solvente no início da coluna, originando picos mais estreitos. A injeção *on-column* é semelhante ao *splitless*, mas a injeção não é feita através de um injetor quente, mas sim diretamente na coluna [19].

A separação em GC é feita através de uma programação de temperatura na coluna cromatográfica, tornando assim o forno um componente importante do sistema. É necessário manter a temperatura dentro do forno o mais próximo possível das temperaturas programadas para análise. Assim, este deve possuir um tempo de resposta curto, bem como, capacidade de regressar à temperatura inicial num curto intervalo de tempo antes da análise seguinte.

A deteção dos analitos em GC pode realizar-se com recurso a vários detetores, como por exemplo, por espectrometria de massa (MS), com o detetor de captura de

eletrões (ECD, *Electron Capture Detector*), entre outros. O detetor faz a medição contínua das propriedades físico-químicas da fase móvel à saída da coluna cromatográfica, enviando um sinal para registo, que geralmente é diretamente proporcional à concentração do componente na amostra [15].

A cromatografia gasosa associada ao detetor de captura de eletrões é empregue na deteção de compostos eletronegativos, tais como compostos halogenados. A célula ECD contém internamente uma lâmina do isótopo radioativo níquel-63. As partículas emitidas por este colidem com as moléculas do gás de arraste ionizando-o. Os eletrões resultantes migram para o ânodo coletor, produzindo uma corrente elétrica. Esta forma uma nuvem de eletrões estáveis e livres na célula detetora. O sistema elétrico do ECD utiliza pulsos de voltagem periódicos para manter a corrente elétrica constante. Após a separação na coluna do GC os compostos entram no detetor, provocando a diminuição da corrente que se verifica na nuvem eletrónica. Este é um detetor não destrutivo e altamente sensível [19, 20].

A cromatografia gasosa acoplada ao detetor de captura de eletrões é normalmente usada para análise de 2,4,6-TCA e outros cloroanisóis, usando uma coluna apolar para separar o pico do analito de outros compostos do vinho [2, 21].

2.3.3. Métodos analíticos para determinação de TCA

Sendo uma combinação complexa de substâncias aromáticas, o vinho pode ser totalmente arruinado pela presença de um único composto em concentrações na ordem dos ng/L, como no caso do “gosto a rolha”. A análise de haloanisóis nos vinhos é da maior importância já que cerca de 1 a 7% das garrafas de vinho são afetadas por este defeito [22]

Outros compostos responsáveis por defeitos do aroma do vinho, e que não pertencem aos haloanisóis, são a 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), a geosmina, o 2-metilisoborneol (MIB), a 1-octen-3-ona, o 1-octen-3-ol e o guaiacol (2-metoxifenol). A MDMP é descrita sensorialmente como um mofo fúngico com um limiar de perceção sensorial de 2 ng/L, sendo considerada o segundo composto mais importante para o gosto a rolha, a seguir ao TCA [23]. Outros haloanisóis, como por exemplo, 2,4-dicloroanisol, 2,6-dicloroanisol, 2,3,4,6-tetracloroanisol e o pentacloroanisol possuem um limiar de perceção sensorial no vinho mais elevado e, raramente, contribuem de forma significativa para o gosto a rolha. Contudo, estes contaminates em combinação com o TCA podem amplificar a perceção do defeito do vinho [24].

A análise de TCA em vinhos é normalmente realizada por métodos sensoriais ou por análise cromatográfica, embora outros métodos também tenham sido propostos, como a análise por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) [25].

Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos vários métodos analíticos para a determinação de TCA em diversas matrizes com especial destaque para as rolhas, vinho e água. Atendendo aos baixos níveis em que este composto está presente, as características mais desejáveis nas metodologias são a elevada sensibilidade e a seletividade dos métodos de deteção associados a procedimentos de pré-concentração muito eficientes [23]. Recentemente foram publicados vários artigos de revisão sobre a análise de haloanisóis em vinho, água e cortiça [22, 23, 26].

A cromatografia em fase gasosa é a técnica de eleição para a análise de TCA, associada a diferentes detetores, particularmente, MS e ECD, embora outros tipos de detetores, como a espectrometria de mobilidade iónica (IMS) [27], e o detetor de emissão atómica (AED), também possam ser usados na análise de TCA [22].

A calibração dos métodos de GC-MS e de GC-ECD pode ser feita com recurso a diferentes padrões internos, como o 2,3,6-tricloroanisol e o 2,3,6-triclorotolueno, no primeiro caso, ou com isótopos deuterados (d3-TCA, d5-TCA). Estes últimos, associados com a deteção MS, permitem uma análise mais sensível e seletiva do TCA [22].

No caso do vinho, podem ser usadas várias técnicas de preparação de amostra mais utilizadas são a SPME, a técnica QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) ou técnicas semelhantes [28], a extração em barra de sorção com agitação (*Stir-Bar sorptive extraction*, SBSE) ([25,28] entre outras[23]).

A SPME tem sido a técnica de preparação de amostra mais utilizada na análise de TCA em vinhos devido às suas vantagens de não utilização de solventes e à facilidade de automatização. O modo de HS é preferido já que a SPME direta no vinho demonstrou menor sensibilidade, aumento da contaminação do injetor e diminuição do tempo de vida da fibra e da coluna de GC [23]. A fibra de PDMS foi a primeira a ser utilizada, e mantém-se como uma das mais usadas, a par com a fibra de DVB/CAR/PDMS, mais utilizada quando se pretende determinar vários *off-flavours*. Alguns autores mencionaram a melhor reprodutibilidade com a fibra de PDMS que pôde ser usada em mais de 80 análises de vinhos brancos e tintos [30]. De um modo geral, e após otimização dos parâmetros de extração, ambas as fibras podem ser usadas com eficiências semelhantes. As fibras de PA têm sido usadas na análise de halofenóis, pela maior polaridade destes analitos. As primeiras aplicações de HS-SPME na análise de

TCA em vinho e na cortiça foram publicadas em 1997 por Evans e colaboradores e por Fischer e Fischer, sendo esta técnica a mais utilizada nos últimos 20 anos [26].

Como a SPME é uma técnica extração não exaustiva, de equilíbrio, os resultados são fortemente dependentes das condições experimentais e da matriz. A otimização dos métodos de HS-SPME envolve a avaliação de vários parâmetros, tais como o tipo de fibra, o tempo e a temperatura de extração, a utilização de sais para alterar a força iônica da solução, a partição do soluto para o HS e a seleção do padrão interno. Os efeitos de matriz na SPME podem ser diminuídos através da utilização de um padrão interno deuterado ou da utilização do método da adição de padrão. Outras abordagens no sentido de diminuir o efeito de matriz são a diluição da matriz e a calibração em matriz [26].

Alguns autores propuseram a utilização da extração múltipla no HS, isto é, MHS-SPME, técnica que consiste na extração sucessiva do analito da amostra, até que este seja retirado na totalidade da matriz. Os halofenóis podem ser determinados com maior sensibilidade com as fibras normalmente usadas para o TCA, após derivatização [26].

O efeito do teor de etanol na SPME do TCA e de outros compostos relacionados tem sido verificado por vários autores, concluindo-se que a sensibilidade diminui com o aumento do teor alcoólico do vinho ou solução modelo [31].

A tabela 2.4 apresenta algumas das características mais importantes de métodos para a análise de TCA por SPME em vinhos descritos na literatura.

Tabela 2. 4 -. - Métodos reportados na literatura para a análise de 2,4,6-TCA e outros compostos relacionados com defeitos do aroma em vinhos por SPME (adaptado [26])

Metodologia	Analitos	Fibra	Tempo e T de extração (min; °C)	Adição de sal	Padrão interno	Deteção	LD (ng/L)	Referência
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; PCA; 2,4,6-TBA; 1-octen-3-ol; geosmina; MIB; IPMP; IBMP; DMMP; fenchol; fenchona	DVB/CAR/PDMS	60 min/45 °C	3 g NaCl	Análogos deuterados; 4-metil-2-pentanol	MS-SIM (EI)	0,9 - 10	[32]
HS-SPME-GC-MS	2,4,6-TCA; 2,4,6-TBA; PCA; geosmina; MIB; 1-octen-3-one; 1-octen-3-ol; 3-octanone; trans-2-octenol; IPMP; IBMP; fenchol; fenchona	DVB/CAR/PDMS	20 min/50 °C	3 g NaCl	Análogos deuterados; metilisobutil cetone; 2-octanol	MS-SIM e Scan (EI)	0,1 – 10	[33]
D-MHS-SPME-GC-MS-MS	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; PCA; 2,4,6-TCP; 2,3,4,6-TCP e PCP	DVB/CAR/PDMS	60 min/70 °C	-	-	MS-MS (CI e EI)	0.004 – 0.007	[34]
MHS-SPME-GC-MS-MS	2,6-DCA; 2,4,6-TCA; 2,4,6-TBA	DVB/CAR/PDMS	30 min/60 °C	3 M NaCl	-	MS – MS (IT)	7 - 15	[35]
MHS-SPME-GC-MS-MS	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; 2,4,6-TBA; PCA	DVB/CAR/PDMS	60 min/70 °C	-	-	MS-MS (CI e EI)	0,1 – 0,7	[36]
HS-SPME-GC-ECD	2,4,6-TCA	DVB/CAR/PDMS	70 min/40 °C	Saturado em NaCl	2,3,6-Tricloro-tolueno	ECD	0,3	[21]

D-HS-SPME- GC-ECD	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; TCP; 2,3,4,6-TCP; PCP	DVB/CAR/PDMS	60 min/70 °C	-	-	ECD	1 - 12	[37]
HS-SPME-MDGC- ECD	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; 2,4,6-TBA	DVB/CAR/PDMS	20 min/35 °C	1 g NaCl	Análogos deuterados	ECD	0.1	[38]
HS-SPME- GC-AED*	2,4-DCA; 2,6-DCA; 2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; PCA, 2,4-BDA; 2,4,6-TBA	DVB/CAR/PDMS	30 min/75 °C	-	5-Bromo-4- cloroanisol	AED	1,2 – 18,5	[39]
HS-SPME- GC-HRMS	2,4,6-TCA; 2,4,6-TBA	PDMS	30 min/21 °C	Saturado em NaCl	2,3,6- Tricloroanisol	MS-SIM (EI)	0,03	[40]
HS-SPME- GC-HRMS	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; PCA; 2,4,6-TBA; MIB	PDMS	30 min/40 °C	Saturado em NaCl	2,4,6-TCA-d ₅	MS-SIM (EI)	0,2 - 4	[30]
HS-SPME- GC-MS	2,4,6-TCA; geosmina	PDMS	40 min/35 °C	1.5 g NaCl	4- Bromoanisole	MS-SIM (EI)	< 0,5	[41]
HS-SPME-GC-MS (triplo quadrupolo)	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; PCA; 2,4,6-TBA	PDMS	10 min/40 °C	-	Análogos deuterados	MS-Scan (EI)	0.10 – 0.50	[42]
HS-SPME- GC-ECD-ICP-MS	2,4,6-TCA; 2,6-DCA; 2,4,6-TBA	PDMS	40 min/50 °C	4.8 M NaCl	-	ECD e ICP-MS	1.3 – 4.0	[43]
HS-SPME-GC- ECD	2,4,6-TCA	PDMS	30 min/25 °C	3 g NaCl	2,3,6-Tricloro- tolueno	ECD	0.18–0.37	[44]
D-HS-SPME- GC-ECD	2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TCA; TCP; 2,3,4,6-TCP; PCP	PA	60 min/70 °C	-	-	ECD	0,3 – 0,8	[36]

DMMP - 3,5-Dimetil-2-metoxipirazina; IBMP - 2-isobutil-3-metoxipirazin; IPMP - 2-isopropil-3-metoxipirazine; MIB – 2-metilisoborneol

CI – ionização química; EI – ionização por impacto electrónico; ICP - *Inductively coupled plasma*; IT – armadilha de iões (*ion trap*); SIM – *Single ion monitoring*

D – derivatização; * Vinho, Whisky e Brandy

2.4. Validação do Método

Na elaboração de métodos internos de ensaio (métodos não normalizados) que produzem resultados fiáveis, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos que demonstrem, recorrendo à validação, que esses métodos internos dão origem a resultados adequados à qualidade pretendida.

Um método de ensaio envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros, sistemáticos e/ou aleatórios, podendo, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final [45].

Para um controlo efetivo dos resultados e para a garantia da interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação. O objetivo fundamental da validação visa então confirmar que as características do método satisfazem as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controlo a aplicar no trabalho de rotina. A validação de um método é um processo contínuo que se inicia no planeamento da estratégia analítica e prossegue ao longo de todo o seu desenvolvimento [45].

Segundo a NP EN ISO 17025, “a validação é a confirmação e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são cumpridos”.

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento de parâmetros como gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exatidão [45].

2.4.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do mesmo produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de trabalho, na qual se pode correlacionar o valor de uma variável dependente (medida) por meio de uma variável independente (concentração) [18].

A análise de correlação linear é uma das formas de verificar a linearidade da curva de calibração. O coeficiente de determinação, R^2 , traduz a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais, ou seja, a variabilidade explicada pelo modelo, e deve apresentar um valor superior a 0,995 [18].

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, de modo a verificar se a regressão linear é a mais adequada para o caso em estudo. A partir de um conjunto de pares ordenados constrói-se a função de calibração linear, a função de calibração não linear (polinómio de segundo grau) tal como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} , sendo $S_{y/x}$ o desvio padrão da curva de calibração linear e S_{y^2} o desvio padrão da curva de calibração não linear.

A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela equação 5:

$$DS^2 = (N - 2) S_{y/x}^2 - (N - 3) S_{y^2}^2 \quad \text{Equação 5}$$

Onde N corresponde ao número de padrões de calibração.

O cálculo do valor teste, PG, é efetuado através da equação 6:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad \text{Equação 6}$$

Comparando o valor obtido com o valor tabelado da distribuição de Fisher:

- Se $PG \leq F$ a função de calibração é linear.
- Se $PG > F$ a função de calibração é não linear. Neste caso deve-se averiguar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho

2.4.2. Gama de trabalho

Em análises quantitativas, o intervalo de concentrações, experimental e estatisticamente validado, é designado por gama de trabalho. A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão.

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Neste o primeiro e o último padrão são analisados através de dez réplicas independentes [45].

A determinação das variâncias associadas ao primeiro e último padrão, S_1 e S_N respetivamente, é efetuada recorrendo à equação 7:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{Equação 7}$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^n y_{i,j}}{n_i}$$

para $i = 1$ e $i = N$.

sendo:

i o número do padrão ($i = 1, \dots, N$);

j o número de réplicas ($j = 1, \dots, n$);

N o número de pontos da curva de calibração;

n o número de réplicas.

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

$$PG = \frac{S_N^2}{S_1^2}, \text{ se } S_N^2 > S_1^2 \quad \text{Equação 8}$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_N^2}, \text{ se } S_1^2 > S_N^2 \quad \text{Equação 9}$$

Segundo a Norma ISO 8466-1, o valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição de Fisher, para $n-1$ graus de liberdade. As diferenças entre as variâncias do primeiro e último ponto são significativas se $PG > F$, e caso assim seja, a gama de trabalho deve ser reduzida até $PG \leq F$ [45].

2.4.3. Limiares Analíticos

O limite de deteção, LD, corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística, normalmente 95%, o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente.

O limite de quantificação, LQ, corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação do sinal se reduziu a valores razoáveis, normalmente 10% para se poder efetuar uma deteção quantitativa.

O intervalo compreendido entre o limite de deteção e o limite de quantificação deve ser considerado como uma zona de deteção semi-quantitativa e não quantitativa, não devendo ser reportados valores numéricos neste intervalo.

Limite de Detecção

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor. Quando a análise de um analito numa amostra passa por uma calibração linear, o LD pode ser estimado com base no desvio padrão residual, $S_{y/x}$, e no declive, m , conforme a equação 10.

$$LD = \frac{3,3 * S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 10}$$

Limite de Quantificação

Em termos práticos, o limite de quantificação corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. O LQ na quantificação do analito numa amostra pode ser estimado com base no desvio padrão residual e no declive pela equação 11.

$$LD = \frac{10 * S_{y/x}}{m} \quad \text{Equação 11}$$

A atualização destes Limites (Deteção e Quantificação) deverá ser efetuada sempre que ocorrem alterações de fatores de influência tais como analista, reagentes, equipamento, ambiente, entre outros, e sempre que se faz nova curva de calibração [18,31].

2.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Se uma curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo da gama de trabalho.

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

Na prática a sensibilidade pode ser obtida pelo declive da curva de calibração, evidenciado na equação 12. Como resultado, o método terá mais sensibilidade quanto maior for o declive.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\Delta L}{\Delta C} = m \quad \text{Equação 12}$$

2.4.5. Precisão

A norma ISO 5725 define precisão, como o grau de concordância entre valores medidos, obtidos por medições repetidas sobre uma mesma amostra ou padrão. A precisão pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Habitualmente, a precisão é expressa na forma de desvio padrão, s , calculado através da equação 13, ou pelo coeficiente de variação, CV (equação 14).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Equação 13}$$

$$\%CV = 100 * \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Equação 14}$$

Existem três medidas de avaliação da precisão: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio executado sobre uma mesma amostra nas mesmas condições experimentais (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e intervalos de tempo curtos).

A repetibilidade pode ser determinada a partir de um ensaio interlaboratorial ou intralaboratorial, em amostras de diferentes concentrações, considerando toda a gama de trabalho, em soluções padrão. A determinação da repetibilidade exige, no mínimo, 10 ensaios.

A estimativa da variância, S_r^2 , de um método pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises nas condições de repetibilidade pela equação 15:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) * S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad \text{Equação 15}$$

Sendo:

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

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

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

p o número de Laboratórios participantes.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade, r , é avaliado pela equação 16.

$$r = t * \sqrt{2} * S_{ri} = 1,96 * \sqrt{2} * S_{ri} = 2,8 * S_{ri} \quad \text{Equação 16}$$

Sendo:

S_{ri} o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados

O limite de repetibilidade, r , é o valor máximo para a diferença absoluta entre dois resultados da medição (x_i, x_{i-1}), em condições de repetibilidade, com nível de confiança específico (normalmente 95 %). Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|x_i - x_{i-1}| \leq r$

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade, CV_r , para cada nível de concentrações expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Equação 17}$$

Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, definindo exatamente quais as condições a variar tais como diferentes analistas, diferente intervalo de tempo ou diferentes equipamentos. A sua determinação é feita com recurso a cartas de controlo de amplitudes, pois assume-se que, ao realizar ensaios em dias diferentes, existe uma considerável variação aleatória dos parâmetros experimentais não controlados, que afetam o desempenho do método.

A precisão intermédia é determinada com base nos resultados de t padrões, analisados n vezes, segundo a equação 18.

$$S_{precisão} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=i}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t * (n-1)}} \quad \text{Equação 18}$$

Sendo:

$S_{\text{precisão}}$ o desvio-padrão relativo da precisão intermédia;

n o número de ensaios efetuados por padrão;

j o número do padrão

k o número do resultado obtido para o padrão;

\bar{y}_j a média aritmética dos resultados de n ensaios realizados sobre o padrão j

y_{jk} o resultado k do padrão j

t o número de padrões.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método realizado em condições experimentais diferentes, utilizando o mesmo método numa mesma amostra, fazendo variar determinadas condições como operadores, laboratórios, equipamentos e intervalo de tempo. A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. Assim, são analisadas uma série de amostras em p laboratórios participantes.

O valor da variância associada à reprodutibilidade é determinado segundo a equação 19.

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad \text{Equação 19}$$

Sendo:

S_{Ri}^2 a variância da reprodutibilidade;

S_{Li}^2 a variância interlaboratorial;

S_{ri}^2 a variância da repetibilidade.

Quando o objetivo passa pela implementação de um novo método de análise, o estudo da reprodutibilidade de um método é imprescindível, visto que assim surge a necessidade de averiguar a precisão do método sob diferentes condições de trabalho. O mesmo não tem tal importância na validação de um método num laboratório de análises, uma vez que a intenção passa por executar o método nesse mesmo laboratório, dando uso ao mesmo equipamento e condições experimentais que variam pouco ao longo do tempo.

2.4.6. Exatidão

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido, μ , e o valor de referência, τ . Este parâmetro, que está dependente de erros sistemáticos, pode ser estimado com base na análise de materiais de referência certificados, na participação em ensaios interlaboratoriais e na realização de ensaios de recuperação. Pode ser expresso através de:

- erro relativo (%Er);
- fator de desempenho (z-score);
- percentagem de recuperação (%Rec).

Uma forma de avaliar a exatidão de um método de ensaio é através do cálculo do erro relativo (Er), expresso em percentagem (%) conforme a equação 20.

$$\%Er = \frac{X_{exp} - X_v}{X_v} * 100 \quad \text{Equação 20}$$

Sendo

X_{exp} o valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v o valor aceite como verdadeiro.

O erro relativo exprime a componente de erros sistemáticos. Cabe ao Laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo. Um valor de Er inferior ou igual a 5 % em alguns casos pode ser satisfatório, sendo, no entanto, este valor meramente indicativo [45].

Outra forma de avaliar o desempenho do Laboratório é o cálculo do fator de desempenho Z ("z-score").

$$Z = \frac{X_{exp} - X_v}{S} \quad \text{Equação 21}$$

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

A avaliação poderá ser feita de acordo com seguinte escala de pontuação:



Figura 2. 4 - Escala de Avaliação do fator de desempenho

A recuperação, R, de um analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito. A escolha da concentração da fortificação deve ser baseada na gama de trabalho de modo a serem avaliadas concentrações nos extremos e o centro da gama [46]. O objetivo da percentagem de recuperação consiste na verificação da existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido por efeito de matriz [18]. A recuperação (%) é dada pela equação 22

$$\%R = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) * 100 \quad \text{Equação 22}$$

Sendo

C_1 a média da concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 a média da concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 a concentração conhecida do analito adicionada à amostra.

2.4.7. Incerteza

A validação do método passa sempre pela avaliação da incerteza global do mesmo [18]. A quantificação da incerteza pode ser realizada através da avaliação de componentes da incerteza a partir de cada fonte individual e depois determinando a incerteza combinada. A análise à contribuição significativa dos componentes da incerteza combinada é fundamental, pois na prática, é provável que existam contribuições significativas de um pequeno número de componentes [46].

No âmbito deste trabalho apenas iremos considerar as seguintes fontes:

- Incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração;
- Incerteza associada à diluição da amostra, quando aplicável;
- Incerteza associada à variabilidade / precisão / dispersão do método de ensaio.

A incerteza associada à interpolação da leitura da amostra na curva de calibração é dada por:

$$u_{\text{recta}} = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\left[\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{\text{lid}} - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

Equação 23

Onde:

S_y - desvio padrão

b – declive da curva de calibração

N – nº de padrões da curva de calibração

n – nº de réplicas utilizadas na amostra

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

y - Valor médio das leituras fornecidas pelo equipamento para os padrões de calibração

x_i - Concentração dos padrões de calibração

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

A incerteza associada à diluição da amostra é calculada pela lei da propagação de erros:

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

Equação 23

A incerteza da precisão é calculada através do desvio padrão de 10 ou mais amostras.

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

Equação 24

A incerteza combinada será dada por:

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

Equação 25

A incerteza expandida, para um grau de confiança de 95,45% é dada por:

$$u(\text{expandida}) = 2 * u(\text{combinada})$$

Equação 26

A incerteza associada ao resultado deverá ser apresentada com um ou no máximo dois algarismos significativos. O resultado do ensaio deverá ser apresentado com um nº de dígitos que será limitado pela incerteza do resultado [47].

2.4.8. Controlo da Qualidade

Uma das necessidades de um laboratório químico passa pela obtenção de resultados de análises químicas, que apenas é conseguida se os métodos apresentarem qualidade adequada ao uso que lhes será inculcado [18]. Após a fase inicial de estudo do equipamento e da técnica analítica, e aprovação do método de análise, o laboratório deve exercer um controlo da sua execução, de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm [48]

Qualquer análise química está sujeita a erro, pelo que é essencial por um lado minimizar e por outro, controlar a sua ocorrência. O laboratório deve estabelecer um sistema de controlo da qualidade (CQ) interno dos resultados, podendo recorrer a ferramentas como análise de brancos em paralelo com amostras, uso de análises em duplicado, repetição de análises anteriormente efetuadas, padrões de controlo, tratamento estatístico de dados como cartas de controlo, entre outras [49].

O controlo de brancos é uma grande ajuda para a deteção de eventuais contaminações ou deterioração de reagentes, permitindo ainda controlar (indiretamente) o limite de deteção e/ou quantificação. No ensaio em branco estão presentes todos os reagentes, exceto a amostra e o resultado obtido terá de ser inferior ao limite de deteção do método [18].

O recurso à análise da amostra em duplicado não garante que o resultado final tenha um menor erro (maior exatidão), pois se houver erro sistemático ambos os duplicados o possuirão. Contudo, se ocorrer um erro pontual num dos duplicados, então o valor médio terá um erro menor. O uso de duplicados é recomendado para análises com várias etapas e fontes de erro, assim como para amostras de difícil homogeneização e/ou estabilidade [18].

Os padrões de controlo são independentes dos padrões de calibração. Têm como objetivo o controlo da curva de calibração, e deve analisar-se no mínimo um padrão, de acordo com a concentração das amostras. A frequência de análise deve ser definida de acordo com o método de ensaio [20].

O emprego das cartas de controlo (CC) é um dos meios mais eficientes de exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos, e detetar erros [18].

Existem 3 tipos de cartas de controle: cartas de indivíduos, cartas de amplitudes e cartas de somas cumulativas, sendo a primeira a mais utilizada para resultados individuais e a segunda para resultados médios [46]. Ambas podem ser aplicadas aos parâmetros acima referidos (brancos, análises em duplicado, padrões de controle).

As CC de indivíduos consideram que a ocorrência de erros é aleatória, pelo que a distribuição de pontos em torno do valor médio (\bar{x}) segue a distribuição normal (ou de Gauss). Assim, a probabilidade de um ponto se situar a mais de 2 desvios-padrão (2δ) do valor médio é superior a 5%, e a mais de 3 desvios-padrão (3δ) excede 0,3% [18], [48]. As cartas de controle são então compostas por um conjunto de linhas que permitem concluir o controle ou não do processo. A linha central corresponde à média das leituras efetuadas, as restantes linhas são linhas de controle e aviso, superiores e inferiores conforme explícito na Figura 2. 5.

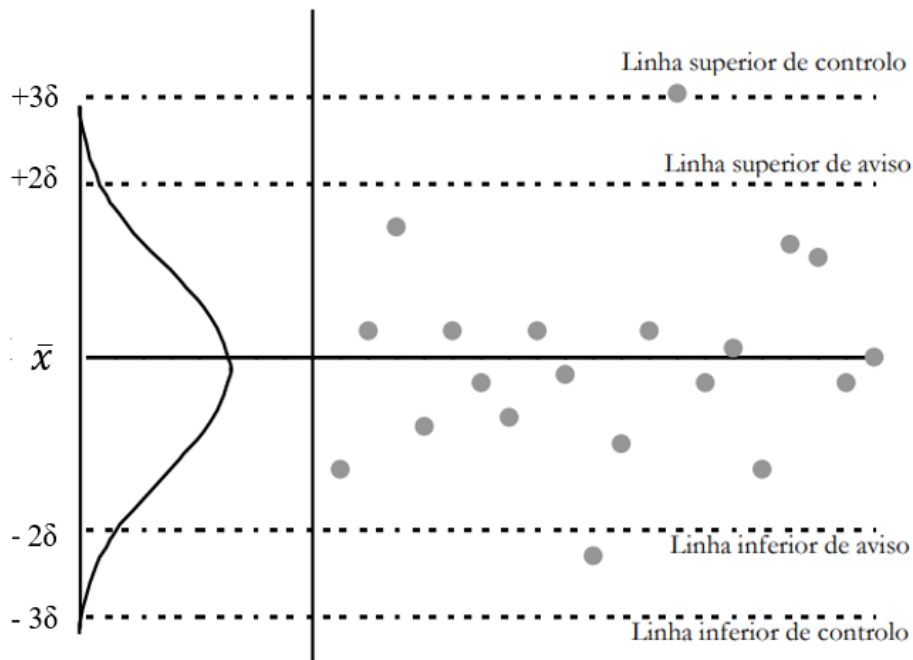


Figura 2. 5 - Princípios Estatísticos das Cartas de Controle (Adaptado de [48])

São consideradas anómalas e com carência de ações corretivas diversas situações [20,33]:

Ponto dos limites de controle;

- 9 pontos seguidos de um dos lados de média (existe um desvio sistemático relativamente ao valor estabelecido);
- 6 pontos consecutivos com tendência de subida ou descida (existe uma tendência não aleatória);

- 14 pontos seguidos em torno da linha central, alternando a subir e a descer (existe um fator temporal a afetar os dados)
- 8 pontos consecutivos fora de $\pm 1 \bar{\sigma}$ (existem duas distribuições em vez de uma só);

As cartas de amplitudes assumem que estando o método sob controlo estatístico, os desvios entre réplicas se mantêm dentro de limites pré-determinados. As cartas de amplitudes móveis são pouco usadas, consistindo num artifício para passar de dados individuais para dados médios, passando-se a monitorizar tendências [48].

1. Materiais e Métodos

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

1.1. Reagentes

No estudo realizado utilizou-se como padrão o 2,4,6-tricloroanisol (Supelco, Sigma Aldrich, 100 µg/mL em metanol), como padrão interno o 2,3,6-tricloroanisol (Dr.Ehrenstorfer GmbH, 10 ng/µL em ciclohexano). O cloreto de sódio (Honeywel Fluka Purris, p.a. ≥ 99,5%) foi utilizado como eletrólito para adição aos padrões e amostras.

Os padrões de matriz etanólica são preparados com etanol 12% (v/v) (este proveniente de diluição de Etanol 99% Vol AGA).

A água usada nos ensaios, quer na preparação das soluções, quer na diluição das amostras e ainda como eluente foi água de tipo I. Esta água é obtida através água da rede pública a qual passa por um desionizador de permuta iônica, uma coluna de resina e um filtro de 0,2 µm de tamanho de poros. A condutividade da água no final era inferior a 0 µS.

1.2. Equipamentos

O cumprimento do objetivo do presente trabalho implicou a utilização de diversos equipamentos de onde se destacam: Micropipeta Gilson 1 a 10 mL, Micropipeta Scientific eVol com seringas de 50 µL e 500 µL e uma balança analítica Mettler AE.



Figura 3. 1 – Micropipeta Scientific eVol

A determinação de TCA foi efetuada recorrendo a um cromatógrafo de gás com detetor de captura de eletrões Thermo Scientific Trace 1300 ECD (Figura 3. 2), equipado com uma coluna capilar TG-5MS, de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m.

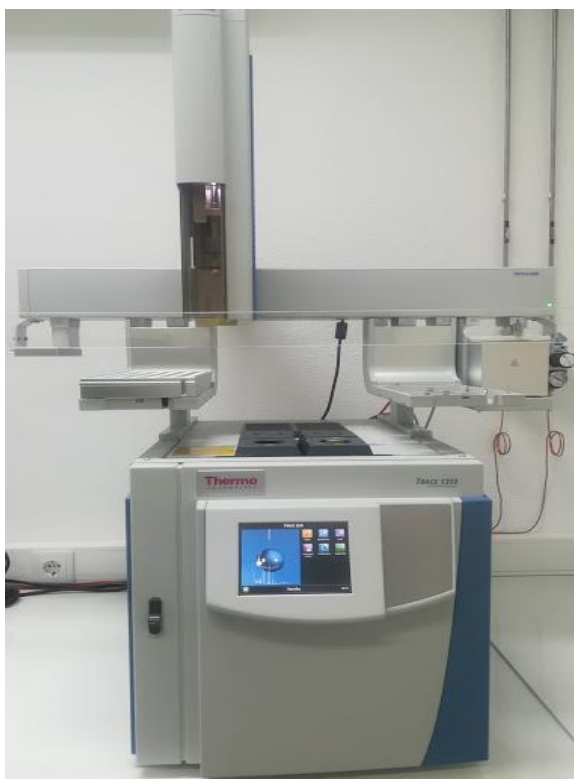


Figura 3. 2 - Cromatógrafo e “Autosampler” SPME

O programa de temperatura usado por forma a obter uma boa resolução está representado na Figura 3. 3.

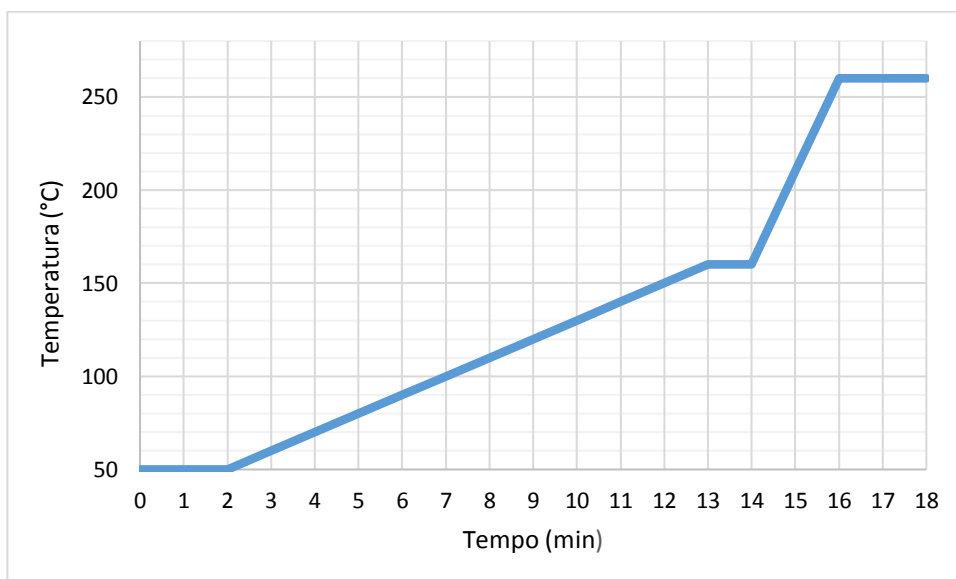


Figura 3. 3 -- Gráfico representativo do programa de temperatura do forno

A dessorção da fibra foi efetuada em modo *splitless* durante 2 minutos, com o injetor a 250°C a um caudal de 15 mL/min, e um fluxo de hélio (gás de arraste) de 1 mL/min. A temperatura do detetor correspondia a 280°C e o caudal de gás de makeup (Azoto) era de 20 mL/min.

1.3. Microextração em fase sólida

Os parâmetros gerais da SPME realizados num “autosampler” Supelco foram os seguintes:

Fase Estacionária: PDMS 100 µm (Supelco, Fused Silica, Autosampler);

Temperatura de extração: 40°C;

Tempo de extração: 15 minutos sob agitação;

Agitação: ciclos de 20 segundos ligada e 60 segundos desligada;

Velocidade de agitação: 250 rpm

Temperatura de dessorção: 250°C;

Tempo de dessorção: 2 minutos;

Viais de 20 mL com tampa roscada de septo;

Estas condições são baseadas na Norma ISO 20752:2014 – Rolhas-Determinação de 2,4,6-TCA, pois o laboratório tem implementado este método e efetua análises de rolhas diariamente.

A otimização do método levou à realização de ensaios em diferentes condições de SPME que são descritas na Tabela 3. 1.

Tabela 3. 1 – Condições SPME utilizadas nos diferentes ensaios de otimização

	Tempo de Extração(min)	Tempo de Dessorção (min)
Ensaio A	15	2
Ensaio B	30	2
Ensaio C	30	5
Ensaio D	25	5
Ensaio E	20	5
Ensaio F	25	5

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

A solução comercial de 2,4,6-TCA tem concentração de 100 µg/mL, pelo que é necessário efetuar duas diluições para obter uma solução de concentração final pretendida de 1 µg/L.

A solução comercial é disponibilizada em ampolas de 1 mL, sendo esta diluída em metanol para uma concentração de 1 mg/L (solução stock I). A solução stock I é posteriormente diluída para 1 µg/L dando origem à solução stock II, que é usada para preparação de padrões da curva de calibração e padrões de controlo.

O padrão interno de concentração 10 ng/µL é obtido no mercado em viais de 10 mL, sendo diluído para uma concentração de trabalho de 10 µg/L. Os cálculos para diluição destas soluções estão referenciados no anexo A.

As soluções stock I e stock II de 2,4,6-TCA e a solução diluída de 2,3,6-TCA são armazenadas no frigorífico em viais devidamente acondicionados isolados da luz. O analito é armazenado em viais de 1,5 mL para evitar perdas por volatilização com a constante abertura dos mesmos para construção de curvas de calibração. Viais de 20 mL são usados para armazenar a solução de padrão interno. As diferentes características dos viais permitem a sua fácil identificação visual, evitando contaminações cruzadas (Figura 3. 4).

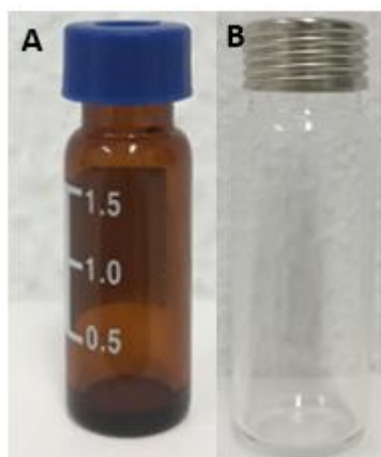


Figura 3. 4 - Viais de armazenamento de soluções: (A) solução stock II de 2,4,6-TCA e (B) solução de 2,3,6-TCA.

1.5. Preparação de soluções padrão e padrões de controlo

As soluções padrão são preparadas com vinho tinto a 13% (v/v) previamente analisado sensorialmente por painel de prova treinado, e por análise cromatográfica por forma a aferir que não está contaminado com TCA. O vinho é armazenado no frigorífico, num “bag in box” (Figura 3. 5).



Figura 3. 5 - Embalagem de armazenamento do vinho

As soluções padrão são preparadas a partir da solução stock II de 2,4,6-TCA 1 µg/L. Os padrões de calibração são preparados diretamente em viais de 20 mL utilizando o volume conveniente de solução stock II conforme a Tabela 3. 2.

Tabela 3. 2- Volumes de solução stock II de 2,4,6-TCA em função dos padrões de calibração

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)
0,5	5,0
1,0	10,0
2,0	20,0
3,5	35,0
5,0	50,0
6,5	65,0
8,0	80,0
9,5	95,0

Os padrões de controlo utilizados têm concentrações e 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 ng/L e são analisados a cada dez amostras. Os volumes de solução stock II usados estão expostos na Tabela 3. 3.

Tabela 3. 3 - Volumes de solução stock II de 2,4, 6-TCA em função dos padrões de controlo

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)
1,5	15,0
2,0	20,0
3,0	35,0
4,0	50,0

A preparação dos padrões de calibração e padrões de controlo diretamente em viais implica que o volume final dentro do vial seja ligeiramente superior aos 10 mL, e como tal a concentração final no vial é inferior à estabelecida inicialmente. Os cálculos das concentrações reais dos padrões estão expressos no anexo A, bem como os cálculos dos volumes de solução de 2,4,6-TCA a adicionar.

Para viais de 20 mL são adicionados 3 gramas de cloreto de sódio (NaCl), 10 mL do vinho padrão, o volume de solução de 2,4,6-TCA pretendido e solução de padrão interno 2,3,6-TCA. Os viais são fechados com tampas de rosca com septo. No caso dos ensaios com matriz diluída, são adicionados 5 mL de água e 5 mL de vinho padrão, bem como os restantes componentes mencionados.

1.6. Preparação das Amostras

As amostras são previamente diluídas para o mesmo grau álcool da curva de calibração, 6% (v/v), em função do seu grau alcoólico. Os volumes de vinho a usar nas diluições estão expressos na Tabela 3. 4.

Tabela 3. 4– Diluições em função do grau alcoólico das amostras

Concentração Inicial do Vinho (%(v/v))	Concentração Pretendida (%(v/v))	Volume de Vinho a colocar no vial (mL)	Volume de Água do Tipo I a colocar no vial (mL)
13%	6,5%	5,0	5,0
14%		4,6	5,4
19%		3,4	6,6
20%		3,3	6,7
21%		3,1	6,9
40%		1,6	8,4

Para viais de 20 mL são adicionados 3 g de cloreto de sódio (NaCl), volume conveniente da amostra e de água em função do padrão e 20,0 µL de padrão interno 2,3,6 TCA. Os viais são fechados com tampas de rosca com septo.

O armazenamento das amostras para análise é feito no frigorífico em frascos âmbar por forma a reproduzir o máximo possível as condições de garrafa, ou seja, ambiente escuro (Figura 3. 5).



Figura 3. 6 - Frasco âmbar usado para armazenamento de amostras de vinho

2. Resultados e Discussão

A determinação do tempo de retenção do analito e do padrão interno pode ser efetuada analisando cromatogramas de ensaios em branco e ensaios com concentrações diferentes de 2,4,6-TCA. Conforme se pode observar na Figura 4. 1, na Figura 4. 2 e na Figura 4. 3 que representam respectivamente o branco, o padrão de menor concentração de 2,4,6-TCA (0,5 ng/L) e o padrão de concentração superior de 2,4,6-TCA (9,5 ng/L), a área do padrão interno mantém-se constante nos três casos, enquanto a área do analito aumenta consideravelmente. Os cromatogramas abaixo foram obtidos numa primeira fase de ensaios.

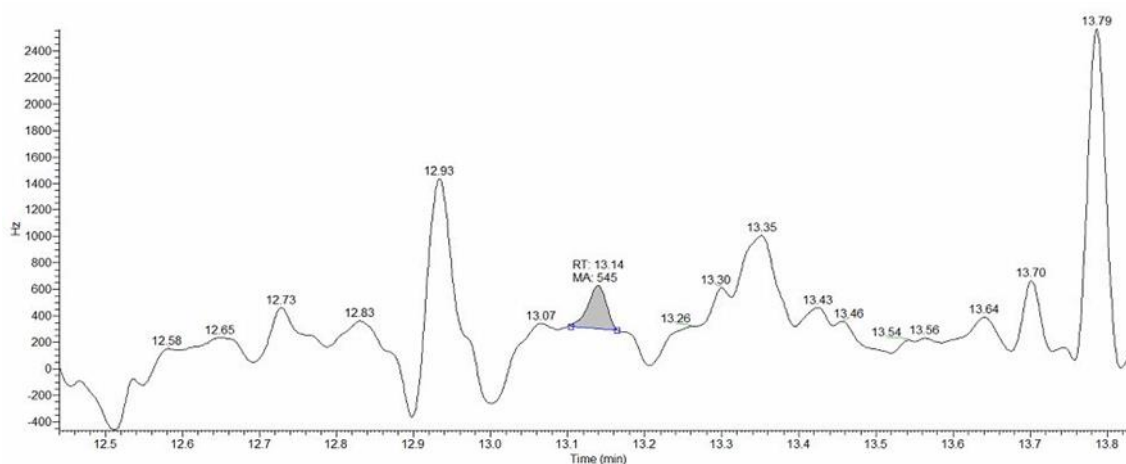


Figura 4. 1 - Extrato de um cromatograma obtido da análise a um vial branco (vinho, sal e padrão interno) entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

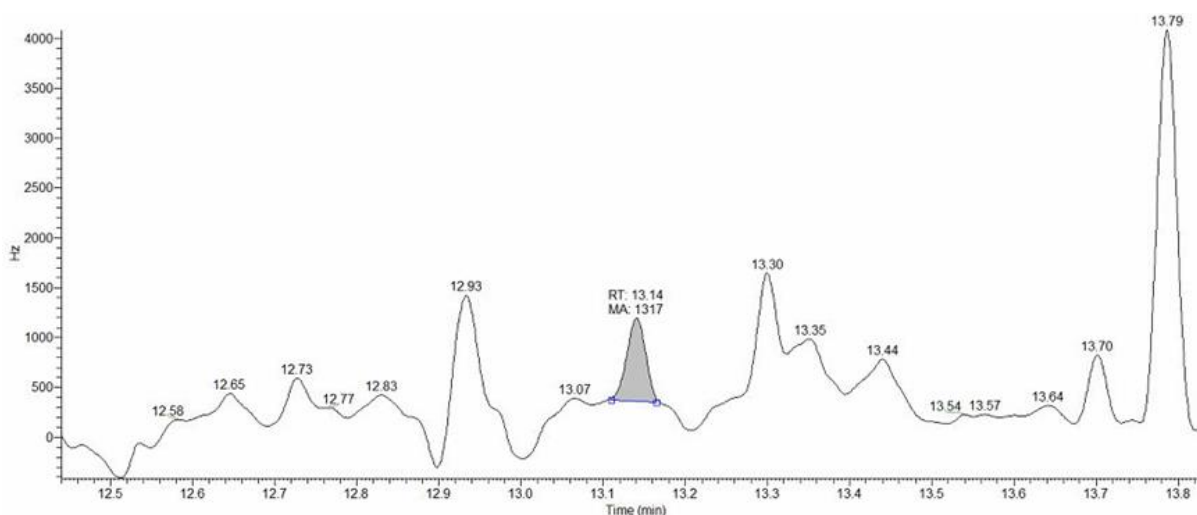


Figura 4. 2 - Extrato de um cromatograma obtido da análise a um vial de 2,4,6-TCA 0,5 ng/L entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

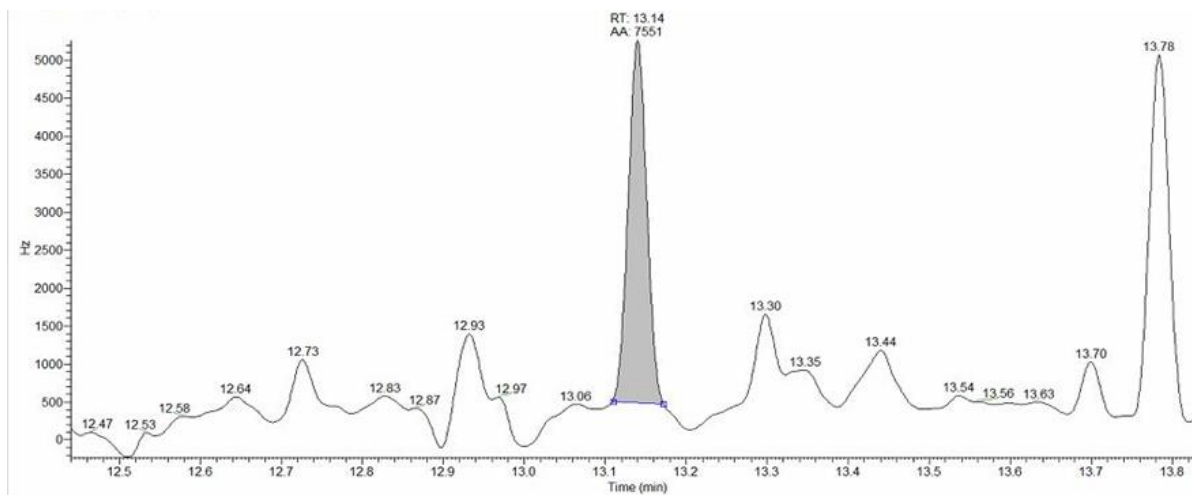


Figura 4. 3 - Extrato de um cromatograma obtido da análise a um vial de 2,4,6-TCA 9,5 ng/L entre 12 e 14 minutos de tempo de retenção

A análise das figuras permite concluir que o tempo de retenção do analito 2,4,6-TCA é de cerca de 13,14 minutos, enquanto o de 2,3,6-TCA é 13,79 minutos. Isto pode ser sustentado também pela análise dos valores das áreas dos picos nestes tempos de retenção, conforme demonstrado na Figura 4. 4.

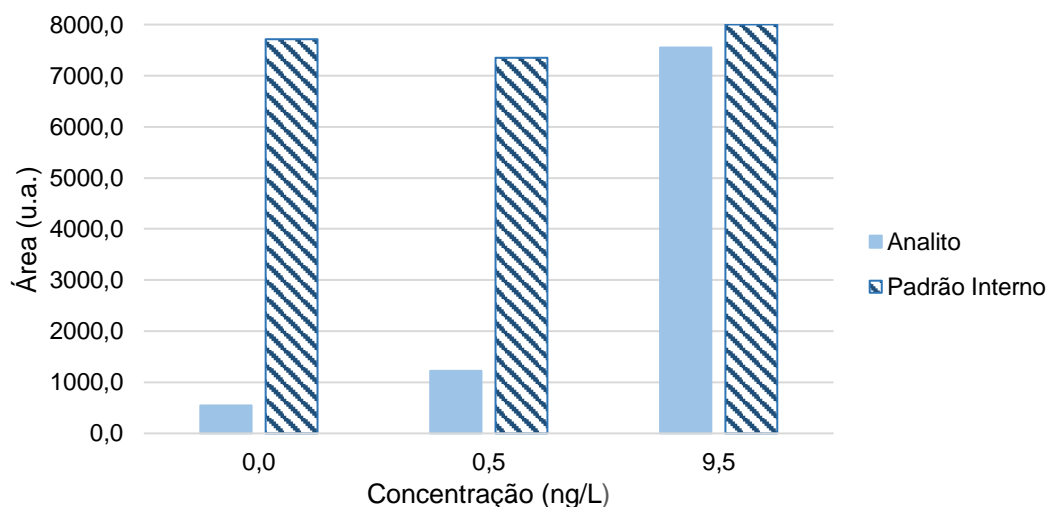


Figura 4. 4 - Gráfico comparativo das áreas dos picos do analito e do padrão interno para amostras de diferentes concentrações

A pesquisa bibliográfica revela a existência de diversas contradições entre as fontes bibliográficas e as práticas adotadas pelos laboratórios que efetuam análises ao 2,4,6-TCA. As indústrias rolheiras e outros laboratórios acreditados, utilizam curvas de calibração com matriz de solução etanólica 12% (v/v) para tratamento dos resultados associados às amostras de vinho. Ou seja, não efetuam uma curva específica de matriz vínica, utilizando a curva de matriz etanólica. Assim, numa primeira fase, tornou-se necessário verificar a viabilidade da quantificação de 2,4,6-TCA em vinho utilizando curvas de calibração de solução etanólica.

2.1. Estudo da viabilidade de uso de matriz etanólica 12% (v/v)

A curva de calibração efetuada com matriz etanólica é preparada do mesmo modo que a curva de matriz vínica. São adicionados 10 mL de solução etanólica a 12% (v/v), 3 g de NaCl, 20 µL de padrão interno e a quantidade necessária de analito em função da concentração pretendida. Este estudo foi realizado usando as condições de extração expressas no capítulo 3.3 para um tempo de extração de SPME de 15 minutos e 2 minutos de dessorção da fibra.

A Figura 4. 5 e a Figura 4. 6 representam respetivamente os cromatogramas completos de uma solução etanólica e de uma amostra de vinho.

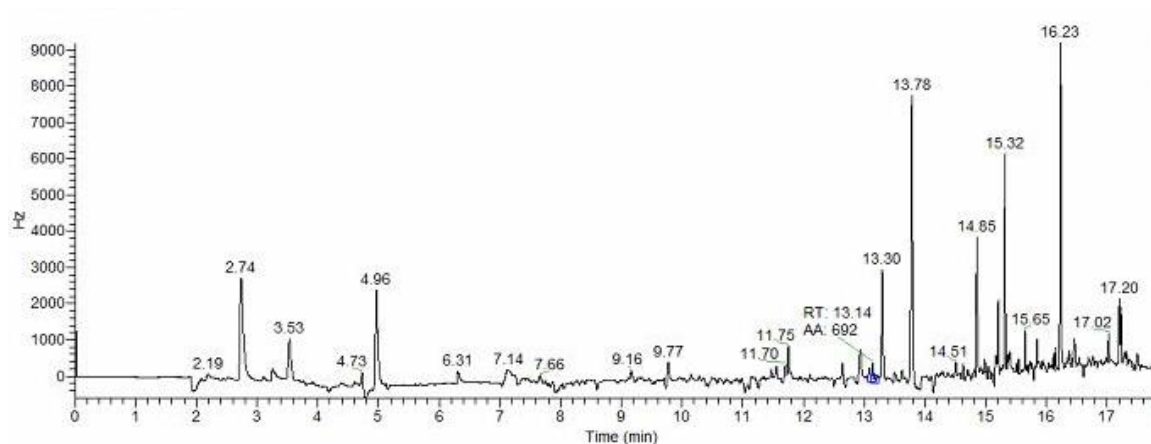


Figura 4. 5 - Cromatograma obtido da análise de 10 mL de solução etanólica com 3 g de sal e 20 µL de padrão interno

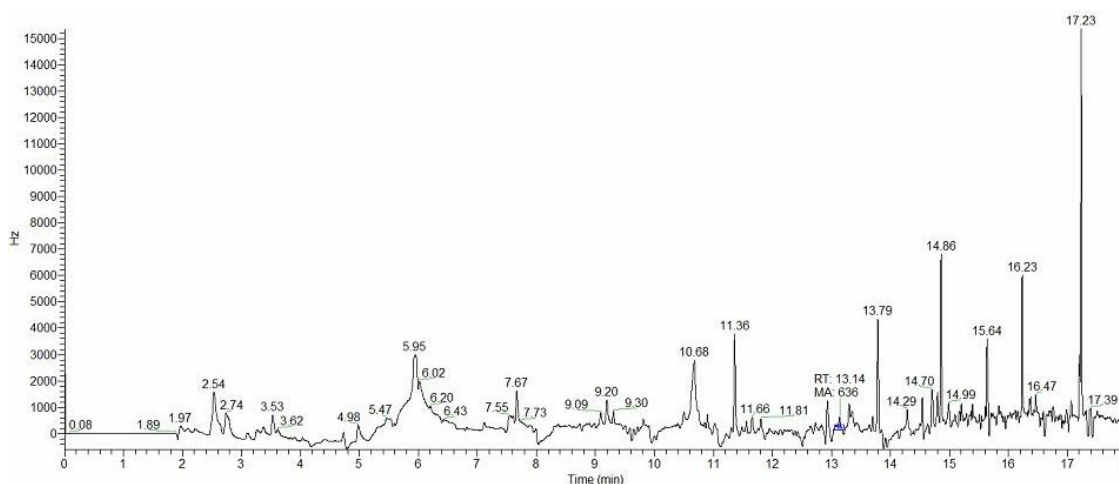


Figura 4. 6 - Cromatograma obtido da análise de 10 mL de vinho com 3 g de sal e 20 µL de padrão interno

É bem visível nas figuras que a matriz vínica apresenta mais ruído que a matriz etanólica, sendo que, no entanto, os picos correspondentes ao analito e ao padrão interno estão presentes nos mesmos tempos de retenção.

Na Tabela 4. 1 estão apresentados os valores obtidos para as áreas dos picos cromatográficos de 2,4,6-TCA e do padrão interno nos diferentes padrões de calibração.

Tabela 4. 1 - Resultados obtidos para as áreas de analito e padrão interno de diferentes concentrações de padrões de calibração de matriz etanólica

Concentração de 2,4,6-TCA (ng/L)	Área do pico de 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do pico de 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)
0,0	244,0	12511,1
0,5	953,3	13944,1
1,0	1718,7	15257,5
2,0	2785,1	16294,2
2,5	3527,4	14800,0
5,0	6540,3	16022,4
10,0	11552,0	14857,5
		14812,4
		1285,2
		8,7
		Média
		Desvio padrão
		Desvio padrão relativo (%)

Verifica-se que a média das áreas do padrão interno dos padrões de calibração é de 14812.4 u.a..

Ao efetuar uma mesma análise a vinho, os valores de área de padrão interno alcançados são de uma ordem de grandeza mais baixa. A Tabela 4. 2 apresenta os valores obtidos para diferentes concentrações de analito no vinho.

Tabela 4. 2 - Resultados obtidos para as áreas de analito e padrão interno de diferentes concentrações de analito em matriz vínica

Concentração de 2,4,6-TCA (ng/L)	Área do pico de 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do pico de 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)
0,0	398,7	8146,5
2,0	2371,3	8533,6
5,0	5005,4	5791,1
9,5	9422,3	6911,4
		7345,6
		1246,0
		17,0
		Média
		Desvio padrão
		Desvio padrão relativo (%)

Pela comparação dos valores apresentados na Tabela 4. 1 e na Tabela 4. 2, conclui-se que a área do padrão interno na matriz vínica é cerca de metade da verificada na matriz etanólica. Pode também perceber-se que a resposta do padrão interno não é

tão estável em matriz vínica, uma vez que o desvio padrão relativo neste caso é elevado (17%), comparado com o da matriz etanólica (8,7%). No caso da área do analito as diferenças não são tão acentuadas. A Figura 4. 7 e a Figura 4. 8 demonstram, respetivamente, as variações das áreas do analito e a consequência causada na razão de áreas, pelo uso de matriz vínica ou matriz etanólica.

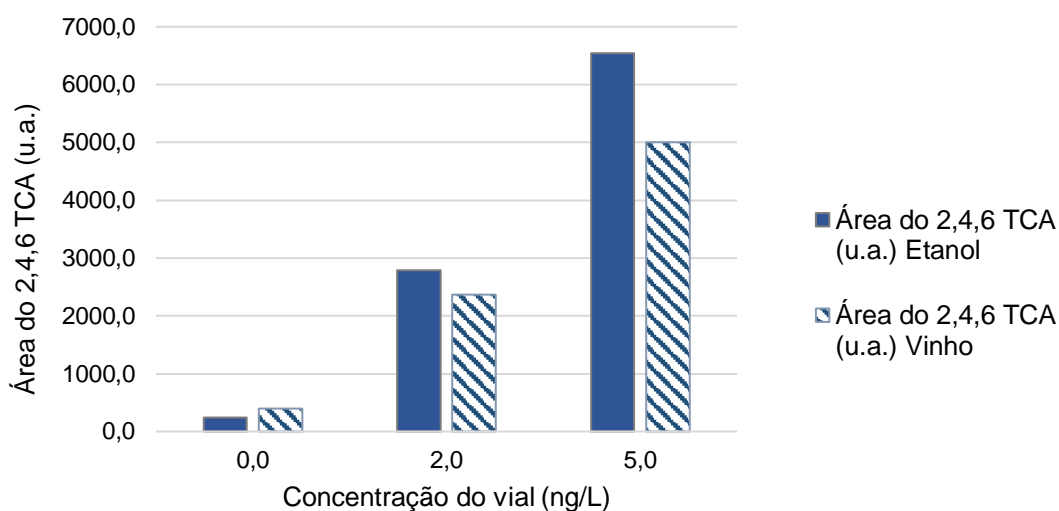


Figura 4. 7 – Comparação das áreas do analito em diferentes padrões em base etanólica e em base vínica.

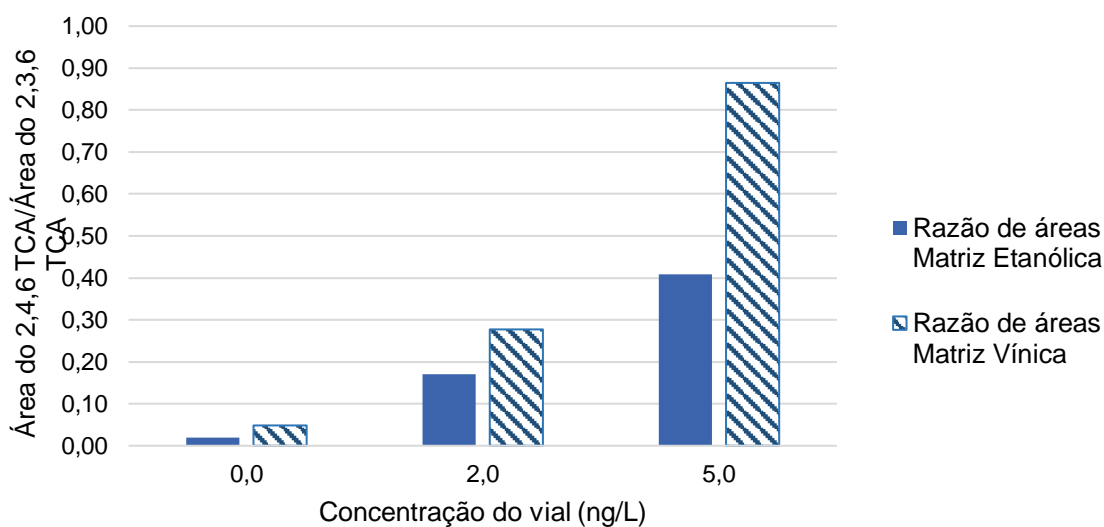


Figura 4. 8 - Gráfico comparativo da razão de áreas de matriz etanólica e matriz vínica

Efetivamente a diferença entre a razão das áreas é significativa, sendo a razão em matriz vínica em média 2 vezes superior à razão em matriz etanólica.

Conclui-se, portanto, que para o caso do vinho analisado, não seria viável utilizar uma curva de calibração de solução etanólica para interpretar os resultados, pois estar-se-ia a incorrer em erro ao utilizar a razão de áreas. O valor de concentração obtido

seria maximizado em relação ao valor real, uma vez que a resposta da área do padrão interno é metade.

2.2. Otimização do Método

A otimização do método de análise do 2,4,6-TCA ocorreu fazendo variar um parâmetro de cada vez e verificando o efeito na linearidade do método e na reprodutibilidade. Foi realizada uma sequência de ensaios (A-G) que se descrevem a seguir. As condições usadas nos ensaios estão resumidas na Tabela 4. 3.

Tabela 4. 3 – Resumo das condições dos ensaios de A a G

	Tempo de Extração (min)	Tempo de Dessorção (min)	Volume de Padrão Interno (µL)	Diluição	Gama de trabalho (ng/L)
Ensaio A	15	2	20	Sem diluição	0,5 - 9,5
Ensaio B	30	2	20	Sem diluição	0,5 - 9,5
Ensaio C	30	5	20	Sem diluição	0,5 - 9,5
Ensaio D	25	5	20	Sem diluição	0,5 - 9,5
Ensaio E	20	5	50	Sem diluição	0,5 - 9,5
Ensaio F	25	5	50	0,5	0,5 - 9,5
Ensaio G	25	5	50	0,5	1,0 - 8,0

Ensaio A

No ensaio A, a extração do 2,4,6-TCA foi efetuada com as seguintes condições de SPME: 15 minutos de extração a 40 °C, 2 minutos de dessorção e adição de 20 µL de Padrão Interno.

Na Figura 4. 9 e Figura 4. 10 estão registados os cromatogramas obtidos para uma solução de 2,4,6-TCA de concentração 0,5 ng/L e 9,5 ng/L, respetivamente. O pico do 2,4,6-TCA ocorre ao tempo de retenção de 13,14 minutos e o do padrão interno, 2,3,6-TCA, a 13,79 minutos.

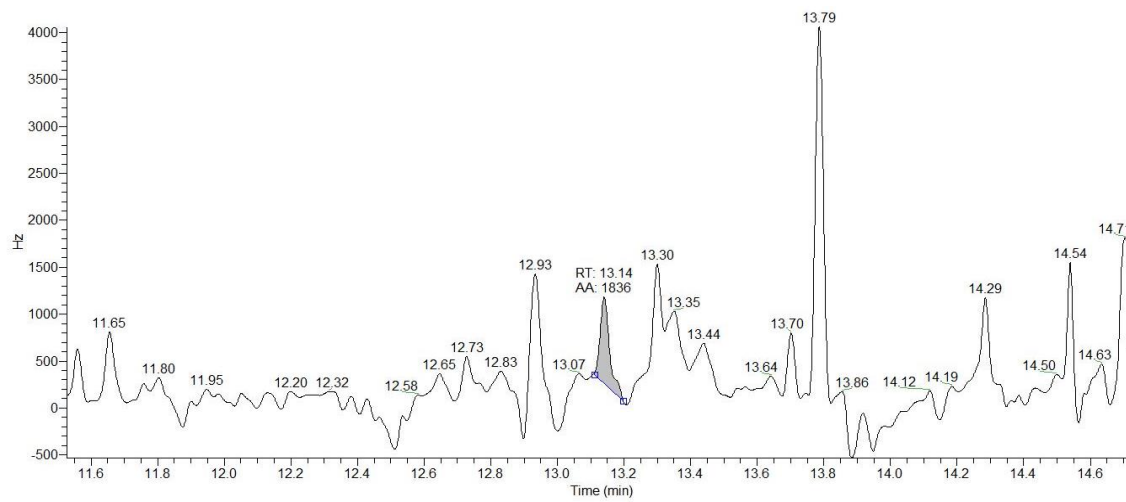


Figura 4. 9 - Cromatograma obtido para o padrão de 0,5 ng/L 2,4,6-TCA no ensaio A

A curva de calibração para o 2,4,6-TCA em matriz vínica por SPME-GC/ECD foi obtida utilizando os padrões de calibração referidos: 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5 ng/L.

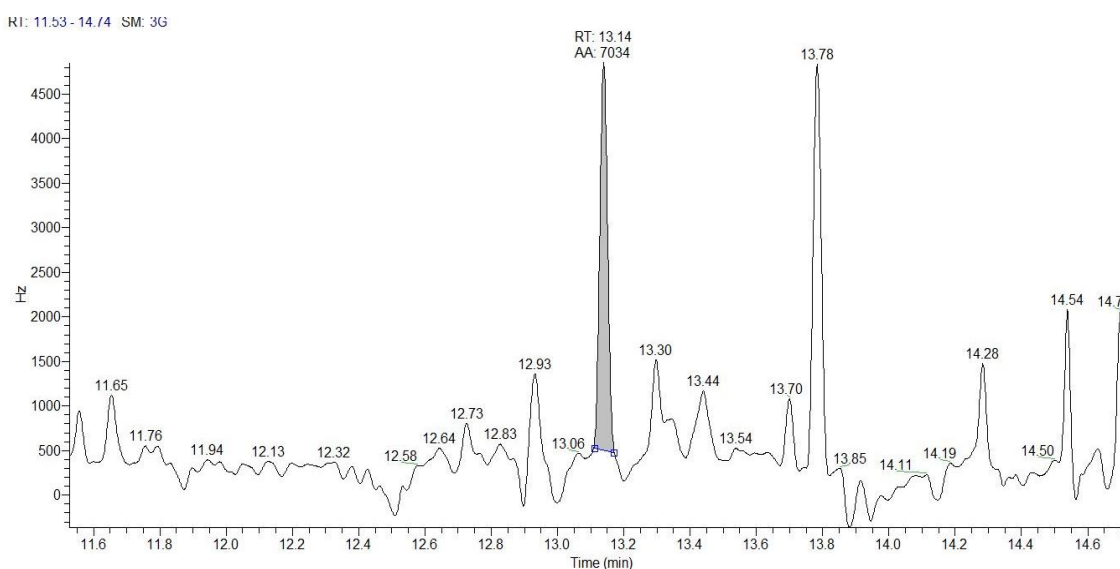


Figura 4. 10 - Cromatograma obtido para o padrão de 9,5 ng/L 2,4,6-TCA no ensaio A

A Figura 4. 11 ilustra os resultados obtidos no ensaio A, verificando-se não existir uma boa linearidade entre a razão das áreas do pico de 2,4,6-TCA e de 2,3,6-TCA (PI) e a concentração de 2,4,6-TCA ($R^2= 0,6476$) na gama de concentrações estudada.

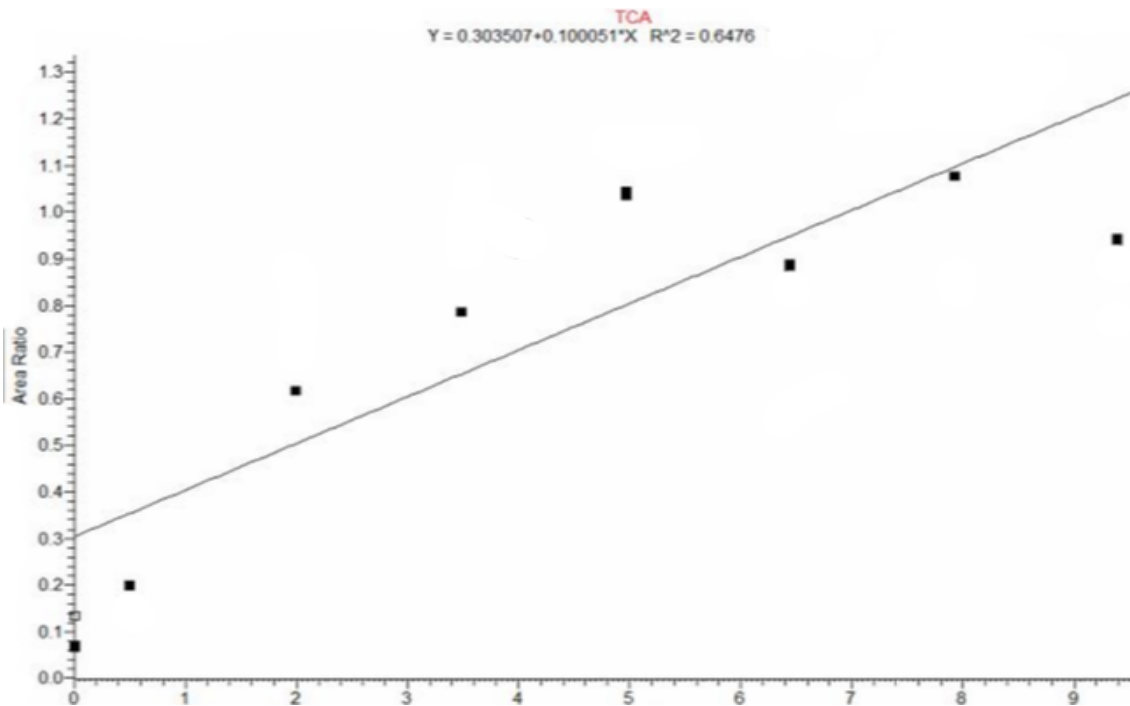


Figura 4. 11 - Curva de calibração correspondente ao ensaio A.

A não linearidade pode estar relacionada com dificuldades na definição dos picos cromatográficos para os padrões de concentração mais baixa (Figura 4. 9) em que há um alargamento do pico correspondente ao analito e uma linha de base menos estável. Nos cromatogramas dos padrões de concentrações mais elevadas (Figura 4. 10) isto não se verifica, no entanto, analisando a Figura 4. 8 é perceptível que a razão de áreas é mais baixa do que a dos padrões de menor concentração, o que não seria expectável.

Este ensaio foi replicado 2 vezes e os resultados obtidos foram idênticos. No anexo B pode encontrar-se as tabelas com os todos os dados.

Um dos motivos para esta ocorrência pode ser o tempo de extração da SPME, o qual pode não ser suficiente para garantir sensibilidade na análise do analito quando este se encontra em concentrações mais baixas. Neste sentido, foram testados tempos de extração por SPME superiores.

Ensaio B

No ensaio B o tempo de extração foi fixado em 30 minutos, mantendo-se todas as outras condições do ensaio A. A Figura 4. 12 e Figura 4. 13 apresentam os cromatogramas obtidos para soluções de 2,4,6-TCA 0,5 ng/L e 9,5 ng/L, respetivamente.

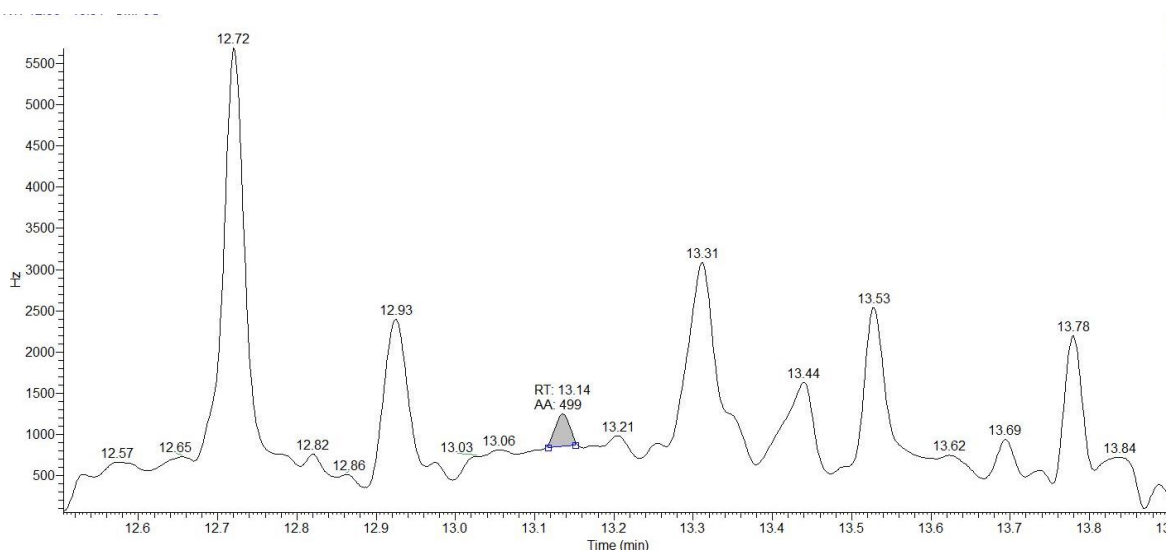


Figura 4. 12 - Cromatograma obtido para o padrão 0,5 ng/L 2,4,6-TCA no ensaio B

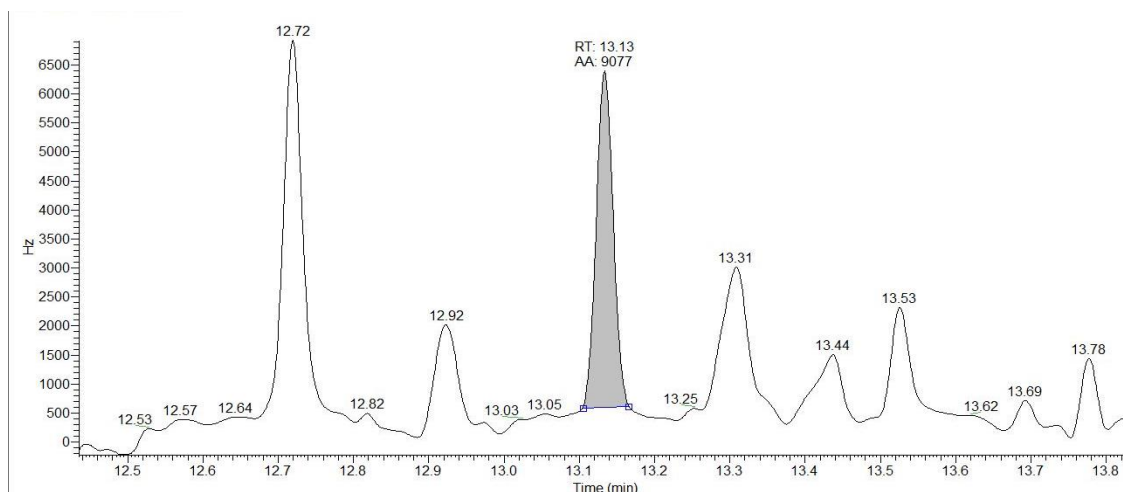


Figura 4. 13 - Cromatograma obtido para o padrão 9,5 ng/L 2,4,6-TCA no ensaio B

A partir da análise dos cromatogramas traçou-se a curva de calibração (Figura 4. 14). Conforme é possível observar, continua a não existir uma boa linearidade ($R^2=0,4651$) para a gama de concentrações de 2,4,6-TCA estudada. Pode-se verificar que as razões das áreas dos picos aumentaram para as soluções de concentração mais

baixas, no entanto o problema da baixa resposta dos padrões mais elevados em relação aos restantes persistiu.

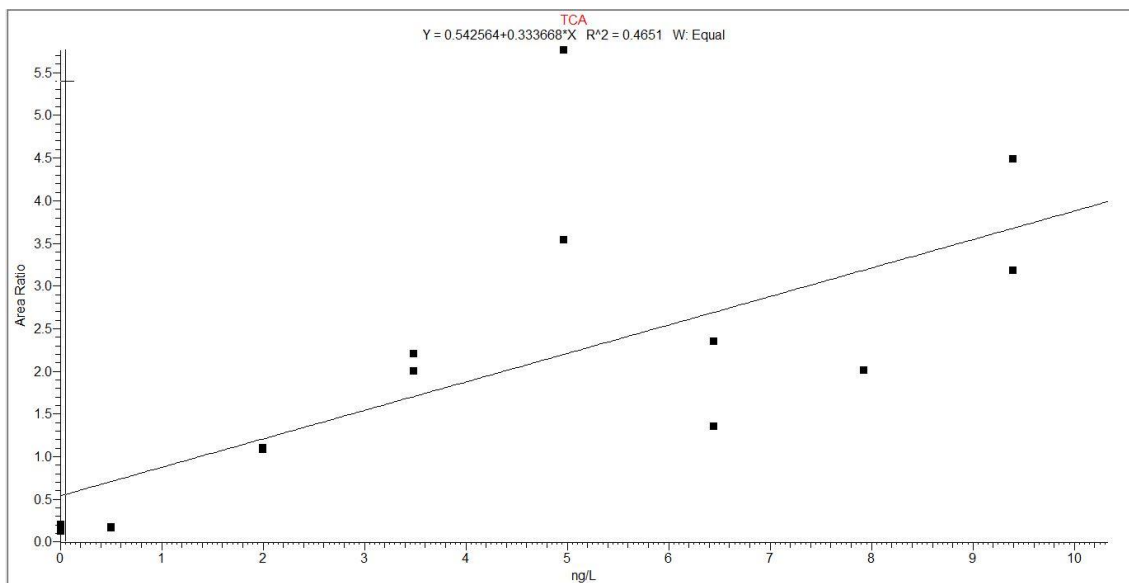


Figura 4. 14 - Curva de calibração correspondente ao ensaio B

Analisando os resultados colocou-se a hipótese de o problema estar relacionado com o tempo de dessorção da fibra. Nos ensaios A e B o tempo utilizado foi de 2 minutos. Talvez este tempo não seja suficiente para a fibra libertar todo o analito que absorveu durante os 30 minutos de extração. Outra das causas possíveis é o tempo de extração ser muito elevado para exposição às concentrações mais elevadas e provocar uma saturação da fibra.

Ensaio C

Um novo ensaio C foi planejado fixando 30 minutos como tempo de extração e aumentando o tempo de dessorção para 5 minutos, mantendo os restantes parâmetros dos ensaios anteriores.

Na Figura 4. 15 e Figura 4. 16 encontram-se os cromatogramas obtidos para um branco e uma solução padrão cuja concentração de 2,4,6-TCA é 0,5 ng/L.

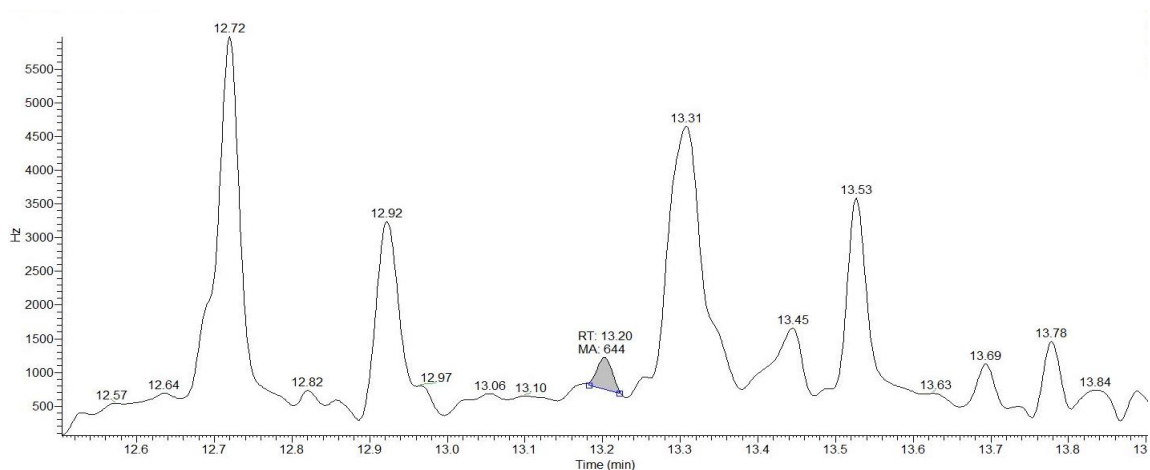


Figura 4. 15 - Extrato do cromatograma obtido para o branco no ensaio C

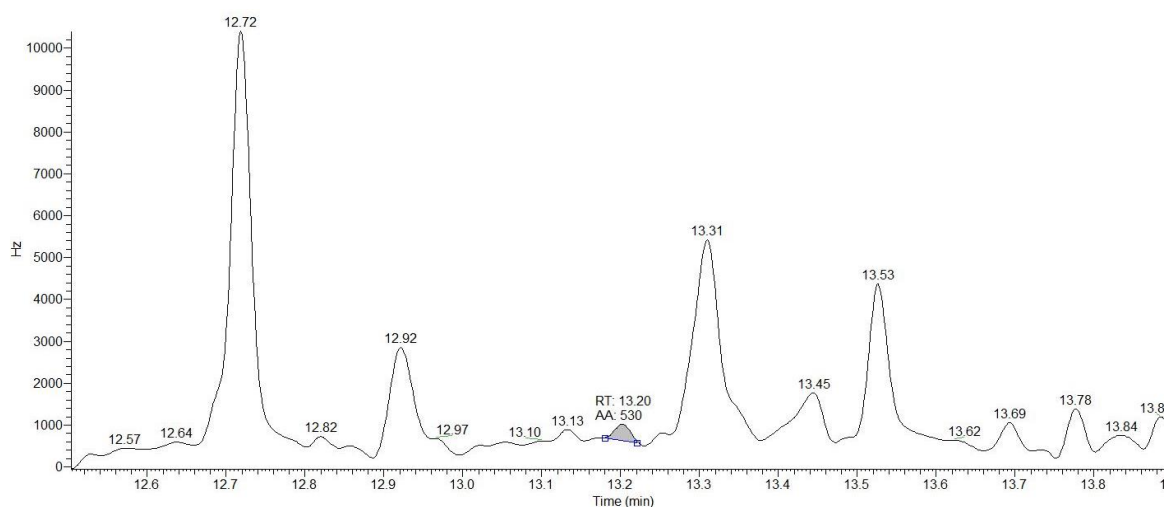


Figura 4. 16- Extrato do cromatograma obtido para o padrão 0,5 ng/L no ensaio C

Da análise dos cromatogramas é possível verificar que o pico de 2,4,6-TCA não aparece no tempo de retenção de 13,20 minutos para concentrações de 2,4,6-TCA inferiores ou iguais a 0,5 ng/L.

Com os resultados obtidos para concentrações de solução de 2,4,6-TCA iguais ou superiores a 0,5 ng/L traçou-se a curva de calibração (Figura 4. 17.). Como se pode verificar existe uma correlação linear ($R^2=0,9956$) entre a razão das áreas do pico de

2,4,6-TCA e 2,3,6-TCA (PI) e as concentrações de 2,4,6-TCA, na gama estudada.

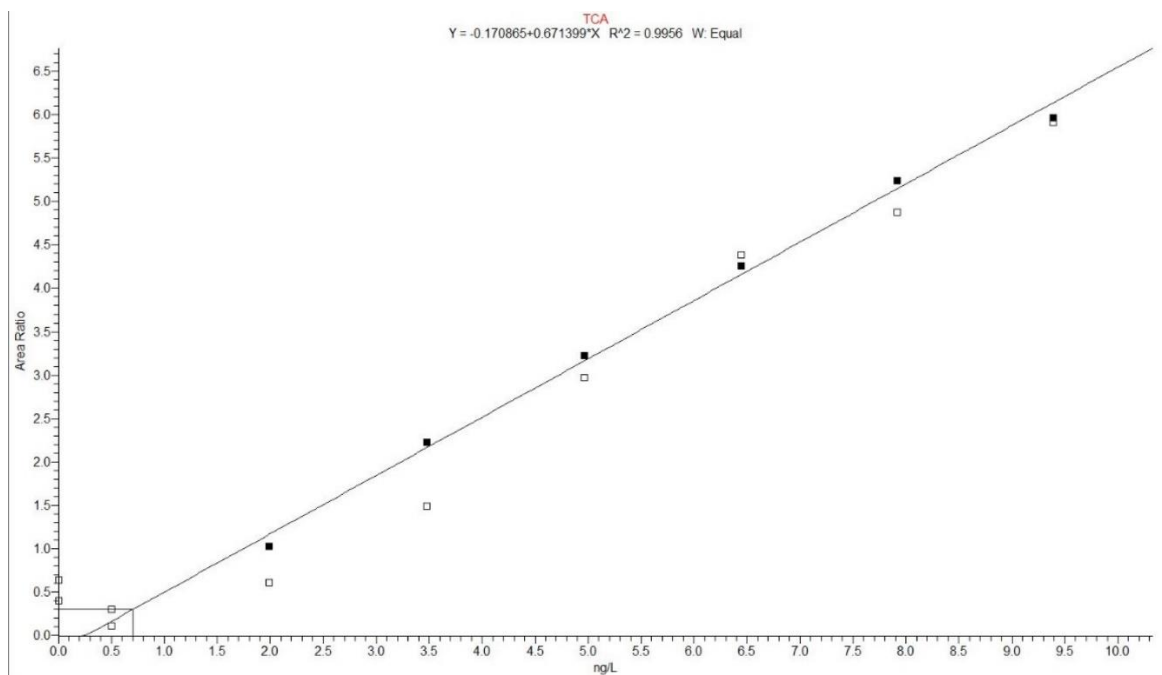


Figura 4. 17 - Curva de calibração correspondente ao ensaio C

Estes resultados permitem concluir que o aumento do tempo de dessorção de 2 minutos para 5 minutos melhorou significativamente a linearidade do método.

Ensaio D

Neste ensaio manteve-se o tempo de dessorção em 5 minutos e reduziu-se o tempo de extração para 25 minutos, considerando a vantagem em termos de tempo de análise.

Este ensaio não revelou uma diferença significativa nas áreas obtidas, podendo assim ser utilizados 25 minutos em vez de 30 minutos de extração para diminuir o tempo de análise total.

Ensaio E

Neste ensaio E fixou-se o tempo de extração em 20 minutos e o tempo de dessorção em 5 minutos.

Comparando as áreas obtidas para os diferentes tempos de extração, 20, 25 e 30 minutos, para o mesmo tempo de dessorção de 5 minutos, conclui-se que não há diferenças significativas entre os 25 e os 30 minutos, no entanto para 20 minutos de extração a resposta dos padrões é, em geral, mais baixa (Figura 4. 18).

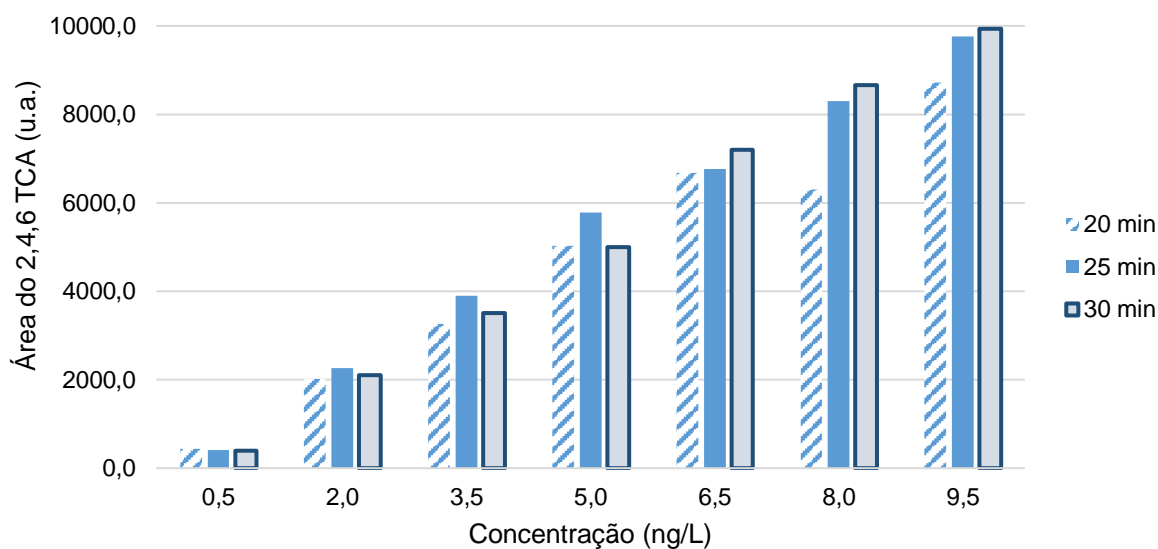


Figura 4. 18 - Comparação das áreas de 2,4,6-TCA obtidas nos diferentes padrões para 20, 25 e 30 minutos de extração

Os 30 minutos melhoram os resultados para soluções de concentrações mais elevadas, mas não tanto para as mais baixas. Tempos de extração de 25 minutos favorecem os padrões de menor concentração, e não tem uma influência significativa nas concentrações mais altas. Assim, fixou-se o tempo de extração em 25 minutos.

Ensaio F

Da análise dos cromatogramas é possível verificar que a área do pico do padrão interno, 2,3,6-TCA é muito inferior à obtida nos ensaios com solução etanólica, o que pode provocar erros maiores uma vez que são usadas razões de concentração. Para verificar a influência deste fator aumentou-se o volume de padrão interno de 20 para 50 μ L. Este ensaio foi realizado em condições de diluição para metade, com o objetivo de diminuir a concentração de etanol no vinho. Na Figura 4. 19 encontra-se um cromatograma em que é possível verificar o aumento significativo da área do pico correspondente ao 2,3,6-TCA.

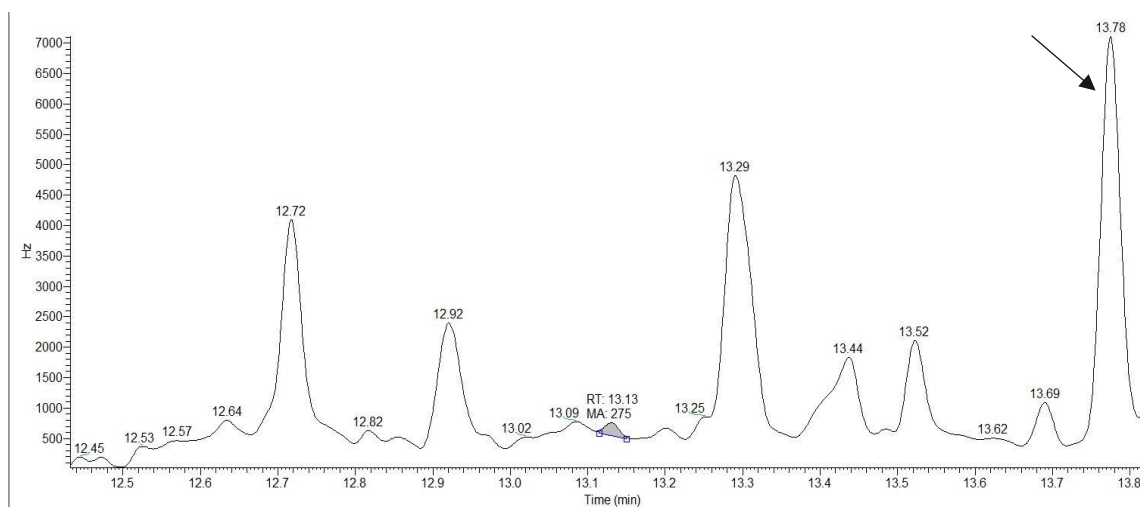


Figura 4. 19 - Extrato do cromatograma obtido para o branco no ensaio F

A fim de estudar o efeito da diluição nas áreas dos padrões, efetuou-se comparações entre o ensaio D e o Ensaio F, os dois realizados nas condições de 25 minutos de extração e 5 minutos de dessorção, variando apenas entre eles a quantidade de padrão interno adicionada e a diluição.

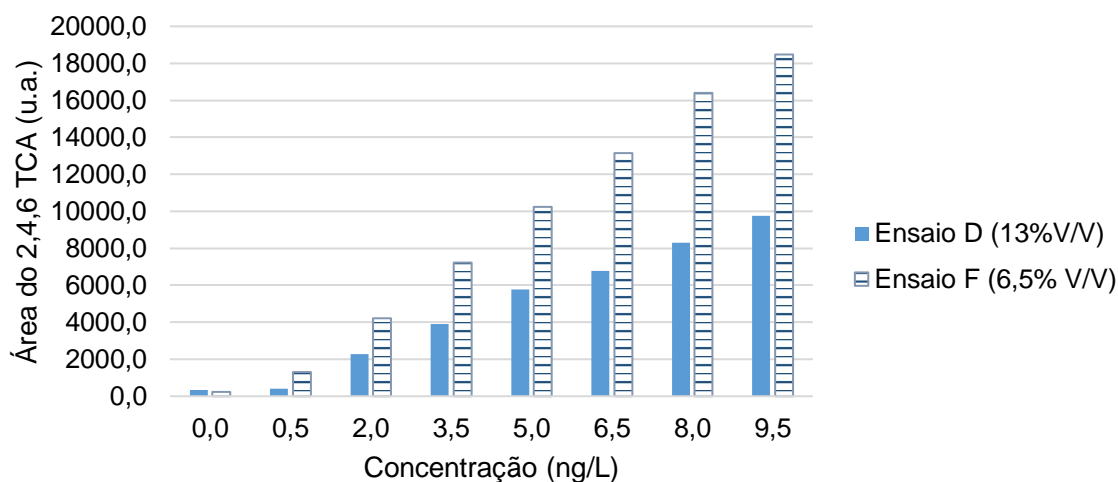


Figura 4. 20 - Gráfico comparativo das áreas de analito obtidas em função da diluição

Verifica-se que a diluição da matriz favorece o método, obtendo-se valores de áreas de analito muito superiores com 6,5% (v/v) em comparação com o padrão não diluído (13% (v/v)). Fixou-se então a diluição como um parâmetro a aplicar.

Avaliando o cromatograma do padrão 0,5 ng/L é possível constatar a dificuldade em distinguir o analito do ruído da matriz. Assim, pode dizer-se que o método é pouco sensível para esta concentração, podendo mesmo não ter capacidade para deteção de concentrações iguais ou inferiores a 0,5 ng/L.

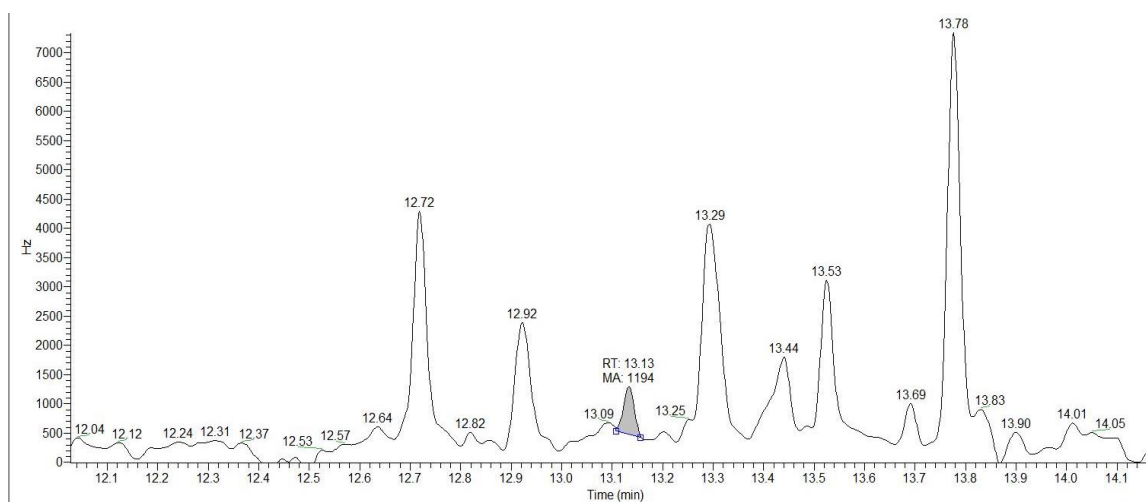


Figura 4. 21 -Extrato do cromatograma obtido para o padrão 0,5 ng/L no ensaio F

Os resultados obtidos possibilitaram o traçado de uma curva de calibração que apresenta um coeficiente de determinação de 0,9969 (Figura 4. 22).

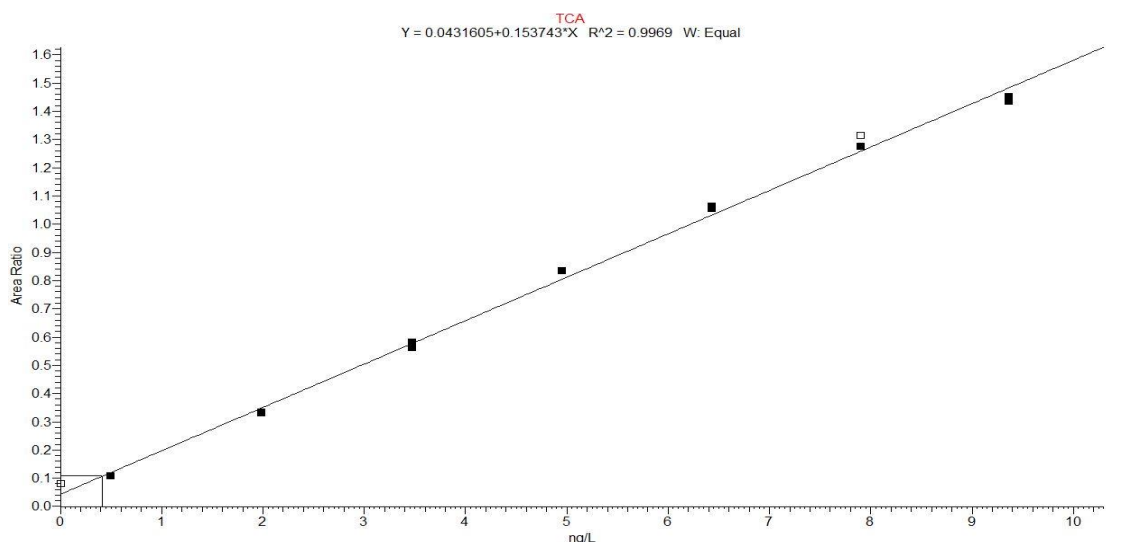


Figura 4. 22 – Curva de Calibração correspondente ao ensaio F

Da análise visual à curva de calibração, pode afirmar-se que o padrão de concentração 9,5 ng/L apresenta um sinal ligeiramente mais baixo que os restantes padrões, contribuindo para a diminuição da correlação linear.

Ensaio G

No ensaio G fixaram-se todas as condições otimizadas pelos ensaios anteriores, e variou-se a gama de trabalho. Os padrões utilizados neste ensaio compreendem concentrações entre 1,0 e 9,5 ng/L.

As condições de extração definidas são:

- 25 minutos de extração;
- 5 minutos de dessorção;
- Adição de 50 μ L de Padrão Interno;
- Diluição para metade (redução de grau álcool para aproximadamente 6,5 % (v/v))

O cromatograma obtido para o padrão de 1,0 ng/L apresenta uma área de analito de 2247 u.a. o que permite incluir com certeza este ponto na curva de calibração, uma vez que o método já apresenta sensibilidade para deteção desta concentração.

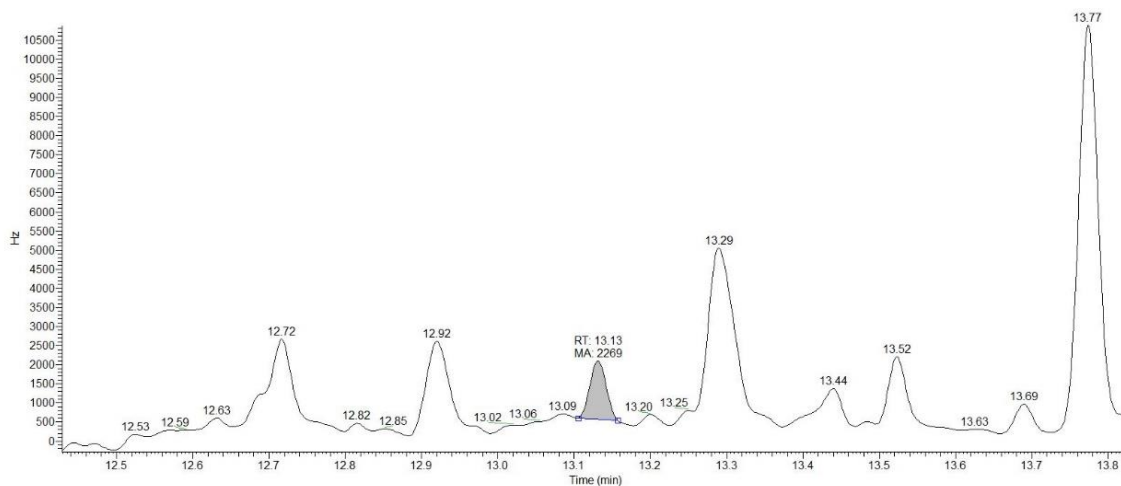


Figura 4. 23 -Extrato do cromatograma obtido para o padrão de concentração 1,0 ng/L

Com a redução da gama de trabalho é possível obter uma curva de calibração com bom coeficiente de determinação ($R^2= 0,9993$) e uma ordenada na origem mais próxima de zero (Figura 4. 24).

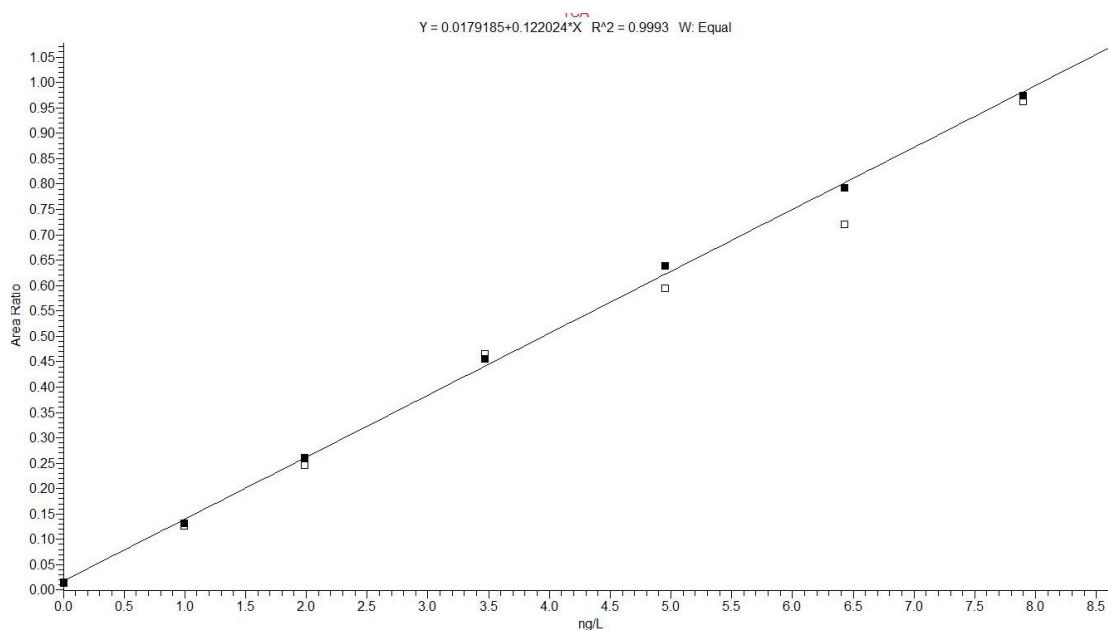


Figura 4. 24 - Curva de Calibração correspondente ao ensaio G

2.3. Curvas de Calibração

As curvas de calibração apresentadas na Tabela 4. 4 foram realizadas recorrendo ao método do padrão interno, e obtidas através da fortificação de um lote de vinho em 6 níveis diferentes. Todas as calibrações foram efetuadas com dois pontos por nível de concentração.

Tabela 4. 4 – Curvas de calibração e respetivos coeficientes de determinação, desvios padrão, limites de deteção e quantificação

Equação	Coefficiente de determinação (R²)	Desvio Padrão (S_{y/x})	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
Y = 0,1220 X + 0,01792	0,9993	0,012	0,28	0,95
Y = 0,1188 X + 0,02283	0,9991	0,012	0,31	1,05
Y = 0,1202 X + 0,00509	0,9951	0,028	0,70	2,32
Y = 0,1175 X + 0,0222	0,9967	0,023	0,59	1,97

Os resultados apresentados mostram que existe uma boa linearidade, apresentando todas as curvas valores de coeficiente de determinação superior a 0,995.

Os limites de deteção e quantificação foram calculados baseados no desvio padrão da curva de calibração linear e no declive de cada reta. Os valores obtidos de limite de quantificação situam-se, no caso das primeiras duas curvas, junto ao valor do primeiro padrão da curva (1 ng/L).

As discrepâncias de resultados obtidos entre as curvas 1 e 2 e 3 e 4, relativamente aos limiares analíticos, podem dever-se ao facto de as curvas 3 e 4 terem sido realizadas junto ao limite de vida útil da fibra esperado.

2.4. Validação da Gama de Trabalho

A validação da gama de trabalho realizou-se através da comparação dos valores dos coeficientes de variação do primeiro e último ponto das curvas de calibração, partindo da preparação de 10 padrões independentes de concentração 1 ng/L e 8 ng/L.

O coeficiente de variação obtido foi de 4,5 e 5,6%, respetivamente, para os padrões de 1 e 8 ng/L. Estes valores são inferiores a 10% e muito próximos entre si, podendo considerar-se a gama de trabalho adequada.

2.5. Precisão

A precisão foi calculada com base nos resultados do desvio padrão de 10 ensaios sobre a mesma amostra.

O valor de limite de repetibilidade (r), calculado através da equação 16, foi de 0,1 ng/L, para concentrações de 1 ng/L, e de 1,25 ng/L, para 8 ng/L. Assim, pode afirmar-se que se aceitam todos resultados, uma vez que a diferença entre réplicas é menor do que o limite de repetibilidade.

A precisão intermédia e a reprodutibilidade não foram parâmetros avaliados.

2.6. Exatidão

A exatidão da metodologia foi avaliada por ensaios de recuperação, através da fortificação de amostras de vinho com concentrações de 1,0; 3,5 e 5,0 ng/L. A recuperação relaciona-se com a quantidade de analito adicionada à amostra ou padrão e que é quantificada no processo. O critério de aceitação para a recuperação é normalmente 80-120%. Todavia, o laboratório pode definir outro critério, de acordo com o desempenho e/ou a complexidade do método, ou a quantidade presente na amostra.

As percentagens de recuperação obtidas foram em média 83%. Este valor encontra-se dentro dos limites normalmente tidos como aceitáveis. Os valores obtidos neste ensaio encontram-se no anexo B.4.

No tocante a ensaios interlaboratoriais, preparam-se duas amostras de concentração 2,0 e 4,0 ng/L e distribuíram-se por sete laboratórios diferentes.

O resultado obtido encontra-se expresso na Tabela 4. 5.

Tabela 4. 5 – Resultados obtidos no ensaio interlaboratorial

Código do Laboratório	Valor Verdadeiro (ng/L)	Valor Obtido (ng/L)	Desvio Padrão	Z-score
A	1,99	1,9	0,77	0,2
B		1,1		1,2
C		2,5		0,7
D		0,0		2,6
E		2,4		0,5
F		0,9		1,4
G		1,3		0,9
H		1,4		0,8
A	3,98	3,8	0,95	0,2
B		2,2		1,9
C		2,8		1,2
D		1,5		2,6
E		4,8		0,9
F		2,5		1,6
G		2,8		1,2
H		2,6		1,5
G	2,8	1,0		

Verifica-se que apenas o laboratório D possui um resultado no limite do questionável, sendo todos os outros aceitáveis.

2.7. Estudo do efeito “carry over”

O efeito “carryover” é caracterizado pela dessorção incompleta dos analitos adsorvidos na fibra. A fim de estudar este efeito são sujeitos a análise 10 viais de brancos em sequência. Ao analisar a resposta do analito verifica-se se existe ou não efeito de memória na fibra. Estes brancos contêm vinho, sal e padrão interno.

Os resultados obtidos neste teste demonstram que não existe arrastamento do analito entre amostras, uma vez que nos dez brancos se obtiveram valores inferiores ao limite de deteção.

2.8. Incerteza

Para calcular a incerteza expandida associada à concentração de uma amostra, deve definir-se todas as fontes de incerteza intervenientes [47]. Neste trabalho foram consideradas as seguintes fontes:

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

Calculando a incerteza combinada, para toda a gama de trabalho, obtém se em média um valor de 0,2 ng/L.

3. Conclusões e Sugestões de Trabalho Futuro

O objetivo principal do trabalho era implementar e validar um método de análise de 2,4,6-tricloroanisol em vinhos de mesa tintos por microextração em fase sólida (SPME) associada à cromatografia gasosa com detecção por captura de eletrões (GC-ECD).

Numa fase inicial do trabalho verificou-se a viabilidade do uso de matriz etanólica na análise em detrimento de matriz de vinho, verificando-se a necessidade de obtenção de curvas de calibração a partir de vinho.

Posteriormente tornou-se necessário otimizar o método, partindo das condições de SPME usadas no método de determinação de 2,4,6-TCA em rolhas. Verificou-se que as condições ótimas de SPME são 25 minutos de tempo de extração, 5 minutos de dessorção, grau alcoólico de 6,5 % (v/v) e adição de 50 µL de padrão interno.

Por forma a validar a metodologia adotada, efetuaram-se estudos de linearidade, gama de trabalho, precisão e exatidão.

Nos estudos de linearidade obtiveram-se valores de coeficientes de determinação superiores a 0,995 em todas as curvas de calibração efetuadas. Os limites de detecção são considerados aceitáveis e os limites de quantificação foram próximos ao primeiro padrão da curva, para dois dos casos. Em média, o limite de detecção obtido é de 0,47 ng/L e o limite de quantificação 1,57 ng/L.

A validação da gama de trabalho mostrou-se positiva, sendo os coeficientes de variação obtidos, para o primeiro e último ponto das curvas de calibração, inferior a 10%.

Nos estudos de repetibilidade efetuados, as diferenças entre as réplicas foram sempre inferiores ao limite de repetibilidade.

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da fortificação de amostras de vinho. A média dos valores de percentagem de recuperação obtidos foi de 83 %, encontrando-se dentro dos limites normalmente tidos como aceitáveis.

A incerteza do método obtida foi de 0,2 ng/L.

De modo a poder dar continuidade ao trabalho são propostas algumas sugestões de trabalho futuro:

- Realizar ensaios de estudo de precisão intermédia e reprodutibilidade;

- Calcular a incerteza do método para uma gama de trabalho mais baixa;
- Verificar o comportamento de um vinho branco, e validar a análise de 2,4,6-TCA.
- Repetir o estudo para vinhos do Porto, bebidas licorosas e aguardentes;
- Implementar o método de deteção de 2,4,6-TCA na água do processo, por forma a verificar as potenciais contaminações externas à cortiça.

Bibliografia

- [1] “symington.” [Online]. Available: <http://pt.symington.com/>. [Accessed: 12-Mar-2018].
- [2] D. Özhan, R. E. Anli, N. Vural, and M. Bayram, “Determination of chloroanisoles and chlorophenols in cork and wine by using HS-SPME and GC-ECD detection,” *J. Inst. Brew.*, vol. 115, no. 1, pp. 71–77, 2009.
- [3] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, and J. Guà, “Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 977, pp. 1–8, 2002.
- [4] A. Martínez-Uruñuela, J. M. González-Sáiz, and C. Pizarro, “Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1056, no. 1–2 SPEC.ISS., pp. 49–56, 2004.
- [5] I. A. Couto, “Método para deteção de 2,4,6-TCA por contaminação de gases halogenados de uma superfície emissora de iões positivos,” Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [6] T. J. Evans, C. E. Butzke, and S. E. Ebeler, “Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 786, no. 2, pp. 293–298, 1997.
- [7] IVDP, “Instituto dos Vinhos do Douro e Porto,” 2018. [Online]. Available: <https://www.ivdp.pt/pagina.asp?codPag=64&codSeccao=2&idioma=0>. [Accessed: 12-Mar-2018].
- [8] AEVP, “AEVP - VINHOS DO DOURO.” [Online]. Available: <http://www.aevp.pt/Vinhos-do-Douro>. [Accessed: 12-Mar-2018].
- [9] P. Neto, “Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de *Quercus suber* L.: Estudo dos efeitos de matriz por micro-extracção em fase sólida na região de espaço de cabeça,” p. 129, 2005.
- [10] J. Soares, “Caracterização do processo de cozedura SRCC e do período de estabilização pós-cozedura,” Instituto Superior de Engenharia de Coimbra Colaboração, 2013.

- [11] L. Gonçalves, “Redução/eliminação,” UNIVERSIDADE DE ÉVORA ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.
- [12] H. S. Dórea, a Gaujac, and S. Navickiene, “Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos,” *Sci. Plena*, vol. 4, no. 7, pp. 1–7, 2008.
- [13] G. Vas and K. Vékey, “Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 3, pp. 233–254, 2004.
- [14] A. D. Batista, “FIBRAS PARA SPME (MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA) RECOBERTAS COM SÍLICAS MODIFICADAS POR GRUPOS VINILA Dissertação,” UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA, 2009.
- [15] S. M. Rocha, Â. C. Salvador, C. Martins, C. Barbosa, M. Santos, and S. Petronilho, “Microextração em fase sólida e cromatografia de gás: Uma combinação de elevado potencial,” *Sci. Chromatogr.*, vol. 5, no. 4, pp. 284–300, 2013.
- [16] Q. L. Ma, N. Hamid, A. E. D. Bekhit, J. Robertson, and T. F. Law, “Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology,” *Microchem. J.*, vol. 111, pp. 16–24, 2013.
- [17] E. Komatsu and J. M. Vaz, “Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida,” *Quim. Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 720–724, 2004.
- [18] A. Martins, “Implementação e Validação de Métodos Analíticos,” Universidade de Coimbra, 2016.
- [19] R. V. M. de Avó, “Determinação de pesticidas por cromatografia gasosa com deteção por captura electrónica (GC-ECD) e por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (LC-MS/MS),” Universidade de Lisboa, 2015.
- [20] V. C. M. Ribeiro, “Controlo da Qualidade e Validação de Métodos Cromatográficos - Da Teoria à Prática,” Universidade de Coimbra, 2015.
- [21] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, and J. Guasch, “Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloranisole in wines,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1138, no. 1–2, pp. 18–25, 2007.

- [22] R. Tarasov, A. Rauhut, D. Jung, “‘Cork taint’ responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review.,” *Talanta*, vol. 175, pp. 82–92, 2017.
- [23] A. R. Fontana, “Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 37, no. July 2012, pp. 135–147, 2012.
- [24] A. Tarasov, D. Rauhut, and R. Jung, “Bottle capsules as a barrier against airborne 2,4,6-trichloroanisole,” *Food Chem.*, vol. 268, no. June, pp. 463–467, 2018.
- [25] T. Garde-Cerdán, C. Lorenzo, A. Zalacain, G. L. Alonso, and M. R. Salinas, “Using near infrared spectroscopy to determine haloanisoles and halophenols in barrel aged red wines,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 46, no. 2, pp. 401–405, 2012.
- [26] R. M. Callejón, C. Ubeda, R. Ríos-Reina, M. L. Morales, and A. M. Troncoso, “Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1428, pp. 72–85, 2016.
- [27] I. Márquez-Sillero, S. Cárdenas, and M. Valcárcel, “Headspace-multicapillary column-ion mobility spectrometry for the direct analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1265, pp. 149–154, 2012.
- [28] S. H. Patil *et al.*, “Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by GC-MS,” *Food Chem.*, vol. 124, no. 4, pp. 1734–1740, 2011.
- [29] J. I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, and M. Hernández-Córdoba, “Stir bar sorptive extraction polar coatings for the determination of chlorophenols and chloroanisoles in wines using gas chromatography and mass spectrometry,” *Talanta*, vol. 118, pp. 30–36, 2014.
- [30] G. Bianco, G. Novario, R. Zianni, and T. R. I. Cataldi, “Comparison of two SPME fibers for the extraction of some off-flavor cork-taint compounds in bottled wines investigated by GC-HRMS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 8, pp. 2019–2027, 2009.
- [31] H. H. Jeleń, M. Dziadas, and M. Majcher, “Different headspace solid phase microextraction - Gas chromatography/mass spectrometry approaches to haloanisoles analysis in wine,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1313, pp. 185–193, 2013.
- [32] S. Boutou and P. Chatonnet, “Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine,” *J. Chromatogr. A*, vol.

1141, no. 1, pp. 1–9, 2007.

- [33] N. Sadoughi, L. M. Schmidtke, G. Antalick, J. W. Blackman, and C. C. Steel, “Gas chromatography-mass spectrometry method optimized using response surface modeling for the quantitation of fungal off-flavors in grapes and wine,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 11, pp. 2877–2885, 2015.
- [34] C. Martínez-Uruñuela, A., Rodríguez, I., Cela, R., González-Sáiz, J.M. , Pizarro, “Development of a solid-phase extraction method for the simultaneousdetermination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography–tandem mass spectrometry,” *Anal. Chim. Acta* 549, pp. 117–123, 2005.
- [35] J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, and R. Beltrán, “Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 133–140, 2006.
- [36] C. Pizarro, N. Pérez-del-Notario, and J. M. González-Sáiz, “Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1166, no. 1–2, pp. 1–8, 2007.
- [37] C. Pizarro, A. Martínez-Uruñuela, N. Pérez-del-Notario, and J. M. González-Sáiz, “Robustness test of a headspace solid-phase microextraction method for the determination of chloroanisoles and chlorophenols related to cork taint in wine using experimental design,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1208, no. 1–2, pp. 54–61, 2008.
- [38] P. Slabizki and H. G. Schmarr, “Analysis of corky off-flavour compounds at ultra trace level with multidimensional gas chromatography-electron capture detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1271, no. 1, pp. 181–184, 2013.
- [39] N. Campillo, R. Peñalver, and M. Hernández-Córdoba, “Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas chromatography and atomic emission detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1210, no. 2, pp. 222–228, 2008.
- [40] S. Jönsson, T. Uusitalo, B. Van Bavel, I. B. Gustafsson, and G. Lindström, “Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole on ng L-1 to pg L-1 levels in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography-high-resolution mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1111, no. 1, pp. 71–75,

2006.

- [41] G. Weingart, G., Schwartz, H., Eder, R., Sontag, “Determination of geosmin and 2,4,6-trichloroanisole in white and red Austrian wines by headspace SPME–GC/MS and comparison with sensory analysis,” *Eur. Food Res. Technol*, vol. 231, pp. 771–779, 2010.
- [42] A. K. Hjelmeland, T. S. Collins, J. L. Miles, P. L. Wylie, A. E. Mitchell, and S. E. Ebeler, “High-throughput, Sub ng/L analysis of haloanisoles in wines using HS-SPME with GC-triple quadrupole MS,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 63, no. 4, pp. 494–499, 2012.
- [43] F. Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., Lorenzo, “). Optimisation of a two-dimensional on-line coupling for the determination of anisoles in wine using ECD and ICP-MS after SPME–GC separation,” , *J. Anal. At. Spectrom*, vol. 20, pp. 883–888, 2005.
- [44] G. Vlachos, P., Kampioti, A., Kornaros, M., Lyberatos, “). Optimisation of a two-dimensional on-line coupling for the determination of anisoles in wine using ECD and ICP-MS after SPME–GC separation,” *J. Anal. At. Spectrom*, vol. 105, pp. 681–690, 2007.
- [45] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, *Guia RELACRE nº 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. 2000.
- [46] D. A. dos S. Pereira, “Implementação e Validação de um Método Analítico para Determinação de Carbono Orgânico Total,” Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- [47] V. (EPAL) Castro, Augusto (SMAS Porto); Santos, Clara (LPQ); Batista, Elsa (IPQ/LCM); Martins, Maria (LABDFGCQA); Franco, Nuno (PETROGAL - Grupo Galp Energia); Cardoso, “Guia Eurachem/Relacre 1.” RELACRE, 2002.
- [48] Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, *Guia Relacre nº 3*, vol. 14, no. 1. 1996.
- [49] IPAC, “Guia Para a Acreditação De Laboratórios Químicos,” 2011.

Anexo A – Cálculos para preparação de soluções intermédias

Preparação de solução Stock I de 2,4,6-TCA (1 mg/L)

A solução comercial de 2,4,6-TCA é uma ampola de 1 mL de concentração 100 mg/L, que diluída em metanol num balão de 100 mL origina uma solução Stock I de 1 mg/L, conforme a equação abaixo:

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

Preparação de solução Stock II de 2,4,6-TCA (1 µg/L)

A solução Stock II é preparada a partir da solução Stock I após diluição conveniente com solução etanólica a 12 % (v/v) segundo a equação:

$$C_{stock I} * V_{stock I} = C_{stock II} * V_{stock II} \Leftrightarrow 1 \frac{mg}{L} * 10^3 \frac{\mu g}{mg} * V_{stock I} = 1 \frac{\mu g}{L} * 100 mL$$
$$\Leftrightarrow V_{stock I} = 0,10 mL = 100 \mu L$$

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

A solução de trabalho de 2,3,6-TCA é diluída em etanol absoluto:

$$C_{comercial} * V_{comercial} = C_{trabalho} * V_{trabalho}$$
$$\Leftrightarrow 10 \frac{mg}{L} * 10^3 \frac{\mu g}{mg} * V_{comercial} = 10 \frac{\mu g}{L} * 100 mL$$
$$\Leftrightarrow V_{comercial} = 0,10 mL = 100 \mu L$$

Preparação de Padrões de Calibração e Padrões de Controlo

Cálculo do volume de solução stock II a usar:

$$C_{stock II} * V_{stock II} = C_{padrão} * V_{padrão} \Leftrightarrow 1 \frac{\mu g}{L} * 10^3 \frac{ng}{\mu g} * V_{stock II} mL = 0,5 \frac{ng}{L} * 10 mL$$
$$\Leftrightarrow V_{stock II} = 5 * 10^{-3} mL = 5,0 \mu L$$

Cálculo da concentração real dos padrões nos viais:

$$C_{final vial} \frac{ng}{L} = \frac{C_{stock II} * V_{stock II}}{V_{final vial}} = \frac{1000 \frac{ng}{L} * V_{stock II} L}{10 * 10^{-3} + V_{stock II} + 20 * 10^{-6} L}$$

As concentrações reais dos padrões de calibração estão expressas na tabela A.1..

Tabela A. 1. – Concentrações reais dos padrões de calibração nos vias

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)	Concentração real (ng/L)
0,5	5,0	0,499
2,0	20,0	1,99
3,5	35,0	3,48
5,0	50,0	4,97
6,5	65,0	6,45
8,0	80,0	7,92
9,5	95,0	9,39

As concentrações reais dos padrões de controlo estão expressas na tabela A.2.

Tabela A. 2 - Concentrações reais dos padrões de controlo nos vias

Concentração do Padrão (ng/L)	Volume da Solução Stock II (µL)	Concentração real (ng/L)
1,5	15,0	1,49
2,0	20,0	1,99
3,0	30,0	2,99
4,0	40,0	3,98

Anexo B – Resultados

As diferenças entre as razões de áreas de matriz vínica e etanólica está expressa na tabela B.1.

Tabela B. 1. - Valores obtidos para as razões de áreas de diferentes padrões de concentração em matriz vínica e matriz etanólica

Concentração do Vial (ng/L)	Razão de áreas Matriz Etanólica	Razão de áreas Matriz Vínica	Razão
0,0	0,02	0,05	2,5
2,0	0,17	0,28	1,6
5,0	0,41	0,86	2,1

A diferença relativa é calculada segundo a equação:

$$\text{Razão} = \frac{\text{razão áreas matriz vínica}}{\text{razão áreas matriz etanólica}}$$

Resultados Ensaio A

Para a construção da curva de calibração efetuaram-se 2 ensaios com condição de extração de 15 minutos. Na Tabela B. 2 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios.

Tabela B. 2. Resultados obtidos no Ensaio A e respetiva repetição

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio A	0,0	505,061	7384,732	0,068
	0,5	1281,544	6927,958	0,185
	2,0	3183,487	5165,224	0,616
	3,5	5565,682	6199,195	0,898
	5,0	8581,194	7488,848	1,146
	6,5	5866,125	6679,673	0,878
	8,0	7098,286	6590,271	1,077
	9,5	7292,550	7803,799	0,934
	Repetição Ensaio A	0,0	1454,542	7928,534
0,5		365,263	8620,296	0,042
2,0		2237,943	8771,297	0,255
3,5		3559,777	9215,059	0,386
5,0		5119,165	9169,374	0,558
6,5		5013,511	9477,838	0,529
8,0		4176,187	9248,150	0,452
9,5		3920,308	9212,843	0,426

Resultados Ensaio B

A tabela B.3 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio B, e as respectivas razões.

Tabela B. 3. – Resultados obtidos no ensaio B

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio B	0,0	447,080	2692,170	0,166
	0,5	471,690	2672,510	0,176
	2,0	2348,080	2139,840	1,097
	3,5	4779,540	2277,740	2,098
	5,0	7769,750	1793,860	4,331
	6,5	4111,510	2284,520	1,800
	8,0	495,810	2426,450	0,204
	9,5	8031,340	2106,480	3,813

Resultados Ensaio C

A tabela B.4 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio C, e as respectivas razões.

Tabela B. 4. – Resultados obtidos no ensaio C

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio C	0,0	1067,110	1662,280	0,642
	0,5	400,320	2090,750	0,191
	2,0	2101,670	2626,400	0,800
	3,5	3504,800	1956,510	1,791
	5,0	5001,980	1619,590	3,088
	6,5	7198,880	1665,680	4,322
	8,0	8656,400	1713,540	5,052
	9,5	9941,710	1675,390	5,934

Resultados Ensaio D

A tabela B.5 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio D, e as respectivas razões.

Tabela B. 5. - Resultados obtidos no ensaio D

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio D	0,0	324,248	1533,070	0,212
	0,5	414,498	1713,710	0,242
	2,0	2267,815	1698,472	1,335
	3,5	3896,917	1695,077	2,299
	5,0	5780,539	1770,369	3,265
	6,5	6765,764	1547,669	4,372
	8,0	8296,185	1653,014	5,019
	9,5	9755,687	1743,526	5,595

Resultados Ensaio E

A tabela B.6 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio E, e as respectivas razões.

Tabela B. 6. - Resultados obtidos no ensaio E

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio E	0,0	369,031	4998,779	0,074
	0,5	434,748	3869,372	0,112
	2,0	2010,977	3788,868	0,531
	3,5	3258,318	3239,079	1,006
	5,0	5025,379	3160,761	1,590
	6,5	6676,241	5573,442	1,198
	8,0	6308,131	4116,611	1,532
	9,5	8715,749	4039,549	2,158

Resultados Ensaio F

A tabela B.7 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio F, e as respectivas razões.

Tabela B. 7. - Resultados ensaio F

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio F	0,0	246,6	11262,7	0,0
	0,5	1292,2	11507,0	0,1
	2,0	4204,6	11326,8	0,4
	3,5	7237,4	11349,2	0,6
	5,0	10228,5	10944,1	0,9
	6,5	13131,7	11200,6	1,2
	8,0	16406,1	11287,3	1,5
	9,5	18490,6	12133,6	1,5

Resultados Ensaio G

A tabela B.8 apresenta os resultados das áreas obtidas no ensaio G, e as respectivas razões.

Tabela B. 8 – Resultados Ensaio G

	Concentração do Vial (ng/L)	Área do 2,4,6-TCA (u.a.)	Área do 2,3,6-TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas
Ensaio G	0,0	271,009	17478,700	0,016
	0,0	232,497	16784,871	0,014
	1,0	2247,728	17015,278	0,132
	2,0	4299,237	16480,618	0,261
	3,5	7751,141	17007,972	0,456
	5,0	10370,341	16255,465	0,638
	6,5	13319,766	16802,563	0,793
	8,0	16902,498	17360,464	0,974

B.1. Curvas de Calibração

Nas Tabela B. 9, Tabela B. 10, Tabela B. 11 Tabela B. 12 apresentam-se os valores de áreas obtidas nas diferentes curvas de calibração.

Tabela B. 9 – Dados da Curva de Calibração nº1

Descritivo	Concentração Teórica	Concentração Obtida	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	S/N	Razão de Áreas
Branco	0,0	0,0	251,750	17131,790	0,250	0,015
Padrao1_0B	1,0	0,9	2247,728	17015,278	78,235	0,132
Padrao2_0B	2,0	2,0	4299,237	16480,618	146,641	0,261
Padrao3_5B	3,5	3,6	7751,141	17007,972	231,736	0,456
Padrao5_0B	5,0	5,1	10370,341	16255,465	304,430	0,638
Padrao6_5B	6,4	6,3	13319,766	16802,563	379,668	0,793
Padrao8_0B	7,9	7,8	16902,498	17360,464	483,853	0,974

As Figura B. 1, Figura B. 2, Figura B. 3, Figura B. 4 evidenciam as curvas de calibração

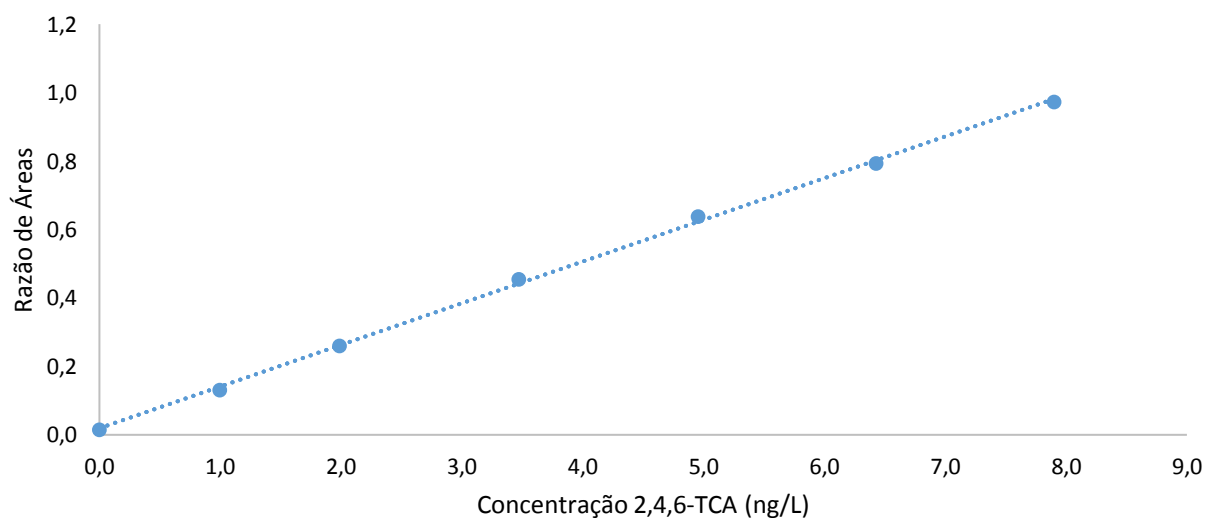


Figura B. 1 – Curva de Calibração nº 1

Tabela B. 10 - Dados da Curva de Calibração nº2

Descritivo	Concentração Teórica	Concentração Obtida	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	S/N	Razão de Áreas
Branco	0,0	0,0	347,360	17037,190	12,540	0,020
Padrao1_0B	1,0	0,9	2425,365	18103,818	69,952	0,134
Padrao2_0B	2,0	2,0	4061,773	15918,303	126,637	0,255
Padrao3_5B	3,5	3,7	7668,363	16703,614	238,245	0,459
Padrao5_0B	5,0	5,0	9917,334	16106,924	300,308	0,616
Padrao6_5B	6,4	6,3	13396,266	17247,566	382,458	0,777
Padrao8_0B	7,9	7,9	15050,236	15736,178	406,790	0,956

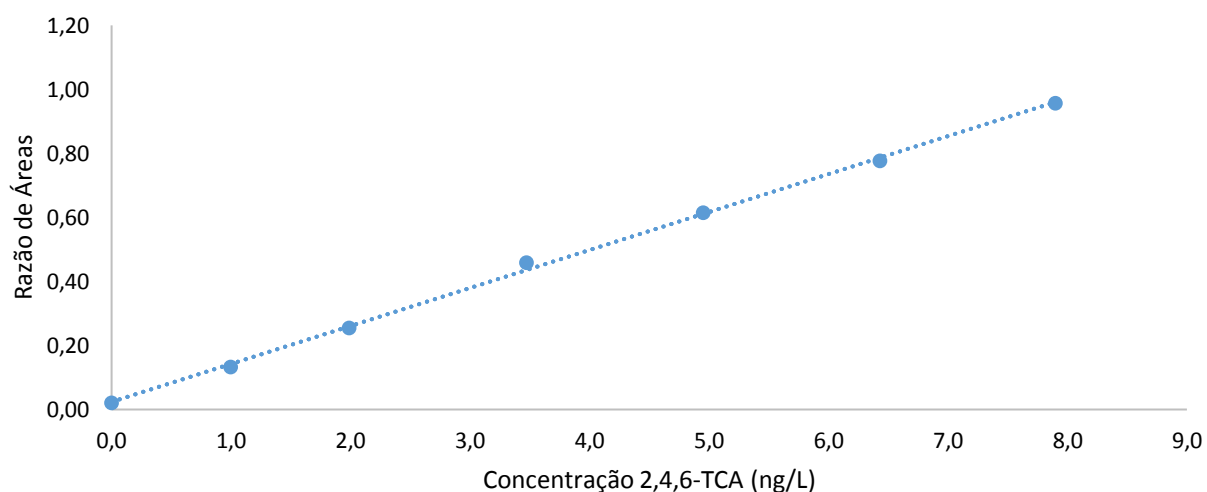


Figura B. 2 – Curva de Calibração nº 2

Tabela B. 11 – Dados da curva de calibração nº 3

Descritivo	Concentração Teórica	Concentração Obtida	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	S/N	Razão de Áreas
Branco	0,0	0,2	458,370	19900,960	13,520	0,023
Padrao1_0B	1,0	1,0	2520,741	20195,549	2,120	0,125
Padrao2_0B	2,0	1,8	4447,291	19940,046	3,564	0,223
Padrao3_5B	3,5	3,2	7641,869	19417,215	215,223	0,394
Padrao5_0B	5,0	4,7	10784,204	18963,461	285,047	0,569
Padrao6_5B	6,4	6,7	14443,149	17723,111	379,966	0,815
Padrao8_0B	7,9	8,0	20939,031	21775,086	498,601	0,962

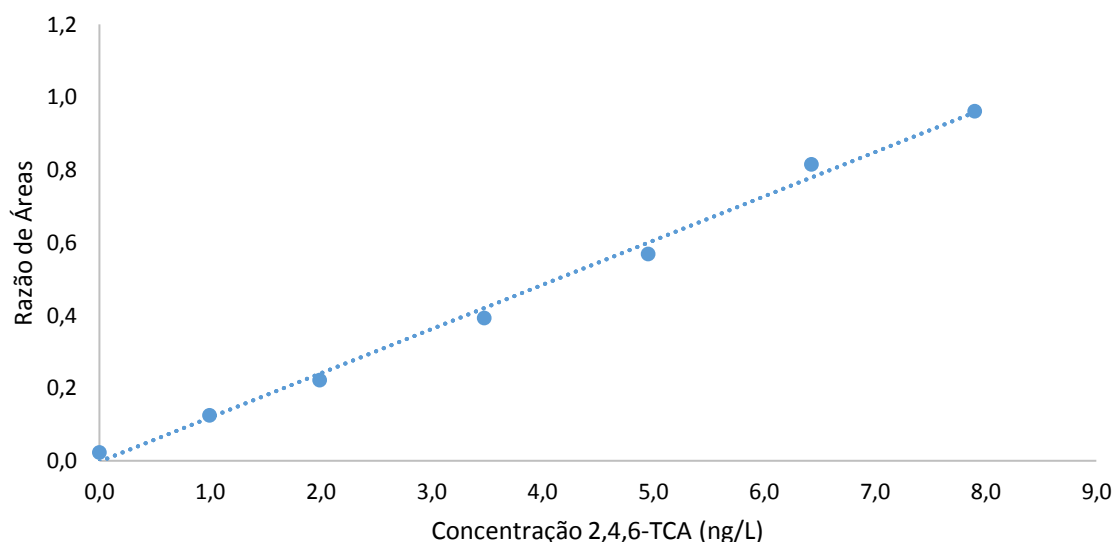


Figura B. 3 – Curva de Calibração nº3

Tabela B. 12 – Dados da curva de calibração nº 4

Descritivo	Concentração Teórica	Concentração Obtida	Área 2,4,6-TCA	Área 2,3,6-TCA	S/N	Razão de Áreas
Branco	0,0	-0,1	197,860	18408,060	0,210	0,011
Padrao1_0B	1,0	0,9	2416,409	18324,274	1,898	0,132
Padrao2_0B	2,0	2,0	4828,502	18639,450	3,797	0,259
Padrao3_5B	3,5	3,7	7836,557	17045,892	219,571	0,460
Padrao5_0B	5,0	5,2	11194,449	17668,707	288,142	0,634
Padrao6_5B	6,4	6,4	13654,834	17682,705	370,456	0,772
Padrao8_0B	7,9	7,7	17302,746	18748,786	437,810	0,923

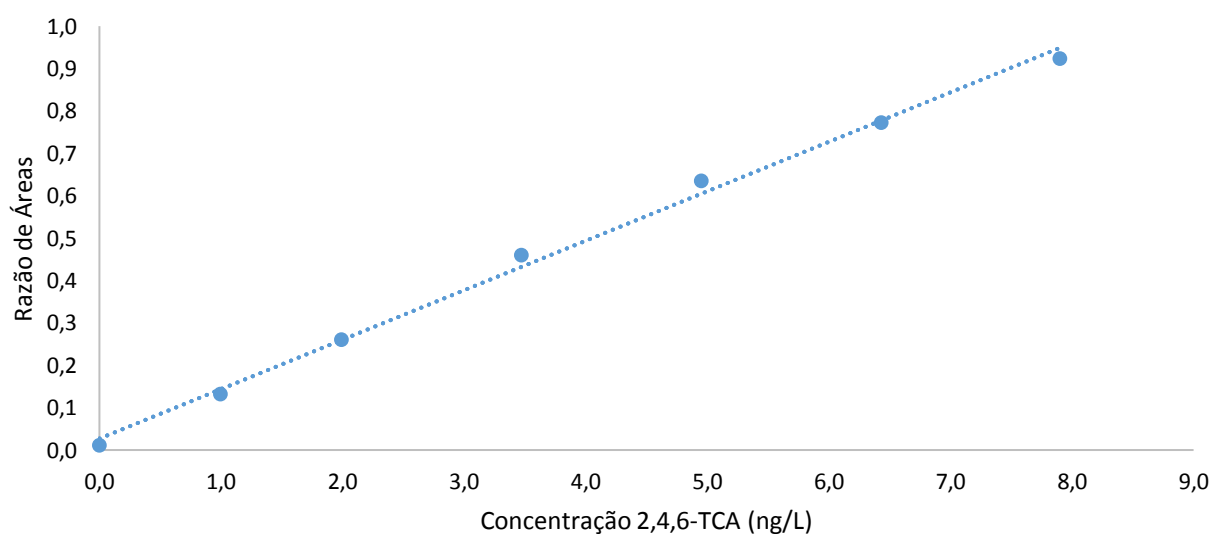


Figura B. 4 – Curva de calibração nº 4

B.2 – Estudo da Gama de Trabalho

Os resultados obtidos nos ensaios de validação da gama de trabalho são evidenciados na Tabela B. 13 e Tabela B. 14.

Tabela B. 13 – Dados Validação Gama de Trabalho para o padrão 1,0 ng/L

Descritivo	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)
Padrão 1,0 ng/L	1,0	2271,1	16319,9	0,9	2152,9	18173,8	0,8	2184,8	18008,6
	0,9	2266,0	18101,1	0,8	1971,4	19061,6	0,8	2237,5	18971,2
	0,9	2350,8	17655,6	0,9	2024,3	17126,7	0,8	2204,8	18477,7
	0,9	2277,6	18096,8	0,9	2046,7	18173,1	0,8	2265,1	18570,5
	0,9	2258,3	17544,8	0,9	1981,1	17995,7	0,9	2200,1	17624,4
	0,9	2105,1	16893,6	0,9	2026,0	18330,3	0,8	2138,4	17739,4
	0,9	2317,8	17888,2	0,9	1958,6	18053,0	0,8	2507,0	20942,4
	0,9	2345,6	17777,8	0,9	1889,9	17586,5	0,8	2262,1	18680,8
	1,0	2461,6	17167,2	0,8	1916,9	18300,1	0,8	2164,0	17728,8
	0,9	2278,3	17405,9	0,8	1943,8	18257,4	0,8	2010,7	17648,6
Média	0,91	2293,2	17485,1	0,87	1991,2	18105,8	0,83	2217,4	18439,2
Desvio Padrão	0,05	90,3	562,7	0,04	75,4	503,0	0,02	125,5	1005,3
Coefficiente de Variação (%)	5,6	3,9	3,2	4,9	3,8	2,8	2,96	5,7	5,5

Tabela B. 14 - Dados Validação Gama de Trabalho para o padrão 8,0 ng/L

Descritivo	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 3		
	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)	Concentração 2,4,6 TCA (ng/L)	Área 2,4,6-TCA (u.a.)	Área 2,3,6-TCA (u.a.)
Padrão 8,0 ng/L	6,7	14389,9	17636,6	7,9	19717,9	20740,8	9,0	18495,7	17164,4
	6,8	14101,7	16932,5	7,8	19446,4	20650,8	7,4	14597,1	16311,4
	6,6	13382,3	16529,8	7,4	19416,4	21586,6	9,3	19349,2	17435,2
	7,1	15139,0	17487,3	7,2	17708,0	20211,5	9,1	19246,0	17677,6
	6,7	14369,3	17669,0	7,6	18104,9	19644,3	8,6	18984,7	18455,3
	7,0	14405,5	16837,3	7,8	19751,4	20859,3	9,0	18354,5	16962,3
	7,2	13909,6	15899,5	8,6	20871,6	20113,4	8,6	18206,0	17677,8
	7,0	15149,2	17677,0	8,3	20392,9	20377,6	7,7	16482,6	17675,3
	6,8	14301,6	17240,0	8,2	20285,3	20439,5	7,5	14959,4	16533,3
	7,1	14513,2	16644,3	8,4	21092,1	20888,3	8,0	14486,1	15115,8
Média	6,90	14366,1	17055,3	7,92	19678,7	20551,2	8,41	17316,1	17100,8
Desvio Padrão	0,21	525,4	593,1	0,43	1094,9	526,9	0,69	1987,6	934,0
Coefficiente de Variação	3,08	3,7	3,5	5,41	5,6	2,6	8,23	11,5	5,5

B.3 – Estudo da Precisão

Exemplo de Cálculo do Coeficiente de Repetibilidade para o ensaio 1 do padrão 1 ng/L.

Desvio padrão Médio= 0,04

Pela Equação 16 temos: $r = 2,8 * desvio\ padrão = 2,8 * 0,04 = 0,1$

B.4 - Estudo da Exatidão

A Tabela B. 15 apresenta os resultados obtidos no ensaio de recuperação.

Tabela B. 15 – Resultados ensaio de recuperação

Concentração do analito na amostra fortificada (ng/L)	Concentração do analito na amostra não fortificada (ng/L)	Concentração do analito adicionado à amostra (ng/L)	% Recuperação
1,5	0,71	1,0	82
3,6	0,68	3,5	84
5,8	1,56	5,0	84

A percentagem de recuperação foi calculada através da Equação 22 do capítulo 2.4.6. O exemplo do cálculo deste valor é apresentado abaixo.

$$\%Recuperação = \frac{1,5 - 0,71}{1,0} * 100 = 82\%$$

B.5 - Estudo do Efeito “Carry Over”

A Tabela B. 16 apresenta os resultados das áreas obtidas no estudo do efeito “carry over”, bem como razão de áreas e concentração obtida.

Tabela B. 16 – Resultados do estudo efeito “Carry Over”

Sequência Vial	Área do 2,4,6 TCA (u.a.)	Área do 2,3,6 TCA (PI) (u.a.)	Razão de Áreas	Concentração Obtida (ng/L)
1	331,9	15939,9	0,02	0,0
2	339,0	16629,9	0,02	0,0
3	282,6	14781,2	0,02	0,0
4	355,5	17482,0	0,02	0,0
5	324,8	16231,2	0,02	0,0
6	322,1	15495,6	0,02	0,0
7	308,3	15840,0	0,02	0,0
8	331,6	15549,7	0,02	0,0
9	307,8	15665,7	0,02	0,0
10	299,7	18356,3	0,02	-0,1

B.6 - Cálculo da Incerteza do Método

Para efeitos de cálculo da incerteza combinada do método é necessário calcular de forma intermédia as incertezas dos padrões, das diluições de soluções comerciais, da curva de calibração e da precisão.

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

$$u(\text{reta}) = \frac{0,01156}{0,120240} * \sqrt{\frac{1}{8} + \frac{1}{3} + \frac{(0,4 - 0,41^2)}{(-0,20^2 + 0,936^2 \dots 7,861^2) - \left(\frac{(-0,20 + 0,936^2)}{8}\right)}} \\ = 0,071 \frac{\text{ng}}{\text{L}}$$

$$u(C) = 7,2 * \sqrt{\left(\frac{0,071}{7,5}\right)^2 + \left(\frac{9,8 * 10^{-6}}{5}\right)^2} * 3 = 0,07 \text{ ng/L}$$

Incerteza da precisão:

$$u(\text{Precisão}) = \frac{\text{desvio padrão resultado 10 réplicas}}{\sqrt{10}} = 0,013 \text{ ng/L}$$

Incerteza combinada

$$u(\text{combinada}) = \sqrt{(u \text{ reta})^2 + (u \text{ Precisão})^2} = \sqrt{(0,07)^2 + (0,013)^2} = 0,072 \text{ ng/L}$$

Incerteza Expandida

$$u(\text{expandida}) = 2 * u(\text{combinada}) = 2 * 0,072 = 0,1 \text{ ng/L}$$