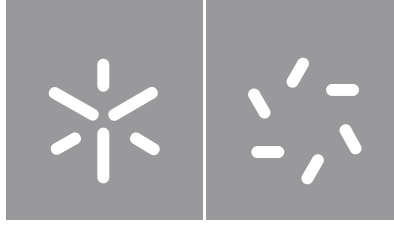


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Daniela Filipa Mendes Oliveira

Validação de um método analítico para a quantificação dos fenóis voláteis: 4-etilguaiaicol e 4-etilfenol em vinhos por GC-FID



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Daniela Filipa Mendes Oliveira

**Validação de um método analítico para a
quantificação dos fenóis voláteis:
4-etilguaiacol e 4-etilfenol em vinhos por
GC-FID**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do

Engenheiro Pedro Nuno da Silva Machado

e da

Professora Doutora Maria Dulce Silva Geraldo

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



**Atribuição
CC BY**

**Atribuição
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Agradecimentos

À Universidade do Minho e a todos os docentes que acompanharam o meu percurso académico e contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À Silliker Portugal S.A. por possibilitar as condições necessárias para a realização desta dissertação.

À Prof. Doutora Dulce Geraldo, minha orientadora de estágio, por toda a preocupação, dedicação, conselhos e apoio fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Eng^o Pedro Machado, por toda a disponibilidade, ajuda e boa disposição ao longo deste meses de trabalho.

Deixo ainda um especial obrigada à Eng^a Laura Sousa por ter supervisionado todo o trabalho e por me ter motivado e ajudado em tudo o que era necessário. Aos restantes colegas da empresa, mas em especial, à Rita, Mariana, Raúl, Jefferson, Joana e Olga, agradeço toda a ajuda e bons momentos que me proporcionaram.

Aos meus pais, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim, por todo o esforço feito ao longo destes anos, ajuda e compreensão. Obrigada por serem os melhores pais do mundo.

Ao meu irmão, por toda a ajuda, incentivo, por ser o mais chato, mas que está presente.

Ao David, pelo apoio incondicional, motivação e amor que me transmite todos os dias, por ser o que mais acredita nas minhas capacidades. Um obrigada muito especial.

À minha melhor amiga, Flávia, pela amizade, apoio, sorrisos e abraços calorosos trocados ao longo deste tempo. Um muito obrigada.

Aos meus amigos, em especial ao Pedro, Bia, Inês, Mary, Sofi, Cátia, Esperança, Mariana, Mia e Nené, por toda a amizade, apoio e motivação durante estes anos. A todos estes, e a todos aqueles que aqui não foram referidos, um grande agradecimento.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Validação de um método analítico para a quantificação dos fenóis voláteis: 4-etilguaiacol e 4-etilfenol em vinhos por GC-FID

O setor vitivinícola é um dos setores mais importantes na economia mundial. Nesse sentido, a garantia da qualidade destes produtos ganha um grande relevo. Do ponto de vista da qualidade dos vinhos, os defeitos olfativos descritos como "couro" e "suor a cavalo" são a principal razão de rejeição por parte do consumidor. Um dos principais defeitos olfativos prende-se com a presença de fenóis voláteis, nomeadamente o 4-etilguaiacol (4-EG) e o 4-etilfenol (4-EF), metabolitos resultantes da presença das leveduras *Brettanomyces*.

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento, implementação e validação de um método analítico interno para determinar o teor dos fenóis voláteis 4-EG e 4-EF, em vinhos comerciais.

A extração dos analitos presentes nas amostras foi efetuada recorrendo ao método de extração líquido-líquido e a separação e quantificação dos compostos por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID). O método foi caracterizado considerando os parâmetros de desempenho: seletividade; limite de quantificação (LDQ); gama de trabalho; linearidade; sensibilidade; justeza; precisão e incerteza em matrizes de vinho tinto maduro, branco maduro, branco verde e rosé.

Demostrou-se que o método analítico apresentou uma boa correlação linear e verificou-se ainda que a sensibilidade do método se manteve inalterada ao longo do tempo.

A precisão do método foi caracterizada recorrendo a ensaios realizados em condições de repetibilidade e de precisão intermédia foi avaliada em três níveis de concentração. Os valores dos coeficientes de variação (CV) foram satisfatórios para os dois analitos.

Recorrendo a ensaios de recuperação, constatou-se que não foi evidenciada ocorrência de erros sistemáticos, demonstrando assim a justeza do método.

A estimativa da incerteza baseada nos dados de validação foi calculada para os diferentes níveis de concentração sendo inferiores à incerteza máxima admitida internamente (20 %).

O método foi devidamente implementado, validado e foi demonstrada a sua adequação para a quantificação do 4-EG e 4-EF em matrizes de vinhos de mesa.

Palavras-chave: Controlo de qualidade; Fenóis voláteis; GC-FID; Validação de métodos; Vinho

Validation of an analytical method for the quantification of volatile phenols: 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in wines by GC-FID

The wine industry is one of the most important sectors in the world economy. In this sense, the quality assurance of these products is of great importance. From the point of view of wine quality, olfactory defects described as "leather" and "horse sweat" are the main reason for rejection by the consumer. One of the main olfactory defects is related to the presence of volatile phenols, namely 4-ethylguaiacol (4-EG) and 4-ethylphenol (4-EF), metabolites resulting from the presence of *Brettanomyces* yeast.

The present dissertation aimed to develop, implement and validate of an in-house analytical method to determine the content of the volatile phenols 4-EG and 4-EF, in commercial wines.

The extraction of the analytes present in the samples was performed using the liquid-liquid extraction method and the separation and quantification of the compounds by gas chromatography coupled with a flame ionization detector (GC-FID).

The method was characterized considering the following performance parameters: sensitivity, working range, linearity, limit of quantification, accuracy, selectivity, precision and uncertainty in matrices of red, white and rosé wines.

The analytical method was shown to have a good linear correlation and it was also found that the sensitivity of the method remained unchanged over time.

The precision of the method was characterized using tests performed under repeatability and intermediate precision conditions and was evaluated at three concentration levels. The coefficient of variation values were satisfactory for both analytes.

Using recovery tests, it was found that no systematic errors were evident, thus demonstrating the accuracy of the method.

The estimated uncertainty based on validation data was calculated at the different concentration levels and was below the maximum uncertainty internally accepted (20 %).

The method was properly implemented, validated and its suitability for the quantification of 4-EG and 4-EF in table wine matrices was demonstrated.

Keywords: GC-FID; Method validation; Quality control; Volatile phenols; wine

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice das Figuras	x
Índice das Tabelas.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Empresa Silliker Portugal S.A. – Grupo MxNS.....	1
1.2. Da uva ao vinho	3
1.2.1. Distribuição.....	5
1.2.2. Características sensoriais.....	7
1.2.3. Alteração do aroma por ação de leveduras.....	8
1.2.4. Fenóis voláteis.....	9
1.3. Técnicas analíticas para a determinação de fenóis voláteis.....	11
1.4. Cromatografia.....	16
1.4.1. Cromatografia Gasosa	18
1.5. Validação de métodos analíticos	21
1.5.1. Parâmetros de validação	22
1.5.2. Ferramentas utilizadas na validação	33
2. Parte experimental	39
2.1. Reagentes	39
2.2. Materiais.....	39
2.3. Equipamentos.....	40
2.4. Descrição do método	40
2.5. Preparação das soluções	41
2.6. Preparação das amostras	43
2.7. Procedimento experimental.....	44
2.8. Condições de análise cromatográfica	46
2.9. Identificação e quantificação dos fenóis voláteis	47
2.10. Tratamento dos resultados.....	47
2.10.1. Estimativa central e de dispersão	48
2.10.2. Teste de <i>Grubbs</i>	48
2.10.3. Teste F de <i>Snedecor Fisher</i>	49

2.10.4.	Teste de <i>Cochran</i>	50
2.10.5.	Forma da apresentação dos resultados	51
3.	Apresentação e discussão dos resultados.....	52
3.1.	Curvas de calibração	52
3.2.	Seletividade	56
3.3.	Limite de quantificação	60
3.4.	Gama de trabalho	64
3.5.	Linearidade	67
3.6.	Sensibilidade.....	68
3.7.	Justeza	69
3.7.1.	Ensaio de recuperação	69
3.7.2.	Ensaio interlaboratoriais	70
3.8.	Precisão	73
3.8.1.	Precisão em condições de repetibilidade.....	73
3.8.2.	Precisão em condições de precisão intermédia.....	81
3.9.	Incerteza do método	85
3.10.	Aplicação de método numa outra matriz.....	90
3.11.	Controlo de qualidade.....	92
3.11.1.	Declives.....	92
3.11.2.	Branco da amostra	93
3.11.3.	Padrão de verificação	94
3.11.4.	Ensaio interlaboratorial	96
4.	Conclusão	97
5.	Referências bibliográficas.....	99
6.	Anexos.....	106
6.1.	Fichas de segurança	106
6.2.	Soluções de calibração	109
6.2.1.	Cálculo da concentração efetiva da solução mãe de calibração e respetiva incerteza combinada associada.....	109
6.2.2.	Cálculo da concentração da solução de trabalho e respetiva incerteza combinada associada.....	111
6.2.3.	Cálculo da concentração da solução padrão de calibração e respetiva incerteza combinada associada.....	113
6.3.	Curvas de calibração	114
6.3.1.	Representação gráfica	114

6.3.2.	Cálculo das incertezas associadas aos declives e ordenadas na origem	116
6.4.	Limite de Quantificação.....	116
6.4.1.	Determinação da concentração adicionada no ensaio de recuperação	116
6.4.2.	Determinação da taxa de recuperação	117
6.5.	Gama de trabalho	117
6.5.1.	Teste F de Snedecor Fisher	117
6.6.	Sensibilidade.....	117
6.6.1.	Coeficiente de variação	117
6.7.	Justeza	118
6.7.1.	Determinação do Z-score	118
6.7.2.	Determinação do bias relativo.....	118
6.8.	Repetibilidade.....	119
6.8.1.	4-EF.....	119
6.8.2.	Teste de <i>Cochran</i>	121
6.8.3.	Determinação do CV_r e r_r	122
6.9.	Precisão intermédia	122
6.9.1.	Determinação do CV_l e r_l	123
6.10.	Incerteza do método	124
6.10.1.	Incerteza associada à componente da precisão	124
6.10.2.	Incerteza associada à componente da justeza	124
6.10.3.	Incerteza combinada e expandida	125

Índice das Figuras

Capítulo 1:

Figura 1.1: Esquema representativo dos serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences. ¹ (Fonte: coleção própria).....	2
Figura 1.2: Revisão generalizada dos diferentes processos de vinificação de vinhos tintos e brancos (Adaptado de ⁷).....	4
Figura 1.3: Balanço comercial internacional relativo ao comércio de maçãs (x 1000 euros) (Adaptado de ¹⁴).	6
Figura 1.4: a) Regiões vitivinícolas em Portugal. ¹⁵ ; b) Produção nacional de vinho por cor. ¹⁰	6
Figura 1.5: Formação de etilfenóis a partir dos seus precursores hidroxicinamicos. ³⁴	10
Figura 1.6: Cromatograma típico de uma mistura de um componente não retido e de um componente que sofre interação com a fase estacionária. ⁵⁹	17
Figura 1.7: Principais componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso. ⁶³	18
Figura 1.8: Esquema representativo de um detetor FID. ⁷⁴	20
Figura 1.9: Etapas para avaliar a estimativa da incerteza “passo-a-passo” (adaptado de ⁹³).	30

Capítulo 2:

Figura 2. 1: Esquema representativo do tratamento da amostra até à análise por GC-FID. (Fonte: coleção própria).....	46
--	----

Capítulo 3:

Figura 3.1: Cromatograma de uma solução de 4-EG e 4-EF de concentração de 1,50 mg/l contendo 4-decanol (C=983,9 mg/l) como padrão interno.	53
Figura 3.2: Representação gráfica da razão entre a área dos picos do 4-EG (azul) e 4-EF (laranja) e a área do PI, 4-decanol, em função da concentração dos padrões.	55
Figura 3.3: Cromatogramas obtidos no estudo da seletividade em diferentes vinhos: rosé, branco verde, branco maduro e tinto maduro. Em cada cromatograma é apresentado um branco do processo, o padrão de calibração com a concentração de 1,50 mg/l, uma amostra e a mesma amostra fortificada. As concentrações de fortificação encontram-se na Tabela 3.3.	58
Figura 3.4: Cromatograma do primeiro padrão da curva de calibração (c= 0,020 mg/l).	62
Figura 3.5: a) Cromatograma do primeiro padrão da curva de calibração e seleção de janelas de tempo.	63
Figura 3.6: Cromatograma de uma amostra de vinho branco obtido na participação num ensaio interlaboratorial. tr do 4-decanol = 25,068 min, tr do 4-EG = 41,761 min e tr do 4-EF = 46,821 min.....	71
Figura 3.7: Cromatograma de uma amostra de Vinho licoroso + Vinho licoroso fortificado (c = 1,25 mg/l) . tr do 4-decanol = 25,207 min; tr do 4-EG = 41,942 min e tr do 4-EF =46,825 min.	91

Figura 3.8: Carta de controlo de indivíduos do declive da reta de calibração do: a) 4-EG; b) 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde.	93
Figura 3.9: Carta de controlo de indivíduos do branco da amostra do: a) 4-EG; b) 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde..	94
Figura 3.10: Carta de controlo de indivíduos do padrão de verificação 1,50 mg/l do a) 4-EG; b) 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde.	95

Capítulo 6:

Figura 6.1: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração efetiva da solução mãe de de calibração.	110
Figura 6.2: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração da solução de trabalho.	112
Figura 6.3: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração da solução padrão.	113
Figura 6.4: Curvas de calibração do 4-EG (azul) e 4-EF (laranja) realizadas aquando da análise de amostras.	115

Índice das Tabelas

Capítulo 1:

Tabela 1.1: Classificação dos principais sabores recebidos pelas papilas gustativas ²²	8
Tabela 1.2: Conversão dos ácidos hidroxicinamicos em vinilfenóis e etilfenóis. ¹²	10
Tabela 1.3: Estudos baseados em métodos cromatográficos utilizados para quantificação de fenóis voláteis.	14
Tabela 1.4: Parâmetros de validação e respetiva metodologia de avaliação.	38

Capítulo 2:

Tabela 2.1: Reagentes utilizados e respetivas características na quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.	39
Tabela 2.2: Materiais utilizados e respetivas características para a quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.	40
Tabela 2.3: Equipamentos utilizados para a quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.	40
Tabela 2.4: Preparação das soluções padrão de fenóis voláteis a partir da solução de 10 mg/l em balões volumétricos de 100 ml, contendo 50 ul de 4-decanol.	43
Tabela 2.5: Condições cromatográficas utilizadas na determinação de fenóis voláteis por GC-FID.	47

Capítulo 3:

Tabela 3.1: Comparação dos tr (minutos) dos picos dos fenóis voláteis e PI em diferentes estudos. Neste trabalho o valor apresentado consiste na média de 5 análises.	54
Tabela 3.2: Valores das áreas dos picos obtidos para cada padrão de calibração apresentado com a incerteza associada (u) (CPI = 983,9 mg/l).....	54
Tabela 3.3: Volume de fortificação das concentrações de 4-EG 9,99 mg/l e de 4-EF= 10,0 mg/l adicionados a cada amostra (50 ml), dependendo da matriz a analisar.	56
Tabela 3.4: Tempos de retenção, assimetria e taxa de recuperação obtidas na matriz vinho rosé.....	59
Tabela 3.5: Tempos de retenção, assimetria e taxas de recuperação obtidas na matriz vinho branco verde.	59
Tabela 3.6: Tempos de retenção, assimetria e recuperações obtidas na matriz vinho branco maduro.	59
Tabela 3.7: Tempos de retenção, assimetria e recuperações obtidas na matriz vinho tinto maduro.....	59
Tabela 3.8: Determinação da taxa de recuperação (R) e desvio padrão (s) em cada ensaio no estudo do LDQ do método de quantificação do 4-EG para a matriz vinho tinto maduro.	61
Tabela 3.9: Determinação da taxa de recuperação (R) em cada ensaio no estudo do LDQ do método de quantificação do 4-EF para a matriz vinho tinto maduro.....	61
Tabela 3.10: Análise dos resultados do sinal/ruído.....	63
Tabela 3.11: Valores das áreas dos picos obtidos para os seis replicados do padrão com concentração 0,0200 mg/l, contendo 983,9 mg/l de 4-decanol.	65
Tabela 3.12: Valores das áreas dos picos obtidos para os seis replicados do padrão com C 4-EG = 1,498 mg/l e C 4-EF = 1,501 mg/l contendo 983,9 mg/l de 4-decanol.	65
Tabela 3.13: Valores da média e variância para obtidos para a concentração de 0,020 e 1,50 mg/l.	66
Tabela 3.14: Coeficiente de correlação (r) obtidos das retas de calibração de 4-EG e 4-EF.	67
Tabela 3.15: Valores dos declives (d) das retas de calibração realizadas ao longo do tempo.....	68
Tabela 3.16: Resultados dos ensaios de recuperação (R).....	69
Tabela 3.17: Resultados da concentração obtida (\bar{x}), do valor de referência (Xref) e desvios (s).	72
Tabela 3.18: Resultados dos intervalos admissíveis pela OIV para avaliar a justeza do método e valores de Z-score obtidos para a análise do material de referência.	72
Tabela 3.19: Valores da concentração de 4-EG, do desvio padrão da repetibilidade e da variância para cada matriz, em mg/l.....	73
Tabela 3.20: Valores da concentração de 4-EF, do desvio padrão da repetibilidade e da variância para cada matriz, em mg/l.....	74
Tabela 3.21: Valores da concentração de 4-EG, obtidos nas diferentes matrizes no estudo da repetibilidade.	75
Tabela 3.22: Valores da concentração de 4-EF obtidos nas diferentes matrizes, no estudo da repetibilidade.....	75

Tabela 3.23: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração baixo.	77
Tabela 3.24: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EG, no nível de concentração baixo.	77
Tabela 3.25: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração intermédio.	78
Tabela 3.26: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EG, no nível de concentração intermédia.	78
Tabela 3.27: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração alto.	79
Tabela 3.28: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EG, no nível de concentração alto.	79
Tabela 3.29: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), do limite de repetibilidade (r) obtidos para o 4-EG nos três níveis de concentração definidos.	80
Tabela 3.30: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), do limite de repetibilidade (r) obtidos para o 4-EF nos três níveis de concentração.	81
Tabela 3.31: Desvio médio da precisão intermédia (Si) e coeficiente de variação médio (CVi) obtidos para o 4-EG.	82
Tabela 3.32: Desvio médio da precisão intermédia (Si) e coeficiente de variação médio (CVi) obtidos para o 4-EF.	83
Tabela 3.33: Comparação da precisão obtida em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia do método dos fenóis voláteis.	84
Tabela 3.34: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração baixo do método de quantificação do 4-EG.	85
Tabela 3.35: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração intermédio do método de quantificação do 4-EG.	86
Tabela 3.36: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração alto do método de quantificação do 4-EG.	87
Tabela 3.37: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração baixo do método de quantificação do 4-EF.	88
Tabela 3.38: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração intermédio do método de quantificação do 4-EF.	88
Tabela 3.39: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração alto do método de quantificação do 4-EG.	89
Tabela 3.40: Volume de fortificação adicionado de uma solução de fenóis de (c 4-EG= 9,99 mg/l e c 4-EF = 10,0 mg/l), recuperações obtidas e respetiva média.	91
Tabela 3.41: Valor alvo, desvio padrão e limites de aviso e controlo do declive das retas de calibração de 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo.	92
Tabela 3.42: Valor médio, desvio padrão e limites de aviso e controlo do declive da reta de calibração de 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo do branco da amostra.	93
Tabela 3.43: Valor médio, desvio padrão e limites de aviso e controlo do 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo do padrão de verificação (1,50 mg/l).	95

Capítulo 6:

Tabela 6.1: Ficha de segurança dos reagentes utilizados.	106
Tabela 6.2: Valores auxiliares para o cálculo da concentração da solução mãe de calibração.	111
Tabela 6.3: Certezas para o cálculo da concentração da solução mãe de calibração. .	111
Tabela 6.4: Incertezas para o cálculo da incerteza da concentração da solução de trabalho.	112
Tabela 6.5: Incertezas para o cálculo da concentração da solução padrão de calibração.	114
Tabela 6.6: Valores auxiliares e respetivas incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem para n=7, realizada no dia 17/01/2022.	116
Tabela 6.7: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho baixa.	119
Tabela 6.8: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho baixa.	119
Tabela 6.9: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho intermédia.	120
Tabela 6.10: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho intermédia.	120
Tabela 6.11: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho alta.	120
Tabela 6.12: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho alta.	121
Tabela 6.13: Teste de Cochran para a gama de trabalho baixa.	121
Tabela 6.14: Teste de Cochran para a gama de trabalho intermédia.	121
Tabela 6.15: Teste de Cochran para a gama de trabalho alta.	121
Tabela 6.16: Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia no nível de trabalho baixo.	123

Lista de abreviaturas

4-EC	4-etilcatecol
4-EF	4-Etilfenol
4-EG	4-Etilguaiacol
4-VF	4-vinilfenol
4-VG	4-vinilguaiacol
A	Área do pico
BIPEA	<i>Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques</i>
C	Teste de <i>Cochran</i>
C 4-EGexp	Concentração do 4-Etilguaiacol experimental
C- 4-EGp	Concentração do 4-Etilguaiacol padrão
C 4-EFexp	Concentração do 4-Etilfenol experimental
C- 4-EFp	Concentração do 4-Etilfenol padrão
CV	Coefficiente de variação
CVi	Coefficiente de variação da precisão intermédia
CVr	Coefficiente de variação de repetibilidade
CQE	Controlo de qualidade externo
CQI	Controlo de qualidade interno
DAD	Detetor de conjunto de díodos (do inglês <i>Diode-array detector</i>)
DPCS	Amostra diárias de controlo do processo (do inglês, <i>Daily process control sample</i>)
DPV	Voltametria diferencial por impulso (do inglês, <i>Differential pulse voltammetry</i>)
ECD	Detetor por captura de eletrões (do inglês, <i>Electron capture detector</i>)
FERA	Food and Environment Research Agency
FID	Detetor de ionização de chama (do inglês, <i>Flame ionization detector</i>)
FLD	Detetor de fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence detector</i>)
G	Teste de <i>Grubbs</i>
GC	Cromatografia gasosa (do inglês, <i>Gas chromatography</i>)

G.L.	Graus de liberdade
H₀	Hipótese nula
H₁	Hipótese alternativa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High performance liquid chromatography</i>)
HS-SPME	Microextração em fase sólida de headspace (do inglês, <i>Headspace-solid phase microextraction</i>)
K	Fator de expansão
LC	Cromatografia líquida (do inglês, <i>Liquid chromatography</i>)
LDD	Limite de deteção
LDQ	Limite de quantificação
LIA	Limite de aviso inferior
LIC	Limite inferior de controlo
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês, <i>Liquid-liquid extraction</i>)
LR	Gama de linearidade (do inglês, <i>linear range</i>)
LSA	Limite de aviso superior
LSC	Limite superior de controlo
MR	Material de referência
MRC	Material de referência certificado
MS	Espectrometria de massa (do inglês, <i>Mass spectrometry</i>)
OIV	Organização internacional da vinha e do vinho
PI	Padrão interno
PLOT	Coluna capilar com camada porosa (do inglês, <i>Porous layer open tube</i>)
r	Coeficiente de correlação
r²	Coeficiente de determinação
r_i	Limite de precisão intermédia relativo
r_r	Limite de repetibilidade
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês, <i>Relative standard deviation</i>)
s	Desvio padrão
S²	Variância amostral

Sa	Desvio padrão associado à ordenada na origem
Sb	Desvio padrão associado ao declive
Si	Desvio padrão de precisão intermédia
S/N	Razão sinal-ruído
Sr	Desvio padrão de repetibilidade
SPE	Extração em fase sólida (do inglês, <i>Solid phase extraction</i>)
tm	Tempo morto
tr	Tempo de retenção
ts	Tempo de permanência do componente na fase estacionária
TCD	Detetor de condutividade térmica (do inglês, <i>Thermal conductivity detector</i>)
U	Incerteza expandida
vma	Valor máximo admissível
x_s	Valor suspeito

1. Introdução

A consciencialização dos consumidores para uma alimentação saudável, cuidada e conseqüentemente que melhore o seu bem-estar tem vindo a aumentar. Como resposta a isso, foram surgindo em todo o mundo inúmeros laboratórios de ensaio que permitem analisar os produtos alimentares de modo a garantir que estes são seguros para a alimentação. Nesse sentido, a segurança alimentar e o controlo de qualidade são pontos fulcrais. Entende-se como segurança alimentar o conjunto de normas de produção, transporte e armazenamento de alimentos visando determinadas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais padronizadas, segundo as quais os alimentos serão adequados ao consumo. Já o controlo da qualidade corresponde ao conjunto de atividades e técnicas operacionais que são utilizadas para satisfazer os requisitos de qualidade.

Neste contexto surge a Silliker Portugal S.A., pertencente ao grupo Mérieux NutriSciences (MxNS), empresa onde foi desenvolvida a presente dissertação.

Foi ainda apresentado o estado da arte relativamente a métodos analíticos descritos na literatura para a determinação de fenóis voláteis em vinhos e a importância da validação de um método e da aplicação das ferramentas de controlo de qualidade.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho da metodologia desenvolvida no laboratório de ensaio, que permite quantificar, com um determinado grau de confiança, os níveis de 4-etilguaicol (4-EG) e 4-etilfenol (4-EF) em diferentes tipos de vinhos, recorrendo à cromatografia gasosa (GC) com detetor de ionização de chama (FID).

1.1. Empresa Silliker Portugal S.A. – Grupo MxNS

A empresa surgiu em julho de 1992, em Vila Nova de Gaia, inicialmente denominada EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda. Numa altura em que a prevenção da qualidade e segurança alimentar se acentuava e que a oferta de

serviços de análises e assessoria escasseia, a EGI rapidamente assumiu a posição de líder nacional no setor.¹

A Silliker Portuga S.A. pertence ao grupo Mérieux NutriSciences (MxNS), sendo esta uma empresa multinacional desenvolvida pelo Instituto Mérieux com o propósito de responder à crescente necessidade de assegurar o controlo da qualidade alimentar, contribuindo para a segurança alimentar dos consumidores finais destes produtos. É este o principal compromisso do grupo, o que motivou a criação do slogan *Better Food, Better Health, Better World*.

A confiança demonstrada pelos consumidores permitiu à empresa expandir a sua atividade para outros setores industriais, nomeadamente: água e meio ambiente; agroquímicos; farmacêutica e dispositivos médicos; bens de consumo; higiene pessoal e cosmética, tal como é possível visualizar na **Figura 1.1**.¹



Figura 1.1: Esquema representativo dos serviços apresentados pela Mérieux NutriSciences.¹ (Fonte: coleção própria).

Atualmente, disponibiliza uma ampla gama de serviços, tais como: serviço de análise microbiológica, química e sensorial, consultoria em segurança alimentar, auditoria, rotulagem e legislação. Esta encontra-se representada em 26 países, contando com mais de 8000 colaboradores distribuídos por mais de 100 laboratórios acreditados pelos 5 continentes.

Quanto à estrutura, existe uma divisão laboratorial, sendo que cada laboratório se responsabiliza por setores diferentes de análise. Nesta divisão pode-se então diferenciar o Laboratório de Química clássica, onde são realizadas as técnicas de análises químicas volumétricas, o Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, onde são realizadas essencialmente as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, o Laboratório de Microbiologia, que fornece as análises microbiológicas e o Laboratório de Análise sensorial.

A diversidade de análises realizadas nos laboratórios permite obter uma informação global, detalhada e completa sobre as diferentes matrizes alimentares. A capacidade por parte da empresa para a prestação de um serviço completo e acima do satisfatório é a razão do seu sucesso. ¹

De forma a garantir a competência pretendida, a empresa define políticas e procedimentos de trabalho que visam assegurar a qualidade do serviço prestado ao cliente. Exemplo disso é a garantia que todos os ensaios realizados sejam sempre executados de acordo com os métodos estabelecidos, cumprindo os requisitos dos clientes e segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025 (Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração) ².

1.2. Da uva ao vinho

Por definição, o vinho é um produto obtido pelo processo de vinificação/fermentação alcoólica, total ou parcial de uvas frescas, provenientes de vários tipos de castas (*Vitis Vinifera*), cujos bagos são esmagados, prensados ou transformados por processos tecnológicos permitidos por lei. ³

O vinho é composto fundamentalmente por: água; álcool etílico ⁴; ácidos orgânicos fixos (como o ácido tartárico); ácidos orgânicos voláteis (ácido acético) ⁵; minerais; sais; glicerol, que confere o corpo (macieza e aveludado); taninos, que conferem a cor e adstringência; matéria corante; matérias minerais; matérias azotadas e vitaminas. ^{6,7}

Na produção de vinho branco são utilizadas uvas de castas brancas ou tintas, pois as polpas das uvas, geralmente, são claras e sem pigmento de cor. As uvas são sujeitas a uma prensagem, de modo a separar as películas e as grainhas, da polpa, originando o mosto que vai fermentar para dar origem ao vinho branco.⁸

Na produção de alguns vinhos brancos, quando estes são produzidos a partir de castas aromáticas é possível efetuar uma maceração pelicular pré-fermentativa, em que as películas e as grainhas mantêm o contacto com o mosto, antes da fermentação alcoólica, de maneira a obter uma maior extração de compostos precursores de aromas.^{9, 10}

No que concerne ao vinho rosé e tinto, este é produzido a partir de uvas tintas, por um processo de fermentação/maceração, onde se separaram, por prensagem, as partes sólidas das uvas quando estas atingem a coloração rosada desejada, após um período de tempo de maceração, e em seguida o processo é semelhante ao do vinho branco (**Figura 1.2**).¹¹

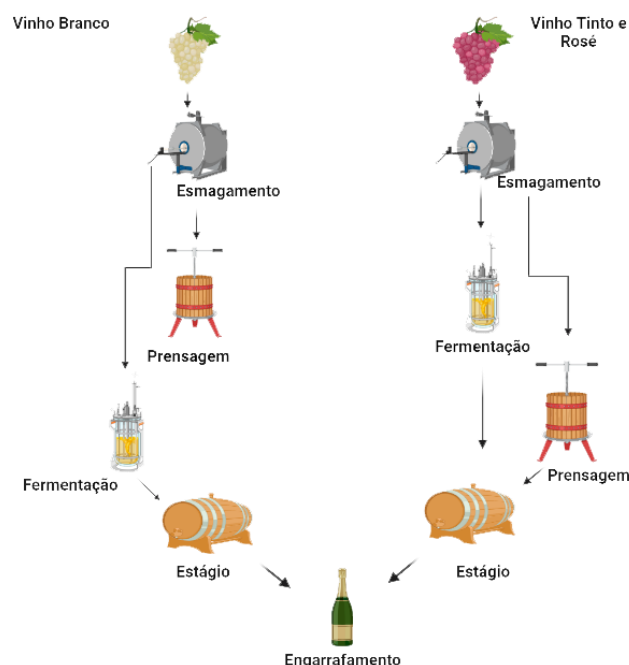


Figura 1.2: Revisão generalizada dos diferentes processos de vinificação de vinhos tintos e brancos (Adaptado de 7).

Os processos de vinificação (**Figura 1.2**) são fatores muito importantes para a qualidade de um vinho, bem como para as características organolépticas. Esta é uma fase crucial para o vinicultor, visto que a colheita de uvas de boa qualidade pode ser sobreposta pela má condução de processos enológicos.¹²

Neste trabalho foram utilizados vinhos brancos, tintos e rosés de diferentes regiões. Os vinhos verdes são aqueles que são produzidos na região dos vinhos verdes, que por norma é a região entre Douro e a região do Minho. Os restantes são vinhos maduros.

1.2.1. Distribuição

O setor vitivinícola é um dos setores mais importantes na economia mundial, sendo que em Portugal, a produção, o consumo e a exportação têm vindo a aumentar, particularmente no ano passado (2021), onde representou cerca de 2 % das exportações nacionais, sendo o produto de maior relevo no segmento agroalimentar, o que equivale a mais de mil milhões de euros.¹³

No que diz respeito ao comércio internacional (**Figura 1.3**). Em 2020, Portugal registou um balanço comercial positivo de mais de 689 milhões de euros. Este valor tem flutuado ao longo dos últimos 10 anos. O valor mais baixo, de 524 milhões de euros, foi atingido em 2010 e o crescimento foi gradual ao longo dos anos, com exceção de 2013, contribuindo sempre com lucro.

O principal fornecedor do mercado interno é a Espanha, enquanto a maioria das exportações vai para França, Reino Unido, Alemanha e países baixos, na Europa. O Brasil e os Estados Unidos da América representam também uma parte considerável das exportações.¹⁴

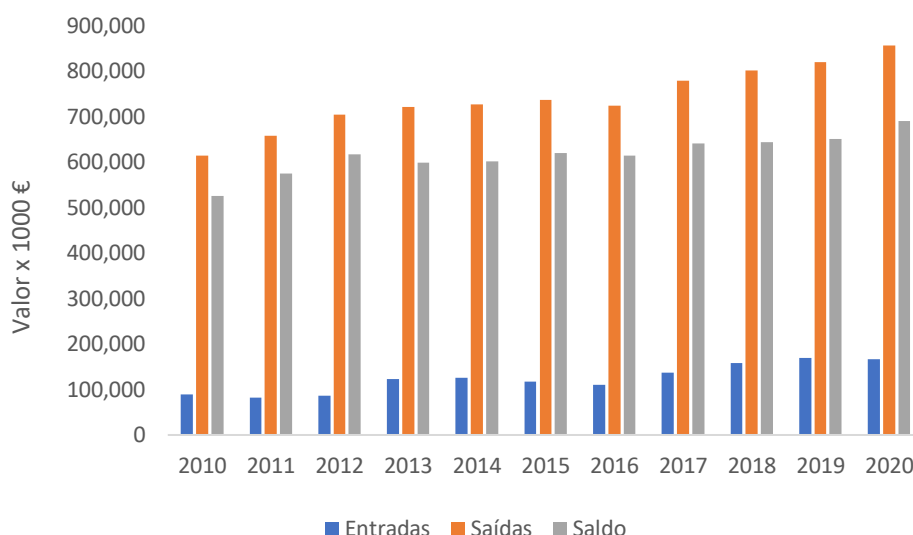


Figura 1.3: Balanço comercial internacional relativo ao comércio de maçãs (x 1000 euros) (Adaptado de ¹⁴).

Das 13 regiões vitivinícolas que atualmente existem no nosso país (**Figura 1.4a**), as regiões do Douro, Lisboa e Alentejo são as que, de um modo geral, apresentam valores mais elevados, representando no ano de 2021/2022, cerca de 22 %, 18 % e 18 %, respetivamente, da produção anual. Pelo contrário, as regiões do Algarve e dos Açores são as que menos contribuem para a produção nacional, tendo no ano de 2021/2022, representado 0,2 % e 0,1 %, respetivamente, da produção anual. ¹⁵

No que diz respeito à cor, Portugal apresenta uma produção de vinhos tinto/rosé muito superior à produção de vinhos brancos, cerca de 70 % de vinhos em comparação com os 30 % de vinhos brancos (**Figura 1.4b**). ¹⁰

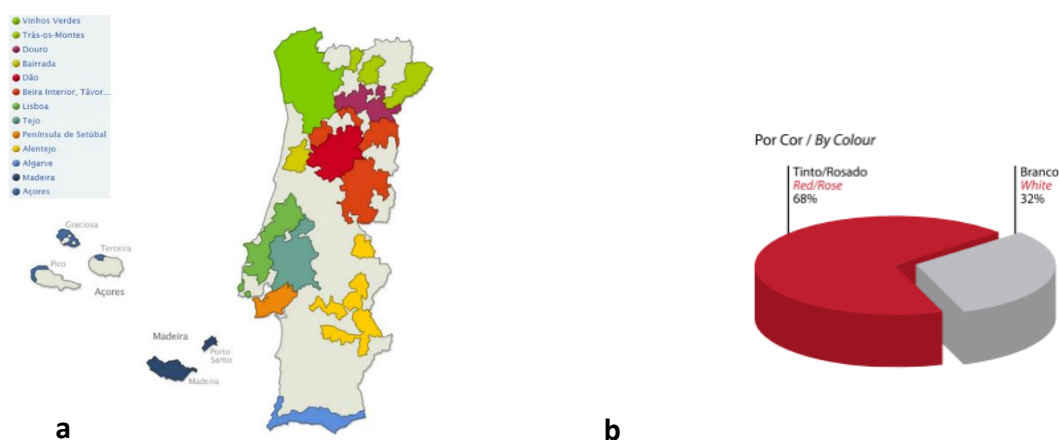


Figura 1.4: a) Regiões vitivinícolas em Portugal. ¹⁵; b) Produção nacional de vinho por cor. ¹⁰

É do conhecimento comum que o consumo irresponsável e excessivo de álcool é prejudicial trazendo graves consequências para a saúde e implicações a nível social.¹⁶ No entanto, ao longo das últimas três décadas foram sendo acumuladas evidências que o consumo moderado, especialmente de vinho tinto, podia ser benéfico para a saúde, isto porque contém algumas substâncias, como os flavonóides, resveratrol e os polifenóis, com ações antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras.¹⁷ Nesse sentido, a garantia da qualidade destes produtos ganha um grande relevo, assegurando que os produtos acabados são mais competitivos e capazes de evitar alguns dos problemas associados às barreiras comerciais de exportação.^{18,19}

1.2.2. Características sensoriais

Para o consumidor, os requisitos da qualidade estão associados às características sensoriais intrínsecas do vinho, isto é, com o impacto que a aparência, olfato, paladar e imagem têm no consumidor, que deriva de muitos aspetos, como: rótulo, prémios atribuídos e custo.²⁰ Assim sendo, um vinho com atributos sensoriais reconhecidos, uma boa imagem e um preço competitivo será considerado de grande valor para os consumidores.²¹

O conjunto das características organolépticas de um vinho é evidenciado pela apreciação da visão, paladar e olfato.²² A visão é o sentido imediato, caracterizado primeiro pela sua cor, limpidez ou transparência. O paladar é importante pois dele resultam as impressões da temperatura, consistência, viscosidade e suavidade.¹²

Nesse sentido, o produtor assume cada vez mais o papel de satisfazer as exigências do consumidor, procurando obter vinhos aromáticos, com cores límpidas e sabores apreciáveis.

A **Tabela 1.1** apresenta, de forma resumida, os cinco sabores básicos evidenciados pelas papilas gustativas.

Tabela 1.1: Classificação dos principais sabores recebidos pelas papilas gustativas ²².

Sabor	Origem
Doce	Álcool e teor em açúcar
Ácido	Ácidos orgânicos
Salgado	Sais
Amargo	Compostos fenólicos
Umami	Ácido glutâmico

Já o olfato é um sentido que nos leva a um registo infindável de aromas, caracterizando o vinho pela sua intensidade, evolução e carácter. O aroma de um vinho descreve-se como uma interação retronasal que corresponde à interação do sabor e odor que cada indivíduo exprime como uma experiência agradável ou não. ²³

1.2.3. Alteração do aroma por ação de leveduras

Entre todas as possíveis contaminações microbianas, as leveduras dos géneros *Dekkera*, comumente designada de *Brettanomyces* têm um importante relevo do ponto de vista enológico, devido ao seu potencial negativo na evolução aromática do vinho, podendo mesmo deteriorar vinhos já elaborados. ²⁴

As leveduras *Brettanomyces bruxellensis* podem ser isoladas quer da superfície das uvas, embora não seja muito comum, quer de barris de madeira usados durante o armazenamento ou envelhecimento dos vinhos. ²⁵ Estas leveduras podem causar defeitos organoléticos que permanecem nos poros da madeira após limpeza, proporcionando um ambiente em que microrganismos indesejáveis possam sobreviver e ser transferidos de vinho para vinho, cada vez que são utilizados. ²⁶

Embora os métodos de limpeza estejam a tornar-se mais sofisticados (vapor de água, ozonização, entre outros), ²⁷ a forma e microestrutura da madeira proporcionam aos organismos indesejáveis um grande grau de proteção. ²³ Além disso, o pH baixo do vinho, as condições anaeróbias rapidamente geradas e os baixos níveis dióxido de enxofre (SO₂) exigidos pela indústria vitivinícola, aumentam estas dificuldades. ¹²

Os produtos metabólicos resultantes da contaminação pelas leveduras *Brettanomyces* são os fenóis voláteis, que incluem o 4-vinilfenol (4-VF), o 4-vinilguaiacol (4-VG), o 4-EF, o 4-EG e o 4-etilcatecol (4-EC).²⁸ Estes metabolitos são indicativos da presença e da atividade destas leveduras, estando associadas a defeitos olfativos descritos como "couro" e "suor a cavalo" mascarando, assim, os desejáveis aromas frutados e florais presentes nos vinhos.²⁹ O limiar de percepção do 4-etilfenol é de 440 µg/l, enquanto do 4-etilguaiacol é de 47 µg/l.¹²

Atualmente, a *Brettanomyces bruxellensis* é considerada a principal ameaça para a qualidade dos vinhos. O efeito não é só direto, devido à produção de fenóis voláteis, mas também indireto devido às medidas tecnológicas necessárias para controlar a sua atividade, que podem ainda levar à redução da qualidade dos vinhos. Este facto acontece pois são sujeitos a tratamentos químicos, tais como: adição de ácidos orgânicos³⁰ ou o uso de dicarbonato dimetílico (DMDC)³¹ no engarrafamento. Também são sujeitos a tratamentos físicos como a filtração³² e/ou centrifugação³³, provocando uma diminuição da concentração de aromas, pigmentos e estrutura coloidal, impossibilitando assim que o produto exprima todo o seu potencial.¹⁹

1.2.4. Fenóis voláteis

Existem dois fatores que influenciam a presença de compostos fenólicos no vinho: a atividade microbiana de leveduras que podem converter substâncias não fenólicas em compostos fenólicos, cerca de 95 % dos casos, e a transformação do substrato previamente presente na uva que pode ser enzimática.

Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se nos vacúolos das células das películas e polpas sob a forma de ésteres e libertam-se para o mosto durante o esmagamento das uvas. Normalmente estes compostos encontram-se em baixas concentrações, mas o seu somatório contribui com um papel importante no aroma estando, por isso implicados no aparecimento de fenóis voláteis, com as consequentes alterações aromáticas dos vinhos.³¹

Os fenóis voláteis têm origem na ação sequencial de duas enzimas num substrato que contém um ácido hidroxicinâmico. Este ácido é transformado no seu vitifenol

correspondente pela cinamato descarboxilase e este será reduzido por uma vinilfenol redutase dando origem ao etilfenol correspondente. ³⁴ Este processo está apresentado na **Figura 1.5**.

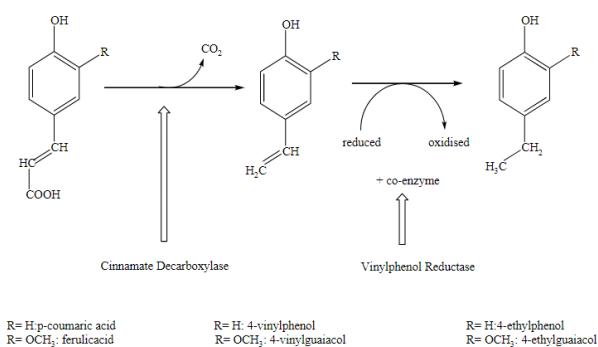


Figura 1.5: Formação de etilfenóis a partir dos seus precursores hidroxicinâmicos.³⁴

Na **Tabela 1.2**, estão representados alguns ésteres dos ácidos cinâmicos e respetivos processos que culminam com a redução do vinilfenol no etilfenol correspondente. ¹²

Tabela 1.2: Conversão dos ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e etilfenóis.¹²

Ésteres tartáricos dos ácidos cinâmicos	→ Ácidos hidroxicinâmicos	→ Vinilfenóis	→ Etilfenóis
R=H: ácido <i>p</i> -cutárico	Ácido <i>p</i> -cumárico	4-vinilfenol	4-etilfenol
R=OCH: ácido fertárico	Ácido ferúlico	4-vinilguaiacol	4-etilguaiacol
R=OH: ácido caftárico	Ácido cafeíco	4-vinilcatecol	4-etilcatecol

Apesar da análise sensorial ser muito importante na deteção dos defeitos olfativos, a quantificação analítica dos etilfenóis é crucial, pois permite lotear vinhos e rejeitar outros num nível muito mais baixo, impedindo que estes vinhos entrem no mercado e consequentemente manter a qualidade da marca de cada vinho.

1.3. Técnicas analíticas para a determinação de fenóis voláteis

O controlo, a monitorização e a deteção dos fenóis voláteis possuem um papel cada vez mais fundamental nos dias de hoje. A procura de novas técnicas para o controlo de qualidade é mais frequente, sendo possível encontrar várias técnicas para o efeito. Assim, a quantificação de fenóis voláteis pode ser conseguida através de vários métodos, como por exemplo: métodos cromatográficos, nomeadamente a GC em combinação com diferentes detetores, FID ²⁶, ou espectrometria de massa (MS) ³⁵, ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com recurso a detetor de fluorescência (FLD) ³⁶, ou detetor de rede de díodos (DAD). ³⁷

Os métodos espectrofotométricos ³⁸ podem ser usados para a determinação de fenóis voláteis em vinhos sendo considerados métodos acessíveis, poucos dispendiosos e proporcionam medições rápidas. ³⁹ Todavia, apresentam desvantagens, uma vez que apresentam uma baixa seletividade. ⁴⁰

No estudo desenvolvido por *Siegrist et al.* ³⁸, foi analisada a viabilidade de diferentes procedimentos de medição analítica para a determinação de fenóis voláteis em vinhos. Foram utilizadas as técnicas espectrofotométricas, como o ultravioleta-visível (UV-Vis) e as análises cromatográficas, como GC-MS e HPLC-DAD. Os autores concluíram que é de facto possível alcançar uma boa precisão e seletividade recorrendo aos métodos cromatográficos, ao contrário dos métodos espectrofotométricos. Por isso, é necessário fazer um balanço entre a precisão e a seletividade relativamente ao custo da análise de maneira a decidir o método a utilizar. ³⁸

Em alternativa, existem também os métodos eletroquímicos, como a voltametria cíclica ⁴¹ ou a voltametria diferencial por impulso (DPV). ⁴² Estes métodos apresentam diversas vantagens, como um tempo de resposta pequeno, uma elevada sensibilidade e um baixo custo, ⁴³ contudo, naturalmente há desvantagens visto que a matriz do vinho é bastante complexa, podendo inclusive existir interferentes que alteram o valor da resposta. ⁴⁴

De entre os métodos referidos, será explicado com maior profundidade, a CG por ser a técnica mais utilizada na determinação de fenóis voláteis em vinhos.

Na **Tabela 1.3** encontram-se apresentados diferentes estudos realizados recorrendo à CG em diferentes matrizes de vinhos para a quantificação de fenóis voláteis. Entre as matrizes apresentadas, a que aparenta ser a mais estudada é o vinho tinto, que tem mais propriedades benéficas para a saúde, mas também é mais suscetível ao aparecimento dos fenóis voláteis. No que diz respeito à extração da amostra, a técnica de extração que é mais comumente utilizada é a extração líquido-líquido (LLE), devido à simplicidade desta técnica.

Analisando a **Tabela 1.3**, verifica-se que, dentro dos diversos métodos de análise existentes, o método mais utilizado para a determinação de fenóis voláteis é o GC-FID, no entanto também existem vários estudos recorrendo ao GC-MS. Relativamente aos analitos analisados, verifica-se que para o 4-EC, existe apenas um estudo. Já os mais estudados são o 4-EG e o 4-EF, que foram estudados neste trabalho.

Comparando os estudos realizados aquele que apresentou melhores características foi o de *Fariña et al.*,⁴⁵ onde os coeficientes de determinação (r^2) foram elevados para ambos analitos e o limite de deteção (LDD) um dos mais baixos. Neste estudo, verificam-se melhores resultados para o 4-EF.

O LDD mais baixo foi obtido pelo estudo de *Martorell et al.*,⁴⁶ onde ambos os analitos apresentam valores muito baixos. No entanto, os valores de r^2 são os mais baixos de todos os trabalhos apresentados.

No estudo de *Monje et al.*⁴⁷, foram realizados dois estudos, em que a técnica de extração é variada, mas manteve-se o mesmo método de análise. Pela técnica de microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME), os autores referem que a sensibilidade foi praticamente a mesma para o 4-EG e 4-EF. Já pela LLE, a sensibilidade foi ligeiramente mais elevada para o 4-EF do que para o 4-EG. Relativamente ao desvio padrão relativo (RSD), os autores referem que são obtidos valores mais baixos, em cerca de 2,5 vezes, pela técnica HS-SPME. Posto isto, foi verificado que a HS-SPME seria a técnica mais indicada para a preparação da amostra para avaliar os fenóis voláteis.

Por fim, em relação à técnica de extração em fase sólida (SPE), foram apresentados dois estudos recorrendo a métodos de análise diferentes. No primeiro estudo desenvolvido por *López et al.*⁴⁸, a relação entre o sinal e a concentração é linear,

com os r^2 superiores a 0,995. O RSD obtido foi < 5 % para todos os analitos, indicando uma baixa dispersão dos resultados e as taxas de recuperação obtidas (R) foram > 80 %. No segundo estudo, da autoria de *Domínguez et al.*,⁴⁹ é referido que os resultados da calibração são bastante bons, sendo melhor para o 4-EF. O RSD obtido foi < 10 %, e as R foram > 80 %, exceto para o 4-VG onde foi obtida uma R de apenas 66 %. No entanto deve-se considerar que estes são compostos muito voláteis e, portanto, perdas durante o tratamento da amostra podem ser elevadas. Assim, comparando os dois métodos de análise, é possível concluir que o GC-MS apresentou melhores resultados.

Neste estudo, ao contrário do referido anteriormente, foi utilizada a técnica GC-FID dado que é de fácil operação, baixo custo, apresenta uma ampla gama linear de concentração e elevada sensibilidade.

Tabela 1.3: Estudos baseados em métodos cromatográficos utilizados para quantificação de fenóis voláteis.

Matriz	Extração da amostra	Método de análise	Analito	LR ($\mu\text{g/ml}$)	r^2	LDD ($\mu\text{g/ml}$)	Ref.
Vinho tinto Vinho verde maduro	LLE	GC-MS Padrão interno: 2H4-4- etilfenol	4-VF	0-1000	0,9986	4	50
			4-VG	0-1000	0,998	4	
			4-EG	0-1000	0,9995	2	
			4-EF	0-1000	0,9994	3	
			4-EC	0-1000	0,9989	5	
Vinho tinto	LLE	GC-MS Padrão interno: 1- heptanol	4-EG	50-1500	0,994	0,095	45
			4-EF	50-1500	0,999	0,147	
Vinho tinto Vinho branco Vinho rosé	SPE	GC-MS Padrão interno: mistura de 4-hidroxi-4- metil-2-pentanona e 2- octanol	4-VF	0,027-0,299	0,9997	0,01	48
			4-VG	0,008-0,564	0,998	0,00083	
			4-EG	0,011-0,290	0,998	$3,5 \times 10^{-5}$	
			4-EF	0,009-0,588	0,997	0,00054	
Vinho xerez	SPE	GC-FID Padrão interno: 3,4- dimetilfenol	4-VF	0,668–26,7	0,997	5,28	49
			4-VG	0,383–30,64	0,996	7,45	
			4-EG	0,275–22,00	0,998	3,77	
			4-EF	0,287–22,96	0,9997	1,60	

Tabela 1.3 (continuação): Estudos baseados em métodos cromatográficos utilizados para quantificação de fenóis voláteis.

Matriz	Preparação da amostra	Método de análise	Analito	LR ($\mu\text{g/ml}$)	r^2	LDD ($\mu\text{g/ml}$)	Ref.
Vinho tinto	LLE	GC-FID Padrão interno:3,4- dimetilfenol	4-EG	0,025-10	0,999	-	47
			4-EF	0,025-10	0,997	-	
Vinho tinto	HS-SPME	GC-FID Padrão interno:3,4- dimetilfenol	4-EG	0,005-5	0,998	-	47
			4-EF	0,005-5	0,989	-	
Vinho tinto	HS-SPME	GC-FID Padrão interno: 4- metilfenol	4-EG	0,04-0,400	0,980	0,05	46
			4-EF	0,200-1,800	0,980	0,05	

LR: Gama de trabalho; r^2 : Coeficiente de determinação; LDD: Limite de detecção; LLE: Extração líquido-líquido; SPE: Extração em fase sólida; HS-SPME: Microextração em fase sólida de *headspace*

1.4. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica que compreende um grupo diversificado e importante de métodos, permitindo separar componentes muito semelhantes de misturas complexas e identificar os analitos numa amostra.⁵¹ Esta separação depende da distribuição das várias moléculas entre duas fases.

A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel é então forçada a passar através de uma fase estacionária imiscível fixa.⁵² De modo geral, a fase móvel é responsável pelo transporte da amostra enquanto a fase estacionária é responsável pela separação dos analitos. Normalmente, esta fase está contida numa coluna e é nesse enchimento que se dá a separação compostos.⁵³ A separação dos constituintes ocorre como resultado das diferenças de velocidades com que cada um deles percorre a fase estacionária, quando arrastados pela fase móvel. Como consequência dessa diferença na mobilidade, os componentes da amostra separam-se em picos ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente.^{54,55}

A separação dos picos resulta num gráfico definido pelo tempo de retenção (t_r) e pela intensidade do sinal num cromatograma.⁵⁶ O t_r de um componente tem duas contribuições: o tempo de permanência do componente na fase móvel, conhecido por tempo morto (t_m) e o tempo de permanência do componente na fase estacionária (t_s). De notar que o t_m é o mesmo para todos os restantes componentes. A soma das duas componentes identifica-se como t_r , que corresponde ao tempo desde a injeção da amostra até a obtenção do pico máximo de deteção do componente. O t_m corresponde ao máximo do pico de deteção da injeção que reflete o tempo necessário a que os compostos não retidos passam pela fase estacionária e, por último, t_s , é o tempo que o componente fica retido após a saída dos restantes (**Figura 1.6**).⁵⁷

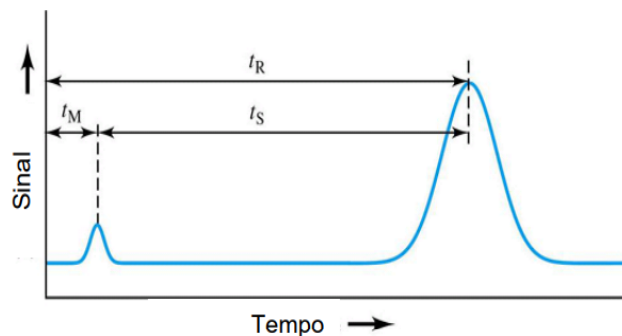


Figura 1.6: Cromatograma típico de uma mistura de um componente não retido e de um componente que sofre interação com a fase estacionária.⁵⁷

A identificação dos analitos é realizada através da comparação com padrões, onde são conhecidos os t_r de cada composto.⁵⁸ A quantificação dos mesmos é normalmente conseguida através de retas de calibração. Portanto, a utilização da cromatografia permite não só a identificação dos componentes, mas também a sua quantificação, o que representa uma das grandes mais-valias associadas a esta técnica. Além disso apresenta uma grande sensibilidade, resolução e eficiência.⁵⁹

A eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser influenciada por inúmeros fatores, nomeadamente as condições de análise como: temperatura; volume de injeção; composição; propriedades inerentes à matriz da amostra; fase estacionária da coluna e, principalmente, o comprimento da coluna.⁶⁰

Uma das principais características da cromatografia é o facto de ser uma técnica extremamente versátil. Apesar do extrato final a analisar estar geralmente no estado líquido, o tipo de cromatografia é definido consoante o tipo de analito a estudar e da matriz extraída. Se os compostos não forem voláteis e apresentarem um elevado peso molecular é mais utilizada a cromatografia líquida (LC). Na eventualidade dos compostos serem mais voláteis ou as amostras serem gases é utilizada a cromatografia gasosa, GC.

⁶¹ Como os fenóis são voláteis, foi utilizado cromatografia gasosa.

1.4.1. Cromatografia Gasosa

Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são o gás de arraste (1), o controlador de fluxo (2), o injetor (3), a coluna (4), o forno (5), o detetor (6) e o sistema de processamento de dados (7).⁶² Na **Figura 1.7** é possível visualizar esses componentes.

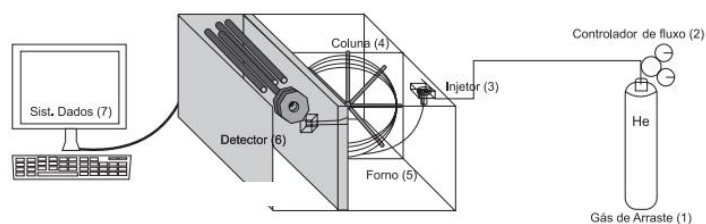


Figura 1.7: Principais componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso.⁶²

Tal como o nome da técnica indica, os gases são parte integrante deste sistema. O gás tem como objetivo transportar a amostra através da fase estacionária sem alterar a sua estrutura e conduzi-la ao detetor com o mínimo de interferência possível. Devido a estes requisitos, o gás de arraste será de alta pureza, inerte e adequado ao tipo de detetor. Os principais gases de arraste são Hélio (He); Hidrogénio (H₂) e nitrogénio (N₂) e neste trabalho foi usado o Hidrogénio (H₂).⁶²

O controlador de fluxo permite realizar o controlo e medição do fluxo do gás de arraste e é uma variável importante para a precisão dos resultados.

O sistema amostrador-injetor é composto por vários itens tais como: a seringa de injeção e o *liner*. É neste local que se inicia a vaporização da amostra. Após ser recolhida com recurso à seringa, a amostra é introduzida num tubo cilíndrico de quartzo, parte integrante do injetor, denominado de *liner*, que devido às altas temperaturas permite a volatilização da amostra.⁵⁷

A amostra é então transportada para a coluna cromatográfica através do gás de arraste. A coluna está localizada no forno que torna possível a criação de rampas de temperatura adequadas para o tipo de análise. Este deve ter a capacidade de manter a

temperatura programada e de permitir um rápido aquecimento e arrefecimento da coluna.⁶³

A injeção na coluna cromatográfica pode ser feita de vários modos, nomeadamente, em modo *split*, *splitless* ou *on-column*. O modo mais usual para quantificação dos fenóis é o modo de *splitless*, sendo este o utilizado neste trabalho, devido ao facto de toda a amostra ser injetada no cromatógrafo. Este modo de injeção possui uma melhor sensibilidade e precisão.⁶⁴

Relativamente às colunas, existem dois tipos: as colunas capilares e as colunas de enchimento. A coluna deve ser escolhida de acordo com as propriedades do analito a ser analisado tais como: polaridade; peso molecular; solubilidade; volatilidade e quantidade de analitos na amostra. Quanto maior for o peso molecular e a polaridade da substância, menor será a sua volatilidade e conseqüentemente maior será a dificuldade para analisar.^{62, 65} As colunas capilares são as mais utilizadas. São constituídas por sílica fundida e revestida exteriormente por poliamidas que conferem a grande flexibilidade da coluna. Já as colunas de enchimento são constituídas por vidro sinalizado e encontram-se empacotadas por partículas sólidas revestidas com o líquido que compõe a fase móvel.⁶⁶

Neste trabalho foi utilizada uma coluna capilar com camada porosa (PLOT). Nesta coluna, a fase estacionária é constituída de partículas de sílica fundida fixas às paredes internas da coluna. A fase estacionária é a principal responsável pela separação dos analitos. Esta separação ocorre devido aos processos diferenciados de transferência de massa dos analitos entre fase estacionária e fase móvel (Hidrogénio).⁶²

O detetor tem como objetivo amplificar o sinal, quantificar os componentes separados pela coluna e a sua escolha deve ser feita tendo em conta o analito que se pretende analisar. Existem diferentes tipos de detetores, sendo que os mais comuns na cromatografia gasosa são os seguintes: ionização de chama (FID)⁶⁷; por captura de eletrões (ECD)⁶⁸; de condutividade térmica (TCD)⁶⁹ e por espectrometria de massa (MS).

48

A especificação do detetor baseia-se, essencialmente, em dois fatores, um deles é a sensibilidade, ou seja, o sinal que este é capaz de produzir, o outro é o ruído, que

caracteriza a instabilidade do detetor. Quanto maior for o ruído menor será a sensibilidade.⁷⁰

O detetor de ionização de chama, FID, utilizado neste trabalho é um dos mais usados para a determinação de fenóis voláteis, pois permite identificar moléculas com ligações C-H. O seu funcionamento baseia-se na combustão do analito presente no estado gasoso, numa chama de hidrogénio ou ar sintético, levando à formação do ião CHO^+ . Assim, as temperaturas têm de ser elevadas para uma completa combustão.⁷¹

A deteção ocorre quando o hidrogénio se mistura com o eluente na coluna e é queimado num pequeno queimador. Os iões formados pela chama são recolhidos devido à diferença de potencial relativamente alta, existente entre o queimador e um eléctrodo cilíndrico, que se encontra em redor da chama. A altura e a área do pico são, em geral, proporcionais ao número de carbonos ligados ao hidrogénio para a mesma quantidade de substância dos componentes.⁶²

Este detetor responde perante praticamente todos os hidrocarbonetos e é insensível aos outros compostos, como por exemplo, N_2 ou He que são normalmente os gases de arraste.⁶¹ É classificado como um detetor destrutivo, sensível e com uma boa estabilidade.⁷² No entanto, a possibilidade de fuga de gases é maior e deve estar num local onde não haja variações de temperatura ou suscetível à exposição solar.⁷⁰

Na **Figura 1.8** está representado o esquema dos constituintes de um detetor FID.

73

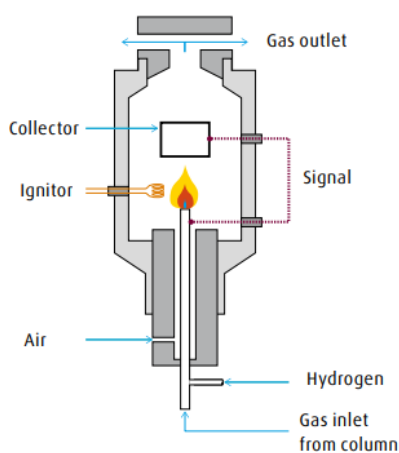


Figura 1.8: Esquema representativo de um detetor FID.⁷³

1.5. Validação de métodos analíticos

Sempre que um método analítico é implementado e antes de ser executado como método de rotina, é necessário proceder à sua validação. Este é um estudo experimental que tem como objetivo demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado ao fim a que se destina, de modo a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos. Assim, neste subcapítulo, aborda-se a validação de um método analítico quantitativo quando ponderada pelo estudo e conhecimento dos parâmetros de validação: seletividade; gama de trabalho/linearidade; limites de quantificação; sensibilidade; precisão, em termos de precisão intermédia e repetibilidade e justeza.⁷⁴

Na norma NP EN ISO 17025:2018 está referido que os métodos de ensaio utilizados em laboratórios acreditados podem ser normalizados ou não, isto é, os métodos não normalizados a serem utilizados pelo laboratório devem, numa fase inicial, ser devidamente validados, e, posteriormente, sujeitos a uma avaliação periódica, de modo a serem reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional.²

Na validação e verificação de métodos analíticos são necessárias determinadas ferramentas de validação que se encontram inseridas nas ações de controlo de qualidade interno (CQI) e controlo de qualidade externo (CQE) de um laboratório.

O CQI depende do laboratório e é referente aos procedimentos que este pode adotar de modo a monitorizar de forma contínua os resultados das medições e avaliar se estes estão corretos. Estes tipos de ferramentas incluem: materiais de referência internos; brancos da amostra; soluções-padrão; ensaios de recuperação; análise de amostras em duplicado; elaboração de cartas de controlo e realização de testes estatísticos.⁷⁴

O CQE consiste nos procedimentos adotados pelo laboratório, mas cuja implementação depende de um organismo externo ao laboratório. Aqui incluem-se a participação em ensaios de comparação interlaboratorial.⁷⁵

1.5.1. Parâmetros de validação

1.5.1.1. Seletividade/Especificidade

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes, que são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito e assim provocar desvios sistemáticos.⁷⁴

A especificidade de um método analítico corresponde à capacidade de o método avaliar inequivocamente o analito em relação a outras substâncias eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possibilidade de existir interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa.⁷⁶

Usualmente, a seletividade é avaliada através de ensaios de recuperação, estudando-se, assim, as possíveis interferências existentes na matriz. Um método para ser considerado seletivo e específico deverá apresentar um valor de R próximo dos 100 %, embora em determinadas situações é possível que este intervalo seja maior de acordo com as características do método e da concentração do analito⁷⁴

1.5.1.2. Limiares analíticos

Os limiares analíticos são classificados como LDD e limite de quantificação (LDQ). O LDD, corresponde à concentração mínima de analito que pode ser detetada pelo método.⁷⁴ O limite de quantificação, LDQ, corresponde à concentração de analito mais baixa, que pode ser quantificada pelo método, com um determinado nível de confiança.

⁷⁷

Geralmente, consideram-se dois tipos de abordagens para determinar o LDQ, através de parâmetros instrumentais ou parâmetros metodológicos. Quanto ao cálculo do LDQ do método, este pode ser realizado utilizando amostras que tenham sido

sujeitas a todo o tratamento que é aplicado às amostras, nas quais, efetivamente se pretende quantificar o analito. ⁷⁵

Embora existam diversas maneiras para calcular o LDQ, neste estudo foram utilizadas apenas duas. A primeira, corresponde ao cálculo do LDQ metodológico, sendo que o LDQ corresponde à concentração do padrão mais baixo, diferente de zero, utilizado no traçado da curva de calibração. Para avaliar esta hipótese, podem realizar-se ensaios de recuperação de modo a demonstrar que este padrão corresponde ao LDQ. Para tal, fortifica-se um branco de amostra ou uma amostra que, idealmente, não deve conter o analito em estudo, ou apresente uma concentração de analito inferior ao do padrão com concentração mais baixa, de modo à concentração de analito, após fortificação ser igual ao LDQ que se pretende definir. Este ensaio deve ser realizado efetuando dez réplicas independentes, de modo a determinar-se a taxa de recuperação média. Se este valor estiver contido no intervalo de R definido pelo laboratório, pode admitir-se que a concentração do primeiro padrão da curva de calibração corresponde ao LDQ. ⁷⁴

A segunda maneira de determinar o LDQ é através da avaliação da relação sinal/ruído (S/N) Neste caso, o LDQ é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para um padrão contendo baixa concentração do analito, onde a concentração corresponde à razão que apresenta um fator de 10. ⁷⁸

Neste trabalho apenas se teve em conta o LDQ para a validação do método.

1.5.1.3. Curva de calibração

A calibração, em análises quantitativas, indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida.

Assim, o desafio antes de se proceder à determinação de qualquer parâmetro de desempenho reside na seleção do melhor modelo para ajustar os resultados obtidos e, portanto, o critério de escolha do modelo de regressão que melhor se ajusta aos pontos é baseado no método dos mínimos quadrados. ⁷⁹

No caso do modelo de regressão linear, observa-se a existência de uma relação linear entre os valores de y e de x, o que visualmente se traduz numa reta. A partir da reta de calibração deste modelo, é possível obter uma equação da reta de calibração dada pela **Equação 1.1**.

$$y = bx + a \quad 1.1$$

onde b corresponde ao declive e a à ordenada na origem.

Os valores destas grandezas devem ser acompanhados da respetiva incerteza associada. Para tal, numa primeira fase é necessário calcular os desvios padrão associados ao declive (S_b) e ordenada na origem (S_a). Estes são calculados a partir das **Equações 1.2 e 1.3**.

$$S_b = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad 1.2$$

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad 1.3$$

onde n corresponde ao número de padrões utilizados para a construção da curva de calibração e $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual do modelo de regressão linear e, pode ser calculado recorrendo à **Equação 1.4**.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2}} \quad 1.4$$

Após o cálculo destas grandezas, é então, calculada a respetiva incerteza associada, isto é, S_{at} e S_{bt} respetivamente. O valor de t utilizado no cálculo destes parâmetros é obtido da tabela *t-student* para 95 % de confiança e n-2 graus de liberdade (G.L.).⁷⁴

1.5.1.4. Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo em que o sistema analítico avaliado produz resultados com uma incerteza aceitável, isto é, nesta gama o analito deve apresentar uma precisão e justeza aceitáveis.⁷⁴

Na validação de um método consideram-se dois tipos de gamas de trabalho, a instrumental e a do método. Relativamente à gama de trabalho do método, esse intervalo pode ser determinado construindo um gráfico da concentração medida em função da concentração real de analito nas amostras analisadas. Portanto, para determinar a gama de trabalho do método é necessário recorrer a amostras cuja concentração de analito seja rigorosamente conhecida. Recorrendo a essa estratégia, a gama de trabalho do método será aquela em que a concentração determinada não é significativamente diferente da concentração real conhecida. A forma mais comum de avaliar esta gama de trabalho é a realização do teste F de *Snedecor-Fisher*, visto que pretende demonstrar que existe homogeneidade de variâncias ao longo da curva.⁷⁵

1.5.1.5. Linearidade

A linearidade é capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito. Existem diversas formas de avaliar a linearidade, entre elas destaca-se o valor do coeficiente de correlação (r). O valor de r é adimensional e encontra-se compreendido entre -1 e 1.

De acordo com o Guia RELACRE 13, pode admitir-se que um modelo de regressão linear se encontra bem ajustado se o valor de r for superior a 0,995.⁷⁴

1.5.1.6. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método, ou equipamento, distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Este parâmetro pode ser definido como o quociente entre a variação de uma indicação de um sistema de medição (ΔY) e

a variação na concentração de analito correspondente (ΔX), tal como demonstra a **Equação 1.5**.

$$S = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad 1.5$$

Na prática, se a curva for linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração.⁷⁴

Idealmente, a sensibilidade associada ao sistema analítico deverá ser a maior possível, de forma a permitir uma maior discriminação de amostras com pequenas diferenças na concentração de analito, devido à maior diferença entre os respetivos sinais analíticos.

1.5.1.7. Justeza

A justeza, também chamada de veracidade, corresponde ao grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Como não é possível executar um número infinito de medições, a justeza não pode ser medida, todavia, é possível fazer uma estimativa dessa característica de desempenho, recorrendo ao “erro de justeza”. Uma estimativa do erro de justeza baseia-se na comparação do valor médio de um conjunto de valores de medição e um determinado valor de referência. Assim sendo, este parâmetro permite avaliar a componente dos efeitos sistemáticos.⁷⁵

Existem várias abordagens para avaliar a justeza tais como: análise de MR, realização de ensaios de recuperação, testes comparativos com outro método e, ainda, pode ser utilizada informação obtida em ensaios interlaboratoriais. A escolha da abordagem que deverá ser usada depende dos meios disponíveis.

1.5.1.8. Precisão

A precisão corresponde ao grau de concordância entre os valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições específicas, sendo elas: a repetibilidade; precisão intermédia e reprodutibilidade. A precisão pode variar com a gama de concentração, sendo recomendado o estudo em três níveis de concentração: baixa, intermédia e alta. Este parâmetro permite avaliar a qualidade dos resultados tendo em consideração possíveis erros aleatórios. ⁷⁴

Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se aos ensaios efetuados (normalmente nunca inferior a seis ensaios) sobre a mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, como por exemplo: o mesmo laboratório; o mesmo analista; o mesmo equipamento; o mesmo tipo de reagentes e/ou mesmos intervalos de tempo. ⁷⁴

A forma de avaliar a precisão em condições de repetibilidade é através do desvio padrão de repetibilidade (S_r) associado aos resultados considerados ou na forma de coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) para uma determinada gama de concentração. O CV é dado pela **Equação 1.6**.

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 \quad 1.6$$

A partir do s_r pode-se determinar o limite de repetibilidade (r_r). Este é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma determinada probabilidade, normalmente 95 %, a diferença absoluta entre 2 resultados de ensaio (X_i e X_{i-1}), obtidos em condições de repetibilidade. O valor de r_r é dado pela **Equação 1.7**.

$$r_r = 2,8 \times S_r \quad 1.7$$

Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|x_i - x_{i-1}| \leq r_r$. Caso tal não se verifique, deve repetir-se o ensaio em questão. ⁷⁴

Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, ou amostras idênticas, utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, mas fazendo variar uma ou mais condições, tais como: análises em dias diferentes ou analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Este parâmetro permite avaliar o impacto das alterações que poderão ocorrer no dia-a-dia do laboratório e é reconhecido como o parâmetro mais representativo da variabilidade dos resultados em laboratório. ⁷⁴

A forma de avaliar a precisão, em condições de precisão intermédia baseia-se no desvio padrão de precisão intermédia (S_I) associado aos resultados considerados ou na forma de coeficiente de variação precisão intermédia (CV_I) para uma determinada gama de concentração. Caso o número de replicados seja igual a dois, o S_I é dado pela **Equação 1.8**.

$$S_I = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1} (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad \mathbf{1.8}$$

Onde t corresponde ao número de amostras estudadas, y_{j1} ao primeiro resultado para o duplicado da amostra e y_{j2} ao segundo resultado para o duplicado da amostra.

Para além do S_I também é possível determinar o limite de precisão intermédia relativo (r_I) e o CV_I , recorrendo às **Equações 1.9 e 1.10**, respetivamente.

$$r_I = 2,8 \times \frac{S_I}{\bar{x}} \times 100 \quad 1.9$$

$$CV_I = \frac{S_I}{\bar{x}} \times 100 \quad 1.10$$

1.5.1.9. Incerteza

A incerteza de uma medição é definida como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações disponíveis utilizadas e, quanto maior for a incerteza, menor será a confiabilidade do resultado. Apesar disso, em termos rigorosos, a incerteza não é uma característica do desempenho de um sistema analítico, mas sim uma propriedade dos resultados obtidos usando esse sistema de medição. É possível proceder à sua estimativa recorrendo aos dados recolhidos na validação.⁸⁰

Existem diversas abordagens/metodologias usadas para o cálculo da incerteza da medição, distinguindo-se duas abordagens principais: “passo a passo” e baseadas em dados da validação. Em ambos os casos, o objetivo principal passa pela determinação das incertezas combinada (u_c) e expandida (U).⁸¹A primeira abordagem consiste em identificar todas as características do sistema analítico que podem contribuir para a incerteza do resultado, estimar as contribuições de cada uma, atribuindo-lhe um valor numérico, e combinar estas de forma a obter um valor final. De um modo geral, esta metodologia pode ser dividida em quatro etapas, como ilustrado na **Figura 1.9**.

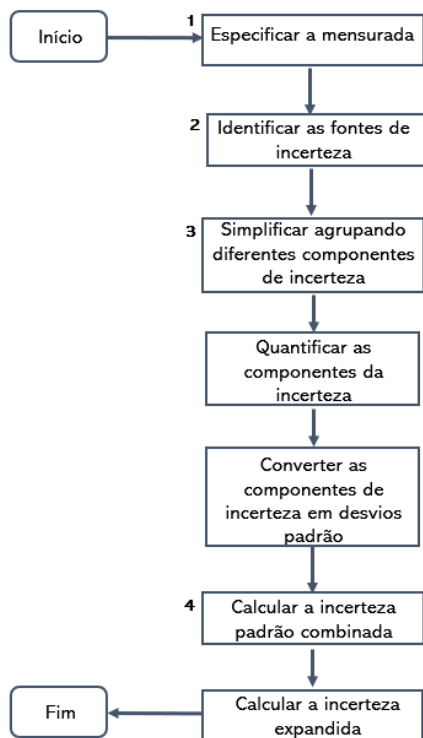


Figura 1.9: Etapas para avaliar a estimativa da incerteza “passo-a-passo” (adaptado de ⁸¹).

A etapa inicial tem como objetivo especificar a mensurada que se pretende determinar de forma clara e objetiva, bem como as variáveis que essa mensurada depende, através de uma expressão matemática.

Já na segunda etapa é possível identificar as variáveis que a mensurada depende, para isso, geralmente recorre-se à construção de diagramas de “espinha de peixe”, também denominados de diagramas de “causa-efeito”. Estes diagramas são feitos de forma a facilitar o processo de identificação e agrupamento das diversas fontes de incerteza.

Após a identificação das fontes de incerteza, segue-se a quantificação da incerteza resultante dessas fontes. É de realçar que as incertezas calculadas devem ser incertezas padrão, e para tal deve admitir-se uma distribuição retangular se todos os valores da grandeza apresentarem igual probabilidade de ocorrerem (**Equação 1.11**), ou uma distribuição triangular se não há razão para esperar obter os extremos da grandeza (**Equação 1.12**).⁹⁴

$$u(x) = \frac{\alpha}{\sqrt{3}} \quad 1.11$$

$$u(x) = \frac{\alpha}{\sqrt{6}} \quad 1.12$$

Por fim, as contribuições para a incerteza global são combinadas em conformidade obtendo-se a incerteza padrão combinada $u_c(y)$. Esta é um desvio padrão que é estimado usando a propagação das incertezas. A incerteza expandida (U) é dada pela **Equação 1.13**.

$$U(x) = k \times u_c \quad 1.13$$

onde o fator de expansão (k) é definido como sendo dois, caso os resultados sigam uma distribuição normal, para um nível de confiança de 95%.

Já a segunda abordagem, visa simplificar a estimativa da incerteza, reduzindo a quantidade de cálculos necessários, através do agrupamento de alguns termos de incerteza num termo único. A incerteza de medição é estimada combinando as incertezas associadas à precisão e à veracidade, considerando-se a componente dos erros aleatórios e sistemáticos, respetivamente. ⁸⁰

Assim sendo, o primeiro passo desta abordagem passa pela determinação das componentes da $u_{(precisão) \text{ relativa}}$ e da $u_{(justeza) \text{ relativa}}$ separadamente. Contudo é de realçar que estas incertezas devem estar na forma de incertezas relativas de modo a poderem ser combinadas.

Para o cálculo da $u_{(precisão) \text{ relativa}}$ é necessário determinar a incerteza associada à precisão intermédia ($u_{precisão}$) sendo que este valor equivale ao S_I . De seguida, deve-se considerar a incerteza associada à precisão intermédia na forma relativa ($u_{(precisão) \text{ relativa}}$) que é equivalente ao CV_I .

A componente da $u_{(justeza) relativa}$ pode ser calculada considerando os resultados obtidos em ensaios de recuperação. Esta componente é dada pela **Equação 1.14**.

$$u_{(justeza) relativa} = \sqrt{(bias\ relativo)^2 + (u_{(recuperação) relativa})^2} \quad 1.14$$

O cálculo do *bias* relativo do ensaio de recuperação aplica-se segundo a **Equação 1.15**.

$$bias\ relativo\ (\%) = \frac{|[x_{observado}] - [x_{teórico}]|}{[x_{teórico}]} \times 100 \quad 1.15$$

Para determinar a $u_{(recuperação) relativa}$ deve-se, numa fase inicial, determinar a incerteza associada à concentração de analito adicionada na fortificação (u_{add}). A fortificação da amostra pode ser efetuada recorrendo a uma solução de trabalho de analito. Neste caso, a u_{add} é calculada através da **Equação 1.16**.

$$u_{(add) relativa} = \frac{u_{add}}{C_{add}} \times 100 \quad 1.16$$

onde C_{add} corresponde à concentração de analito adicionada no ensaio de recuperação.

Além disso, quando se determina a componente da $u_{(justeza) relativa}$ considerando os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, é necessário ter em conta a incerteza na forma relativa associada ao volume de solução de fortificação adicionado ($u_{(vol) relativa}$). Esta incerteza é dada pela **Equação 1.17**.

$$u_{(vol) relativa} = \frac{u_{add}}{V_{add}} \times 100 \quad 1.17$$

Devem combinar-se a $u_{(add) relativa}$ e a $u_{(vol) relativa}$ para determinar a $u_{(recuperação) relativa}$, tal como na **Equação 1.18**.

$$u_{(recuperação) relativa} = \sqrt{(u_{(add) relativa})^2 + (u_{(vol) relativa})^2} \quad \mathbf{1.18}$$

Por fim, calcula-se a $u_C(y)$ através da **Equação 1.19**, seguida do cálculo da U, de acordo com a **Equação 1.13**, para determinar a incerteza do método.

$$u_C(y) = \sqrt{(u_{(precisão) relativa})^2 + (u_{(justeza) relativa})^2} \quad \mathbf{1.19}$$

Das abordagens referidas, cada uma das estratégias tem as suas vantagens e desvantagens e a escolha da estratégia mais adequada depende das características do sistema analítico considerado.

1.5.2. Ferramentas utilizadas na validação

1.5.2.1. Brancos

Os brancos são soluções em que o analito não está presente. Permitem avaliar quanto sinal medido é atribuível à substância a analisar e quanto é devido a outras causas. Distinguem-se dois tipos principais de brancos o de amostra e o de reagentes.

Branco da amostra

O branco da amostra corresponde à matriz da amostra sem o analito. Frequentemente, é impossível obter um branco de amostra. Contudo, sempre que possível, esse branco deverá ser usado para obter uma estimativa mais realista do tipo de interferências que poderão ser encontradas ao aplicar rotineiramente o sistema analítico avaliado. ⁷⁴

Branco de reagente

O branco de reagente corresponde a reagentes que são adicionados à amostra ao longo do método analítico, estes incluem solventes para dissolução ou extração. Permitem obter informação sobre a contribuição destes reagentes para o sinal medido, possibilitando efetuar a correção adequada. ⁸²

1.5.2.2. Amostra de rotina

Correspondem a amostras habitualmente analisadas no laboratório. No caso deste laboratório são chamadas de amostra diárias de controlo do processo (DPCS) e estas podem fornecer informações importantes relativamente à precisão e às interferências que podem ser encontradas diariamente nas análises de rotina. De realçar, quando o resultado de uma DPCS se encontra fora dos limites estabelecidos, todos os resultados de amostras desta série de trabalho ficam suspensos até a não conformidade ser resolvida.

1.5.2.3. Ensaio de recuperação

É uma das ferramentas mais utilizadas em estudos de validação de métodos analíticos. Consiste na adição de diferentes quantidades de analito, de acordo com a sua concentração esperada. Como a amostra poderá conter já algum analito, a adição terá de ser feita de modo que a concentração final de analito não exceda o valor máximo de concentração do sistema analítico validado, ou seja, a concentração obtida não deve ser superior ao máximo da gama de trabalho. ⁷⁵

A adição a uma determinada amostra poderá não passar unicamente pela adição de analito, podendo adicionar-se à amostra quantidades variáveis de um determinado interferente, a fim de identificar a partir de que concentração de interferente a concentração de analito é afetada significativamente.

A R é calculada, em percentagem, através da **Equação 1.20**.

$$R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{X_{add}} \times 100 (\%) \quad 1.20$$

Em que \bar{x}' corresponde ao valor médio da amostra fortificada, \bar{x} ao valor médio da amostra não fortificada e X_{add} à concentração da solução padrão adicionada com uma determinada concentração.

Idealmente, R deve ser igual a 100 %, contudo sabe-se que este valor está dependente da concentração de analito presente na amostra e do método de ensaio utilizado, pelo que se deve realizar um ensaio de recuperação em três níveis de concentração da gama de trabalho, sendo da responsabilidade do laboratório definir a gama de R admissível para cada uma delas. ⁷⁴

1.5.2.4. Materiais de referência

Um material de referência (MR) é, essencialmente, um material ou solução em que um determinado parâmetro ou propriedade foi caracterizada de modo a poder servir como uma referência metrológica. ⁷⁴

É importante fazer a distinção entre MR e material de referência certificado (MRC) pois existem diferenças relevantes quanto à forma como esses materiais podem ser usados na validação. Um MRC inclui qualquer material em que a propriedade de interesse é estável, homogénea, com um elevado grau de caracterização, rastreabilidade e documentação, e onde está apresentada a respetiva incerteza. ⁸³

Sempre que possível, a validação deverá ser realizada recorrendo a MRC que tenham o mesmo tipo de matriz e gama de trabalho. ⁷⁸

1.5.2.5. Ensaio interlaboratoriais

Segundo a norma ISO/IEC 17043, um ensaio interlaboratorial corresponde à organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo item, ou similares, por dois ou mais laboratórios respeitando as condições pré-estabelecidas. Normalmente são

regulados por organismos como o *Food and Environment Research Agency* (FERA) ou *Bureau Interprofessionnel d'Etudes Analytiques* (BIPEA).⁸⁴

A classificação dos ensaios interlaboratoriais normalmente baseiam-se nos seus objetivos, sendo estes: a avaliação do desempenho do método, a avaliação das características de materiais e a avaliação do desempenho de laboratórios e analistas. Geralmente, o último denominado de ensaio interlaboratorial de aptidão é o mais utilizado.⁷⁴

Neste tipo de ensaio, os laboratórios participantes analisam um ou mais materiais idênticos, que foram fornecidos pela entidade organizadora, através de um método escolhido pelo laboratório. De seguida, é avaliada a exatidão dos resultados obtidos e, é atribuído ao laboratório um indicador numérico do seu desempenho.⁸⁵ Geralmente, este indicador numérico é apresentado na forma de *Z-score*, dado pela **Equação 1.21**.

$$Z = \frac{\bar{x} - X_{ref}}{s} \quad 1.21$$

Sendo, \bar{x} o valor de concentração obtido pelo laboratório, X_{ref} é o valor aceite como verdadeiro e s é o desvio definido pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial.

Segundo a norma ISO 17043:2010, a avaliação do *Z-score* em valor absoluto conduz às seguintes conclusões. Quando o $|z| \leq 2$, o desempenho é satisfatório; $2 < |z| \leq 3$, o desempenho é questionável e para valores > 3 , o desempenho é classificado como não satisfatório.⁸⁴

Por este motivo, a participação nestes ensaios, permite ao laboratório detetar erros sistemáticos nas suas medições e, deste modo, adotar medidas corretivas quando o nível de aceitação requerido não é atingido. Para além disso, estes ensaios contribuem para a determinação da justeza do método na validação do mesmo.

1.5.2.6. Cartas de controlo de indivíduos

As cartas de controlo constituem uma ferramenta estatística interessante para avaliar os resultados obtidos em ensaios, uma vez que a monitorização dos resultados obtidos em laboratório permite verificar se estes estão fora do intervalo definido, e assim tomar medidas antes que os efeitos se tornem irreversíveis. No entanto, esta monitorização pode gerar uma grande quantidade de resultados, tornando a sua interpretação mais difícil. Assim, as cartas de controlo facilitam a compreensão destes dados. ⁸⁶

Estas cartas correspondem a gráficos onde são registados os valores medidos de uma determinada grandeza em função do tempo. A construção de cartas de controlo de indivíduos requer a realização de um estudo prévio de modo a definir o valor alvo e os limites de aviso e de controlo. Deste modo, é feito um estudo preliminar onde são efetuadas análises de uma série de amostras ou padrões, em dias diferentes. De seguida, determina-se a média, \bar{x} , sendo este o valor alvo da carta de controlo e, o respetivo s obtido em condições de precisão intermédia. ⁷⁴ Os limites superiores de aviso (LSA) e inferiores de aviso (LIA) são dados com 95 % de confiança pelas **Equações 1.22 e 1.23:**

$$LSA = \bar{x} + 2s \quad 1.22$$

$$LIA = \bar{x} - 2s \quad 1.23$$

Os limites superiores de controlo (LSC) e inferiores de controlo (LIC) são obtidos com 99,7 % de confiança recorrendo às **Equações 1.24 e 1.25:**

$$LSC = \bar{x} + 3s \quad 1.24$$

$$LIC = \bar{x} - 3s \quad 1.25$$

Posteriormente, todos os valores obtidos diariamente para esta grandeza devem ser introduzidos na carta de controlo. Deste modo, é possível verificar a deteção de desvios nos valores obtidos.⁸⁷

Na **Tabela 1.4**, encontra-se de forma resumida as metodologias utilizadas para avaliar cada parâmetro da validação dos fenóis voláteis.

Tabela 1.4: Parâmetros de validação e respetiva metodologia de avaliação.

Parâmetro de validação	Metodologia de avaliação
Seletividade	Ensaio de recuperação
Limite de quantificação	Ensaio de recuperação; Relação S/N
Gama de trabalho	Teste de F de <i>Snedecor-Fisher</i>
Linearidade	Coefficiente de correlação (f)
Sensibilidade	Declive
Justeza	Ensaio de recuperação; Ensaio interlaboratoriais
Precisão	Análise de réplicas
Incerteza	Dados da validação

2. Parte experimental

Nesta secção são descritos os materiais, equipamentos e reagentes utilizados, a caracterização das amostras, assim como os procedimentos experimentais efetuados ao longo deste trabalho.

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados e as suas respetivas características encontram-se apresentados na **Tabela 2.1**. De salientar que todos os reagentes são de grau analítico e a água desionizada do tipo I (condutividade de 0,02 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Tabela 2.1: Reagentes utilizados e respetivas características na quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.

Reagentes*	Fórmula química	Grau de pureza (%)	Massa molar (g/mol)	Marca
Éter dietílico	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	$\geq 99,8$	74,12	Honeywell
Hexano	C_6H_{14}	$\geq 99,0$	86,18	Honeywell
4-decanol	$\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$	$> 98,0$	158,28	TCI
Metanol	CH_4O	$> 99,8$	32,04	Honeywell
4-etilguaicol	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2$	99,5	152,18	Sigma-Aldrich
4-etilfenol	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	97,0	122,16	Acros Organics
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	$\geq 99,8$	46,07	Honeywell

*Informação sobre advertências de perigo e de prudência no Anexo 6.1.

2.2. Materiais

De forma a realizar o procedimento analítico, foram utilizados materiais volumétricos devidamente calibrados e verificados sempre que utilizados, como é indicado na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2: Materiais utilizados e respetivas características para a quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.

Material volumétrico	Capacidade (ml)	Incerteza (ml)
Micropipeta (Eppendorf)	1	$\pm 0,0006$
	5	$\pm 0,0041$
	10	$\pm 0,0064$
Balão volumétrico (Normax)	100	$\pm 0,1$
	500	$\pm 0,25$
	1000	$\pm 0,40$
Pipeta graduada	15	$\pm 0,03$
	50	$\pm 0,05$

2.3. Equipamentos

Durante o procedimento analítico foram utilizados determinados equipamentos indicados na **Tabela 2.3**. Por sua vez, a balança e o frigorífico foram controlados diariamente através da monitorização dos valores de massa e de temperatura, respetivamente, em cartas de controlo.

Tabela 2.3: Equipamentos utilizados para a quantificação dos fenóis voláteis em bebidas alcoólicas.

Equipamentos
Balança de precisão (Mettler Toledo, XS603S) ($\pm 0,1$ mg)
Frigorífico, regulável a uma temperatura de 4 ± 2 °C
Agitador magnético regulado a 700 rpm (Cimarec i Multipoint)
Evaporador de nitrogénio (Thermo Scientific)
Cromatógrafo gasoso com detetor FID (Agilent Technologies)

2.4. Descrição do método

Quando um método de ensaio é implementado e otimizado em laboratório, este deverá ser descrito e caracterizado num documento o mais detalhado possível, de forma a garantir a sua execução por qualquer pessoa com experiência adequada. O método

de ensaio aplicado no laboratório encontra-se descrito nesta secção para posteriormente ser implementado o controlo de qualidade.

2.5. Preparação das soluções

2.5.1.1. Solução de extração, 50 % (v:v)

A escolha do solvente extrator é o passo determinante desta técnica, uma vez que a eficiência de extração irá depender da afinidade do soluto pelo solvente extrator. Este deve ser imiscível na matriz aquosa, para que ambos os líquidos possam ser facilmente separados. ⁸⁸

A solução de extração foi preparada num balão volumétrico de $100 \pm 0,1$ ml, adicionando 50 ml de éter dietílico e perfazendo-se o volume com hexano.

Esta solução deve ser preparada no dia da realização do ensaio.

2.5.1.2. Solução de etanol, 10 % (v:v)

A solução de etanol a 10 % (v:v) foi preparada num balão volumétrico de $1000 \pm 0,4$ ml, adicionando 100 ml de etanol, perfazendo-se o volume com água desionizada.

Esta solução deve ser preparada no dia da realização do ensaio.

2.5.1.3. Solução de 4-decanol, 1000 mg/l

Para a preparação da solução de padrão interno pesaram-se 100 mg de 4-decanol para um balão volumétrico de $100 \pm 0,1$ ml e fez-se o volume do balão com metanol.

Esta solução tem validade de doze meses, quando conservada em condições de refrigeração e devidamente selada com Parafilm[®].

2.5.1.4. Solução mãe de fenóis voláteis, 1000 mg/l

Para a quantificação dos fenóis voláteis, 4-EG e 4-EF, em bebidas alcoólicas, procedeu-se, numa primeira fase, à preparação de uma solução mãe de calibração conjunta de fenóis voláteis com concentração de 1000 mg/l. Para ambos os analitos, pesaram-se rigorosamente 100 mg de 4-EG e 100 mg de 4-EF para um balão volumétrico de $100 \pm 0,1$ ml, e fez-se o volume do balão com metanol.

Esta solução tem validade de doze meses, quando conservada em condições de refrigeração e devidamente selada com Parafilm[®].

2.5.1.5. Solução de trabalho de fenóis voláteis, 10 mg/l

A solução de trabalho de fenóis voláteis foi preparada através da diluição da solução mãe de fenóis voláteis. Transferiram-se 5 ml desta solução para um balão volumétrico de $500 \pm 0,1$ ml e fez-se o volume com a solução de etanol a 10 %.

Esta solução tem validade de dois meses, quando conservada em condições de refrigeração e devidamente selada com Parafilm[®].

2.5.1.6. Soluções padrão de calibração

Para elaborar a curva de calibração prepararam-se sete soluções padrão de fenóis voláteis. Os padrões de calibração foram preparados por diluição da solução de trabalho de fenóis voláteis na solução etanólica a 10 % (v:v) em balões volumétricos de $100 \pm 0,1$ ml. Foram preparadas soluções de concentração de 0,02 a 1,5 mg/l, como ilustrado na **Tabela 2.4**.

Estas soluções padrão consistem em padrões mistos contendo os dois analitos, permitindo a multianálise na mesma corrida, otimizando assim o método de análise. Em cada solução padrão é adicionado 50 µl do padrão interno (P.I.).

Estas soluções devem ser preparadas e utilizadas no dia da realização do ensaio.

Tabela 2.4: Preparação das soluções padrão de fenóis voláteis a partir da solução de 10 mg/l em balões volumétricos de 100 ml, contendo 50 ul de 4-decanol.

Padrão	Volume inicial (ml)	Concentração (mg/l)
1	0	0
2	0,200	0,020
3	0,500	0,050
4	2,00	0,200
5	5,00	0,500
6	10,0	1,00
7	15,0	1,50

2.6. Preparação das amostras

Foram realizados ensaios em quatro matrizes de vinhos, nomeadamente, vinho tinto maduro; branco maduro; branco verde e rosé. Os vinhos utilizados eram de mesa e provenientes tanto de diferentes regiões como de diferentes anos de colheita. Adicionalmente, foi analisado um vinho licoroso para avaliar apenas a aplicabilidade do método a esta matriz.

As amostras foram preparadas de acordo com o definido no procedimento interno PAFQ.044 – Métodos de preparação de amostras para análise, sendo que, esta preparação é independente do método de ensaio a realizar. As amostras foram agitadas, homogeneizadas e transferidas diretamente para os copos de plástico estéril de 50 ml, sem qualquer outro tipo de preparação. Os copos encontravam-se devidamente identificados com o número da amostra, a matriz, bem como a data de preparação, contudo, sem conter qualquer informação referente ao cliente que forneceu a amostra, de modo a que toda a análise possa ser realizada de forma imparcial, como requerido na NP EN ISO 17025:2018. ²

2.7. Procedimento experimental

Com o objetivo de quantificar os fenóis voláteis, 4-EG e 4-EF, em vinhos é feita uma extração líquido-líquido com uma solução de éter dietílico: hexano (1:1), seguida da adição de uma quantidade (50 μ l) de 4-decanol, usado como P.I.

Para isso transferiram-se 50 ml da amostra (ou da solução padrão de calibração), com uma pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 100 \pm 0,1 ml.

Adicionaram-se 50 μ l da solução de P.I., 4-decanol, com recurso a uma seringa, tendo o cuidado de garantir que não ficassem bolhas na solução. De seguida, foram adicionados 5 ml da solução de extração, com uma micropipeta, de modo a ocorrer a separação de fases e agitou-se manualmente. De seguida, introduziu-se uma barra magnética no balão volumétrico e colocou-se na placa de agitação durante 5 minutos a 700 rpm.

Posteriormente, na hote, colocou-se a montagem do sistema de extração, retirou-se a barra magnética e transferiu-se o conteúdo do balão volumétrico para a ampola de decantação de 250 ml. Aguardou-se até que ocorresse a separação de fases.

Após a separação das fases, a fase inferior (fase aquosa) é decantada para o balão volumétrico de 100 \pm 0,1 ml, enquanto a fase superior (fase etérea) é colocada num tubo Falcon[®]. De seguida, a extração foi efetuada mais duas vezes, para isso adicionaram-se 2 ml da solução de extração, com uma micropipeta, para o balão volumétrico de 100 \pm 0,1 ml e agitou-se vigorosamente. A restante extração foi efetuada do mesmo modo referido anteriormente.

Por fim, transferiram-se 2 ml da fase superior para um vial com graduação de volume, assegurando que se rejeitou qualquer porção de fase aquosa que possa ter sido arrastada na extração. Evaporou-se, cautelosamente, o extrato a 1/3 do volume original com recurso a uma corrente de nitrogénio. A válvula que regula a corrente de nitrogénio deve ser regulada e aberta muito lentamente de modo a evitar a perda de extrato na **Figura 2.1** apresenta-se esquematicamente o processo de tratamento da amostra para a quantificação dos fenóis.

A extração líquido-líquido, LLE, é uma das técnicas de separação mais utilizadas e por isso foi a técnica selecionada para a extração dos fenóis voláteis. Esta técnica envolve a distribuição de uma ou mais substâncias entre duas fases líquidas imiscíveis, onde numa das fases o analito se encontra dissolvido (fase aquosa) e a outra é um solvente orgânico (solvente extrator).

As principais vantagens desta técnica são, essencialmente, o processo poder ser realizado à temperatura ambiente e a possibilidade de utilização de solventes com boa capacidade de extração. Por sua vez, a principal desvantagem está no facto de gerar produtos intermediários e, portanto, ser necessário utilizar um outro processo de separação posteriormente, como por exemplo, a evaporação, destilação, etc. ^{89, 55}

Dado que neste método, parte da amostra é evaporada depois da extração, não é possível saber rigorosamente o volume final do resíduo, então é necessário recorrer ao método do P.I. para a quantificação dos fenóis.

Este método consiste, essencialmente, na adição de uma quantidade conhecida de um elemento de referência, também denominado de padrão interno, P.I., nas soluções padrão e amostras. É o método mais adequado quando a quantidade de amostra limita a precisão da análise e permite corrigir variações no sinal analítico devido a mudanças nas condições de análise. ⁹⁰ Assim, permite corrigir perdas de volumes e não requer volumes iguais, pois a relação do analito/P.I. é sempre a mesma.

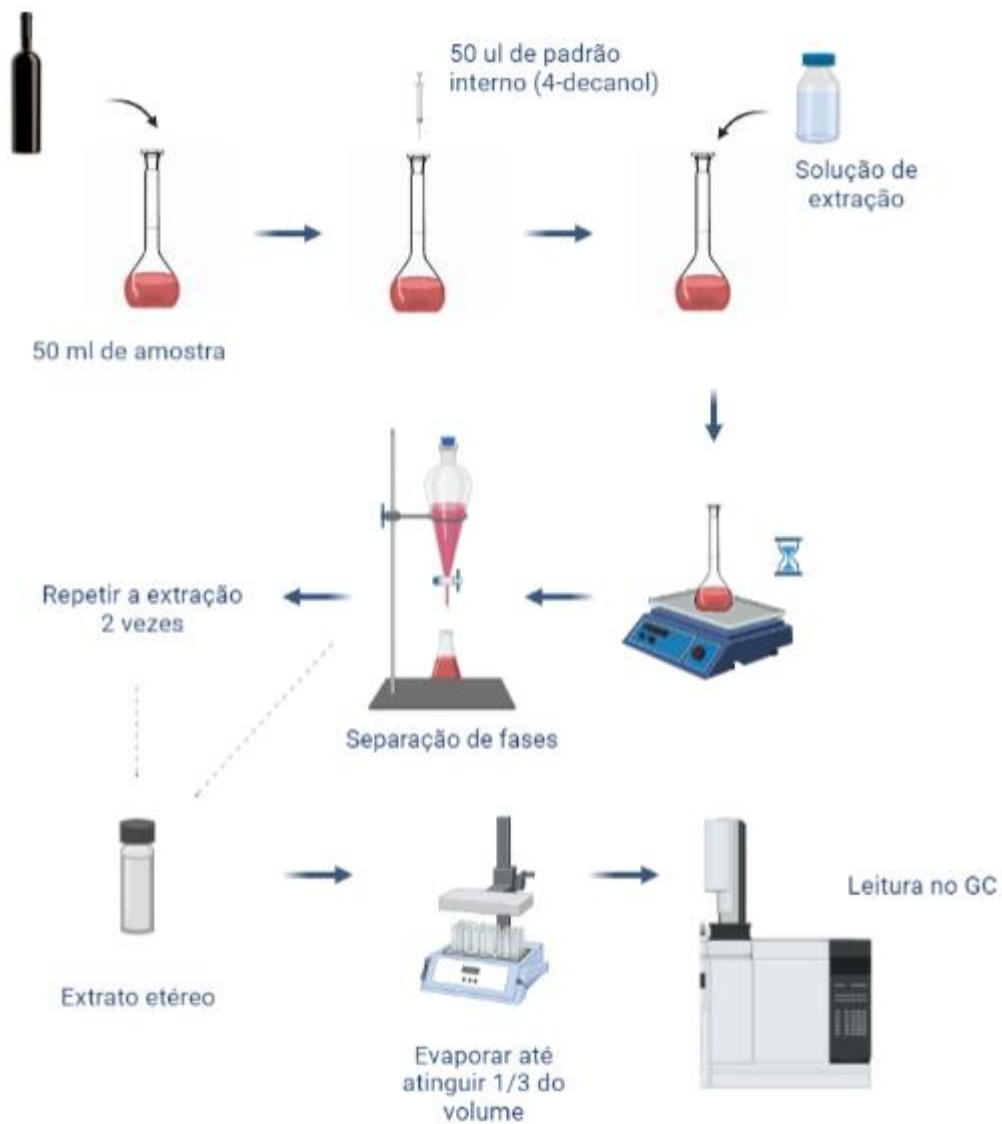


Figura 2. 1: Esquema representativo do tratamento da amostra até à análise por GC-FID. (Fonte: coleção própria).

2.8. Condições de análise cromatográfica

Para a realização destes ensaios utilizou-se a metodologia de análise de cromatografia gasosa com detetor FID, com um equipamento *Agilent Technologies*, modelo 6890N. As condições experimentais otimizadas utilizadas encontram-se listadas na **Tabela 2.5**.

Tabela 2.5: Condições cromatográficas utilizadas na determinação de fenóis voláteis por GC-FID.

Condições operatórias	
Coluna (Agilent Technologies)	CP-WAX 58 (FFAP) CB (50 m × 0,25 mm × 0,20 μm)
Detetor FID	250 °C
Injetor Splitless	250 °C
Variação da temperatura	50 °C (5 min); rampa 3 °C/min até 220 °C
Pressão	Constante
Gás de arraste	Hidrogénio
Volume de injeção	1 ul
Tempo de análise	91 minutos
Solvente de limpeza	Hexano

2.9. Identificação e quantificação dos fenóis voláteis

Após a obtenção dos cromatogramas, foi efetuada a análise dos resultados recorrendo ao *software Chromeleon* e ao *Microsoft Excel*.

A análise qualitativa corresponde à identificação dos sinais na amostra por comparação com os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas das soluções padrão.

Para a análise quantitativa, é considerada a razão entre a área dos picos (em *pA min*) dos fenóis voláteis, 4-EG e 4-EF e a área do padrão interno, 4-decanol.

A quantificação é realizada por interpolação do razão das áreas de pico de cada fenol volátil da amostra e do P.I. na reta de calibração em função da concentração do analito.

2.10. Tratamento dos resultados

Para que a validação de um método analítico seja devidamente descrita e estatisticamente suportada, é necessário proceder à aplicação de alguns testes estatísticos. Assim nesta secção é apresentada uma explicação sucinta de cada método estatístico usado no capítulo discussão e apresentação dos resultados.

2.10.1. Estimativa central e de dispersão

Existem duas estimativas populacionais indispensáveis na análise de resultados a média, \bar{x} , e o desvio padrão, s . Geralmente, o resultado apresentado para uma análise não deve ser um resultado individual, mas sim, um valor médio do conjunto dos resultados obtidos numa série de medições, assim a média é definida através da **Equação 2.1.**⁸²

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n} \quad 2.1$$

Em que x_i corresponde ao somatório de todos os resultados individuais obtidos e n ao número de medições efetuadas.

A influência dos erros aleatórios é avaliada através do cálculo do desvio padrão amostral (s), dado pela **Equação 2.2.**

$$\bar{s} = \sqrt{\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 2.2$$

Relativamente à análise das amostras, as mesmas são efetuadas em duplicado. Nos ensaios de fortificação são realizadas sete réplicas para os estudos de repetibilidade e duas para os estudos de precisão intermédia.

2.10.2. Teste de *Grubbs*

Com vista à homogeneização dos resultados, realiza-se um teste de *Grubbs* para averiguar a existência de aberrantes, ou seja, determinar o quão desviado se encontra um valor suspeito (x_s) do \bar{x} obtido na medição (**Equação 2.3**).

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s} \quad 2.3$$

O teste de *Grubbs* (G) pressupõe à priori que a distribuição em causa é normal. Este teste consiste num procedimento estatístico, no qual, em primeiro lugar, se deve formular as hipóteses, denominadas de hipótese nula (H_0) e hipótese alternativa (H_1). De um modo geral, o objetivo destes testes passa por avaliar se a H_0 deve ser rejeitada ou não rejeitada para um determinado propósito. É de realçar que o facto de a H_0 não ser rejeitada não implica que esta seja verdadeira, apenas não foram obtidas evidências de que seja falsa. ⁸²

Neste teste, a H_0 é definida como “não existem diferenças significativas entre o valor suspeito e os outros valores obtidos na medição”.

O valor de G calculado é comparado com o valor de G indicado na tabela de *Grubbs* para n observações, incluindo o suspeito, e para a probabilidade de 95 %. Caso o valor de G calculado seja inferior ao valor de G tabelado, a H_0 não é rejeitada, o que indica que o valor suspeito não difere significativamente dos restantes, e, como tal, não deve ser desprezado. ⁹¹

Os resultados deste teste apenas foram apresentados nos anexos quando algum dos valores foi desprezado.

2.10.3. Teste F de *Snedecor Fisher*

O teste F de *Snedecor-Fisher* é um teste estatístico que foi utilizado para avaliar a gama de trabalho. Para avaliar esta componente, neste teste utiliza-se a variância amostral (s^2) que se define como o quadrado do s (**Equações 2.4 e 2.5**). ⁸²

$$PG = \frac{S_1^2}{S_2^2}, \text{ se } S_1^2 > S_2^2 \quad 2.4$$

$$PG = \frac{S_2^2}{S_1^2}, \text{ se } S_2^2 > S_1^2 \quad 2.5$$

Neste teste, a H_0 é definida como “a variância dos resultados do primeiro conjunto de medições (S_1^2) não difere estatisticamente da variância dos resultados do segundo conjunto de medições (S_2^2).”

O valor de PG calculado é comparado com o valor indicado na tabela F *two-side tailed* para n-1 G.L. e para a probabilidade de 95 %. Caso o valor de PG calculado seja inferior ao valor de F tabelado, a H_0 não é rejeitada, o que indica que as variâncias não diferem significativamente.

2.10.4. Teste de Cochran

Um outro teste estatístico que permite avaliar a homogeneidade das variâncias de um conjunto de resultados é o teste de Cochran. Este teste foi utilizado no cálculo da precisão, onde foi possível avaliar o ensaio que tem maior influência na não homogeneidade das variâncias relativamente aos ensaios realizados. Calcula-se a razão entre a maior variância (S^2_{max}) e o somatório de todas as outras, como ilustrado na **Equação 2.6**.

$$PG = \frac{S^2_{max}}{\sum Si^2} \quad 2.6$$

Neste teste, a H_0 é definida como “não existem diferenças significativas das variâncias entre grupos de ensaios (S_1^2)”.

O valor de C calculado é comparado com o valor indicado na tabela C para n G.L. no numerador e denominador. Caso o valor de C calculado seja inferior ao valor de C tabelado, a H_0 não é rejeitada, o que indica que as variâncias não diferem significativamente e que o ensaio com maior variância não deve ser desprezado.⁹²

2.10.5. Forma da apresentação dos resultados

Os resultados são sempre apresentados considerando dois algarismos significativos nas incertezas. As incertezas associadas aos parâmetros estatísticos da reta de calibração são obtidas para 95 % de probabilidade e para $n-2$ G.L.

Para a apresentação das concentrações efetivas foram consideradas as incertezas obtidas pela abordagem passo a passo.

O intervalo de confiança das taxas de recuperação é apresentado considerando o desvio padrão.

Por fim, a incerteza do método foi avaliada considerando os dados da validação, sendo a componente da justeza obtida através dos ensaios de recuperação e a componente da precisão obtida em condições de precisão intermédia.

3. Apresentação e discussão dos resultados

Nesta secção são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a validação do mesmo, sendo posteriormente apresentados a monitorização de alguns parâmetros recorrendo a ferramentas de controlo de qualidade.

Para a validação do método foram realizados os ensaios necessários para avaliar os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade; LDQ; gama de trabalho; linearidade; sensibilidade; justeza; precisão (em condições de repetibilidade e de precisão intermédia) e finalmente a incerteza do método.

3.1. Curvas de calibração

A validação do método analítico para a quantificação do teor dos fenóis voláteis, 4-EG e 4-EF, foi iniciada com o traçado de curvas de calibração. Os padrões de calibração foram preparados a partir de uma solução mãe de calibração conjunta de fenóis voláteis com a concentração efetiva para o 4-EG de 999 ± 12 mg/l e 1001 ± 13 mg/l para o 4-EF (**Anexo 6.2.1.**) e uma solução de trabalho de fenóis voláteis com a concentração de $9,99 \pm 0,24$ mg/l para o 4-EG e $10,00 \pm 0,26$ mg/l para o 4-EF (**Anexo 6.2.2.**).

A partir destas soluções foram preparadas soluções padrão de calibração, por diluição, e estas foram analisadas por GC-FID. A **Figura 3.1** apresenta um cromatograma obtido para o padrão de concentração $1,501 \pm 0,080$ mg/l para o 4-EF e de $1,498 \pm 0,073$ mg/l para o 4-EG (**Anexo 6.2.3.**).

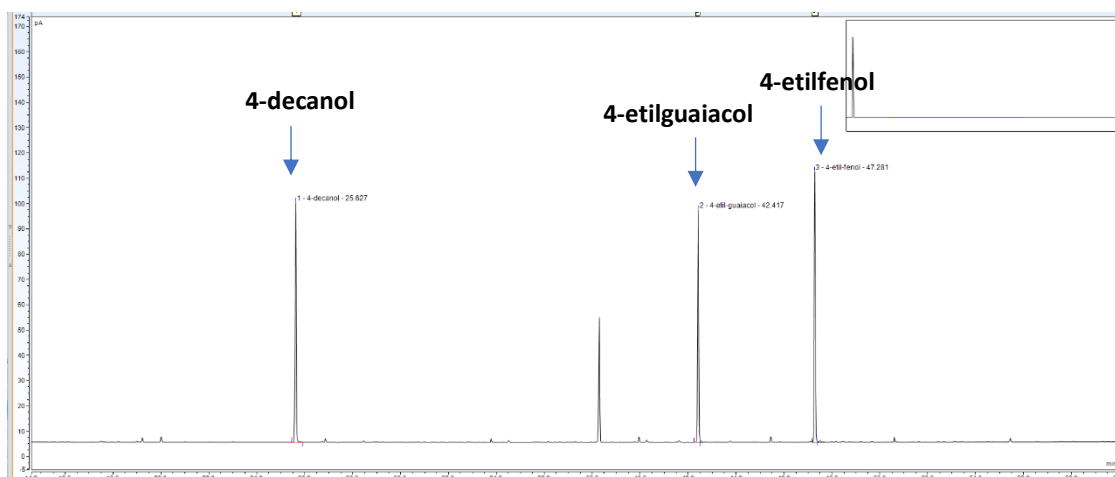


Figura 3.1: Cromatograma de uma solução de 4-EG e 4-EF de concentração de 1,50 mg/l contendo 4-decanol (C=983,9 mg/l) como padrão interno.

No cromatograma da **Figura 3.1** observam-se três picos, correspondentes ao padrão interno, 4-decanol, com um tempo de retenção, t_r , de 25,612 min, e aos analitos em estudo, 4-EG, com um t_r de 42,406 min e 4-EF, com um t_r de 47,723 min.

A implementação e validação do método teve como base o trabalho desenvolvido por Joana Gomes.³¹ Os t_r médios referidos nesta fonte bibliográfica foram de 25 min para o PI utilizado (3-octanol), 63 min para 4-EG e 70 min para 4-EF. Já os t_r obtidos no trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação foram diferentes pois as condições experimentais variam como, por exemplo, as dimensões da coluna diferem, assim como a natureza do padrão interno utilizado.

Num outro estudo realizado por Valentão *et al.*,²⁶ com uma coluna CP-WAX 58- (FFAP) CB (50 m × 0,25 mm × 0,25 μm), os t_r médios obtidos foram de 48,0 min para 4-EG e 52,4 min para 4-EF, muito próximos dos obtidos neste trabalho.

Na **Tabela 3.1** encontram-se apresentados os t_r referidos nos diversos trabalhos. De realçar que, embora os t_r obtidos sejam diferentes do método utilizado por Joana Gomes³¹, é possível verificar que o intervalo de tempo entre o pico do 4-EG e do 4-EF é superior a 5 min em todos os casos.

Tabela 3.1: Comparação dos tr (minutos) dos picos dos fenóis voláteis e PI em diferentes estudos. Neste trabalho o valor apresentado consiste na média de 5 análises.

Ref.	Padrão interno	tr PI (min)	tr 4-EG (min)	tr 4-EF (min)
31	3-octanol	25	63	70
26	4-decanol	-	48,0	52,4
Este trabalho	4-decanol	25,62	42,41	47,28

A partir dos cromatogramas obtidos foram determinadas as áreas correspondentes aos picos dos 2 fenóis voláteis e do PI. Na **Tabela 3.2** registaram-se os valores das áreas dos picos (A) obtidos nos cromatogramas para cada um dos padrões de calibração, em *pA min*, bem como as suas concentrações com a respetiva incerteza combinada associada, em mg/l. (**Anexo 6.2.3.**).

Tabela 3.2: Valores das áreas dos picos obtidos para cada padrão de calibração apresentado com a incerteza associada (u) (CPI = 983,9 mg/l).

A 4-decanol (<i>pA min</i>)	C 4-EGp ± u (mg/l)	A 4-EG (<i>pA min</i>)	C 4-EFp ± u (mg/l)	A 4-EF (<i>pA min</i>)
3,650	0	0	0	0
3,460	0,0200 ± 0,0010	0,0471	0,0200 ± 0,0011	0,0548
10,89	0,0499 ± 0,0024	0,3491	0,0501 ± 0,0027	0,4110
4,936	0,200 ± 0,010	0,6380	0,200 ± 0,011	0,7551
4,351	0,499 ± 0,024	1,479	0,500 ± 0,026	1,763
12,37	0,999 ± 0,049	8,344	1,001 ± 0,053	9,885
5,004	1,498 ± 0,073	4,887	1,501 ± 0,080	5,796

A partir dos dados da **Tabela 3.2**, elaboraram-se as retas de calibração considerando a razão entre a área dos picos, em *pA min*, dos fenóis voláteis, 4-EG e 4-EF e a área do PI, 4-decanol.

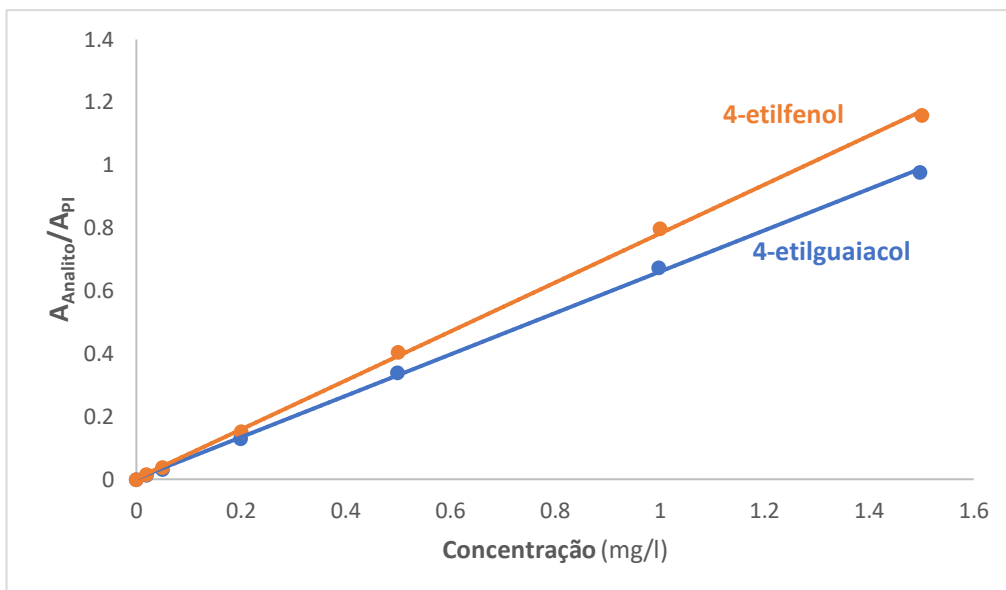


Figura 3.2: Representação gráfica da razão entre a área dos picos do 4-EG (azul) e 4-EF (laranja) e a área do PI, 4-decanol, em função da concentração dos padrões.

Na **Figura 3.2** está representada uma curva de calibração para cada analito. De salientar que foram traçadas retas de calibração em dias diferentes, sempre que eram realizadas análises de amostras (**Anexo 6.3.1.**)⁹³

A partir da análise da **Figura 3.2** é possível verificar que a representação é uma função linear sendo que as equações do primeiro grau são: $Y = (0,658 \pm 0,015) c \text{ (mg/l)} + (0,002 \pm 0,021)$ para o 4-EG e $Y = (0,779 \pm 0,018) c \text{ (mg/l)} + (0,003 \pm 0,026)$ para o 4-EF, em que Y representa a razão entre a área do analito e a área do PI.

As incertezas dos declives e ordenadas na origem foram apresentadas considerando uma probabilidade de 95 % e um número de G.L. de 5 permitindo avaliar a qualidade das retas obtidas.⁹⁴ Os cálculos das incertezas estão apresentados no **Anexo 6.3.2.**

Considerando a incerteza calculada para a ordenada na origem, verifica-se que esta é superior ao respectivo valor de ordenada na origem, ou seja, o intervalo de confiança inclui o ponto (0;0) para cada um dos compostos.

A curva de calibração é considerada satisfatória desde que o r seja superior a 0,995 e que a sua representação gráfica seja uma reta. Verificou-se, a existência de uma

elevada correlação linear para ambos os compostos, dado que o valor obtido ($r=0,9997$) é superior ao considerado adequado.⁷⁴

3.2. Seletividade

A seletividade permite concluir acerca da capacidade que o método apresenta para quantificar, com a confiança necessária, o analito de interesse na presença de outras espécies que poderão influenciar a sua quantificação.⁹⁵

Para avaliar este parâmetro de desempenho recorreu-se à análise de cromatogramas de diversas soluções: branco da amostra, padrão, amostra e amostra com fortificação. Na **figura 3.3** encontram-se apresentados os cromatogramas obtidos nos ensaios da avaliação da seletividade nas diferentes matrizes.

Foram utilizados quatro níveis de concentração diferentes e realizou-se sete réplicas em cada nível, utilizando diferentes matrizes. Na **Tabela 3.3**, encontram-se as concentrações utilizadas, assim como os volumes adicionados nos ensaios de recuperações nas matrizes analisadas.

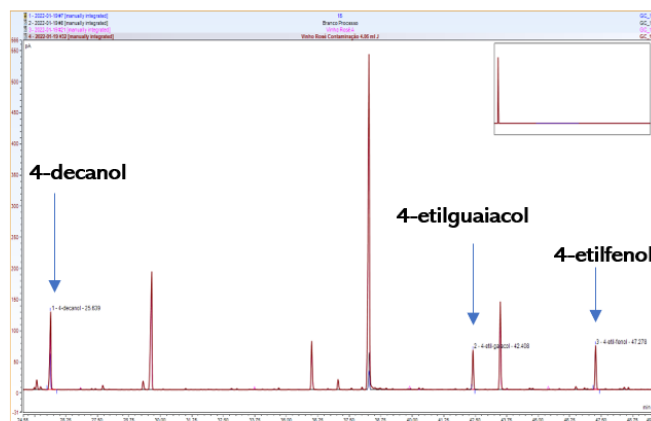
Tabela 3.3: Volume de fortificação das concentrações de 4-EG 9,99 mg/l e de 4-EF= 10,0 mg/l adicionados a cada amostra (50 ml), dependendo da matriz a analisar.

Matriz	Volume adicionado (ml)	C 4-EGp (mg/l)	C 4-EFp (mg/l)
Vinho branco maduro	1,28	0,249	0,250
Vinho verde branco	2,65	0,503	0,504
Vinho rosé	4,06	0,750	0,752
Vinho tinto maduro	9,00	1,50	1,50

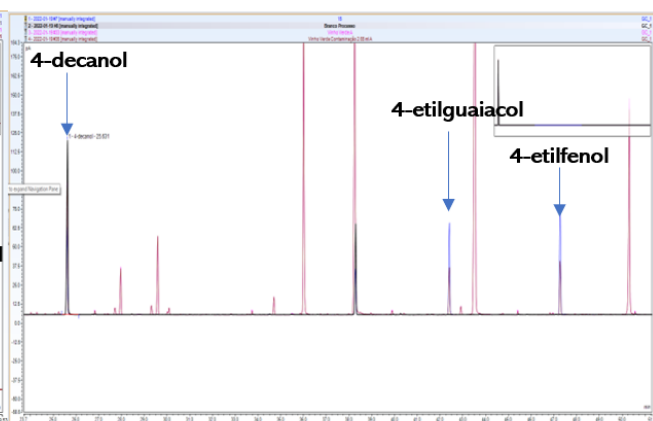
Com base nos ensaios realizados, é possível observar que a fortificação de uma amostra com uma concentração conhecida dos analitos conduz a um aumento da área do pico proporcional à fortificação.

Para complementar o estudo da seletividade, a avaliação dos tempos de retenção, da assimetria e da percentagem de recuperação na amostra fortificada, permitem avaliar a seletividade/especificidade do método. Os valores obtidos para cada matriz encontram-se nas **Tabelas 3.4 a 3.7**.

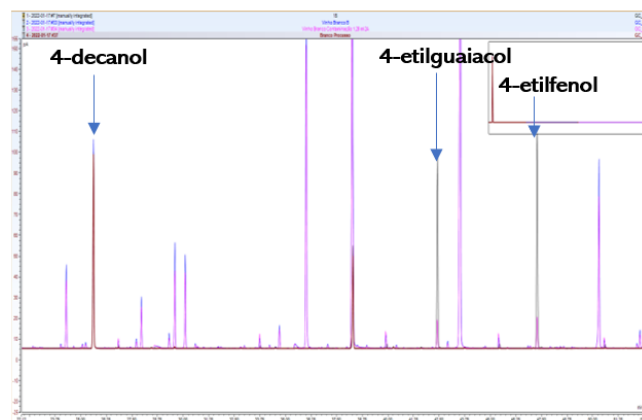
A) Vinho Rosé



B) Vinho Verde Branco



C) Vinho Branco Maduro



D) Vinho Tinto Maduro

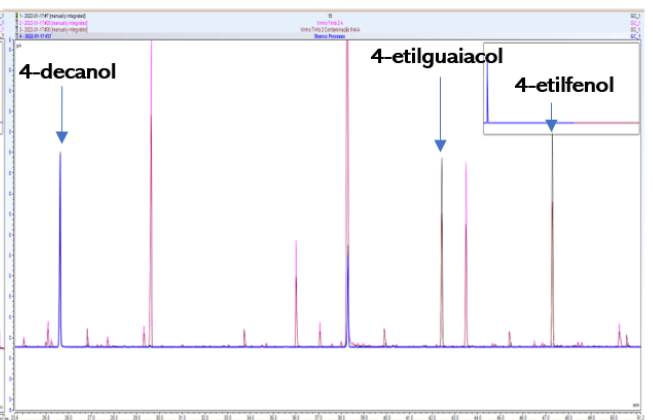


Figura 3.3: Cromatogramas obtidos no estudo da seletividade em diferentes vinhos: rosé, branco verde, branco maduro e tinto maduro. Em cada cromatograma é apresentado um branco do processo, o padrão de calibração com a concentração de 1,50 mg/l, uma amostra e a mesma amostra fortificada. As concentrações de fortificação encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.4: Tempos de retenção, assimetria e taxa de recuperação obtidas na matriz vinho rosé.

Analito	tr (min)		Assimetria		R (%)	
	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF
Branco da amostra	-	-	-	-	-	-
Padrão (1,50 mg/l)	42,41	47,27	0,97	1,04	-	-
Amostra	42,41	47,27	-	0,96	-	-
Amostra fortificada	42,41	47,28	0,96	1,01	90,9	91,2

Tabela 3.5: Tempos de retenção, assimetria e taxas de recuperação obtidas na matriz vinho branco verde.

Analito	tr (min)		Assimetria		R (%)	
	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF
Branco da amostra	-	-	-	-	-	-
Padrão (1,50 mg/l)	42,41	47,27	0,97	1,04	-	-
Amostra	42,41	47,28	-	1,00	-	-
Amostra fortificada	42,41	47,27	0,97	1,03	104,1	102,4

Tabela 3.6: Tempos de retenção, assimetria e recuperações obtidas na matriz vinho branco maduro.

Analito	tr (min)		Assimetria		R (%)	
	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF
Branco da amostra	-	-	-	-	-	-
Padrão (1,50 mg/l)	42,42	47,28	0,94	1,03	-	-
Amostra	42,40	47,28	-	1,00	-	-
Amostra fortificada	42,41	47,28	0,96	1,05	100,4	98,2

Tabela 3.7: Tempos de retenção, assimetria e recuperações obtidas na matriz vinho tinto maduro.

Injeção	tr (min)		Assimetria		R (%)	
Analito	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF	4-EG	4-EF
Branco da amostra	-	-	-	-	-	-
Padrão (1,50 mg/l)	42,2	47,1	1,02	1,08	-	-
Amostra	42,2	47,1	-	0,94	-	-
Amostra fortificada	42,2	47,1	0,99	1,02	113,7	109,3

Verifica-se que os tr não variaram significativamente, mesmo alterando algumas variáveis, como o dia de análise e o tipo de matriz, sendo que o definido internamente como aceitável é uma variação de $\pm 0,30$ min.

Relativamente à assimetria, em testes com soluções padrões e sob condições controladas, o fator de assimetria deve situar-se entre 0,9 e 1,1. Em situações de trabalho de rotina, podem existir outros comprometimentos com a metodologia e o tipo de analito, assim, picos com fator de assimetria até 2,0 são geralmente aceites.⁹⁶ Nos ensaios de seletividade realizados, todos os valores apresentados encontram-se dentro dos valores definidos entre 0,9 e 1,1.

O laboratório definiu internamente que para o método da quantificação dos fenóis voláteis, o valor da taxa de recuperação (R) deverá estar contido no intervalo entre 80 e 120%. Concluiu-se que o método é seletivo e, como tal, as respostas encontram-se diretamente relacionadas com a concentração dos analitos na amostra não sendo afetadas pela presença de outros componentes da matriz.

3.3. Limite de quantificação

De acordo com o procedimento interno da empresa, quando se procede à validação de um método analítico, no que diz respeito aos limiares analíticos, apenas é relevante a determinação do LDQ, pelo que o LDD não foi determinado na validação estatística dos métodos em estudo.

Este parâmetro foi estimado a partir da realização de ensaios de recuperação com adição de analito de concentração idêntica à do primeiro padrão da curva de calibração diferente de zero, isto é, 0,020 mg/l, a uma amostra.

Os ensaios de recuperação foram efetuados para demonstrar que o método permite quantificar o 4-EG e o 4-EF neste nível de concentração e, como tal, este poderia ser o valor mínimo de concentração que poderia ser quantificada por este método de análise.⁹⁷

Às sete amostras da matriz vinho tinto maduro, adicionaram-se, 0,1 ml da solução de trabalho com concentração de $9,99 \pm 0,24$ mg/l para o 4-EG e $10,01 \pm 0,26$ mg/l para o 4-EF. As concentrações das amostras fortificadas encontrando-se apresentadas nas **Tabelas 3.8** e **3.9**, respetivamente, bem como as taxas de recuperação, R.

Tabela 3.8: Determinação da taxa de recuperação (R) e desvio padrão (s) em cada ensaio no estudo do LDQ do método de quantificação do 4-EG para a matriz vinho tinto maduro.

Ensaio	C 4-EF amostra (mg/l)	C 4-EF adicionada (mg/l)	C 4-EF fortificada (mg/l)	R \pm S (%)
1			0,032	98,3
2			0,029	85,3
3			0,031	91,2
4	0,012	0,020	0,031	93,9
5			0,030	89,6
6			0,030	89,9
7			0,031	91,4
Média	-	-	0,031	91,4 \pm 4,4

Tabela 3.9: Determinação da taxa de recuperação (R) em cada ensaio no estudo do LDQ do método de quantificação do 4-EF para a matriz vinho tinto maduro.

Ensaio	C 4-EF amostra (mg/l)	C 4-EF adicionada (mg/l)	C 4-EF fortificada (mg/l)	R \pm S (%)
1			0,053	102,1
2			0,054	103,1
3			0,055	108,4
4	0,033	0,020	0,050	84,9
5			0,050	86,6
6			0,052	96,3
7			0,051	90,4
Média	-	-	0,052	96,0 \pm 9,3

Uma vez que as \bar{R} obtidas para o 4-EG ($91,4 \pm 4,4 \%$) e para o 4-EF ($96,0 \pm 9,3\%$), encontram-se inseridas no intervalo de R estabelecido, concluiu-se que o LDQ pode ser considerado a concentração do primeiro padrão de calibração diferente de zero, isto é, 0,020 mg/l. (**Anexo 6.4.**)

Uma outra forma de avaliar o LDQ consiste na avaliação da relação S/N, utilizada particularmente para os métodos cromatográficos. Este método é adequado para procedimentos analíticos que apresentam ruído na linha de base.⁹⁸ Neste caso, o LDQ é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para um padrão contendo baixa concentração dos analitos em estudo com os sinais de ruído antes e após a saída dos picos do 4-EG e 4-EF. Em geral, para o LDQ considera-se aceitável uma relação S/N de 10:1.⁹⁵

A relação S/N foi calculada considerando o primeiro padrão da curva de calibração do cromatograma da **Figura 3.4** e a seleção de janelas de tempo antes e após cada pico (ruído) de modo a determinar a relação S/N (**Figura 3.5**).

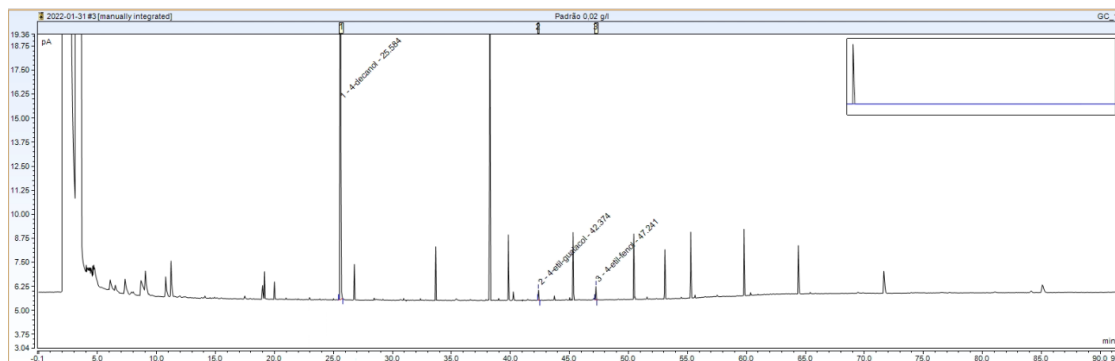
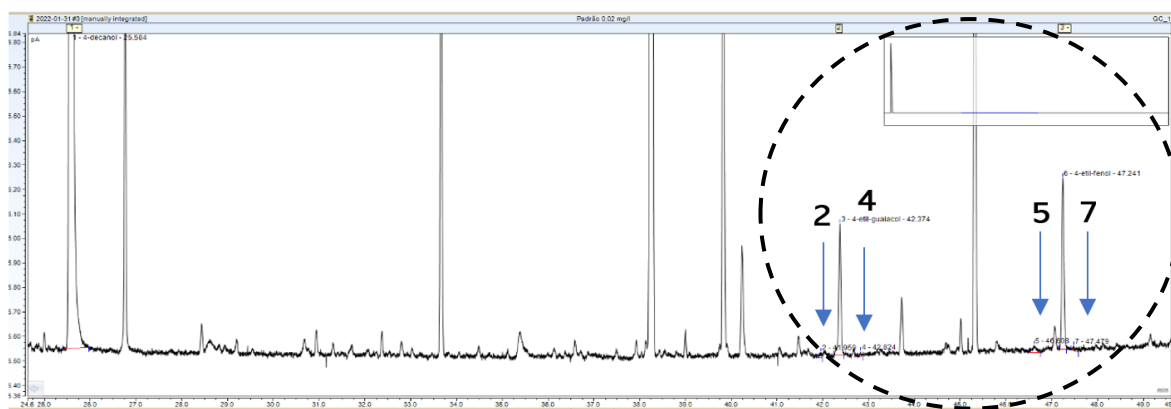


Figura 3. 4: Cromatograma do primeiro padrão da curva de calibração (c= 0,020 mg/l).

a)



b)

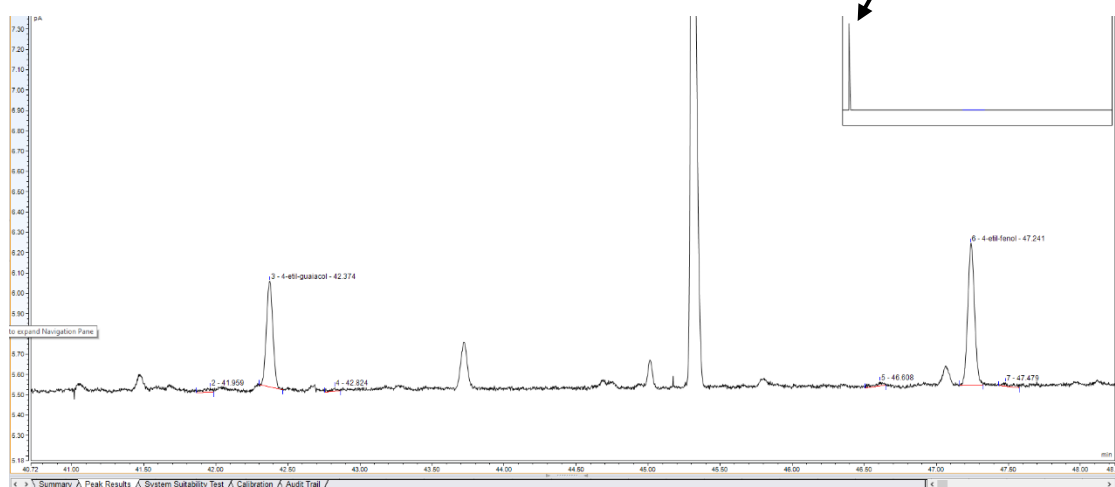


Figura 3.5: a) Cromatograma do primeiro padrão da curva de calibração e seleção de janelas de tempo.

b) Ampliação da Figura 5 a)

Pela análise da **Figura 3.5** foi possível avaliar o valor da altura do ruído antes e após o pico de cada analito para a determinação do S/N. Os dados estão representados na **Tabela 3.10**.

Tabela 3.10: Análise dos resultados do sinal/ruído.

Pico	Janela de tempo (min)	Altura máxima (pA)
2	41,8 – 42,0	0,020
4	42,7 – 42,9	0,022
5	46,5 – 46,7	0,021
7	47,3 – 47,5	0,020

Com base nos ensaios e resultados obtidos, demonstrou-se que o valor estudado para o LDQ cumpre com o definido no procedimento interno PCQ.34- Validação de métodos em análise química, uma vez que para as janelas de tempo selecionadas, o resultado obtido para Altura x 10 = 0,20 pA, é inferior à altura do pico dos fenóis voláteis, cuja altura para o 4-EG é 0,52 pA e para o 4-EF é 0,70 pA.

Comparando o LDQ obtido com os valores dos limiares de percepção, 47 µg/l para o 4-EG e 440 µg l para o 4-EF, é possível verificar que o LDQ apresentava valores mais baixos que os limiares de percepção.

Relativamente aos estudos apresentados na **Tabela 1.3**, verifica-se que os autores apenas referem o valor do LDD. Considerando que geralmente o LDQ é o triplo do LDD, multiplicou-se os valores de LDD por 3 para efeitos de comparação. Assim, conclui-se que o valor obtido é consideravelmente inferior a todos os estudos com exceção no estudo de *López et al.*⁴⁸, que obtiveram um LDQ muito inferior para o 4-EG e 4-EF. Isto acontece porque o método de análise utilizado é o GC-MS e neste trabalho o GC-FID, sendo o primeiro muito mais sensível.

3.4. Gama de trabalho

Um dos parâmetros mais importantes a definir na validação de um método analítico é a gama de trabalho, pois define o intervalo de concentração que o analito pode ser quantificado recorrendo a este método de análise. Uma das formas de avaliar este parâmetro é pela verificação da existência de homogeneidade de variâncias ao longo de toda a gama de trabalho, demonstrando que a gama selecionada se encontra bem ajustada.⁷⁵

Para tal, realiza-se um teste F de *Snedecor-Fisher* para avaliar se as variâncias das respostas obtidas na análise do padrão de concentração mais baixa, diferente de zero, e do padrão de concentração mais elevada da curva de calibração diferem significativamente. Deste modo, prepararam-se seis réplicas do padrão com C 4-EG de $0,0200 \pm 0,0010$ mg/l e C 4-EF de $0,0200 \pm 0,0011$ mg/l. Foram preparadas também seis réplicas do padrão com C 4-EG de $1,498 \pm 0,073$ mg/l e C 4-EF de $1,501 \pm 0,080$ mg/l.

A partir dos cromatogramas foram determinadas as áreas correspondentes aos picos dos fenóis voláteis e do P.I. Assim, nas **Tabelas 3.11 e 3.12** apresentam-se os valores das áreas dos picos, obtidos nas seis réplicas efetuadas para o padrão de concentração mais baixa e mais alta, respetivamente.

Tabela 3.11: Valores das áreas dos picos obtidos para os seis replicados do padrão com concentração 0,0200 mg/l, contendo 983,9 mg/l de 4-decanol.

A 4-decanol (pA min)	A 4-EG (pA min)	C 4-EGexp (mg/l)	A 4-EF (pA min)	C 4-EFexp (mg/l)
6,914	0,0641	0,0215	0,0779	0,0206
6,883	0,0671	0,0225	0,0741	0,0198
6,920	0,0656	0,0219	0,0746	0,0199
4,893	0,0459	0,0218	0,0504	0,0191
6,987	0,0665	0,0222	0,0759	0,0200
9,992	0,0759	0,0182	0,0915	0,0173

Tabela 3.12: Valores das áreas dos picos obtidos para os seis replicados do padrão com C 4-EG = 1,498 mg/l e C 4-EF = 1,501 mg/l contendo 983,9 mg/l de 4-decanol.

A 4-decanol (pA min)	A 4-EG (pA min)	C 4-EGexp (mg/l)	A 4-EF (pA min)	C 4-EFexp (mg/l)
7,397	4,811	1,520	5,905	1,525
8,108	5,293	1,526	6,500	1,532
8,164	5,338	1,528	6,564	1,536
8,401	5,501	1,530	6,758	1,537
7,568	4,902	1,534	6,016	1,529
8,203	5,463	1,520	6,604	1,525

Utilizando estes resultados, realizou-se o teste de homogeneidade de variâncias. Na **Tabela 3.13** apresentam-se os valores obtidos para a análise do primeiro padrão e último, em termos de média e s^2 .

Tabela 3.13: Valores da média e variância para obtidos para a concentração de 0,020 e 1,50 mg/l.

Analito	Padrão de C mais		
	baixa	elevada	
4-EG	C 4-EGp (mg/l)	0,0200	1,498
	\bar{C} (mg/l)	0,0219	0,0199
	S ²	3,01 x10 ⁻⁶	1,30 x10 ⁻⁶
4-EF	C 4-EFp (mg/l)	0,0200	1,501
	\bar{C} (mg/l)	1,527	1,530
	S ²	2,69 x10 ⁻⁵	2,43 x10 ⁻⁵

A partir destes resultados apresentados na **Tabela 3.13**, calculou-se o valor de F, sendo este igual a 8,942 para o 4-EG e 18,63 para o 4-EF (**Anexo 6.5**). Este valor foi comparado com o valor de F de 7,146 indicado na tabela *two-side tailed* (n = 6) para 95 % de confiança. Como o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado concluiu-se que a gama de trabalho do método não se encontra bem ajustada.

Por este motivo, dever-se-ia reduzir a gama de trabalho até que as variâncias das respostas obtidas para a solução padrão de mais baixa e mais elevada concentração não fossem estatisticamente diferentes, ou, em alternativa, testar o modelo de regressão ponderada. Contudo, devido a contingências de tempo, não foi possível avaliar estas situações.

Assim, apesar de não existir homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho, foi demonstrada a linearidade da reta de calibração na gama de trabalho selecionada, e de acordo com os procedimentos internos da empresa, esta pode ser considerada válida. No entanto, no estudo da precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, foi verificada a necessidade de estabelecer três níveis de concentração atendendo ao teste de *Crochan* que permite avaliar se as matrizes são significativamente diferentes.

Posto isto, definiu-se que o valor mínimo de concentração de fenóis voláteis corresponde ao LDQ, isto é, 0,020 mg/l. Já o limite superior foi de 2,0 mg/l definido tendo em conta o valor mais elevado obtido na análise das amostras das diversas matrizes em condições de repetibilidade.

É importante referir que os valores de concentração mais elevados obtidos nas amostras analisadas, situaram-se sempre dentro deste intervalo. Assim, para o 4-EG o valor máximo obtido foi de 1,81 mg/l para a matriz vinho tinto maduro e 1,85 mg/l para o 4-EF na mesma matriz.

Comparando a gama de trabalho obtida neste trabalho com as apresentadas nos trabalhos da **Tabela 1.3.**, verifica-se que, de forma geral, estes apresentam gamas mais alargadas comparativamente a este trabalho.

3.5. Linearidade

A linearidade foi avaliada por visualização dos gráficos obtidos, pelo cálculo e análise do r de 7 curvas de calibração. O teste de linearidade deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade.⁷⁴

O coeficiente de correlação de cada reta encontra-se listado na **Tabela 3.14.**

Tabela 3.14: Coeficiente de correlação (r) obtidos das retas de calibração de 4-EG e 4-EF.

Data	r 4-EG	r 4-EF
23/11/2021	0,9997	0,9997
13/01/2022	0,9991	0,99994
17/01/2022	0,9997	0,9997
19/01/2022	0,9994	0,9994
26/01/2022	0,9996	0,9997
01/02/2022	0,9998	0,9998
15/06/2022	0,9991	0,9993

Verifica-se, através da análise da **Tabela 3.14** que as curvas de calibração da razão do analito e do PI e a concentração dos fenóis voláteis para cada composto apresentam uma elevada correlação na gama de trabalho estudada, tendo em conta que os valores de r foram superiores ou iguais a 0,9991. Assim, conclui-se que existe linearidade pois os coeficientes de correlação são superiores a 0,995.

Comparando os coeficiente de correlação obtidos com os coeficientes de determinação obtidos nos trabalhos apresentados na **Tabela 1.3.**, verifica-se que, de forma geral, os valores obtidos são superior a todos os estudos, talvez devido a considerar-se uma gama de trabalho mais restrita.

3.6. Sensibilidade

A sensibilidade de um método que segue um modelo de regressão linear pode ser avaliada através do declive da reta de calibração. Por este motivo, o controlo dos declives também permite verificar se a sensibilidade do método se mantém constante ao longo tempo.⁷⁴

Deste modo, registaram-se os declives das curvas de calibração dos fenóis voláteis obtidos a partir da análise de sete curvas de calibração, como ilustrado na **Tabela 3.15.**

Tabela 3.15: Valores dos declives (d) das retas de calibração realizadas ao longo do tempo.

Data	d 4-EG (l/mg)	d 4-EF (l/mg)
23/11/2021	0,682	0,805
13/01/2022	0,688	0,823
17/01/2022	0,658	0,780
19/01/2022	0,698	0,850
26/01/2022	0,567	0,741
28/01/2022	0,620	0,748
01/02/2022	0,645	0,772
\bar{d}	0,651	0,788
s	0,046	0,040

Determinou-se o valor médio dos declives e o respetivo desvio padrão e, ainda, o coeficiente de variação (CV) de 7,1 % e 5,1 % para o 4-EG e 4-EF, respetivamente. **(Anexo 6.6.)**

De acordo com o definido internamente pelo laboratório, os resultados são considerados satisfatórios sempre que o CV for inferior a 10 %. Como tal foi verificado, concluiu-se que a sensibilidade do método não é alterada ao longo do tempo.

3.7. Justeza

3.7.1. Ensaio de recuperação

A justeza do método foi avaliada a partir dos resultados obtidos na realização de ensaios de recuperação. Estes ensaios permitem avaliar os efeitos da matriz, que representa uma possível fonte de erro neste tipo de análises. Para tal, considerou-se uma série de amostras, em que apenas se variava a concentração dos analitos adicionados em proporções conhecidas ao longo de toda a gama de trabalho. ⁷⁴ De realçar que a concentração adicionada de cada matriz encontra-se apresentada na **Tabela 3.3**.

Na **Tabela 3.16** encontram-se os resultados obtidos para as recuperações nas matrizes analisadas, assim como a média das percentagens (%) de recuperação de todas as matrizes e respetivo desvio padrão.

Tabela 3.16: Resultados dos ensaios de recuperação (R).

Analito	Matriz	R (%)							$\bar{R} \pm s$ (%)
4-EG	Vinho branco maduro	106	103	103	103	106	105	105	104,5 ± 1,3
	Vinho branco verde	106	103	108	110	109	106	107	107,0 ± 2,5
	Vinho rosé	95	91	92	92	96	95	94	91,4 ± 2,0
	Vinho tinto maduro	103	105	107	95	96	109	98	101,8 ± 5,6
4-EF	Vinho branco maduro	104	105	105	106	107	105	104	105,2 ± 1,2
	Vinho branco verde	109	105	108	113	112	107	109	109,4 ± 2,8
	Vinho rosé	93	87	87	88	93	91	89	89,8 ± 2,4
	Vinho tinto maduro	101	104	105	115	107	95	112	105,5 ± 6,7

Como as taxas de recuperação obtidas situam-se entre os 80 e 110 %, estes valores são satisfatórios uma vez que se encontram dentro do intervalo estabelecido pelo laboratório (80 -120 %).

Analisando a **Tabela 3.16** verifica-se que a matriz de vinho tinto maduro apresentou uma taxa de recuperação média satisfatória, contudo o respetivo valor de desvio padrão é o mais elevado para os dois analitos, o que indica que existe uma maior variação na taxa de recuperação nesta matriz.

Para a matriz de vinho rosé, o valor da média de recuperação está contido no intervalo 80-100 % e é a matriz que apresenta taxas de recuperação mais baixas para ambos os analitos.

O vinho branco maduro foi a matriz que apresentou melhores resultados para os dois analitos, sendo a taxa de recuperação média, próxima de 100 %, não apresentando grandes variações de recuperação de réplica para réplica. Observa-se, também, um comportamento semelhante para a matriz vinho branco verde, no entanto com um desvio ligeiramente maior.

Pode-se, portanto, concluir que os métodos são justos, que indica que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos.

3.7.2. Ensaio interlaboratoriais

Além do recurso a ensaios de recuperação, a justeza do método foi avaliada através da participação num ensaio interlaboratorial, no qual os participantes analisaram a mesma amostra fornecida pelo BIPEA. Para avaliação dos resultados através do procedimento sugerido pela Organização internacional da vinha e do vinho (OIV), os mesmos devem estar de acordo com as seguintes condições, **equações 3.1 e 3.2.**⁹⁹

$$X_{\text{ref}} + vma > \bar{x} + 2s \quad 3.1$$

$$X_{\text{ref}} - vma < \bar{x} - 2s \quad 3.2$$

onde X_{ref} é o valor de referência fornecido pela entidade organizadora, vma (valor máximo admissível) é fornecido igualmente pela entidade organizadora, \bar{x} é o valor médio experimental de concentração e s é o desvio padrão obtido pelo laboratório.

De forma a avaliar o desempenho do método calculou-se o Z-score.

A amostra analisada tem como matriz um vinho branco, tendo na sua composição os analitos em estudo e procedeu-se à sua análise em duplicado. O número de laboratórios participantes neste ensaio foi 30. Na **Figura 3.6** está representado um cromatograma da amostra analisada.

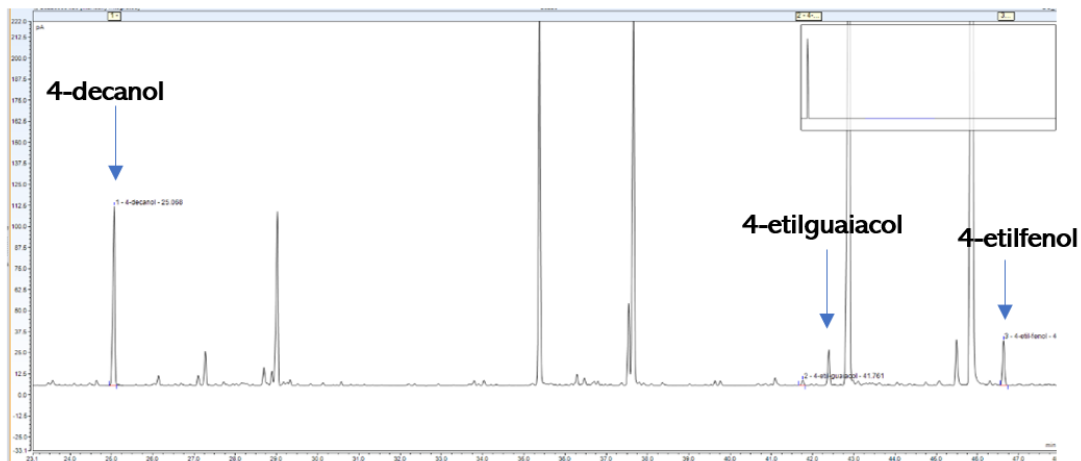


Figura 3.6: Cromatograma de uma amostra de vinho branco obtido na participação num ensaio interlaboratorial. tr do 4-decanol = 25,068 min, tr do 4-EG = 41,761 min e tr do 4-EF = 46,821 min.

Na **tabela 3.17** é possível comparar os resultados obtidos pelo método desenvolvido com os resultados de referência fornecidos pela entidade organizadora. Verificou-se que a média dos resultados obtidos neste ensaio se encontra dentro dos limites estabelecidos pela BIPEA.

Tabela 3.17: Resultados da concentração obtida (\bar{x}), do valor de referência (X_{ref}) e desvios (s).

Analito	X_{ref} (mg/l)	\bar{x} (mg/l)	s (mg/l)
4-EG	0,049	0,061	9
4-EF	0,353	0,394	54

O procedimento utilizado pelo OIV⁹⁹ para a avaliação deste parâmetro considera que se os resultados dados por $\bar{x} \pm 2s$ se encontram dentro do intervalo estipulado $x_{ref} \pm vma$, é verificada a veracidade nos resultados. Assim, foram calculados os intervalos admissíveis que podem ser analisados na **Tabela 3.18**.

Determinaram-se também os valores de *Z-score*, que estão apresentados na **Tabela 3.18**.

Tabela 3.18: Resultados dos intervalos admissíveis pela OIV para avaliar a justeza do método e valores de *Z-score* obtidos para a análise do material de referência.

Analito	$X_{ref} + vma$ (mg/l)	$\bar{x} + 2s$ (mg/l)	$X_{ref} - vma$ (mg/l)	$\bar{x} - 2s$ (mg/l)	<i>Z-score</i>
4-EG	0,116	0,079	0,018	0,043	1,33
4-EF	0,814	0,502	0,108	0,286	0,76

Analisando os resultados apresentados na **Tabela 3.18**, verifica-se que os analitos se encontram dentro do intervalo tolerado, cumprindo com o estipulado pelo OIV.

Relativamente ao *Z-score*, verifica-se que todos os resultados são inferiores a 2, logo o método apresenta um desempenho satisfatório.¹⁰⁰(**Anexo 6.7.1**)

De forma a complementar este estudo foi calculado, ainda, o *bias* relativo (**Anexo 6.7.2**), tendo-se obtido um erro de 24 % e 12 % para o 4-EG e 4-EF, respetivamente. Apesar dos valores obtidos serem apreciáveis, estes são aceitáveis dentro dos critérios

definidos pela BIPEA e corroborados pelos valores do *Z-score*, pois apresentam um valor inferior a 2.

Conclui-se, assim, que os resultados obtidos mostraram que o método é justo, sendo os resultados obtidos para o 4-EF considerados melhores.

3.8. Precisão

A avaliação da precisão envolve a repetição de medições numa mesma amostra em determinadas condições especificadas. Neste trabalho, as condições de precisão avaliadas foram a repetibilidade e a precisão intermédia. A reprodutibilidade não foi avaliada, dado que implicava a realização da metodologia analítica desenvolvida num outro laboratório.

3.8.1. Precisão em condições de repetibilidade

Para avaliar a precisão em condições de repetibilidade foram analisadas réplicas (n) em oito matrizes, em diferentes níveis de concentração para os dois analitos em estudo. Em cada matriz, analisou-se a amostra em duplicado e sete réplicas da amostra fortificada. Os resultados obtidos encontram-se nas **Tabelas 3.21 e 3.22**

Determinaram-se os valores da concentração dos analitos, 4-EG e 4-EF, o desvio padrão da repetibilidade para cada uma das matrizes, considerando os sete ensaios realizados para cada uma delas. (**Tabelas 3.19 e 3.20**).

Tabela 3.19: Valores da concentração de 4-EG, do desvio padrão da repetibilidade e da variância para cada matriz, em mg/l.

Matriz	C 4-EGp (mg/l)	C 4-EGexp (mg/l)	S _r (mg/l)	S ² (mg/l)
Vinho tinto	0,020	0,031	0,0008	1,30 × 10 ⁻⁶
Vinho tinto	0,020	0,036	0,0012	6,00 × 10 ⁻⁷
Vinho tinto	0,250	0,249	0,0068	4,64 × 10 ⁻⁵

Vinho tinto	1,50	1,59	0,043	$1,81 \times 10^{-3}$
Vinho verde branco	0,500	0,547	0,012	$1,53 \times 10^{-4}$
Vinho rosé	0,750	0,716	0,015	$2,35 \times 10^{-4}$
Vinho branco maduro	0,250	0,261	0,0032	$1,05 \times 10^{-5}$
Vinho branco maduro	1,25	1,25	0,048	$2,29 \times 10^{-3}$

Tabela 3.20: Valores da concentração de 4-EF, do desvio padrão da repetibilidade e da variância para cada matriz, em mg/l.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	C 4-EFexp (mg/l)	S _r (mg/l)	S ² (mg/l)
Vinho tinto	0,020	0,066	0,0025	$6,50 \times 10^{-6}$
Vinho tinto	0,020	0,052	0,0018	$3,20 \times 10^{-6}$
Vinho tinto	0,250	0,287	0,0093	$8,61 \times 10^{-5}$
Vinho tinto	1,50	1,59	0,042	$1,75 \times 10^{-3}$
Vinho verde branco	0,500	0,548	0,015	$2,39 \times 10^{-4}$
Vinho rosé	0,750	0,701	0,018	$3,37 \times 10^{-4}$
Vinho branco maduro	0,250	0,264	0,0029	$8,70 \times 10^{-6}$
Vinho branco maduro	1,25	1,24	0,045	$2,04 \times 10^{-3}$

Tabela 3.21: Valores da concentração de 4-EG, obtidos nas diferentes matrizes no estudo da repetibilidade.

Matriz	C 4-EGexp (mg/l)								
	$\bar{Amostra}$	Fortificação	1	2	3	4	5	6	7
Vinho tinto maduro	0,017	0,020	0,036	0,037	0,034	0,037	0,035	0,037	0,037
Vinho tinto maduro	0,012	0,020	0,032	0,029	0,031	0,031	0,030	0,030	0,031
Vinho tinto maduro	0,014	0,250	0,251	0,250	0,249	0,244	0,245	0,235	0,256
Vinho tinto maduro	0,000	1,50	1,59	1,51	1,55	1,55	1,59	1,63	1,63
Vinho branco verde	0,011	0,500	0,544	0,528	0,554	0,564	0,561	0,543	0,547
Vinho rosé	0,015	0,750	0,730	0,697	0,704	0,704	0,734	0,730	0,716
Vinho branco maduro	0,000	0,250	0,264	0,257	0,258	0,257	0,264	0,263	0,261
Vinho branco maduro	0,000	1,25	1,26	1,29	1,17	1,25	1,23	1,31	1,20

Tabela 3.22: Valores da concentração de 4-EF obtidos nas diferentes matrizes, no estudo da repetibilidade.

Matriz	C 4-EFexp mg/l								
	$\bar{Amostra}$	Fortificação	1	2	3	4	5	6	7
Vinho tinto maduro	0,047	0,020	0,066	0,070	0,066	0,067	0,066	0,063	0,069
Vinho tinto maduro	0,033	0,020	0,053	0,054	0,055	0,050	0,050	0,052	0,051
Vinho tinto maduro	0,029	0,250	0,284	0,280	0,288	0,279	0,285	0,306	0,291
Vinho tinto maduro	0,000	1,50	1,59	1,54	1,58	1,56	1,60	1,66	1,64
Vinho branco verde	0,000	0,500	0,551	0,531	0,551	0,519	0,567	0,540	0,548
Vinho rosé	0,032	0,750	0,727	0,689	0,688	0,692	0,730	0,717	0,701
Vinho branco maduro	0,002	0,250	0,263	0,263	0,265	0,268	0,270	0,264	0,261
Vinho branco maduro	0,017	1,25	1,24	1,29	1,19	1,27	1,23	1,31	1,21

Com o objetivo de avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método, a partir dos valores da variância de repetibilidade determinados anteriormente, realizou-se um teste de *Cochran* (**Anexo 6.8.1**). A partir da análise dos resultados, verificou-se que o valor de C tabelado é igual a 0,307, para 95 % de confiança, e o valor de C calculado da matriz com maior variância, vinho tinto maduro, foi de 0,612. Este cálculo seria sucessivamente realizado até que não fosse necessário eliminar mais nenhuma matriz.

No entanto, ao invés de se eliminarem as matrizes e se determinar a repetibilidade do método para a gama de trabalho estabelecida, considerou-se três níveis de concentrações, dado não se ter verificado a homogeneidade de variâncias ao longo de toda a gama de trabalho. Para cada nível, determinou-se não só a repetibilidade como também a precisão intermédia e a incerteza do método.

Para a determinação do 4-EG, o nível de concentração mais baixo corresponde ao intervalo $0 \leq [4\text{-EG}] < 0,020$ mg/l. O nível de concentração intermédio corresponde ao intervalo $0,020 \leq [4\text{-EG}] < 1,00$ mg/l. Por fim, o nível de concentração alto corresponde ao intervalo $1,00 \leq [4\text{-EG}] < 1,50$ mg/l. O critério de divisão da gama de trabalho nestes níveis corresponde ao que permite uma menor rejeição de matrizes no estudo da repetibilidade, de modo que não se observassem diferenças significativas nas variâncias.

Para a determinação do 4-EF, o nível de concentração mais baixo corresponde ao intervalo $0 \leq [4\text{-EF}] < 0,500$ mg/l. O nível de concentração intermédio corresponde ao intervalo $0,500 \leq [4\text{-EF}] < 1,00$ mg/l. Por fim, o nível de concentração alto é idêntico à do 4-EG e corresponde ao intervalo $1,00 \leq [4\text{-EF}] < 1,50$ mg/l.

Para o nível de concentração de 4-EG da concentração inferior a 0,020 mg/l, foram consideradas 2 matrizes, como ilustrado na **Tabela 3.23**, onde consta a concentração dos analitos, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.23: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração baixo.

Matriz	C 4-EGp (mg/l)	C 4-EGexp (mg/l)	S _r (mg/l)	S ² (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,020	0,031	0,0008	1,30 × 10 ⁻⁶
Vinho tinto maduro	0,020	0,036	0,0012	6,00 × 10 ⁻⁷

Com a aplicação do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, a segunda, o valor de C calculado foi de 0,684. Como o valor de C tabelado para n = 2 e 95 % de confiança é de 0,853, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as duas matrizes mencionadas. A partir destas, foram calculados o respetivo CV_r e o limite de repetibilidade apresentados na **Tabela 3.24**.

Tabela 3.24: Coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) e do limite de repetibilidade (r_r) para o 4-EG, no nível de concentração baixo.

Matriz	C4-EGp (mg/l)	CV _r (%)	r _r (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,020	2,6	0,0022
Vinho tinto maduro	0,020	3,2	0,0032
Média	-	2,9	0,0027

Da análise da tabela é possível concluir que o $\overline{CV_r}$ foi de 2,9 %, o que de acordo com o definido pelo laboratório (< 10 %) é considerado satisfatório. Para além disso, ainda se concluiu que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade, podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,0027 mg/l.

Para o nível de concentração intermédio (0,020 ≤ [4-EG] < 1,00 mg/l), foram consideradas quatro matrizes, como ilustrado na **Tabela 3.25**, sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de analitos, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.25: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração intermédio.

Matriz	C 4-EGp (mg/l)	C 4-EGexp (mg/l)	Sr (mg/l)	S2 (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,250	0,247	0,0068	$4,64 \times 10^{-5}$
Vinho branco verde	0,500	0,549	0,0124	$1,53 \times 10^{-4}$
Vinho rosé	0,750	0,717	0,0153	$2,35 \times 10^{-4}$
Vinho branco maduro	0,250	0,261	0,0032	$1,05 \times 10^{-5}$

Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, o vinho rosé, o valor de C calculado foi de 0,529. Como o valor de C tabelado para $n = 4$ e 95 % de confiança é de 0,560, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as 4 matrizes mencionadas. A partir destas, foram calculadas o respetivo CVr e o limite de repetibilidade, tal como está representado na **Tabela 3.26**.

Tabela 3.26: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EG, no nível de concentração intermédia.

Matriz	C 4-Gp (mg/l)	CV _r (%)	r _r (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,250	2,8	0,019
Vinho branco verde	0,500	2,2	0,035
Vinho rosé	0,750	2,1	0,043
Vinho branco maduro	0,250	1,2	0,009
Média	-	2,1	0,026

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CVr for inferior a 10 %, o que se verificou, uma vez que o \overline{CVr} é de 2,1 %. Concluiu-se, ainda, que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,026 mg/l.

Por fim, o nível de concentração alto ($1,00 \leq [4\text{-EG}] < 1,50$ mg/l) foram consideradas duas matrizes, como ilustrado na **Tabela 3.27**, sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de analitos, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade.

Tabela 3.27: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EG para o nível de concentração alto.

Matriz	C 4-EGp (mg/l)	C 4-EGexp (mg/l)	S _r (mg/l)	S ² (mg/l)
Vinho tinto maduro	1,50	1,580	0,043	0,0018
Vinho branco maduro	1,25	1,247	0,048	0,0023

Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, o vinho branco maduro, o valor de C calculado foi de 0,558. Como o valor de C tabelado para n = 4 e 95 % de confiança é de 0,853, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as duas matrizes mencionadas. A partir destas, foram calculadas o respetivo CV_r e o limite de repetibilidade, tal como está representado na **Tabela 3.28**.

Tabela 3.28: Coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) e do limite de repetibilidade (r_r) para o 4-EG, no nível de concentração alto.

Matriz	C 4-EGp (mg/l)	CV _r (%)	r _r (mg/l)
Vinho tinto maduro	1,50	2,7	0,12
Vinho branco maduro	1,25	3,8	0,13
Média	-	3,3	0,13

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CV_r for inferior a 10 %, o que se verificou, uma vez que o $\overline{CV_r}$ é de 3,3

% . Concluiu-se, ainda, que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,13 mg/l.

Em síntese, na **Tabela 3.29** estão apresentados os resultados obtidos para a repetibilidade o 4-EG nos três níveis de concentração.

Tabela 3.29: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), do limite de repetibilidade (r) obtidos para o 4-EG nos três níveis de concentração definidos.

Analito	Nível de concentração (mg/l)	\overline{CVr} (%)	$\overline{r_r}$ (mg/l)
4-EG	$\leq 0,020$	2,9	0,003
	0,020—1,00	2,1	0,026
	$> 1,00$	3,3	0,13

Pela análise da **Tabela 3.29** verifica-se que o $\overline{r_r}$ aumenta com o aumento do nível de concentração. Já para o CVr não se verifica o mesmo, uma vez que o valor mais baixo é o do nível de concentração intermédio, sendo este o que engloba mais matrizes.

Em relação à determinação do 4-EF, o nível de concentração inferior a 0,500 mg/l engloba a análise de quatro matrizes, como ilustrado no **Anexo 6.8.2**. Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz com maior variância, vinho tinto maduro (0,250 mg/l), o valor de C calculado foi de 0,865. Como o valor de C tabelado para n = 4 e 95 % de confiança é de 0,560, concluiu-se que esta matriz deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas apenas as três matrizes mencionadas.

Já para o nível de concentração intermédio, foram consideradas duas matrizes, como ilustrado no **Anexo 6.8.2**. Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, o vinho rosé, o valor de C calculado foi de 0,590. Como o valor de C tabelado para n = 2 e 95 % de confiança é de 0,853, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as duas matrizes mencionadas.

Por fim, o nível de concentração alto, foram consideradas duas matrizes, como ilustrado no **Anexo 6.8.2**. Após realização do teste de *Cochran*, verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, o vinho branco maduro, o valor de C calculado foi de 0,538. Como o valor de C tabelado para $n = 2$ e 95 % de confiança é de 0,853, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as duas matrizes mencionadas. (**Anexo 6.8.3**)

Em síntese, está apresentado os resultados obtidos para a repetibilidade na determinação do 4-EF nos três níveis de concentração.

Tabela 3.30: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), do limite de repetibilidade (r) obtidos para o 4-EF nos três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração (mg/l)	\overline{CVr} (%)	$\overline{r_r}$ (mg/l)
4-EF	$\geq 0,500$	2,79	0,007
	0,500—1,00	2,72	0,047
	$> 1,00$	3,12	0,122

Comparando a repetibilidade dos resultados obtidos para os dois analitos, é possível constatar que os valores obtidos do 4-EF apresentam um menor CVr para os níveis de concentração baixo e alto, enquanto para o 4-EG o CVr é menor para o nível de concentração intermédio. O valor de r_r para ambos os fenóis vai aumentando ao longo dos níveis de concentração.

Apenas foi eliminada uma matriz pelo teste de *Cochran* para a determinação do 4-EF no nível de concentração baixo nas oito matrizes analisadas para ambos os fenóis.

3.8.2. Precisão em condições de precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada, em análises realizadas nas mesmas condições experimentais, alterando os dias de análise, para os níveis de concentração utilizados no

estudo de repetibilidade. Em cada dia que uma matriz foi analisada, os ensaios foram realizados em duplicado.

A partir dos valores dos duplicados, foi possível calcular o valor do desvio médio da precisão intermédia, S_i , e o valor do coeficiente de variação médio, CV_i . Estes valores estão demonstrados no **Anexo 6.9**.

Os valores obtidos para os três níveis de concentração definidas para o 4-EG, encontram-se resumidos na **Tabela 3.31**.

Tabela 3.31: Desvio médio da precisão intermédia (S_i) e coeficiente de variação médio (CV_i) obtidos para o 4-EG.

Analito	Nível de concentração (mg/l)	Nº de matrizes	S_i (mg/l)	CV_i (%)
4-EG	$\leq 0,020$	6	0,0011	3,7
	0,020—1,00	19	0,012	2,6
	$> 1,00$	7	0,063	3,9

Os resultados obtidos para os duplicados de seis amostras, foram levados em consideração para o estudo da precisão intermédia para o nível de concentração mais baixo. Desta forma, foi possível calcular o valor de S_i , sendo o valor obtido de 0,0011 mg/l. Já o valor de CV_i é igual a 3,7 %, concluindo, assim que a precisão intermédia é considerada satisfatória dado que é inferior a 10 %.

Para o nível de concentração intermédio, 0,020 a 1,00 mg/l, foram tomadas em consideração dezanove amostras analisadas, em duplicado, para o estudo da precisão intermédia. Assim, o valor de S_i obtido foi de 0,012 mg/l. A partir deste valor, determinou-se o CV_i é igual a 2,6 %, concluindo, assim que a precisão intermédia é considerada satisfatória dado que o valor é inferior a 10%.

Por último, para o nível de concentração alto, $> 1,00$ mg/l, foram consideradas para o estudo da precisão intermédia sete amostras replicadas. A partir destes valores, determinou-se o valor médio da concentração de 4-EG nestas amostras, bem como, o quadrado da diferença entre duplicados. De seguida, determinou-se o valor do S_i , sendo

este igual a 0,063 mg/l. A partir deste valor, determinou-se o CV_I é igual a 3,9 %, concluindo, assim que a precisão intermédia é considerada satisfatória.

O mesmo estudo também foi efetuado para a determinação do 4-EF. Os valores obtidos para os três níveis concentração, encontram-se resumidos na **Tabela 3.32**.

Tabela 3.32: Desvio médio da precisão intermédia (S_I) e coeficiente de variação médio (CV_I) obtidos para o 4-EF.

Analito	Nível de concentração (mg/l)	Nº de matrizes	S_I (mg/l)	CV_I (%)
4-EF	$\geq 0,500$	15	0,006	3,3
	0,500—1,00	11	0,027	4,0
	$> 1,00$	7	0,064	3,9

Os resultados obtidos para os duplicados de quinze amostras, foram levados em consideração para o estudo da precisão intermédia para o nível de concentração baixo. Desta forma, foi possível calcular o valor de S_I , sendo o valor obtido de 0,006 mg/l. Já o valor de CV_I é igual a 3,3 %.

Para o nível de concentração intermédio, definido o intervalo como 0,500 a 1,00 mg/l, onze amostras analisadas em duplicado foram tomadas em consideração para o estudo da precisão intermédia. Assim, o valor de S_I obtido foi de 0,027 mg/l. A partir deste valor, determinou-se o CV_I é igual a 4,0 %.

Por último, para o nível de concentração alto, $> 1,00$ mg/l, foram consideradas para o estudo da precisão intermédia ao longo deste intervalo sete amostras replicadas. Determinou-se o valor do S_I , sendo este igual a 0,064 mg/l. A partir deste valor, determinou-se o CV_I é igual a 3,9 %.

Assim foi possível concluir que a precisão intermédia é considerada satisfatória em todos os níveis de concentração dado que o valor de CV_I foi sempre inferior a 10%.

Na **Tabela 3.33**, encontra-se de forma resumida os CV obtidos para a repetibilidade e precisão intermédia para os dois analitos em estudo.

Tabela 3.33: Comparação da precisão obtida em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia do método dos fenóis voláteis.

Analito	Nível de concentração (mg/l)	CV _r (%)	CV _i (%)
4-EG	≤ 0,020	2,9	3,7
	0,020—1,00	2,1	2,6
	> 1,00	3,3	3,9
4-EF	≥ 0,500	2,8	3,3
	0,500—1,00	2,7	4,0
	> 1,00	3,1	3,9

Analisando a **Tabela 3.33**, conclui-se que, dentro das condições de precisão avaliadas, são observados valores superiores para a CV_i, como seria de esperar atendendo que as análises foram realizadas em diferentes dias, apesar de terem sido estudadas um maior número de matrizes para o estudo da precisão intermédia. Comparando os resultados obtidos com os dois analitos, é possível verificar que os valores do 4-EG são superiores aos do 4-EF, como exceção do nível de concentração intermédio.

No que diz respeito aos CVs, foi possível observar que, de modo geral, os coeficientes de variação calculados para cada gama de trabalho, quer em condições de repetibilidade quer de precisão intermédia, se encontravam bastante próximos uns dos outros e situados a cerca de 3 %.

Em suma, dado que o valor do coeficiente de variação médio em todos os níveis de concentração, foi sempre muito baixo, pode-se considerar que a precisão é satisfatória, ou seja, os erros aleatórios observados nas análises efetuadas em condições de repetibilidade e precisão intermédia não afetaram a confiança nos resultados produzidos.

3.9. Incerteza do método

O grau de incerteza associado à avaliação analítica do sistema foi estimado de acordo com os dados da justeza e da precisão obtidos para os três níveis de concentração. (Anexo 6.10)

Na **Tabela 3.34** é apresentado um resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza do método do nível de concentração baixo considerando a precisão em condições de precisão intermédia e os ensaios de recuperação efetuados, neste trabalho, para o 4-EG.

Os valores de justeza obtidos para os ensaios de recuperação foram apresentados na **seção 3.7** e para a precisão em condições de precisão intermédia foram apresentados na **seção 3.8.2**.

Tabela 3.34: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração baixo do método de quantificação do 4-EG.

Componente	Variável	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})_{\text{relativa}}$	3,6	%
	$\overline{[4 - EG]_{\text{obs}}}$	0,034	mg/l
Justeza	$\overline{[4 - EG]_{\text{ref}}}$	0,034	mg/l
	bias relativo	2,7	%
	u_{add}	0,12	mg/l
	Cadd	9,99	mg/l
	$u(\text{add})_{\text{relativa}}$	1,2	%
	uV_{add}	0,000071	ml
	Vadd	0,100	ml
	$u(\text{Vol})_{\text{relativa}}$	0,070	%
	$u(\text{recuperação,c})_{\text{relativo}}$	1,2	%
	$u(\text{justeza})_{\text{relativa}}$	3,0	%
Incerteza combinada	$u_c(y)$	4,7	%
Incerteza expandida	U	9,4	%

Na **Tabela 3.35** é apresentado o resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza do método do nível de concentração intermédio considerando a precisão em

condições de precisão intermédia e os ensaios de recuperação efetuados neste trabalho para o 4-EG.

Tabela 3.35: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração intermédio do método de quantificação do 4-EG.

Componente	Variável	Matriz	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})_{\text{relativa}}$		2,5	%
	Justeza	$\overline{[4 - EG]}_{\text{obs}}$	Vinho tinto maduro	0,261
Vinho branco maduro			0,247	
Vinho branco verde			0,549	
Vinho rosé			0,717	
$\overline{[4 - EG]}_{\text{ref}}$		Vinho tinto	0,249	mg/l
		Vinho branco maduro	0,258	
		Vinho branco verde	0,514	
		Vinho rosé	0,765	
bias relativo			5,6	%
u_{add}			0,12	mg/l
C_{add}			9,99	mg/l
$u(\text{add})_{\text{relativa}}$			1,2	%
$u_{V_{\text{add}}}$		0,002	ml	
V_{add}	Vinho tinto maduro	1,28	ml	
	Vinho branco maduro	1,25		
	Vinho branco verde	2,65		
	Vinho rosé	4,06		
$u(\text{Vol})_{\text{relativa}}$	Vinho tinto maduro	0,041	%	
	Vinho branco maduro	0,020		
	Vinho branco verde	0,051		
	Vinho rosé	0,042		
$u(\text{recuperação},c)_{\text{relativo}}$		1,2	%	
$u(\text{justeza})_{\text{relativa}}$		5,7	%	
Incerteza combinada	$u_c(y)$		6,3	%
Incerteza expandida	U		12,5	%

Na **Tabela 3.36** é apresentado o resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza do método do nível de concentração alto considerando a precisão em

condições de precisão intermédia e os ensaios de recuperação efetuados neste trabalho para o 4-EG.

Tabela 3.36: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração alto do método de quantificação do 4-EG.

Componente	Variável	Matriz	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})_{\text{relativa}}$		3,9	%
	$\overline{[4 - EG]_{\text{obs}}}$	Vinho tinto maduro	1,58	mg/l
Vinho branco maduro		1,25		
Justeza	$\overline{[4 - EG]_{\text{ref}}}$	Vinho tinto maduro	1,52	mg/l
		Vinho branco maduro	1,25	
	bias relativo		2,6	%
	u_{add}		0,12	mg/l
	C_{add}		10,0	mg/l
	$u(\text{add})_{\text{relativa}}$		1,2	%
	uV_{add}		0,0032	ml
	V_{add}	Vinho tinto maduro	9,00	ml
		Vinho branco maduro	7,15	
	$u(\text{Vol})_{\text{relativa}}$	Vinho tinto maduro	0,035	%
		Vinho branco maduro	0,045	
	$u(\text{recuperação,c})_{\text{relativo}}$		1,2	%
$u(\text{justeza})_{\text{relativa}}$		2,9	%	
Incerteza combinada	$u_c(y)$		4,9	%
Incerteza expandida	U		9,8	%

Os dados das tabelas anteriores demonstram que estimativa da incerteza do método obtida para o 4-EG é de 10 %, 13 % e 10 % para o nível baixo, intermédio e alto, respetivamente. A estimativa do nível de concentração intermédio é superior às restantes. Uma possível explicação para essa diferença poderá dever-se a um maior número de matrizes apresentadas neste nível.

A incerteza do método da determinação do 4-EF é apresentado em resumo para os diversos do níveis de concentração considerando a precisão em condições de precisão intermédia e os ensaios de recuperação efetuados neste trabalho, apresentada nas **Tabelas 3.37, 3.38 e 3.39**, para o nível baixo, intermédio e alto, respetivamente.

Tabela 3.37: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração baixo do método de quantificação do 4-EF.

Componente	Variável	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})_{\text{relativa}}$	3,3	%
	$\overline{[4 - \text{EF}]_{\text{obs}}}$	0,276	mg/l
Justeza	$\overline{[4 - \text{EF}]_{\text{ref}}}$	0,263	mg/l
	bias relativo	5,1	%
	u_{add}	0,12	mg/l
	Cadd	10,0	mg/l
	$u(\text{add})_{\text{relativa}}$	1,2	%
	uV_{add}	0,00052	ml
	Vadd	1,25	ml
	$u(\text{Vol})_{\text{relativa}}$	0,041	%
	$u(\text{recuperação,c})_{\text{relativo}}$	1,2	%
	$u(\text{justeza})_{\text{relativa}}$	5,3	%
Incerteza combinada	$u_c(y)$	6,2	%
Incerteza expandida	U	12,4	%

Na **Tabela 3.38** é apresentado o resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza do nível de concentração intermédio considerando os ensaios de recuperação efetuados neste trabalho para o 4-EF.

Tabela 3.38: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração intermédio do método de quantificação do 4-EF.

Componente	Variável	Matriz	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})_{\text{relativa}}$		2,8	%
	$\overline{[4 - \text{EF}]_{\text{obs}}}$	Vinho branco verde	0,544	mg/l
		Vinho rosé	0,706	
Justeza	$\overline{[4 - \text{EF}]_{\text{ref}}}$	Vinho branco verde	0,504	mg/l
			Vinho rosé	
	bias relativo		9,0	%
	u_{add}		0,12	mg/l
	Cadd		10,01	mg/l
	$u(\text{add})_{\text{relativa}}$		1,2	%
	uV_{add}		0,00207	ml

	Vadd	Vinho branco verde	2,65	ml
		Vinho rosé	4,01	
	u(Vol)relativa	Vinho branco verde	0,020	%
		Vinho rosé	0,051	
	u(recuperação,c)relativo		1,2	%
	u(justeza)relativa		9,1	%
Incerteza combinada	$u_c(y)$		9,5	%
Incerteza expandida	U		19,0	%

Na **Tabela 3.39** é apresentado o resumo dos resultados obtidos na estimativa da incerteza do nível de concentração alto considerando os ensaios de recuperação efetuados neste trabalho para o 4-EG.

Tabela 3.39: Estimativa da incerteza expandida do nível de concentração alto do método de quantificação do 4-EG.

Componente	Variável	Matriz	Valor	Unidades
Precisão	$u(\text{precisão})\text{relativa}$		4,0	%
	$\overline{[4 - EF]_{\text{obs}}}$	Vinho tinto maduro	1,59	mg/l
		Vinho branco maduro	1,25	
	$\overline{[4 - EF]_{\text{ref}}}$	Vinho tinto maduro	1,52	mg/l
		Vinho branco maduro	1,27	
	bias relativo		3,3	%
	u_{add}		0,12	mg/l
	C_{add}		10,0	mg/l
Justeza	$u(\text{add})\text{relativa}$		1,2	%
	$u_{V_{\text{add}}}$		0,00319	ml
	Vadd	Vinho tinto maduro	9,00	ml
		Vinho branco maduro	7,15	
	u(Vol)relativa	Vinho tinto maduro	0,035	%
		Vinho branco maduro	0,045	
	u(recuperação,c)relativo		1,2	%
	u(justeza)relativa		3,6	%
Incerteza combinada	$u_c(y)$		5,4	%
Incerteza expandida	U		10,7	%

Para o caso da determinação do 4-EF, os dados das tabelas anteriores demonstram que a estimativa da incerteza obtida é de 13 %, 19 % e 11 % para o nível baixo, intermédio e alto, respetivamente. Aqui verifica-se o mesmo que para o outro analito, isto é, a estimativa da incerteza do nível de concentração intermédio é superior às restantes.

Comparando a estimativa da incerteza dos dois analitos é possível verificar que o 4-EF apresenta incertezas maiores. De realçar que estes valores vão de encontro aos do CV_i determinados no estudo da precisão intermédia do método para cada gama de trabalho.

Conclui-se, assim, que a incerteza do método é inferior a 20 % em todos os níveis de concentração o que indica que, de acordo com critérios estabelecidos internamente, a metodologia utilizada é apropriada para estimar a incerteza em todas as gamas de trabalho.

3.10. Aplicação de método numa outra matriz

A validação dos fenóis voláteis por GC-FID foi realizada considerando quatro matrizes de vinhos diferentes. Contudo, foi também realizado um estudo a uma matriz de um vinho licoroso, mais concretamente, um moscatel para verificar o desempenho do método nesta matriz, por indicação dos auditores.

Na **Figura 3.7** está apresentando um cromatograma obtido numa amostra de vinho licoroso e na mesma amostra fortificada com ambos os fenóis, uma vez que na amostra não foi detetado qualquer um dos fenóis em estudo.

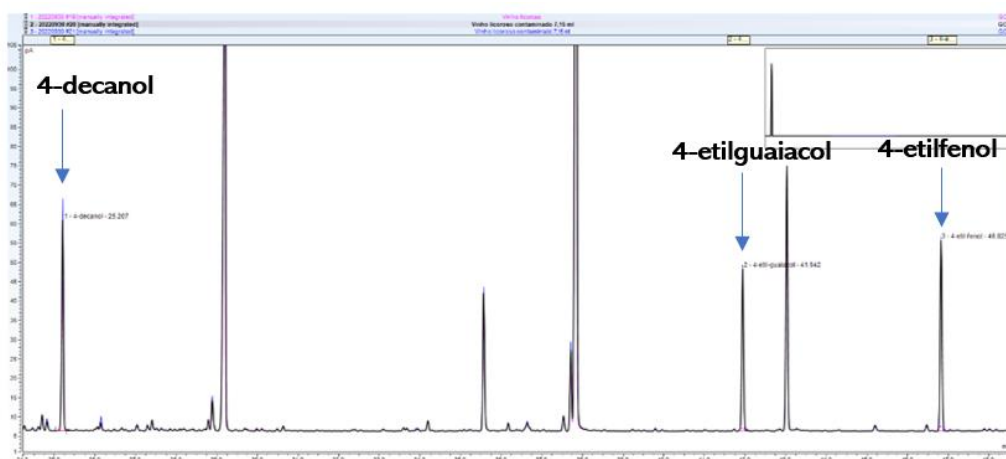


Figura 3.7: Cromatograma de uma amostra de Vinho licoroso + Vinho licoroso fortificado (c = 1,25 mg/l) . tr do 4-decanol = 25,207 min; tr do 4-EG = 41,942 min e tr do 4-EF = 46,825 min.

A partir da análise do cromatograma, verifica-se a existência de 3 picos referentes ao 4-decanol, 4-EG e 4-EF, tal como era esperado. Foi calculada a R (%) obtida num ensaio em duplicado. Os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 3.40**.

Tabela 3.40: Volume de fortificação adicionado de uma solução de fenóis de (c 4-EG= 9,99 mg/l e c 4-EF = 10,0 mg/l), recuperações obtidas e respetiva média.

Analito	Volume adicionado (ml)	R1 (%)	R2 (%)	\bar{R} (%)
4-EG	7,50	101	104	102,5
4-EF		98	100	99

Com base nos valores apresentados na **Tabela 3.40**, é possível observar que as taxas de recuperações obtidas são muito aceitáveis, pois a \bar{R} (%) obtida para ambos os fenóis voláteis foi de 102 % e 99 %, muito próxima dos 100 %. Conclui-se, assim, que o comportamento do vinho licoroso no que respeita à determinação dos fenóis voláteis em estudo é semelhante às restantes matrizes.

3.11. Controlo de qualidade

As cartas de controlo são frequentemente utilizadas para monitorizar a qualidade dos resultados a partir de diversos parâmetros, como o declive da reta de calibração, padrão de verificação ou branco da amostra.

Esta ferramenta serve para averiguar se existem anomalias que exijam revisão da curva de calibração, ou de outro parâmetro, que possa estar a influenciar os resultados.

3.11.1. Declives

A partir dos valores obtidos na **Tabela 3.15 (capítulo 3.6)** elaborou-se uma carta de controlo de indivíduos provisória para cada analito (**Figura 3.8a e 3.8b**). Para tal, foi necessário determinar o valor alvo e os limites de aviso e controlo a partir da média e desvio padrão. Estes valores estão apresentados na **Tabela 3.41**.

Tabela 3.41: Valor alvo, desvio padrão e limites de aviso e controlo do declive das retas de calibração de 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo.

Analito	Valor alvo (l/mg)	S (l/mg)	LSA (l/mg)	LIA (l/mg)	LSC (l/mg)	LIC (l/mg)
4-EG	0,651	0,046	0,743	0,789	0,559	0,513
4-EF	0,788	0,040	0,868	0,908	0,669	0,708

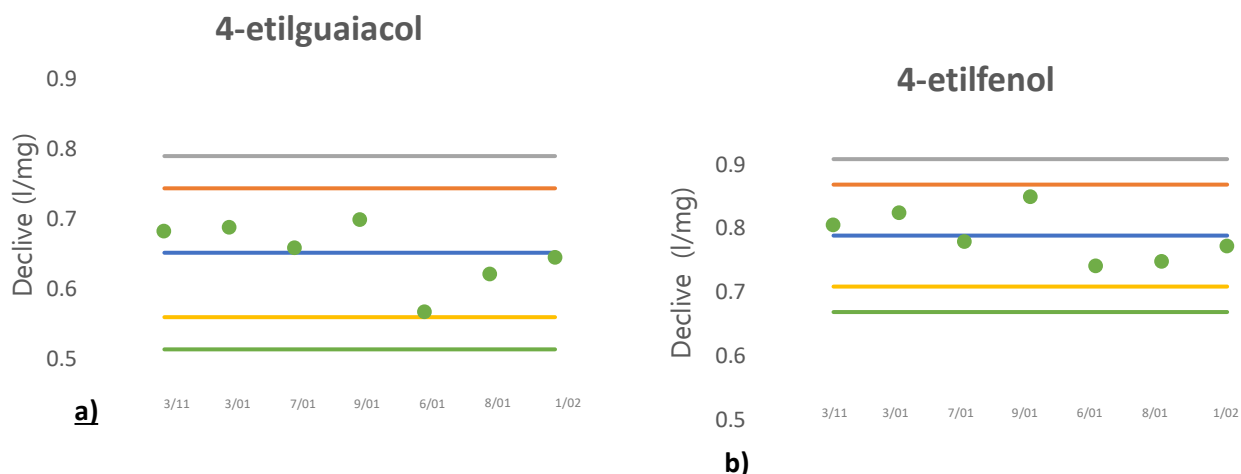


Figura 3.8: Carta de controlo de indivíduos do declive da reta de calibração do: **a)** 4-EG; **b)** 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde.

Da análise da **Figura 3.8a e 3.8b**, verifica-se que os valores do declive se encontram dentro dos limites estabelecidos na carta de controlo e sempre entre os valores de LSA e LSC, o que demonstra que os limites poderiam ser reduzidos. Assim, conclui-se que o declive das retas de calibração dos dois fenóis se manteve estável e sob controlo ao longo do tempo.

3.11.2. Branco da amostra

Foi construída uma carta de controlo a partir do branco da amostra, para verificar a existência de impurezas, (**Figura 3.9a e 3.9b**). Para tal, foi necessário determinar o valor alvo e os limites de aviso e controlo a partir da média e desvio padrão. Estes valores estão apresentados na **Tabela 3.42**.

Tabela 3.42: Valor médio, desvio padrão e limites de aviso e controlo do declive da reta de calibração de 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo do branco da amostra.

Analito	Valor alvo (pA min)	S (pA min)	LSA (pA min)	LIA (pA min)	LSC (pA min)	LIC (pA min))
4-EG	0,020	0,010	0,040	0,050	0,000	-0,010
4-EF	0,019	0,005	0,030	0,035	0,008	0,003

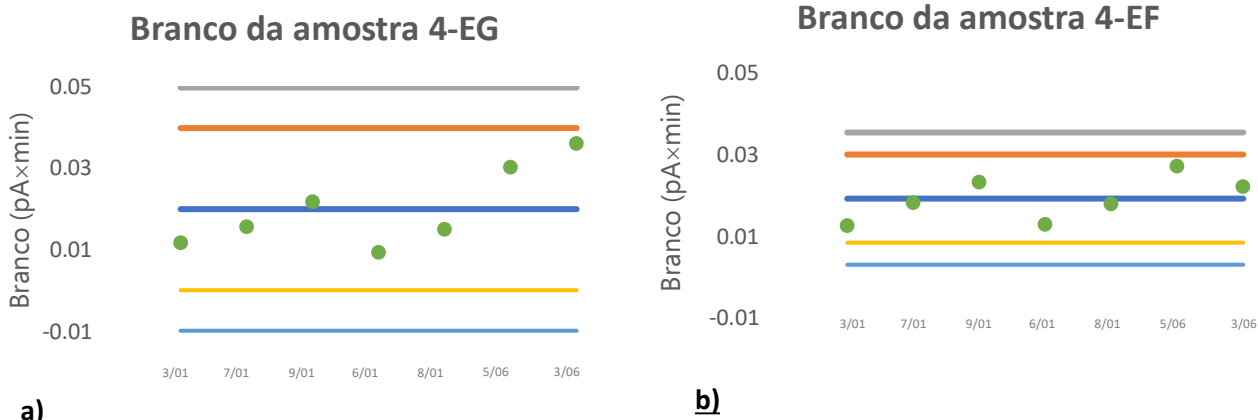


Figura 3.9: Carta de controlo de indivíduos do branco da amostra do: **a)** 4-EG; **b)** 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde.

Da análise da **Figura 3.9a e 3.9b**, verifica-se que os valores dos brancos se encontram dentro dos limites estabelecidos na carta de controlo e sempre entre os valores de LSA e LSC. Verifica-se que não existe nenhuma tendência demonstrando que o processo de análise encontra-se sob controlo.

3.11.3. Padrão de verificação

Foi construída uma carta de controlo, com os valores de concentração determinada experimentalmente do padrão de concentração 1,50 mg/l, denominado de padrão de verificação, para cada analito (**Figura 3.10a e 3.10b**).

No início de cada análise, é traçada uma reta de calibração. De seguida são analisadas as amostras e no final analisa-se novamente o padrão de verificação, de forma a garantir a validade da curva de calibração durante a análise das amostras. Assim, é relevante monitorizar a concentração do padrão de verificação sendo os resultados inseridos numa carta de controlo para verificar se o processo está sob controlo, ou seja, se estão dentro dos limites estabelecidos.

Para tal, foi necessário determinar o valor alvo e os limites de aviso e controlo a partir da média e desvio padrão. Estes valores estão apresentados na **Tabela 3.43**.

Tabela 3.43: Valor médio, desvio padrão e limites de aviso e controlo do 4-EG e 4-EF para a construção das cartas de controlo do padrão de verificação (1,50 mg/l).

Analito	Valor alvo (mg/l)	S (mg/l)	LSA (mg/l)	LIA (mg/l)	LSC (mg/l)	LIC (mg/l)
4-EG	1,51	0,021	1,56	1,58	1,47	1,45
4-EF	1,51	0,031	1,58	1,61	1,45	1,42

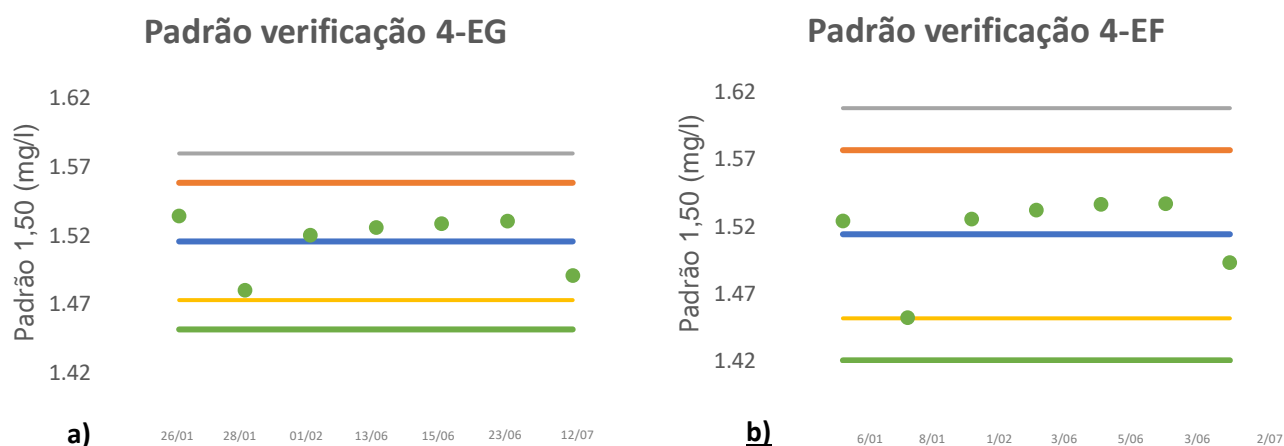


Figura 3.10: Carta de controlo de indivíduos do padrão de verificação 1,50 mg/l do a) 4-EG; b) 4-EF. O valor alvo corresponde à reta azul, LSA à laranja, LIA à cinzenta; LSC à amarela e LIC à verde.

Da análise da **Figura 3.10a e 3.10b**, verifica-se que os valores de concentração dos padrões de verificação encontravam-se dentro dos limites estabelecidos na carta de controlo. Apenas um ponto do padrão de verificação do 4-EF é que se encontra ao mesmo nível do LSC. Assim, pode-se concluir que a reta de calibração se manteve constante, sendo determinado para o padrão de verificação dos dois fenóis um valor que se encontra dentro dos limites definidos ao longo do tempo.

O principal objetivo do controlo da qualidade de rotina é o reconhecimento e a eliminação de erros grosseiros e/ou sistemáticos. Assim, nas cartas de controlo traçadas é possível monitorizar os resultados da análise, tendo-se verificado que, para os dois analitos, não existem anomalias, concluindo-se que a informação obtida a partir da análise de brancos da amostra, padrões de verificação e declives das retas de calibração permitem concluir que o método encontra-se sob controlo. Posto isto, constata-se que

não existem impurezas dos reagentes, dos materiais e que o equipamento está a funcionar adequadamente.

3.11.4. Ensaio interlaboratorial

Durante o período do trabalho experimental foi possível participar num ensaio interlaboratorial, constituindo uma ferramenta importante do controlo da qualidade. O parâmetro mais utilizado para avaliar os resultados obtidos neste ensaio é o *Z-score*. Os valores obtidos foram de 1,33 e 0,76 para o 4-EG e 4-EF. Estes resultados foram apresentados na secção da avaliação da justeza no **subcapítulo 3.7.2**.

Estes valores demonstram que o desempenho do método é satisfatório, dado que são inferiores a 2, não existindo, então evidência da presença de erros sistemáticos.

Os ensaios interlaboratoriais constituem uma ferramenta de CQE permitindo a avaliação do desempenho do método, concluiu-se que o método apresentou um desempenho aceitável.

4. Conclusão

Os fenóis voláteis, 4-EG e o 4-EF, são produtos metabólicos resultantes da contaminação por leveduras *Brettanomyces* que conferem defeitos olfativos descritos como “couro” e “suor a cavalo” que se sobrepõem aos aromas desejáveis dos vinhos. É essencial o desenvolvimento de métodos de fácil operação, com uma boa sensibilidade e precisão.

Neste trabalho foi realizada a validação do método analítico para a determinação dos fenóis voláteis recorrendo ao GC-FID, tendo sido caracterizados os seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, limite de quantificação, gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, justeza, precisão, assim como a incerteza em matrizes de bebidas alcoólicas, nomeadamente vinho tinto maduro, branco maduro, branco verde e rosé.

A seletividade foi demonstrada recorrendo à fortificação de amostras tendo obtido taxas de recuperação entre os 90 e 114 %.

O valor do LDQ (0,020 mg/l) demonstrou ser adequado ao propósito e foi avaliado de duas maneiras distintas. Na primeira, foram realizados ensaios de recuperação ao nível do primeiro padrão da curva de calibração, tendo-se obtido taxas de recuperação entre 85 % e 108 %. A segunda maneira consistiu na análise da relação S/N, que foi considerada aceitável. De referir ainda que os limiares de perceção do 4-EG (47 µg/l) e do 4-EF (440 µg/l), são cerca de 2 e 22 vezes superiores ao LDQ determinado, respetivamente.

Foi verificada uma boa correlação linear da razão entre as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno, concluindo-se, que existe linearidade na gama de trabalho utilizada. Os valores de R obtidos foram sempre superiores ou iguais a 0,9991. No entanto, não se verificou a homogeneidade das variâncias nesta gama.

A sensibilidade do método foi avaliada pelo declive das retas de calibração realizadas em dias diferentes, mantendo-se praticamente constante ao longo do tempo, dado que não ocorreram alterações significativas dos declives durante o período de estudo.

A justeza foi avaliada recorrendo a ensaios de recuperação e a um ensaio interlaboratorial no qual o laboratório apresentou um desempenho satisfatório (*Z-score* < 2).

Quanto à precisão do método, avaliada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, foi possível concluir que nos três níveis de concentração estudados os valores dos CV foram satisfatórios para os dois analitos em estudo.

A incerteza do método foi estimada para os três níveis de concentração e situaram-se entre os 10 e 19 %, transmitindo confiança nos resultados produzidos.

Para além das matrizes estudadas, vinhos de mesa, foi analisado um vinho licoroso para verificar o alargamento do campo de aplicabilidade do método, tendo-se obtido taxas de recuperação idênticas às restantes matrizes. Assim, seria desejável, no futuro, a inclusão desta matriz na validação do método.

De uma forma geral, pode-se referir que os resultados para o 4-EF são melhores em todos os parâmetros de desempenho. Por último, conclui-se que atendendo aos resultados dos parâmetros de desempenho, o método foi validado e mostra-se adequado para a quantificação do 4 EF e 4 EG na matriz vinhos de mesa.

5. Referências bibliográficas

1. Website da Merieux NutriSciences Portugal. <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/sillikerportugal>. [Data de Acesso: 10/12/2021].
2. NP EN ISO/IEC 17025:2018 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. 2018.
3. V. Moraes, C. Locatelli. Vinho: uma revisão sobre a composição química e benefícios à saúde. *Evidência, Joaçaba*. 10(1-2) (2010) 57-68.
4. R. Jackson. *Wine Science: Principles and Applications*. third edition. Elsevier; 2008.
5. E. J. Bartowsky, I. S. Pretorius. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
6. H. Sirén, K. Sirén, J. Sirén. Evaluation of organic and inorganic compounds levels of red wines processed from Pinot Noir grapes. *Analytical chemistry Research*. 3 (2015) 26-36.
7. S. Catarino, M. Madeira, F. Monteiro; F. Rocha; A. S. S Garcia; B. Sousa. Effect of Bentonite Characteristics on the Elemental Composition of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(1) (2008) 158-165.
8. I. Panigas. Manual sobre vinhos – Da história ao serviço. *Revista Médica de Minas Gerais*. 4(3) (1994) 27-32.
9. P. Sereno. (2009) Vinicultura de precisão: utilização da detecção remota no estudo da variabilidade espacial do vigor, produção e qualidade, castas "Syrah" e "Touriga Franca". Tese de Mestrado em Vinicultura e Enologia. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa; Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 87 pp.
10. C. Vagante (2012). Efeitos Do Consumo de Vinho Na Saúde Humana: Aspectos Positivos e Negativos. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 87 pp.
11. L. Zhu, Y. Zhang, L. Jiang. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 (2012) 3492-3510.
12. F. Morgado (2009). Fenóis Voláteis Em Vinhos Tintos. Tese de Mestrado em Vinicultura e Enologia. Universidade de Évora; Évora. 74 pp.
13. Website O portal do vinho português. <http://www.infovini.com>. [Data de Acesso: 13/07/2021].

14. Website do Planeamento, políticas e Administração Geral. <https://www.gpp.pt/index.php/>. [Data de Acesso: 30/09/2021].
15. Website Evolução da Produção Nacional de Vinho por Região Vitivinícola. <https://www.ivv.gov.pt/np4/163.html>. [Data de Acesso: 07/10/2021].
16. C. Santos-Buelga, S. González-Manzano. Wine and health relationships. A question of moderation ? *Ciência Téc Vitiv.* 26(1) (2011) 22-44.
17. J. M. Guilford, J. M. Pezzuto. Wine and Health: A Review. *Am J Enol Vitic.* 62 (2011) 471-486.
18. E. Bartowsky, P. Costello, P. Henschke. Management of malolactic fermentation - wine flavour manipulation. *he Austalian Grapegrower and Winemaker.* 461(7) (2002).
19. R. Suárez, J. A. Suárez-Lepe, A. Morata, F. Carderón. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. 102(1) (2007)10-21.
20. S. Lecocq, M. Visser. What Determines Wine Prices: Objective vs. Sensory Characteristics. *Journal of Wine Economics.* 1(1) (2006) 42-56.
21. A. Baiano, C. Scrocco, G. Sepielli, A. Matteo. Wine processing: a critical review on physical, chemical, and sensory implications of innovative vinification procedures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* (2015) 2391-2407.
22. L. S. Gonzaga, D. L. Capone, S. P. Bastian, D. W. Jeffery. Defining wine typicity: sensory characterization and consumer perspectives. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 27 (2021) 246-256.
23. G. Fleet. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 86(1-2) (2003) 11-22.
24. V. Loureiro, M. Malfeito-Ferreira. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology.* 86(1-2) (2003) 23-50.
25. M. G. Aguilar-Uscanga, M. L. Délia, P. Strehaiano. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61(2) (2003) 157-162.
26. P. Valentão, R. M. Seabra, G. Lopes, L. R. Silva, V. Martins, M. E. Trujillo, E. Velázquez, P. B. Andrade. Influence of *Dekkera bruxellensis* on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine. *Food Chemistry.* 100(1) (2007) 64-70.
27. P. Laureano, I. D'Antuono, A. Barata, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro. Effect of different sanitation treatments on the population of *Dekkera bruxellensis* recovered from the wood of barrels (in Portuguese). *Enologia.* 43(44) (2004) 3-8.

28. P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J. Boidron, V. Lavigne. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J Sci Food Agric.* 62(2) (1993) 191-202.
29. P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J. N. Boidron, M. Pons. The origin of ethylphenols in wines. *J Sci Food Agric.* (1992) 60:165.
30. A. Oelofse, M. Lonvaud-Funel. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology.* (2009) 377-385.
31. J. Gomes (2012). *Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por Brettanomyces/Dekkera*. Tese de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Escola Superior de Biotecnologia; Universidade Católica Portuguesa, Porto. 54 pp.
32. V. Millet, A. Lonvaud-Funel. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Applied Microbiology.* 30 (2000) 136-141.
33. M. Malfeito-Ferreira. Yeasts and off-flavours: a technological perspective. *Ann Microbiol.* 61 (2010) 95-102.
34. A. C. Carel, J. Hans-Gerd, M. D. Marieke, A. L. Piet. High-speed gas chromatography: an overview of various concepts. *Journal of Chromatography A.* 856 (1999) 315-329.
35. R. Yang, A. Alcazar-Magana, Y. Qian, M. Qian. Smoked-Derived Volatile Phenol Analysis in Wine by Stir Bar Sorptive Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Molecules.* 26 (2021) 5613.
36. G. Nicolini, R. Larcher, D. Bertoldi, C. Puecher, F. Magno. Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *Vitis.* 46(4) (2007) 202-206.
37. P. Caboni, A. Angioni, M. Cabras, G. Sarais. Determination of 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol in Wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55(18) (2007) 7288-7293.
38. J. Siegrist, C. Salles, P. Etiévant. HPLC Determination of Volatile Phenols in Wines. *Chromatographia.* 35(1-2) (1993) 50-54.
39. A. Escarpa, M. Gonzalez. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal Chim Acta.* 427(1) (2001) 119-127.
40. V. Ivanova, M. Stefova, F. Chinnici. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J Serbian Chem Soc.* 75(1) (2010) 45-59.
41. A. González-Calabuig, M. Valle. Voltammetric electronic tongue to identify Brett character in wines. On-site quantification of its ethylphenol metabolites. *Talanta.* 179 (2018) 70-74.

42. A. Herrera-Chacon, A. González-Calabuig, I. Campos, M. Valle. Bioelectronic tongue using MIP sensors for the resolution of volatilephenolic compounds. *Sensors and Actuators B*. 258 (2018) 665-671.
43. D. Lowinsohn, M. Bertotti. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments. *Quim Nova*. 29(6) (2006) 1318-1325.
44. S. Gomes, J. Nogueira, M. Rebelo. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens Bioelectron*. 20(6) (2004) 1211-1216.
45. L. Fariña, E. Boido, F. Carrau, E. Dellacassa. Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 1157 (2007) 46-50.
46. N. Martorell, M. P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Determination of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*,. 97 (2002) 349-354.
47. M. C. Monje, C. Privat, V. Gastine, F. Nepveu. Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*. 458 (2002) 111-117.
48. R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 966 (2002) 67-1771.
49. C. Domínguez, D. Guillén, C. Barroso. Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta*. 458 (2002) 95-102.
50. F. M. Sousa, R. J. Ferreira, V. M. Sá, S. C. Cunha, J. Fernandes. Novel analytical approach to assess the profile of volatile phenols in Portuguese red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 26 (2020) 90-100.
51. L. Martín-Pozo, K. Arena, F. Cacciola, P. Dugo, L. Mondello. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in food analysis. Is any sample preparation necessary? *Green Analytical Chemistry*. 3 (2022) 100025.
52. P. Silva (2012). Determinação de compostos fenólicos por HPLC. Tese de Mestrado em Química Industrial. Universidade da Beira Interior, Covilhã. 136 pp.
53. S. Moldoveanu, V. David. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Second Edition. Elsevier; 2022.
54. F. J. Holler, D. A. Skoog, S. R. Crouch, C. Pasquini. *Principios de análise instrumental*. Bookman; 2009.
55. A. L. Pombeiro. Técnicas e Operações Unitárias Em Química Laboratorial. *Fundação Calouste Gulbenkian*. (1) 2003.

56. P. K. Sahu, N. R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Swain, C. S. Patro, J. Panda. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147 (2018) 590-611.
57. D. A. Skoog, S. R. Crouch, F. J. Holler. *Principles of Instrumental Analysis*. 7th edition. Thomson; 2007.
58. R. W. Scoot. Principles and Practice of Chromatography. *Library4Science* (1) 2002.
59. P. Ravisankar, S. Anusha, K. Supriya, U. Ajith Kumar. Fundamental Chromatographic Parameters. *Int J Pharm Sci Rev Res*,. 55(2) (2009) 46-50.
60. J. A. Paschoal, S. Rath, F. P. Airoidi, F. G. Reyes. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*. 31 (2008) 1190-1198.
61. P. J. Marriott, C. Cornwell, R. Shellie. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. 936 (2001) 1-22.
62. R. Nascimento, A. Clecius, P. Barbosa, V. Silva. Cromatografia Gasosa Aspectos Teóricos e Práticos. *Imprensa Universitária UFC* (2019).
63. H. McNair, J. Miller, N. Snow. *Basic Gas Chromatography*. Third edition. Wiley; 2019.
64. N. Snow. Split/Splitless Inlets in Gas Chromatography: What's Up with All Those Different Glass Inlet Liners? *Lc Gc North America*. 40(2) (2022) 121-124.
65. W. Niessen. *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. First Edition. CRC Press; 2001.
66. R. Mametov, I. A. Ratiu, F. Monedeiro, T. Ligor. Evolution and Evaluation of GC Columns. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. (2019) 1-24.
67. Valentão P. Influence of Dekkera bruxellensis on the contents of anthocyanins, organic acids and volatile phenols of Dão red wine.
68. G. S. Silva, A. A. S. Silva, L. S. N. Silva, R. L. Godoy, L. C. Nogueira, S. L. Quitério, R. S. Raices. Method development by GC–ECD and HS-SPME–GC–MS for beer volatile analysis. *Food Chemistry*. 167 (2015) 71-77.
69. J. O. Bosset, M. Collomb, R. Sieber. The Aroma Composition of Swiss Gruyère Cheese IV. The Acidic Volatile Components and their Changes in Content during Ripening. *LWT - Food Science and Technology*. 26(6) (1993) 581-592.
70. K. Dettmer-Wilde, W. Engewald. *Practical Gas Chromatography*. Springer; 2014.
71. C. F. Poole. Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1421 (2015) 137-153.








72. J. Visentainer, T. Claus, L. Chiavelli, S. Maruyama, J. R. Santos. Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison with Mass Spectrometry with Emphasis on Fatty Acids and Their Esters. *Advances in Gas Chromatography*. (2014).
73. Website Flame ionisation detector. Gas chromatography with HiQ® specialty gases. <http://hiq.lindegas.com/>. [Data de Acesso: 15/10/2022].
74. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Guia Relacre Guia 13, edição 1; RELACRE: 2013.
75. B. Magnusson; U. Ornemark. *Eurachem Guide: The fitness for Purpose of Analytical Methods- A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2ª edição; 2014.
76. H. Aboul-Enein. *Selectivity versus Specificity in Chromatographic Analytical Methods*. 5th. edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg,; 2000.
77. L. Currie. Detection and quantification limits: origins and historical overview. 91(2) (1999) 127-134.
78. M. Ribani, C. Bottoli, C. Collins, I. Jardim. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*. 27(5) (2004) 771-780.
79. R. I. Rawski, P. T. Sanecki, K. M. Kijowska, P. M. Skitał, D. E. Saletnik. Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies. *South African J Chem*. 69 (2016) 166-173.
80. S. L. R. Ellison, A. Williams. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3ª edição; 2012.
81. Quantificação de Incerteza de Medição Em Ensaio Químicos e Físico-Químicos. Guia relacre 31, edição 1; RELACRE: 2018.
82. J. N. Miller, J. C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5ª edição. Pearson Education Limited (2005).
83. ISO/REMCO Guide 30:2015 - Reference materials - Selected terms and definitions. 2015.
84. ISO/IEC 17043: 2010 Conformity assessment — General requirements for proficiency testing. 2010.
85. Y. Heyden, J. Smeyers- Verbeke. Set-up and evaluation of interlaboratory studies. *Journal of Chromatography A*. 2007;1158:158-167.
86. Cheng S, Thaga K. Single Variables Control Charts: an Overview. *Qual Reliab Engng Int*. 22 (2006) 811-820.
87. Alguns exemplos de cartas de controlo em laboratórios de análise Química. Guia relacre 9, edição 1; RELACRE: 2000.

88. P. B. Kyle. Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory. *Toxicology: GCMS*. (2017) 131-163.
89. F. Scholz, S. Komorsky-Lovric, M. Lovric. A new access to Gibbs energies of transfer of ions across liquid/liquid interfaces and a new method to study electrochemical processes at well-defined three-phase junctions. *Electrochemistry Communications* 2. 2(2) (2000) 112-118.
90. L. Cuadros-Rodríguez, A. M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, C. Jiménez-Linares. Validation of an Analytical Instrumental Method by Standard Addition Methodology. *Journal of AOAC International*. 78(2) (1995) 471-476.
91. J. N. Miller. Using the Grubbs and Cochran Tests to Identify Outliers. *Anal Methods*. 7 (2015) 7948-7950.
92. Y. Wang, P. R. Gil, Y. H. Chen, J. D. Kromrey, E. S. Kim, T. Pham, D. Nguyen, J. L. Romano. Comparing the Performance of Approaches for Testing the Homogeneity of Variance Assumption in One-Factor ANOVA Models. *Educ Psychol Meas*. 77 (2017) 305-329.
93. Website do Instituto Português da acreditação, diretório de entidades acreditadas. <http://www.ipac.pt/pesquisa/acredita.asp>. [Data de Acesso: 13/08/2022].
94. R.K. PEARSON. Fitting straight lines to poor quality (z,y) data.. *Mathematical and Computer Modelling*. 16(3) (1992) 71-80.
95. M. Ribani, C. Bottoli, H. Carol, I. Jardim, L. Melo. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 227(5) (2001) 771-780.
96. A. Neto. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*. 1(3) (2009) 69-77.
97. O. Júnior, E. Caldas, N. Brito, T. Santos, M. Vale. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad Pesq, São Luís*. 12(1-2) (2001) 116-131.
98. Guidance for Industry Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures. 1995.
99. Website da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV). <https://www.oiv.int/>. [Data de Acesso: 26/06/2022].
100. M. B. C. Menezes, R. Jaćimović. Validation of the k0_IAEA software using SMELS material at CDTN/CNEN, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 278(3) (2008) 607-611.

6. Anexos

6.1. Fichas de segurança

Tabela 6.1: Ficha de segurança dos reagentes utilizados.

Reagentes	Pictogramas	Perigo
Éter dietílico		Inflamável; nocivo ou irritante
Hexano		Inflamável; carcinogénico; nocivo ou irritante e prejudicial para o ambiente
4-decanol		Inflamável
Metanol		Inflamável; carcinogénico e tóxico
4-etilguaicol		Inflamável
4-etilfenol		Corrosivo; inflamável
Etanol		Inflamável; nocivo ou irritante

1. Éter dietílico

Advertências de perigo

H224 - Líquido e vapor extremamente inflamáveis.

H302 - Nocivo por ingestão.

H336 - Pode provocar sonolência ou vertigens.

Advertências de prudência

P210 - Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.

P280 - Usar luvas de proteção/proteção ocular.

P303+P361+P353 - Se entrar em contacto com a pele (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche.

P304+P340 Em caso de inalação - retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P312 - Caso sinta indisposição contacte um centro de informação antivenenos/médico.

P403+P235 - Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.

2. Hexano

Advertências de perigo

H225 - Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H304 - Pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias.

H315 - Provoca irritação cutânea.

H336 - Pode provocar sonolência ou vertigens.

H361f - Suspeito de afetar a fertilidade.

H373 - Pode afetar os órgãos (sistema nervoso) após exposição prolongada ou repetida (em caso de inalação).

H411 - Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Advertências de prudência

P202 Não manuseie o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de Segurança.

P280 - Usar luvas de proteção/proteção ocular.

P303+P361+P353 - Se entrar em contacto com a pele (ou o cabelo): Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P304+P340 - Em caso de inalação: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P308+P313 – Em caso de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

3. Metanol

Advertências de perigo

H225 - Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H301+H311+H331 - Tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação.

H370 - Afeta os órgãos (olho).

Advertências de prudência

P210 - Manter afastado do calor, faísca, chama aberta, superfícies quentes. Não fumar.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P280 - Usar luvas de proteção/proteção ocular.

P303+P361+P353 - Se entrar em contacto com a pele (ou o cabelo): Retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P304+P340 - Em caso de inalação: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P308+P311 - Em caso de exposição ou suspeita de exposição: contacte um centro de informação antivenenos/médico.

4. 4-etilguaiacol

Advertências de perigo

H315 - Provoca irritação cutânea.

H319 - Provoca irritação ocular grave.

H335 - Pode provocar irritação das vias respiratórias.

Advertências de prudência

P261 - Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 - Lavar cuidadosamente após manuseamento.

P271 - Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

P280 - Usar luvas de proteção/proteção ocular.

P302+P352 - Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água.

P305 + P351 + P338 - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

5. 4-etilfenol

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H312 - Nocivo em contacto com a pele.

H314 - Provoca queimaduras cutâneas graves e danos oculares.

H318 - Causa sérios danos oculares.

H332 - Nocivo por inalação.

Advertências de prudência

P280 - Usar luvas de proteção/proteção ocular.

P301 +P312 – Em caso de ingestão: caso sinta indisposição contacte um centro de informação antivenenos/médico.

P301 + P330 + P331 - Em caso de ingestão: enxaguar a boca. Não provocar o vômito.

P302+P352 - Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água.

P304+P340 - Em caso de inalação: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P305 + P351 + P338 - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

P310 - Contacte imediatamente um centro de informação antivenenos/médico.

6. Etanol

Advertências de perigo

H225 - Líquido e vapor facilmente inflamáveis.

H319 - Provoca irritação ocular grave.

Advertências de prudência

P210 - Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar.

P233 - Manter o recipiente bem fechado.

P305 + P351 + P338 - Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

6.2. Soluções de calibração

6.2.1. Cálculo da concentração efetiva da solução mãe de calibração e respetiva incerteza combinada associada

Para o cálculo das incertezas das soluções foi utilizada a abordagem “passo a passo”. De maneira a visualizar de forma efetiva, são apresentados os passos necessários para o cálculo da incerteza da solução mãe do 4-EG.

Em primeiro lugar, especificou-se a mensuranda de acordo com a **Equação 6.1**.

$$[\text{Sol. mãe}] = \frac{m \times \text{Pureza}}{V_{\text{balão}}} = \frac{100,4 \times 99,5}{0,1000} = 999 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.1}$$

Determinaram-se as fontes de incerteza que estão apresentadas no diagrama em espinha de peixe para este caso em particular representado na **Figura 6.1**.

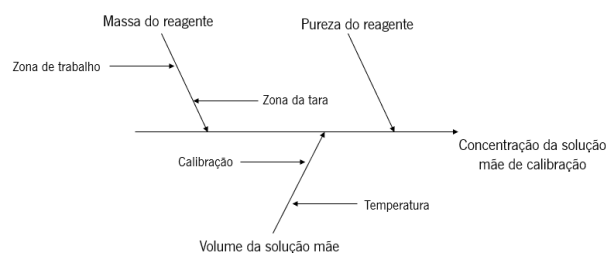


Figura 6. 1: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração efetiva da solução mãe de de calibração.

Após a identificação das fontes de incerteza, foi necessário quantificá-las. Assim, calculou-se a incerteza da pureza $u(P)$, assumindo uma distribuição retangular. A incerteza padrão é calculada através da **Equação 6.2**.

$$u(P) = \frac{\alpha}{\sqrt{3}} = \frac{0,005}{\sqrt{3}} = 0,003 \quad \mathbf{6.2}$$

Seguidamente, determinou-se a incerteza da massa $u(m)$, tendo em conta o erro máximo admissível (EMA) da balança na zona da tara e na zona de trabalho, de acordo com a **Equação 6.3**.

$$u_m = \sqrt{\frac{EMA\ tara^2}{\sqrt{3}} + \frac{EMA\ trabalho^2}{\sqrt{3}}} = \sqrt{\frac{0,002^2}{\sqrt{3}} + \frac{0,0005^2}{\sqrt{3}}} = 0,0012g \quad \mathbf{6.3}$$

Por fim, determinou-se a incerteza do volume $u(V)$, sabendo que o volume contido no balão volumétrico pode ser afetado pelas seguintes fontes de incerteza:

- **Solução (uMv)**, na forma de incerteza padrão, admitindo uma distribuição triangular. Dada pela **Equação 6.4**:

$$uMv(V) = \frac{T}{\sqrt{6}} = \frac{0,10}{\sqrt{6}} = 0,041 \text{ l} \quad \mathbf{6.4}$$

- **Temperatura (uT)**, na forma de incerteza padrão é determinada calculando a variação do volume do material volumétrico (ΔV), tendo em consideração que normalmente a temperatura de um laboratório oscila aproximadamente 4°C . Assim a ΔV é calculada através da **Equação 6.5**.

$$\Delta V = \pm (V_{bal\tilde{a}o} \times \text{coeficiente de expansão da agua} \times \Delta T) = 100 \times 2,1 \times 10^{-4} \times 4 = 0,084 \text{ l} \quad \mathbf{6.5}$$

Assumindo uma distribuição triangular, calcula-se a incerteza padrão associada à temperatura recorrendo à Equação 6.6.

$$u_T(V) = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} = \frac{0,084}{\sqrt{3}} = 0,048 \text{ l} \quad 6.6$$

Tendo em conta as diferentes fontes de incerteza associadas ao volume, a $u(V)$ é obtida através da seguinte equação:

$$u_V = \sqrt{u_{Mv}(V)^2 + u_T(V)^2} = \sqrt{(0,041)^2 + (0,048)^2} = 0,063 \text{ l} \quad 6.7$$

A incerteza combinada da solução mãe do 4-EG é obtida através da Equação 6.8.

$$u_c(C_{4\text{-etilguaiacol}}) = C \times \sqrt{\frac{u(P)^2}{P} + \frac{u(m)^2}{m} + \frac{u(V)^2}{V}} = 999 \sqrt{\frac{0,003^2}{0,995} + \frac{(0,001)^2}{0,100} + \frac{(0,063)^2}{100}} = 12,2 \text{ mg/l} \quad 6.8$$

Para o caso do 4-EF, o cálculo das concentrações é efetuado da mesma forma que o 4-EG, uma vez que foi preparada uma solução conjunta de calibração, variando apenas a pureza do reagente, que corresponde a 99,9%, tal como está apresentado na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Valores auxiliares para o cálculo da concentração da solução mãe de calibração.

	<i>m</i> (g)	<i>P</i> (%)	<i>V</i> (ml)	<i>C</i> (mg/l)
4-EG	0,100	99,5	100	999
4-EF	0,100	99,9	100	1001

Na Tabela 6.3, encontram-se apresentadas, de forma resumida, as incertezas para o cálculo da concentração da solução mãe de calibração.

Tabela 6.3: Certezas para o cálculo da concentração da solução mãe de calibração.

	u_p	u_m	u_v	u_c
4-EG	0,003	0,001	0,068	999 ± 12
4-EF	0,006	0,001	0,068	1001 ± 13

6.2.2. Cálculo da concentração da solução de trabalho e respetiva incerteza combinada associada

Neste caso foi também utilizada a abordagem passo a passo para o cálculo da incerteza combinada associada à solução de trabalho.

Como a solução de trabalho de fenóis voláteis foi preparada por diluição a partir da da solução mãe, a concentração da mesma é obtida através da **Equação 6.9**.

$$[Sol. trabalho] = \frac{C_{solução\ mãe} \times V_{adição\ mãe}}{V_{balão}} = \frac{999 \times 5}{0,5000} = 9,99 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.9}$$

De seguida, determinaram-se as fontes de incerteza e, as mesmas estão apresentadas no diagrama em espinha de peixe para este caso em particular na **Figura 6.2**.

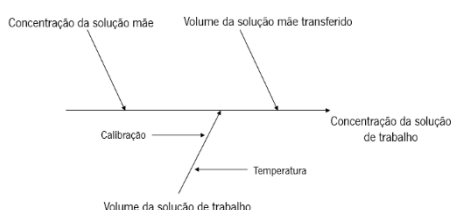


Figura 6. 2: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração da solução de trabalho.

Com base na incerteza da concentração de 4-EG na sua forma expandida (24,4 mg/l) e na incerteza padrão associada ao volume da solução mãe de calibração transferido para preparar esta solução, correspondente à incerteza indicada no certificado da micropipeta utilizada (0,004 ml), determinou-se a incerteza do volume $u(V)$ de acordo com a **Equação 6.10**.

$$u_V = \sqrt{(0,102)^2 + (0,000)^2} = 0,102 \text{ l} \quad \mathbf{6.10}$$

Assim, a incerteza combinada da solução de trabalho é obtida através da **Equação 6.11**.

$$u_c(Cstock) = C \times \sqrt{\frac{u(conc.mãe)^2}{c} + \frac{u(adição\ mãe)^2}{V} + \frac{u(V)^2}{V}} = 9,99 \times \sqrt{\frac{24,4^2}{0,999} + \frac{(0,004)^2}{5,0} + \frac{(0,105)^2}{500}} = 0,244 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.11}$$

Na **Tabela 6.4**, encontram-se apresentadas, de forma resumida, as incertezas para o cálculo da concentração da solução de trabalho.

Tabela 6.4: Incertezas para o cálculo da incerteza da concentração da solução de trabalho.

	$u_c\ expandida$	u_{vmi}	u_v	u_c
4-EG	24,4	0,004	0,105	9,99 ± 0,24
4-EF	26,4	0,004	0,105	10,01 ± 0,26

6.2.3. Cálculo da concentração da solução padrão de calibração e respetiva incerteza combinada associada

Neste caso foi também utilizada a abordagem passo a passo para o cálculo da incerteza combinada associada à solução padrão de concentração 1,50 mg/l.

Como a solução padrão de fenóis voláteis foi preparada por diluição a partir da concentração da solução de trabalho, a concentração da mesma é obtida através da seguinte equação.

$$[\text{Sol. padrão}] = \frac{C_{\text{solução trabalho}} \times V_{\text{adição trabalho}}}{V_{\text{balão}}} = \frac{9,99 \times 15}{0,100} = 1,50 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.12}$$

Determinaram-se as fontes de incerteza e, as mesmas estão apresentadas no diagrama em espinha de peixe para este caso em particular na **Figura 6.3**.

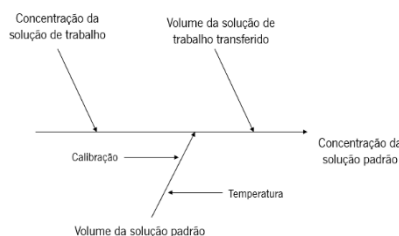


Figura 6.3: Diagrama em espinha de peixe para o cálculo da incerteza da concentração da solução padrão.

Identificadas as fontes de incerteza, é necessário quantificá-las, sabendo que a $u_c(C_{4-EG})$ corresponde a 0,244 mg/l. No entanto, utilizou-se esta incerteza na sua forma expandida que corresponde a 0,489 mg/l.

A incerteza padrão associada ao volume da solução mãe de calibração transferido para preparar esta solução, corresponde à incerteza indicada no certificado da pipeta graduada (0,030 ml).

Por fim, determinou-se a incerteza do volume $u(V)$, tal como demonstrado anteriormente a $u(V)$ é dada pela **Equação 6.13**.

$$u_V = \sqrt{(0,041)^2 + (0,000)^2} = 0,041 \text{ l} \quad \mathbf{6.13}$$

Assim, a incerteza combinada da solução padrão é obtida através da **Equação 6.14**.

$$u_c(C_{\text{stock}}) = C \times \sqrt{\frac{u(\text{conc. trabalho})^2}{c} + \frac{u(\text{adição trabalho})^2}{v} + \frac{u(V)^2}{V}} = 1,50 \times \sqrt{\frac{(0,489)^2}{9,990} + \frac{(0,030)^2}{15,0} + \frac{(0,048)^2}{100}} = 0,073 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.14}$$

Na **Tabela 6.5**, encontram-se apresentadas, de forma resumida, as incertezas para o cálculo da concentração da solução padrão.

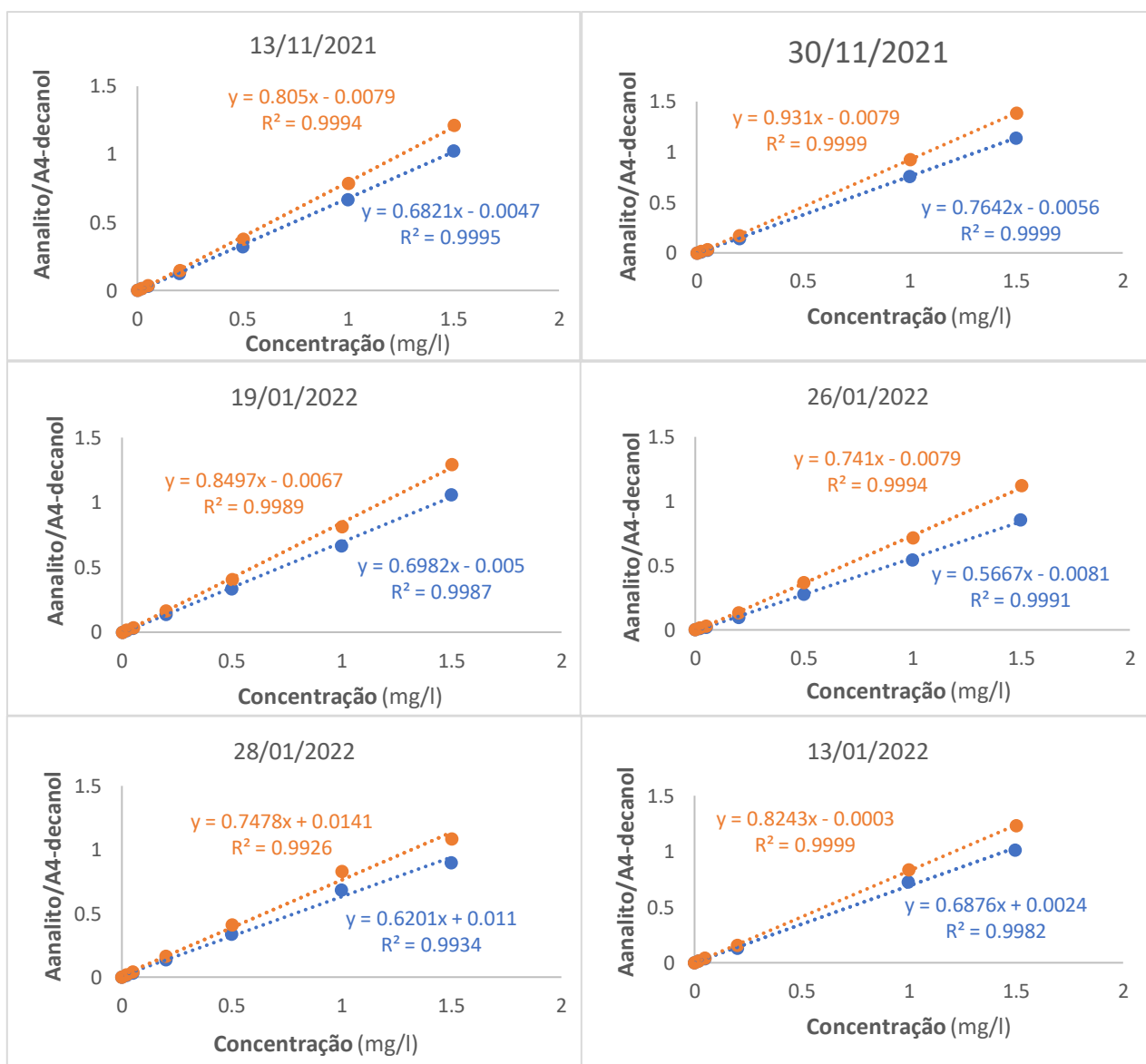
Tabela 6.5: Incertezas para o cálculo da concentração da solução padrão de calibração.

	$u_{c \text{ expandida}}$	u_{vmi}	u_v	u_c
4-EG	0,489	0,030	0,048	$1,501 \pm 0,073$
4-EF	0,530	0,030	0,048	$1,501 \pm 0,080$

6.3. Curvas de calibração

6.3.1. Representação gráfica

As curvas de calibração realizadas ao longo da validação do método da determinação dos fenóis voláteis encontram-se representadas na **Figura 6.4**.



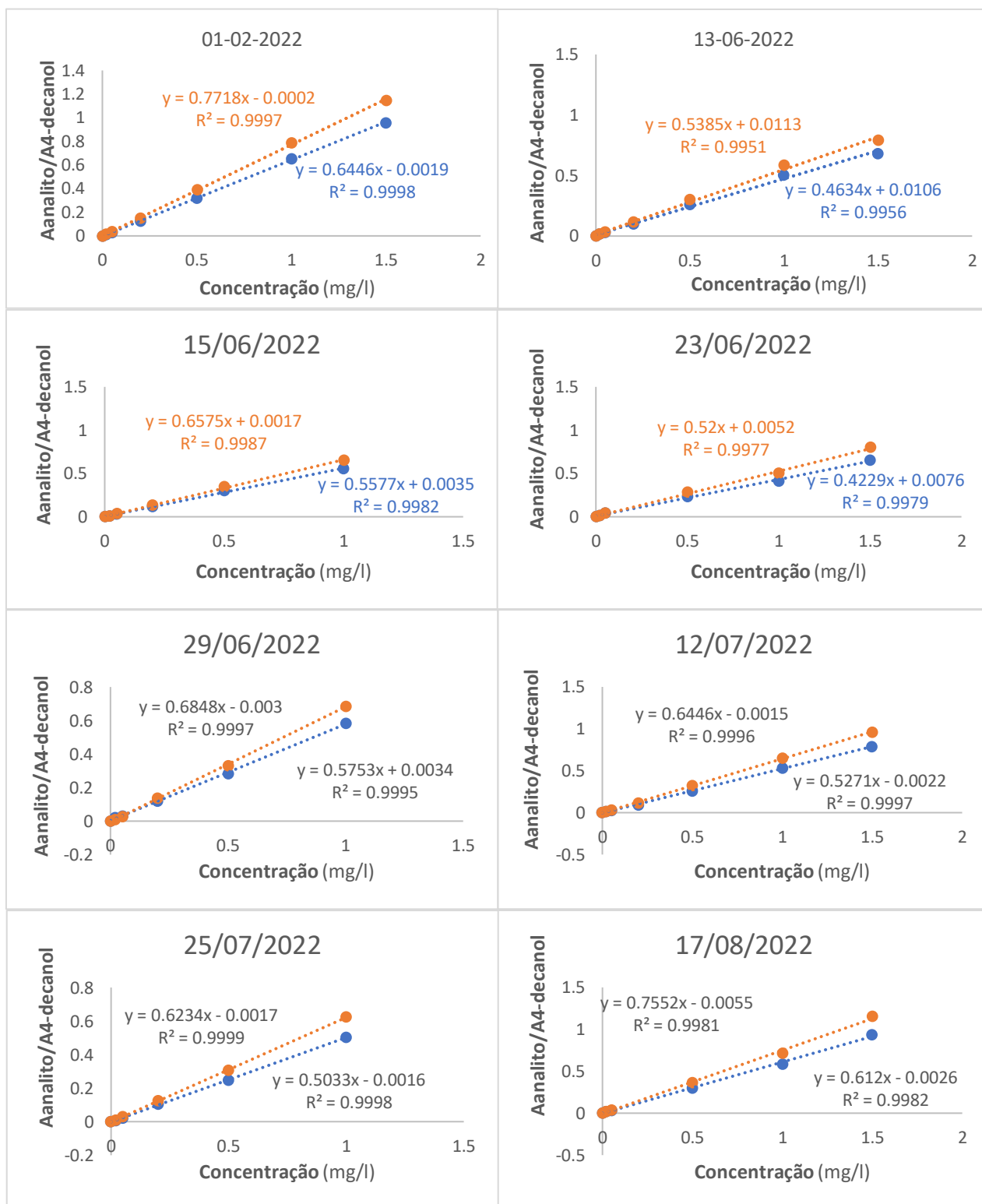


Figura 6.4: Curvas de calibração do 4-EG (azul) e 4-EF (laranja) realizadas aquando da análise de amostras.

6.3.2. Cálculo das incertezas associadas aos declives e ordenadas na origem

Para calcular as incertezas associadas ao declive (S_a) e ordenada na origem (S_b) recorreu-se às Equações 6.15, 6.16 e 6.17.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad 6.15$$

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad 6.16$$

$$S_b = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad 6.17$$

Tabela 6.6: Valores auxiliares e respetivas incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem para $n=7$, realizada no dia 17/01/2022.

	$\sum_i x_i^2$	$\sum (x_i - \bar{x})^2$	$\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{-}$	$S_{y/x}$	S_a	$S_b \text{ (mg/l)}^{-1}$
4-EG	3,534	1,3344	0,000465	0,0096	$8,344 \times 10^{-3}$	$5,929 \times 10^{-3}$
4-EF	3,548	1,3451	0,00067	0,0116	$1,001 \times 10^{-2}$	$7,126 \times 10^{-3}$

6.4. Limite de Quantificação

6.4.1. Determinação da concentração adicionada no ensaio de recuperação

A concentração do 4-EG adicionada ([4-EG] adicionada), em mg/l, em cada um dos ensaios de recuperação realizados foi determinado considerando a concentração da solução de trabalho, que equivale a $9,99 \pm 0,244$ mg/l, o volume da solução de trabalho adicionado e o volume final de solução em cada ensaio (Equação 6.18).

$$[4 - EG]_{adicionada} = \frac{C_{solução\ trabalho} \times V_{adição\ trabalho}}{V_{balão}} = \frac{9,99 \times 0,1}{50} = 0,020 \text{ mg/l} \quad 6.18$$

O cálculo da concentração do 4-EF adicionada ([4-EF] adicionada), em mg/l, foi realizado da mesma forma.

6.4.2. Determinação da taxa de recuperação

A taxa de recuperação, R, obtida em cada ensaio de recuperação foi calculada como descrito na **Equação 6.19**

$$R = \frac{[4-EG]_{fortificada} - [4-EG]_{amostra}}{[4-EG]_{adicionada}} \times 100 = \frac{0,023 - 0,005}{0,020} = 90\% \quad \mathbf{6.19}$$

6.5. Gama de trabalho

6.5.1. Teste F de Snedecor Fisher

Para avaliar se a gama de trabalho se encontrava bem ajustada, avaliou-se a homogeneidade das variâncias ao longo da mesma e, para tal, aplicou-se o teste F de Snedecor-Fisher. Neste caso, o valor de F para o 4-EG foi obtido, tendo em consideração a **Equação 6.20**.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{2,694 \times 10^{-5}}{3,013 \times 10^{-6}} = 8,942 \quad \mathbf{6.20}$$

O valor de F para o 4-EF foi calculado, considerando a **Equação 6.21**.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{2,428 \times 10^{-5}}{1,303 \times 10^{-6}} = 18,63 \quad \mathbf{6.21}$$

6.6. Sensibilidade

6.6.1. Coeficiente de variação

As sensibilidades dos métodos analíticos foram avaliadas através da determinação dos CVs (**Equação 6.22 e 6.23**).

$$CV(4-EG) = \frac{0,046}{0,651} \times 100 = 7,1\% \quad \mathbf{6.22}$$

$$CV(4-EF) = \frac{0,040}{0,788} \times 100 = 5,1\% \quad \mathbf{6.23}$$

6.7. Justeza

6.7.1. Determinação do Z-score

Para avaliar o desempenho do laboratório na participação de ensaios interlaboratoriais, procedeu-se à determinação do *Z-score* em cada um dos ensaios realizados. O *Z-score* para o 4-EG foi calculado através da **Equação 24**, sabendo que o desvio padrão do ensaio foi de 9,0 mg/l, o valor médio de concentração de 4-EG na amostra foi de 0,061 mg/l e conhecendo o valor de referência de concentração de 4-EG na amostra de 0,049 mg/l.

$$Z = \frac{\bar{x} - X_{ref}}{s} = \frac{0,061 - 0,049}{9} = 1,33 \quad \mathbf{6.24}$$

Para o 4-EF, o desvio padrão do ensaio foi 54 mg/l, o valor médio de concentração de 4-EG na amostra foi 0,394 mg/l e o valor de referência de concentração de 4-EG na amostra foi de 0,353 mg/l (**Equação 25**).

$$Z = \frac{\bar{x} - X_{ref}}{s} = \frac{0,394 - 0,353}{54} = 0,76 \quad \mathbf{6.25}$$

6.7.2. Determinação do bias relativo

Para avaliar o desempenho do laboratório na participação de ensaios interlaboratoriais, procedeu-se também à determinação do *bias* relativo em cada um dos ensaios realizados.

O *bias* relativo para o 4-EG foi calculado como descrito na **Equação 6.26**, sabendo que, o valor médio de concentração de 4-EG na amostra foi de 0,061 mg/l e conhecendo o valor de referência de concentração de 4-EG na amostra foi de 0,049 mg/l.

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - X_{ref}}{X_{ref}} \times 100 = \frac{0,061 - 0,049}{0,049} \times 100 = 24 \% \quad \mathbf{6.26}$$

Para o 4-EF, o valor médio de concentração de 4-EG na amostra foi 0,394 mg/l e o valor de referência de concentração de 4-EG na amostra foi de 0,353 mg/l (**Equação 6.27**).

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - X_{ref}}{X_{ref}} \times 100 = \frac{0,394 - 0,353}{0,353} \times 100 = 12 \% \quad \mathbf{6.27}$$

6.8. Repetibilidade

6.8.1. 4-EF

Para intervalo de trabalho de concentração inferior a 0,500 mg/l, foi determinado o valor médio da concentração de analito, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade, como ilustrado na **Tabela 6.7**.

Tabela 6.7: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho baixa.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	C 4-EFexp (mg/l)	Sr (mg/l)	S2 (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,020	0,0663	0,00325	$6,00 \times 10^{-6}$
Vinho tinto maduro	0,020	0,0522	0,0018	$3,00 \times 10^{-6}$
Vinho tinto maduro	0,250	0,2875	0,0093	$8,60 \times 10^{-5}$
Vinho branco maduro	0,250	0,2648	0,0029	$9,00 \times 10^{-6}$

A partir destes valores, foram calculadas o respetivo CVr e o limite de repetibilidade apresentados na **Tabela 6.8**.

Tabela 6.8: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho baixa.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	CVr (%)	rr (mg/l)
Vinho tinto maduro	0,020	3,8	0,0071
Vinho tinto maduro	0,020	3,4	0,0050
Vinho branco maduro	0,250	1,1	0,0083
Média	-	2,8	0,0068

A partir da tabela é possível concluir que o \overline{CVr} é de 2,8 %, o que de acordo com o definido pelo laboratório (> 10 %) é considerado satisfatório. Para além disso, ainda se concluiu que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,0068 mg/l.

Para intervalo de trabalho de concentração intermédio: $0,500 \leq [4-EF] < 1,00$ mg/l, foi determinado o valor médio da concentração de analito, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade, como ilustrado na **Tabela 6.9**.

Tabela 6.9: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho intermédia.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	C- 4Fexp (mg/l)	Sr (mg/l)	S2 (mg/l)
Vinho branco verde	0,500	0,544	0,015	$2,39 \times 10^{-4}$
Vinho rosé	0,750	0,706	0,018	$3,37 \times 10^{-4}$

A partir destes valores, foram calculadas o respetivo CVr e o limite de repetibilidade apresentados na **Tabela 6.10**.

Tabela 6.10: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho intermédia.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	CV _r (%)	r _r (mg/l)
Vinho branco verde	0,500	2,8	0,043
Vinho rosé	0,750	2,6	0,051
Média	-	2,7	0,047

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CVr for inferior a 10 %, o que se verificou, uma vez que o \overline{CVr} é de 2,7 %. Concluiu-se, ainda, que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,047 mg/l.

Para intervalo de trabalho de concentração alta: $1,00 \leq [4-EF] < 1,50$ mg/l, foi determinado o valor médio da concentração de analito, o desvio padrão de repetibilidade e a variância de repetibilidade, como ilustrado na **Tabela 6.11**.

Tabela 6.11: Valores de concentração, desvio padrão de repetibilidade e variância obtidos em condições de repetibilidade do 4-EF para a gama de trabalho alta.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	C- 4Fexp (mg/l)	Sr (mg/l)	S2 (mg/l)
Vinho tinto maduro	1,50	1,593	0,042	$1,75 \times 10^{-3}$
Vinho branco maduro	1,25	1,249	0,045	$2,04 \times 10^{-3}$

A partir destes valores, foram calculadas o respetivo CVr e o limite de repetibilidade apresentados na **Tabela 6.12**.

Tabela 6.12: Coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) e do limite de repetibilidade (rr) para o 4-EF, na gama de trabalho alta.

Matriz	C 4-EFp (mg/l)	CV _r (%)	r _r (mg/l)
Vinho tinto maduro	1,50	2,6	0,18
Vinho branco maduro	1,25	3,6	0,13
Média	-	3,1	0,12

De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o CVr for inferior a 10 %, o que se verificou, uma vez que o (CVr)̄ é de 3,1%. Concluiu-se, ainda, que os valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 0,12 mg/l.

6.8.2. Teste de Cochran

A fim de determinar se alguma matriz necessitava de ser eliminada para calcular a repetibilidade do método, foi realizado um teste *Cochran*, que se baseia numa análise das variâncias calculadas para cada matriz utilizada no estudo da precisão. Os resultados obtidos são apresentados nas **Tabelas 6.13, 6.14 e 6.15**.

Tabela 6.13: Teste de Cochran para a gama de trabalho baixa.

	Nº de matrizes	Nº de ensaios	Maior S ²	C calculado	C tabelado	Avaliação
4-EG	2	7	0,000001	0,000	0,853	Valor aceite
4-EF	4	7	0,000009	0,865	0,869	Alerta

Tabela 6.14: Teste de Cochran para a gama de trabalho intermédia.

	Nº de matrizes	Nº de ensaios	Maior S ²	C calculado	C tabelado	Avaliação
4-EG	4	7	0,0002	0,541	0,860	Valor aceite
4-EF	2	7	0,00003	0,590	0,853	Valor aceite

Tabela 6.15: Teste de Cochran para a gama de trabalho alta.

	Nº de matrizes	Nº de ensaios	Maior S ²	C calculado	C tabelado	Avaliação
4-EG	2	7	0,002	0,558	0,853	Valor aceite
4-EF	2	7	0,002	0,538	0,853	Valor aceite

Tomando como exemplo a gama de trabalho alta, é apresentado o cálculo do C para o 4-EG através da **Equação 6.28**.

$$C = \frac{w_{max}^2}{\sum w_i^2} = \frac{0,0029}{(0,00229+0,00181)} = 0,558 \quad \mathbf{6.28}$$

Onde a variância máxima corresponde à matriz de vinho branco maduro.

6.8.3. Determinação do CV_r e r_r

O CV_r para o 4-EG foi calculado como descrito na **Equação 6.29**, considerando o valor médio de concentração de 4-EG, para a matriz de vinho branco maduro na gama alta, foi de 1,247 mg/l e que o S_r corresponde a 0,048 mg/l.

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,048}{1,247} \times 100 = 3,84 \% \quad \mathbf{6.29}$$

Admitindo a mesma matriz, o r_r foi calculado como indicado na **Equação 6.30**.

$$r_r = 2,8 \times S_r = 2,8 \times 0,048 = 0,134 \quad \mathbf{6.30}$$

Para o 4-EF, o valor médio de concentração de 4-EG, para a matriz de vinho branco maduro na gama alta, foi de 1,249 mg/l e o S_r corresponde a 0,045 mg/l (**Equação 6.31**).

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,045}{1,249} \times 100 = 3,6 \% \quad \mathbf{6.31}$$

Admitindo a mesma matriz, o r_r foi calculado como indicado na **Equação 6.32**.

$$r_r = 2,8 \times S_r = 2,8 \times 0,045 = 0,13 \quad \mathbf{6.32}$$

6.9. Precisão intermédia

A precisão intermédia foi estudada considerando três gamas de trabalho. Para o nível baixo, foram considerados os resultados da concentração de 4-EG de 6 amostras e 15 para o 4-EF, obtidos em duplicado, cujos valores se encontram apresentados na **Tabela 6.16**.

Tabela 6.16: Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia no nível de trabalho baixo.

	Matriz	C 4-EGp (mg/l)	C ₁ (mg/l)	C ₂ (mg/l)	(C ₁ - C ₂) ² (mg/l) ²
4-EG	Vinho tinto maduro	0,020	0,03596	0,03685	0,0000008
	Vinho tinto maduro	0,020	0,02128	0,02073	0,0000003
	Vinho tinto maduro	0,020	0,02498	0,02791	0,0000086
	Vinho tinto maduro	0,020	0,02936	0,03054	0,0000014
	Vinho tinto maduro	0,020	0,04000	0,03850	0,0000023
	Vinho tinto maduro	0,020	0,01894	0,01881	0,0000000
4-EF	Vinho branco maduro	0,250	0,26261	0,26327	0,0000000
	Vinho branco maduro	0,250	0,24538	0,25463	0,0000086
	Vinho branco maduro	0,250	0,29452	0,28854	0,0000036
	Vinho branco maduro	0,250	0,25490	0,24221	0,000161
	Vinho branco maduro	0,500	0,25784	0,26851	0,000114
	Vinho branco maduro	0,250	0,26798	0,28097	0,000169
	Vinho tinto maduro	0,020	0,06581	0,06709	0,000002
	Vinho tinto maduro	0,020	0,04316	0,04528	0,000005
	Vinho tinto maduro	0,020	0,04994	0,05438	0,000020
	Vinho tinto maduro	0,020	0,05359	0,05465	0,000001
	Vinho tinto maduro	0,020	0,04357	0,04692	0,000011
	Vinho tinto maduro	0,020	0,05920	0,06005	0,000001
	Vinho tinto maduro	0,250	0,28372	0,27991	0,000014
	Vinho tinto maduro	0,250	0,29288	0,30822	0,00231
	Vinho tinto maduro	0,250	0,18963	0,20374	0,000199

A partir dos resultados apresentados na tabela x, determinou-se o S_I, para o 4-EG, de acordo com a **Equação 6.33**.

$$S_I = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 6} \times 0,0000134} = 0,0011 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.33}$$

Para o 4-EF, o S_I foi calculado através da **Equação 6.34**.

$$S_I = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 15} \times 0,00150} = 0,0059 \text{ mg/l} \quad \mathbf{6.34}$$

6.9.1. Determinação do CV_I e r_I

O CV_I para o 4-EG foi calculado como descrito na **Equação 6.35**, considerando que o valor médio de concentração de 4-EG, para o vinho tinto na gama baixa, foi de 0,0286 mg/l e o S_r corresponde a 0,0011 mg/l.

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,0011}{0,0286} \times 100 = 3,7 \% \quad \mathbf{6.35}$$

Já para o caso do 4-EF, sabe-se que o valor médio de concentração de 4-EG, para o vinho branco maduro e vinho tinto na gama baixa foi de 0,0179 mg/l e sabendo que o S_r corresponde a 0,0059 mg/l. (Equação 6.36).

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,0059}{0,0179} \times 100 = 3,3 \% \quad \mathbf{6.36}$$

6.10. Incerteza do método

Apresenta-se, a título de exemplo, a estimativa da incerteza associada ao 4-EG da gama de concentração baixa.

6.10.1. Incerteza associada à componente da precisão

A u (precisão) relativa foi estimada através do CV, determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 3,7 %.

6.10.2. Incerteza associada à componente da justeza

Para se estimar a u (justeza) relativa, determinou-se, em primeiro lugar, o bias relativo como descrito nas Equações 6.37 e 6.38.

$$\text{bias relativo (\%)} = \frac{|[x_{\text{observado}}] - [x_{\text{teórico}}]|}{[x_{\text{teórico}}]} \times 100 = \frac{0,036 - 0,037}{[0,037]} \times 100 = 2,26 \% \quad \mathbf{6.37}$$

$$\text{bias relativo (\%)} = \frac{|[x_{\text{observado}}] - [x_{\text{teórico}}]|}{[x_{\text{teórico}}]} \times 100 = \frac{0,031 - 0,032}{[0,032]} \times 100 = 3,12 \% \quad \mathbf{6.38}$$

Foi determinado o valor quadrático médio dos desvios dos ensaios de recuperação, através da Equações 6.39.

$$b_{rms} = \sqrt{\frac{\sum bi^2}{n}} = \sqrt{\frac{14,9}{2}} = 2,73 \% \quad \mathbf{6.39}$$

Onde, bi corresponde ao desvio relativamente à recuperação e n ao número de ensaios de recuperação efetuados.

Para determinar a u (add) relativa, considerou-se a concentração de 4-EG adicionada, C_{add} , assim como a u_{add} . O cálculo está apresentado na Equação 6.40 e 6.41.

$$u_{(add) relativa} = \frac{u_{add}}{C_{add}} \times 100 = \frac{0,120}{9,9898} \times 100 = 1,20 \% \quad \mathbf{6.40}$$

$$u_{(add) relativa} = \frac{u_{add}}{C_{add}} \times 100 = \frac{0,120}{9,9898} \times 100 = 1,20 \% \quad \mathbf{6.41}$$

Para determinar a $u(\text{Vol})$ relativa de acordo com a **Equação 6.42**, considerou-se a u_{Vol} que foi de 0,00007 ml, tendo por base o volume da micropipeta e o V_{add} que equivaleu a 0,100 ml.

$$u_{(vol) relativa} = \frac{u_{vol}}{Vol} \times 100 = \frac{0,00007}{0,100} \times 100 = 0,070 \% \quad \mathbf{6.42}$$

Para determinar a $u(\text{recuperação},c)$ relativo, combinou-se a $u(\text{add})$ relativa com a $u(\text{Vol})$ relativa dado que estas se apresentam nas mesmas unidades. (**Equação 6.43**)

$$u_{(recuperação) relativa} = \sqrt{(u_{(add) relativa})^2 + (u_{(vol) relativa})^2} = \sqrt{(1,20)^2 + (0,070)^2} = 1,20 \% \quad \mathbf{6.43}$$

Calculou-se a $u(\text{justeza})$ relativa combinando o *bias* relativo com a $u(\text{recuperação},c)$ relativo. (**Equação 44**)

$$u_{(justeza) relativa} = \sqrt{(bias\ relativo)^2 + (u_{(recuperação) relativa})^2} = \sqrt{(2,73)^2 + (1,20)^2} = 2,98 \% \quad \mathbf{6.44}$$

6.10.3. Incerteza combinada e expandida

Calculou-se a $u_C(y)$ do 4-EG do nível de trabalho baixo, combinando a $u(\text{precisão})$ relativa com a $u(\text{justeza})$ relativa através da **Equação 6.45 e 6.46**.

$$u_C(y) = \sqrt{(u_{(precisão) relativa})^2 + (u_{(justeza) relativa})^2} = \sqrt{(3,69)^2 + (2,98)^2} = 4,71 \% \quad \mathbf{6.45}$$

$$u(x) = k \times u_c = 2 \times 4,71 = 9,4 \% \quad \mathbf{6.46}$$