

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica**



ESPECTROMETRIA DE MASSA DE RAZÕES ISOTÓPICAS

Ana Isabel Amaral Janeiro Viegas Ferreira

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA

Especialidade em Química Analítica

2008

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica**



ESPECTROMETRIA DE MASSA DE RAZÕES ISOTÓPICAS

Ana Isabel Amaral Janeiro Viegas Ferreira

Tese orientada pelos

Doutor Adriano Júlio Rodrigues Teixeira

e

Professora Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio

DOUTORAMENTO EM QUÍMICA

Especialidade em Química Analítica

2008

**Ao meu pai,
À minha mãe,
À minha filha
e
Ao meu marido.**

Agradecimentos

Correndo o risco de usar um estereótipo, a verdade é que a concretização deste trabalho se deve à contribuição de várias pessoas e entidades a quem quero manifestar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pela força e coragem que me deu durante a execução deste trabalho.

Em segundo lugar quero agradecer aos meus pais que tornaram possível a minha formação académica sem a qual não poderia ter chegado à realização desta dissertação.

Agradeço à Directora do Departamento de Tecnologias de Indústrias Químicas (DTIQ) do INETI, Doutora Maria João Marcelo Curto, o apoio permanente para que este trabalho chegasse a bom termo salientando a sua disponibilidade para ler e comentar esta tese.

É na qualidade de orientanda que quero expressar o meu agradecimento ao Director do Laboratório de Química Orgânica Analítica e de Síntese (LAQAS), Doutor Adriano Teixeira, pela orientação deste trabalho, pelas críticas e pelas proveitosas e sábias sugestões e discussões científicas durante a correcção da tese.

À Professora Doutora Maria Helena Florêncio da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, do Departamento de Química e Bioquímica, orientadora desta tese, agradeço profundamente o seu espírito prático e o incentivo permanente para eu a finalizar; agradeço a rapidez com que fazia as correcções tendo tido um papel chave em todo este processo. Obrigada pela confiança que depositou em mim.

Ao meu marido quero agradecer o carinho, o estímulo permanente, a paciência e a ajuda incondicional ao longo destes anos e principalmente na fase de escrita. Ensinou-me muito sobre \LaTeX e foi incansável. Não me deu qualquer hipótese de desanimar! Obrigada por tudo, Luís.

À minha filha Catarina quero dizer-lhe que foi uma grande Mulher na forma como lidou com a minha ausência e no apoio e amor para a sua mãe (como eu poderia esperar).

Obrigada filha. És maravilhosa.

À minha grande amiga Paula Marques que sempre esteve ao meu lado sem arredar pé. Obrigada por tudo.

À Carla pelas nossas “discussões incertas” nos momentos em que só nós existíamos para trocar ideias. Foi um prazer trabalhar contigo e conhecer-te. Estávamos no mesmo barco.

Ao Eng^o Paul Hanson da Tecnomass não encontro palavras para lhe agradecer os infinitos telefonemas que atendeu e as visitas que fez para resolver problemas relacionados com as diferentes técnicas hifenadas com o IRMS.

Quero agradecer à Lina Santos a sua preciosa ajuda na utilização da folha de cálculo.

Aos meus colegas e amigos do Núcleo de Espectrometria de Massa do LAQAS Luís Ramalho, Bruno Henriques e Júlio Nunes. Ao primeiro quero agradecer a ajuda e a disponibilidade permanente, para discutir sobre problemas que surgiam ou apenas, para discussões científicas. Ao segundo o apoio nas determinações das razões isotópicas. Aos três pelo momentos de boa disposição e camaradagem no Núcleo.

Às minhas amigas Mafalda Costa, Fátima Justino, Leonor, Fernanda Mendes, Paula Passarinho, Cristina Oliveira, Aida Martins, Filomena Costa e Teresa Nogueira estou muito grata pelo seu carinho, amizade e apoio em todos os dias, durante muito tempo.

À Ester Lima e à Isabel Passos que em todos os finais de dia diziam “...Está quase Ana, vá força, já falta pouco...”

Quero agradecer aos meus amigos a trabalhar na Comissão Europeia que me deram a mão sempre que eu pedi ajuda sem pedirem nada em troca nomeadamente a Doutora Francesca Serra, o Doutor Giovanni Calderone e o Doutor Claude Guillou investigadores no Joint Research Center (ISPRA), ao Doutor Aleksander Kubiak a trabalhar no Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM.

Ao Doutor Thomas Linsinger também do IRMM, pela troca de opiniões acerca de alguns cálculos estatísticos.

Ao João Almeida, colega de uma luta comum, pela amizade e ânimo.

Às colegas e amigas do DTIQ, Florência, Sandra Lucas, Patrícia, Susana Ramos, Irene Coelho, Augusta Medeiros, Anabela Cachudo, Ana Pica, Fernanda Alvarrão, Maria João Brites, Alexandra Esteves, Margarida Guerreiro, Isabel Lima, Cristina Moiteiro e Paula Branco pela boa disposição e alegria fazendo muitas vezes esquecer todos os problemas inerentes a este tipo de trabalho (a ordem é puramente arbitrária).

Ao Américo Martins e ao Nuno Castilho pelo apoio informático.

Desejo agradecer ainda ao Doutor Rui Bessa, ao Ricardo Bettencourt e ao Doutor Paulo Alves a ajuda nalguns pontos de carácter mais específico.

À Doutora Eduarda Filipe (mesmo sem me conhecer) e ao Doutor Leopoldo Cortez ambos do IPQ, pela amabilidade na troca de ideias sobre termos estatísticos.

À Comunidade Europeia que financiou o projecto para o desenvolvimento do presente trabalho.

Espero não me ter esquecido de ninguém!

E eu? Afinal, onde é que eu entro?...

Resumo

As técnicas isotópicas são metodologias muito poderosas usadas na detecção da adulteração de géneros alimentícios. O acoplamento de cromatógrafos em fase gasosa (GC) a um espectrómetro de massa de razões isotópicas (IRMS), com uma interface de combustão (GC/C/IRMS) para determinação das razões isotópicas tais como $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ é relativamente recente e apresenta a vantagem de fornecer valores de razões isotópicas dos diferentes componentes de misturas complexas. Contudo, não existem ainda Materiais de Referência Certificados (MRC) que validem todo o sistema de GC/C/IRMS.

Com vista a reforçar a legislação comunitária existente, é essencial que os métodos isotópicos usados se baseiem em procedimentos experimentais bem definidos e cuidadosamente validados, que tornem possível a comparação directa e clara de resultados entre laboratórios da Comunidade e entre laboratórios de todo o mundo (rastreadibilidade dos resultados).

A finalidade do presente trabalho é demonstrar a exequibilidade de utilização de uma mistura do tipo Grob, *i.e.*, baseada na mistura de Grob (vulgarmente utilizada na verificação de colunas na técnica de GC) como material de referência para aplicação na técnica de GC/IRMS. Foram seleccionados onze compostos (alguns dos quais pertencentes à mistura de Grob) nomeadamente, 1-octanol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, nonanal, *N,N*,3,5-tetrametilanilina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo, 2-(metilamino)benzoato de metilo e vanilina. Numa primeira fase do trabalho que aqui se apresenta realizou-se o Ensaio Circular para determinação da razão isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ pela técnica hifenada análise elementar - espectrometria de massa de razões isotópicas, EA/IRMS, de todos os compostos puros e das amostras resultantes dos testes de homogeneidade e de estabilidade no curto prazo ou de degradação acelerada (resistência a choques térmicos e por irradiação com luz UV) e de estabilidade no longo prazo. Estes testes foram realizados segundo o guia Bureau Communautaire de Référence (BCR) para a produção de Materiais de Referência Certificados. Para comparação com a técnica de EA/IRMS determinaram-se as razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ nos compostos puros utilizando a técnica de GC/C/IRMS com duas colunas cromatográficas diferentes, uma polar e outra não

polar.

Numa segunda fase, os compostos puros e a mistura do tipo Grob seleccionada, constituída por sete compostos (1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, *N,N*,3,5-tetrametilanilina e 2-(metilamino)benzoato de metilo) foram submetidos a um Ensaio de Certificação Simulado (ECS) a fim de se obterem os valores de consenso e valores da exactidão e da precisão para a técnica de GC/C/IRMS.

No final, foi possível obter valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ (e não certificar, uma vez que se trata de um estudo de exequibilidade e não de certificação) para a certificação dos onze compostos puros, para a técnica de EA/IRMS.

E também valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ para a mistura constituída pelos sete compostos acima referidos e ainda para a vanilina pura, para a técnica de GC/IRMS.

Foi ainda possível avaliar o desempenho da técnica de GC/IRMS e compará-lo com a técnica de EA/IRMS, tomada como método de referência, e foram construídas Folhas de Dados Técnicos (“Technical Data Sheets”) que compilam os valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ com uma estimativa da sua incerteza e informação sobre o tamanho das unidades a serem produzidas, o transporte e as condições de armazenamento dos futuros candidatos a MRCs.

Este trabalho foi realizado ao abrigo de um projecto financiado pela Comunidade Europeia dentro do Programa “Competitive and Sustainable Growth”, do 5º Programa Quadro (1998-2002).

Abstract

Stable isotope analyses are powerful techniques for the detection of food adulteration. One of the most recent additions to this field, the GC/C/IRMS technique is becoming increasingly used as a tool for authentication. This measuring system that combines the separation power of gas-chromatography with an isotope ratio mass spectrometer (using a combustion interface), has the added advantage of directly providing isotope ratio determinations of components of a complex mixture. Nevertheless there are not yet any available Certified Reference Materials to validate the GC/C/IRMS system. This study was directed towards the investigation of suitable compounds to be used as stable isotope reference materials for gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) calibration. Eleven organic compounds were selected, including, from those used in the “Grob” mixture (a mixture with different polarities and functionalities used to test the performance of the GC columns) namely 1-octanol, 2,6-dimethylphenol, 2,6-dimethylaniline, dodecane, methyl decanoate, methyl dodecanoate, nonanal, *N,N,3,5*-tetramethylaniline, ethyl 4-(*N,N*-dimethylamino)benzoate, methyl 2-(methylamino)benzoate and vanillin. The latter is very important in the food authenticity domain.

All the compounds were individually assessed for homogeneity, short-term stability and long-term stability by means of EA/IRMS, as required by de Bureau Communautaire de Référence (BCR) Guide for Production of Certified Reference Materials.

The results were compared with the GC/C/IRMS measurements using both polar and non-polar columns, and the final mixture of seven selected compounds namely 1-octanol, 2,6-dimethylaniline, dodecane, methyl decanoate, methyl dodecanoate, *N,N,3,5*-tetramethylaniline and methyl 2-(methylamino)benzoate underwent a further Simulated Certification Exercise (SCE) in order to assess limits of accuracy and reproducibility for GC/C/IRMS technique. Overall, the results from this work have shown that it is feasible to obtain reference values for the eleven selected compounds for the EA/IRMS technique. Regarding the GC/IRMS measurements, it was shown that it is possible to obtain a mixture of compounds of known $\delta^{13}\text{C}$ values, coherent GC/IRMS results (deviations from EA values are within the precision of the GC/C/IRMS method) as well as for vanillin.

“Technical Data Sheets” have been drafted for each one of the eleven compounds and for the mixture and include the name of compound or compounds in the mixture, size of sample, procedure for mixing, proposed packaging and the target values for $\delta^{13}\text{C}$ to indicate for certification and a preliminary associated uncertainty. This work was carried out under a shared-cost RTD EU project financed under the Fifth Framework Programme of the European Community, within the “Competitive and Sustainable Growth Programme”, Measurements and Testing Activity (1998-2002).

Keywords: Isotope ratio mass spectrometry; Production of certified reference materials (CRMs); Stable isotopes; $\delta^{13}\text{C}$; EA/IRMS; GC/IRMS; Authenticity; Food and beverages.

Glossário

α Nível de significância (em estatística).

$\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$... É definida como a diferença relativa entre a razão de isótopos de um elemento para uma dada amostra e a razão de isótopos de um padrão internacional para o mesmo elemento. Exemplificado para o carbono e azoto.

μ Massa reduzida da espécie mais leve.

μ^* Massa reduzida da espécie mais pesada.

θ Temperatura em graus Celsius.

Abundância Natural A concentração média na natureza de um isótopo estável específico (e.g. no ar existe cerca de 0,366 % de azoto-15 e 99,634 % de azoto-14).

ADN Ácido DesoxirriboNucleico.

ANOVA Análise de Variância.

AOAC Association of Official Analytical Chemists (até 1965 como Association of Official Agricultural Chemists).

AQSE Agência para a Qualidade e Segurança Alimentar.

ASAE Autoridade de Segurança Alimentar e Económica.

ATP Adenosina trifosfato.

B Campo magnético.

BAM Federal Institute of Materials Research and Testing. Organismo da Alemanha para produção de materiais de referência.

BAS Bureau of Analyzed Samples. Organismo do Reino Unido para produção de materiais de referência.

BCR Bureau Communautaire de Référence.

BIPM Departamento Internacional de Pesos e Medidas (Bureau International des Poids et Mesures).

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$... Razão entre as abundâncias dos isótopos estáveis 13 e 12 do carbono e 15 e 14 do azoto...

CAC Comissão do Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission).

CCQM Comité Consultivo do BIPM (Consultative Committee for Amount of Substance).

CDT Canion Diablo Troilite, padrão para determinação da razão isotópica do enxofre, já esgotado e substituído pelo Vienna-CDT.

CE Electroforese Capilar (Capillary Electrophoresis).

CEE Comunidade Económica Europeia.

CEN Comité Europeu de Normalização.

CF-IRMS Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas de Fluxo Contínuo: sistemas “on-line” (Continuous Flow - Isotope Ratio Mass Spectrometry).

Chaptalização Processo de adição de açúcar ao mosto, antes da fermentação, para aumento do teor alcoólico.

CITAC Cooperação na rastreabilidade internacional em química analítica (Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry).

COMAR Base de dados de Materiais de Referência (Code d'Indexation des Matériaux de Référence).

CQ Controlo da Qualidade.

CV Coeficiente de variação.

CV_{-80 °C} Coeficiente de variação à temperatura -80 °C (teste de estabilidade no longo prazo).

CV_{inter} Coeficiente de variação interunidades.

CV_{intra} Coeficiente de variação intra-unidades.

CV_θ Coeficiente de variação à temperatura θ (teste de estabilidade no longo prazo).

Deriva Variação lenta de uma característica metrológica de um instrumento de medição,¹ (do inglês “drift”).

DI Diâmetro interno.

Diluição Adição de água ao vinho.

DOP Denominação de Origem Protegida.

Dupla entrada Sistema de IRMS de dupla entrada (“off-line”) uma para a amostra e outra para a referência (do inglês “dual-Inlet”)

E Energia de activação para a espécie mais leve.

E* Energia de activação para a espécie mais pesada.

EA Analisador Elementar (Elemental Analyzer).

EA Cooperação Europeia para a Acreditação (European co-operation for Accreditation).

EA/IRMS Análise Elementar hifenada com Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (Elemental Analyzer - Isotope Ratio Mass Spectrometry).

EC Comunidade Europeia (European Community) ou Comissão Europeia (European Commission)

ECE Comissão Económica para a Europa (Economic Commission for Europe).

ECS Exercício de Certificação Simulado.

EFSA Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority).

EI Ionização electrónica.

Ensaio Circular Designa um ensaio interlaboratorial com o objectivo de demonstrar a precisão de um procedimento global a fim de se estabelecer um planeamento experimental definitivo.² Contudo este termo pode também ser usado em estudos interlaboratoriais para a certificação de materiais³(do inglês “ring test”).

Ensaio de Proficiência Métodos para verificar o desempenho de um laboratório através de testes interlaboratoriais.

ESF Filtro Electroestático (Electrostatic Filter).

ETG Especialidade Tradicional Garantida.

EURACHEM Rede de organizações da União Europeia com o objectivo de estabelecer um sistema para a rastreabilidade internacional de medições químicas e a promoção de boas práticas.

EUROMET Associação Europeia dos Institutos de Metrologia Nacionais (European Association of National Metrology Institutes).

FAO Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

F_{calc} Valor de F calculado (teste F).

F_{crit} Valor de F crítico (teste F).

FID Detector de Ionização de Chama (Flame Ionization Detector).

FIT-PTS Ensaios de proficiência a nível europeu específicos para as técnicas isotópicas (Food Analysis using Isotopic Techniques-Proficiency Testing Scheme).

Fracionamento isotópico Enriquecimento ou empobrecimento de um isótopo estável originado por processos naturais ou artificiais, *e.g.*, as diferentes vias de fotossíntese que ocorrem nas plantas podem fraccionar o carbono-13.

FTIR Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared).

g.l. Graus de liberdade.

GC Cromatografia em fase gasosa (Gas Chromatography).

GC-FID Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (Gas Chromatography/Flame Ionization detector).

GC/C/IRMS Cromatografia em fase gasosa hifenada com Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas por interface de Combustão (Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry).

GC/IRMS Cromatografia em fase gasosa hifenada a Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (Gas Chromatography/Isotope Ratio Mass Spectrometry).

GC/MS Cromatografia em fase gasosa hifenada a Espectrometria de Massa (Gas Chromatography/Mass Spectrometry).

GC/P/IRMS Cromatografia em fase gasosa hifenada a Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas por interface de Pirólise (Gas Chromatography/Pyrolysis/Isotope Ratio Mass Spectrometry).

GISP Camada de gelo da precipitação na Gronelândia. Padrão de água obtido por intercomparação, para análise de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$. (Greenland Ice Sheet Precipitation).

GQ Garantia da Qualidade.

GUM Guia para exprimir a Incerteza da Medição (Guide to the expression of Uncertainty in Measurement).

GV Instruments Empresa inglesa especializada no fabrico de Espectrómetros de Massa, incluindo IRMS (ex-Micromass).

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography).

HS Válvula “Heart split”.

IAEA Agência Internacional de Energia Atômica (International Atomic Energy Agency).

IC Intervalo de confiança.

ICP/MS Espectrometria de Massa com plasma de acoplamento induzido (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry).

IGP Indicação Geográfica Protegida.

ILAC Cooperação Internacional para a Acreditação de Laboratórios (International Laboratory Accreditation Cooperation).

INETI Instituto Nacional de Engenharia Tecnologia e Inovação, I.P..

interLab Interlaboratórios.

intraLab Intralaboratórios.

IR Espectroscopia de Infravermelho (Infrared Spectroscopy).

IRMM Institute for Reference Materials and Measurements.

IRMS Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas (Isotope Ratio Mass Spectrometry).

ISO Organização Internacional de Normalização (International Organization for Standardization).

ISO-REMCO Organização Internacional de Normalização - Comité do Conselho para os Materiais de Referência (ISO-Council Committee on Reference Materials).

Isótopo estável Isótopo não radioactivo no qual o número de protões e de neutrões no núcleo atómico é constante ao longo do tempo.

Isótopos Podem ser definidos como átomos de um mesmo elemento possuindo o mesmo número atómico mas número de massa diferente.

IT Intervalo de tolerância.

IUPAC União Internacional para a Química Pura e Aplicada (International Union for Pure and Applied Chemistry).

JRC Joint Research Center. Centro de investigação da Comissão Europeia em Ispra, Itália.

k Constante de velocidade de reacção para a espécie mais leve.

k* Constante de velocidade de reacção para a espécie mais pesada.

kV Quilovolt.

Lab Laboratório.

LAQAS Laboratório de Química Orgânica Analítica e de Síntese.

m Massa.

MQ Média de Quadrados (tabelas ANOVA).

MQ_D Média de Quadrados dentro dos grupos (tabelas ANOVA).

MQ_E Média de Quadrados entre grupos (tabelas ANOVA).

MQ_r Média de Quadrados da variação residual (tabelas ANOVA).

MR Material de referência.

M_r Massa molecular relativa.

MRC Material de referência certificado.

MRL Material de referência de laboratório.

MS Espectrometria de Massa (Mass Spectrometry).

MTBE Éter *tert*-butílico e metílico (Methyl *tert*-butyl ether).

m/z Razão massa/carga iônica.

n.c. Nível de confiança.

NADP Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida.

NBS National Bureau of Standards (o actual NIST).

NDIR Espectroscopia de Infravermelho Não Dispersiva (Nondispersive Infrared Spectroscopy).

NIR Espectroscopia de Infravermelho Próximo (Near Infrared).

NIST National Institute of Standards and Technology.

NMR Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance).

OECD Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Económica (Organization for Economic Co-operation and Development).

OIV Organização Internacional da Vinha e do Vinho (Organisation (ex-Office) International de la Vigne et du Vin).

PAHs Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons).

PCR Reacção em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction).

PDB Padrão de referência internacional já esgotado e substituído pelo Vienna-PDB, para a determinação da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (Pee Dee Belemnite).

Penning Sensor que fornece medidas de pressão de alto vácuo.

PEP Fosfoenolpiruvato (Phosphoenolpyruvate).

Percentagem de átomos (% átomos) O número absoluto de átomos de um dado isótopo de um elemento em 100 átomos do total. *E.g.*, o teor de azoto-15 no ar é de 0,3663 % de átomos. Pode calcular-se da seguinte forma, $\text{At \%} = [R_s / (R_s + 1) * 100]$ onde R_s é a razão do isótopo leve relativamente ao isótopo mais pesado numa amostra.⁴

Pirani Sensor que fornece medidas de pressão de vácuo mas pressões mais altas que as medidas pelo Penning.

Plantas do tipo CAM Plantas cuja via de fotossíntese segue a do Metabolismo Ácido das Crassuláceas (Crassulacean Acid Metabolism).

Plantas do tipo C_3 Plantas cuja via de fotossíntese segue o ciclo de Calvin.

Plantas do tipo C_4 Plantas cuja via de fotossíntese segue o ciclo de Hatch-Slack.

POPs Poluentes Orgânicos Persistentes (Persistent Organic Pollutants).

PTR-MS Espectrometria de Massa de Reacção de Transferência de Protão (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry).

r Limite de repetibilidade ou apenas repetibilidade.

r Raio.

R Constante dos gases perfeitos.

R Limite de reprodutibilidade ou apenas reprodutibilidade.

Razão isotópica A razão entre o isótopo menos abundante e o mais abundante para um dado elemento (*e.g.*, o azoto presente no ar contém 0,3663 % de átomos do isótopo ^{15}N e 99,6337 % de átomos do isótopo ^{14}N , o que dá uma razão isotópica de $0,3663/99,6337 = 0,003676466$).⁴

REMPA Comissão de trabalho da ISO dedicada ao desenvolvimento de materiais de referência (Working Party of Reference Materials).

R_r Razão isotópica entre o isótopo estável mais pesado e o isótopo estável mais leve para a referência.

R_s Razão isotópica entre o isótopo estável mais pesado e o isótopo estável mais leve para a amostra.

R_θ Razão entre os valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ às temperaturas de θ e $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura da amostra de referência) no teste de estabilidade no longo prazo.

RuBisCO Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase.

RuBP Ribulose-1,5-bifosfato.

s Desvio padrão.

SCE Simulated Certification Exercise.

s_{exp} Desvio padrão experimental da média.

SI Sistema Internacional de unidades.

s_{inter} Desvio padrão interlaboratórios.

s_{intra} Desvio padrão intralaboratórios.

s_L^2 Variância interlaboratórios.

SLAP Padrão da precipitação leve da Antártida para a determinação das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Standard Light Antarctic Precipitation).

SMOW Padrão da Água Média do Oceano. Padrão de referência internacional para a determinação das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$, substituído pelo Vienna-SMOW (Standard Mean Ocean Water).

SNIF-NMR Fracionamento Isotópico Natural Específico - Ressonância Magnética Nuclear (Site-specific Natural Isotope Fractionation - Nuclear Magnetic Resonance).

SQ Soma de Quadrados.

SQ_D Soma de Quadrados dentro dos grupos (tabelas ANOVA).

SQ_E Soma de Quadrados entre grupos (tabelas ANOVA).

SQ_r Soma de Quadrados residual (tabelas ANOVA).

SQ_T Soma de Quadrados total (tabelas ANOVA).

s_r Desvio padrão da repetibilidade.

s_R^2 Variância da reprodutibilidade.

s_r^2 Variância da repetibilidade.

T Temperatura absoluta.

t_{calc} Valor de t calculado (teste t -student).

TCD Detector de condutividade térmica (Thermal Conductivity Detector).

t_{crit} Valor de t crítico (teste t -student).

t_R Tempo de retenção (em cromatografia).

U Estimativa da incerteza expandida.

u_c Estimativa da incerteza combinada.

U_{CV} Estimativa da incerteza associada ao coeficiente de variação.

$U_{CVinter}$ Estimativa da incerteza associada ao coeficiente de variação interunidades.

$U_{CVintra}$ Estimativa da incerteza associada ao coeficiente de variação intra-unidades.

UE União Europeia.

UPS Unidade de alimentação ininterrupta (Uninterrupted Power Supply).

U_{R_θ} Estimativa da incerteza associada a R_θ .

USGS United States Geological Survey.

UV Ultravioleta.

V Potencial.

V-CDT Vienna-Canion Diablo Troilite (ver CDT).

V-PDB Vienna - Pee Dee Belemnite (ver PDB).

V-SMOW Vienna- Standard Mean Ocean Water (ver SMOW).

VIM Vocabulário Internacional de Metrologia.

VOCs Compostos Orgânicos Voláteis (Volatile Organic Compounds).

WHO Organização Mundial de Saúde (World Health Organization).

\hat{X} Valor alvo (avaliação de resultados interlaboratoriais).

z Carga iónica.

z-score Valores de avaliação de resultados interlaboratoriais.

Conteúdo

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xi
Glossário	xiii
Índice de Figuras	xxix
Índice de Tabelas	xxxvi
1 Introdução	1
1.1 Motivação e Contexto	1
1.2 Objectivos	2
1.3 As Contribuições desta Tese	3
1.4 Estrutura da Tese	4
2 Isótopos Estáveis	5
2.1 Fraccionamento Isotópico	7
2.1.1 Efeitos Isotópicos Físicos	8
2.1.2 Efeitos Isotópicos Químicos	8
2.1.2.1 Efeito Isotópico Termodinâmico (ou de Equilíbrio)	8
2.1.2.2 Efeitos Isotópicos Cinéticos	9

2.1.2.3	Outros Efeitos Isotópicos	10
2.2	O Carbono e a Origem Botânica	11
2.3	Oxigénio e Deutério e a Origem Geográfica	18
2.4	Azoto e a sua Variabilidade na Natureza	27
2.4.1	Processos de Fraccionamento Isotópico do Azoto	29
3	Estado da Arte/Técnicas Isotópicas	31
3.1	Técnicas Analíticas para a Determinação das Razões de Isótopos Estáveis .	32
3.1.1	Isotopólogos ou Isotopómeros?	32
3.1.2	A Espectrometria de Massa IRMS	33
3.1.3	Espectrómetros de Massa de Razões Isotópicas	35
3.1.4	Técnicas Hifenadas com IRMS	39
3.1.4.1	EA/IRMS	39
3.1.4.2	GC/IRMS	42
3.1.4.3	Método de Equilíbrio com CO ₂ . Análise de $\delta^{18}\text{O}$	44
3.2	Correcção de Iões com a Mesma Massa na Determinação de CO ₂ (Correcção de Craig)	46
3.3	Razão Isotópica. A Notação δ	47
3.4	Normalização das Medidas Isotópicas	48
3.5	Aplicações da Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas	49
3.5.1	Autenticidade de Géneros Alimentícios	49
3.5.2	Hidrologia e Meteorologia	51
3.5.3	Geologia e Paleoclimatologia	51
3.5.4	Ecologia	52
3.5.5	Outras Áreas	53
3.6	Outras Técnicas para a Determinação da Autenticidade	54
3.7	A Autenticidade Alimentar no Contexto Sócio-Político Internacional	56
3.7.1	Autenticidade de Géneros Alimentícios	57
3.7.2	Normas Para Géneros Alimentícios	58

3.7.3	Legislação da União Europeia	59
3.7.4	Em Portugal	60
3.8	Garantia e Controlo da Qualidade	61
3.8.1	Controlo da Qualidade	62
3.8.1.1	CQ Externo	62
3.8.1.2	CQ Interno	62
3.9	Cálculo das Incertezas	62
4	Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC)	65
4.1	Introdução	65
4.2	O início...	67
4.3	O que é um MR(C)?	68
4.4	Normas Internacionais e Definições	69
4.4.1	Definições	71
4.5	MR(C) para quê?	72
4.6	Princípios Gerais de Produção de Materiais de Referência	73
4.7	MR para Isótopos Estáveis	74
4.7.1	Materiais de Referência Primários	76
4.7.1.1	SMOW (Standard Mean Ocean Water)	76
4.7.1.2	PDB (Pee Dee Belemnite)	77
4.7.1.3	N ₂ Atmosférico	77
4.7.1.4	CDT (Canyon Diablo Troilite)	77
4.7.2	Materiais de calibração	78
4.7.2.1	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)	78
4.7.2.2	SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation)	78
4.7.2.3	NBS-19 (Calcite)	79
4.7.2.4	IAEA-S-1 e IAEA-S-2 (Sulfureto de prata)	79
4.7.3	Materiais de intercomparação	79
4.8	Importância de MRC para GC/IRMS	81

5	Metodologias Analíticas	83
5.1	Determinações de $\delta^{13}\text{C}$ por IRMS	83
5.1.1	Equipamentos Utilizados	83
5.1.2	Verificação do IRMS	85
5.1.3	Medição de $\delta^{13}\text{C}$ por EA/IRMS	87
5.1.4	Medições de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/C/IRMS	92
5.1.5	Operações de Manutenção do Analisador Elementar	95
5.2	Garantia da Qualidade	95
5.2.1	Análise dos Pontos Críticos dos Processos	95
5.2.1.1	Bom Estado de Operacionalidade do IRMS	99
5.2.1.2	EA/IRMS	99
5.2.1.3	Método GC/IRMS	100
5.2.2	Controlo da Qualidade	101
5.3	Análise Estatística	104
5.4	Cálculo das Estimativas das Incertezas	104
5.5	Protocolo Experimental dos Testes de Homogeneidade e de Estabilidade e do Ensaio de Certificação Simulado	105
5.5.1	Teste de Homogeneidade	105
5.5.2	Teste de Estabilidade	105
5.5.2.1	Estabilidade no longo prazo	106
5.5.2.2	Resistência a choques térmicos	106
5.5.2.3	Irradiação com luz UV	106
5.6	Ensaio de Certificação Simulado	106
6	Materiais de Referência para GC/IRMS	109
6.1	Estudo da exequibilidade de produção de MRC para GC/IRMS	109
6.1.1	Introdução	109
6.2	Seleção dos compostos químicos	111
6.3	Laboratórios Participantes no Ensaio Circular	117

6.4	Resultados e Discussão	117
6.4.1	Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ nos Compostos Puros por EA/IRMS. Ensaio Circular	117
6.4.2	Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ nos Compostos Puros e na Mistura por GC/IRMS. Ensaio Circular	119
6.4.2.1	Estudo das Condições Cromatográficas Adequadas e da Identificação da Mistura	119
6.4.2.2	Medição dos Valores de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS	120
6.4.3	Testes de Homogeneidade e de Estabilidade	128
6.4.3.1	Homogeneidade	128
6.4.3.2	Estabilidade	136
6.5	Exercício de Certificação Simulado (ECS)	147
6.5.1	Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por EA/IRMS. ECS	147
6.5.2	Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS. ECS	156
6.6	Tabelas <i>z</i> -score	161
6.6.1	<i>z</i> -score 1	161
6.6.2	<i>z</i> -score 2	164
6.6.3	Valores dos Materiais a Certificar	164
6.6.4	Vanilina (11)	171
6.6.5	Comparação de GC/IRMS com EA/IRMS. ECS	173
6.6.5.1	Valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$	173
6.6.5.2	Parâmetros de desempenho de GC/IRMS e de EA/IRMS	176
6.6.5.3	Estimativa da incerteza	177
7	Conclusões Finais e Perspectivas Futuras	179
7.1	Conclusões	179
7.2	Perspectivas Futuras	180
	Referências Bibliográficas	183
	Apêndices	211

A	Teste de Homogeneidade	211
B	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ por EA-IRMS. Ensaio Circular	223
C	Teste de Estabilidade	225
C.1	Amostra 1, para $t = 3$ meses	225
C.2	Amostra 2, para $t = 3$ meses	231
C.3	Amostra 1, para $t = 6$ meses	236
C.4	Amostra 2, para $t = 6$ meses	240
C.5	Amostra 1, para $t = 9$ meses	244
C.6	Amostra 2, para $t = 9$ meses	247
D	Breves Notas Explicativas Sobre Estatística	251
E	Cálculos Estatísticos	255
E.1	ANOVA unifactorial	255
E.2	ANOVA bifactorial	256
F	Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS. Ensaio Circular	259
G	Exercício de Certificação Simulado (ECS)	265
G.1	Resultados do ECS. EA/IRMS	266
G.2	Resultados do ECS. GC/IRMS	277
H	Tabelas z-score	283
I	Folhas dos Dados Técnicos para os Compostos Puros e para a Mistura do Tipo Grob	285

Lista de Figuras

2.1	Variação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no ambiente e na biosfera. (adaptado de http://web.udl.es/usuaris/x3845331/invest_copia(1).htm ; consultado em 12/06/2006)	11
2.2	Esquema simplificado do ciclo de Calvin, plantas do tipo C_3 (adaptado de http://fig.cox.miami.edu/cmallery/150/phts/reverse2.htm ; consultado em 15/01/2008).	13
2.3	Esquema representativo do ciclo de Hatch-Slack, plantas do tipo C_4 (adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/C4_carbon_fixation ; consultado em 23/02/2008).	14
2.4	A fotossíntese das plantas do tipo C_4 envolve a separação, no espaço e no tempo, da fixação do dióxido de carbono e da síntese dos hidratos de carbono (adaptado de http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm ; consultado em 11/01/2008).	15
2.5	Representação do processo de fotossíntese nas plantas CAM (adaptado de http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio111/metabolism.htm ; consultado em 22/02/2008).	16
2.6	Fisiologia do tecido foliar de uma planta do tipo C_3 (adaptado de http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm ; consultado em 19/02/2008).	17
2.7	Fisiologia do tecido foliar de uma planta do tipo C_4 (adaptado de http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm ; consultado em 19/02/2008).	17
2.8	Modelo do fracionamento isotópico de ^{13}C na dieta, <i>e.g.</i> , à base das plantas do tipo C_3 e C_4 , e o fracionamento do carbono entre a dieta e os diferentes tecidos de mamíferos herbívoros (figura adaptada).	18

- 2.9 Composição isotópica do carbono e o peso atómico de alguns materiais que contêm carbono (figura adaptada). Indicam-se os termos originais que constam dos trabalhos referidos, em que algumas das expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas. 19
- 2.10 Variação natural dos isótopos de oxigénio relativamente a SMOW (adaptado de <http://geoweb.tamu.edu>; consultado em 07/05/2007). Indicam-se os termos originais que constam dos trabalhos referidos, em que algumas das expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas, *e.g.*, carbonatos recentes (modern carbonates), água magmática (magmatic water). 20
- 2.11 Variação natural dos isótopos de hidrogénio relativamente a SMOW (adaptado de <http://geoweb.tamu.edu>; consultado em 12/12/2007). As seguintes expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas, mas incluem-se os termos originais que constam da referência: Salmoura em jazigos petrolíferos (oil field brines) e serpentinas oceânicas e continentais (oceanic e continental serpentines) que é diferente da rocha serpentinito. 21
- 2.12 Linha meteórica da água. As regiões quentes são caracterizadas por valores mais positivos de valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ e as regiões mais frias por valores mais negativos. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ são reportados ao padrão SMOW (adaptado de <http://www.biology.duke.edu/bio265/jlh/abiotic/html>; consultado em 13/03/2008). 22
- 2.13 Distribuição da média ponderada anual dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação no globo terrestre (adaptado de GNIP Maps and Animations, IAEA, Vienna (2001), em <http://isohis.iaea.org>; consultado em 28/04/2008). 23
- 2.14 Variação no teor de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação com um valor inicial de $\delta^{18}\text{O}_{\text{vapor}} = -11 \text{‰}$ à temperatura de 25 °C e um valor final de temperatura de -30 °C. A 0 °C o fraccionamento isotópico entre a neve e o vapor de água substitui o fraccionamento entre a precipitação e o vapor. As linhas a tracejado ligam $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação com a temperatura de condensação. ϵ é o factor de enriquecimento (figura adaptada). 24
- 2.15 Esquema simplificado do fraccionamento isotópico do oxigénio no ciclo global da água (adaptado de <http://www.leo.lehigh.edu/>; consultado em 17/07/2007). 25
- 2.16 Esquema representativo do ‘efeito continental’. Fraccionamento isotópico de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^2\text{H}$ da precipitação quando se afasta do oceano em direcção ao continente (adaptado de <http://www.sahara.arizona.edu/programs/isotopes/oxygen.html>; consultado em 01/04/2008). 26

2.17	Principais processos de fraccionamento e valores típicos de $\delta^{18}\text{O}$ num clima temperado. $\delta^{18}\text{O}_v$, $\delta^{18}\text{O}_p$ e $\delta^{18}\text{O}_{af}$ correspondem aos valores de $\delta^{18}\text{O}$ no vapor de água, na precipitação (chuva ou neve) e água das folhas, respectivamente; DVP, o défice da pressão de vapor e g_s a conductância estomatal (adaptado de http://web.udl.es/usuarios/x3845331/invest_copia(1).htm ; consultado em 01/04/2008).	26
2.18	Composição isotópica de azoto de alguns compostos e padrões de referência e a sua distribuição na natureza (figura adaptada).	28
2.19	Modelo do fraccionamento do azoto nas plantas e do fraccionamento dos isótopos de azoto presente no colagénio entre diferentes níveis tróficos incluindo, herbívoros, carnívoros e omnívoros (figura adaptada).	29
2.20	Esquema das gamas típicas de valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de nitrato com diferentes origens. A nitrificação a partir de fertilizantes seguida de precipitação e na presença de resíduos orgânicos pode originar gamas elevadas de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (adaptado de http://www.rcamnl.wr.usgs.gov/isoig/isopubs/itchch16.html ; consultado em 03/04/2008).	30
3.1	Ilustração esquemática de um IRMS e dos processos em curso em cada uma das suas partes constituintes. Os iões são gerados e acelerados na fonte, A, focados pelo sistema óptico B, deflectidos pelo analisador, C, (constituído por um campo magnético) de acordo com a sua razão m/z e finalmente detectados pelos multicolectores de Faraday, D (adaptado de uma imagem gentilmente fornecida pela GV Instruments).	35
3.2	Imagem do trajecto do feixe de iões num sistema de IRMS (Isoprime) e um “zoom” dos trajectos dos feixes de iões em direcção aos diferentes “Faraday cups” (adaptada de uma imagem gentilmente fornecida pela GV Instruments).	36
3.3	Esquema dos multicolectores “Faraday cups” e as respectivas correspondências em termos de m/z dos diferentes isotopólogos para os gases CO_2 , SO_2 , O_2 e N_2 (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).	37
3.4	Representação esquemática da comparação entre um equipamento de fluxo contínuo (CF) e um de dupla entrada (“Dual Inlet”) (figura adaptada).	38
3.5	Efeito do filtro electrostático (ESF) exemplificado para o percurso de um ião hélio após colisão com moléculas do gás He (figura adaptada).	39
3.6	Comparação entre a ausência e a presença do filtro ESF na determinação do isotopólogo do hidrogénio m/z 3 (figura adaptada).	40
3.7	Esquema simplificado de um sistema hifenado EA/IRMS em modo de combustão para determinação das razões isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).	41

3.8	Esquema simplificado de um sistema hifenado EA-IRMS em modo de pirólise para determinação das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).	42
3.9	Esquema simplificado de um sistema de GC/C/IRMS (cromatografia em fase gasosa hifenada a espectrometria de massa de razões isotópicas com interface de combustão) (adaptado de http://www.bris.av.uk/ ; consultado em 16/05/2006).	43
3.10	Equipamento para determinação da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ pelo método de Equilíbrio com CO_2 (equipamento em uso no INETI/LAQAS).	45
3.11	Preparação das amostras para determinação de $\delta^{18}\text{O}$ pelo método Equilíbrio com CO_2 . As condições experimentais apresentadas são as utilizadas no INETI.	46
5.1	Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Micromass, modelo Isoprime TM	84
5.2	Esquema representativo do sistema hifenado EA/IRMS com diluidor (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).	85
5.3	Analisador elementar da marca EuroVector, modelo Euro EA.	86
5.4	Cromatógrafo em fase gasosa da marca Agilent e interface de combustão hifenado ao Isoprime TM	87
5.5	Organigrama do procedimento de verificação do estado de operacionalidade do IRMS.	88
5.6	Enchimento dos reactores de combustão e de redução do analisador elementar.	89
5.7	Organigrama correspondente ao procedimento da pesagem.	90
5.8	Organigrama do procedimento de análise de $\delta^{13}\text{C}$ por EA-IRMS.	91
5.9	Organigrama do procedimento para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por GC-IRMS.	93
5.10	Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o IRMS.	96
5.11	Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o método EA/IRMS.	97
5.12	Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o método GC/IRMS.	98
6.1	Teste de homogeneidade. Comparação dos valores de F_{calc} obtidos no INETI com os obtidos no laboratório de referência comunitário.	129
6.2	Teste de homogeneidade: 1-Octanol.	130

6.3	Teste de homogeneidade: 2,6-Dimetilfenol.	131
6.4	Teste de homogeneidade: 2,6-Dimetilanilina.	131
6.5	Teste de homogeneidade: <i>N,N,3,5</i> -Tetrametilanilina.	132
6.6	Teste de homogeneidade: 4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo.	132
6.7	Teste de homogeneidade: Dodecano.	133
6.8	Teste de homogeneidade: Decanoato de metilo.	133
6.9	Teste de homogeneidade: Dodecanoato de metilo.	134
6.10	Teste de homogeneidade: 2-(Metilamino)benzoato de metilo.	134
6.11	Teste de homogeneidade: Nonanal.	135
6.12	Teste de homogeneidade: Vanilina.	135
6.13	Teste de estabilidade no curto prazo por degradação acelerada: irradiação com luz UV	137
6.14	Teste de estabilidade no curto prazo, por degradação acelerada: choques térmicos	138
6.15	Teste de estabilidade no longo prazo: 1-Octanol.	141
6.16	Teste de estabilidade no longo prazo: 2,6-Dimetilfenol.	141
6.17	Teste de estabilidade no longo prazo: 2,6-Dimetilanilina.	142
6.18	Teste de estabilidade no longo prazo: <i>N,N,3,5</i> -Tetrametilanilina.	142
6.19	Teste de estabilidade no longo prazo: 4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo.	143
6.20	Teste de estabilidade no longo prazo: Dodecano.	143
6.21	Teste de estabilidade no longo prazo: Decanoato de metilo.	144
6.22	Teste de estabilidade no longo prazo: Dodecanoato de metilo.	144
6.23	Teste de estabilidade no longo prazo: 2-(Metilamino)benzoato de metilo.	145
6.24	Teste de estabilidade no longo prazo: Nonanal.	145
6.25	Teste de estabilidade no longo prazo: Vanilina.	146
6.26	1-Octanol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA/IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	148
6.27	2,6-Dimetilfenol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	148

6.28	2,6-Dimetilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	149
6.29	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	149
6.30	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	150
6.31	Dodecano. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	150
6.32	Decanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	151
6.33	Dodecanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	151
6.34	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	152
6.35	Nonanal. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	152
6.36	Vanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$	153
6.37	1-Octanol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	157
6.38	2,6-Dimetilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	158
6.39	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	158
6.40	Dodecano. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	159
6.41	Decanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	159
6.42	Dodecanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	160
6.43	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	160

6.44	<i>z</i> -score 1 para todos os laboratórios (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS)	162
6.45	<i>z</i> -score 1 para todos os compostos (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS)	163
6.46	<i>z</i> -score 2 para todos os laboratórios (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS por comparação com os valores de referência obtidos por EA-IRMS)	165
6.47	<i>z</i> -score 2 para todos os compostos (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS por comparação com os valores de referência obtidos por EA-IRMS)	166
6.48	Vanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com <i>s</i> associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$	171
I.1	Folha de dados técnicos do 1-octanol.	286
I.2	Folha de dados técnicos do 2,6-dimetilfenol.	287
I.3	Folha de dados técnicos da 2,6-dimetilanilina.	288
I.4	Folha de dados técnicos da <i>N,N</i> ,3,5-tetrametilnilina.	289
I.5	Folha de dados técnicos do 4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)benzoato de etilo.	290
I.6	Folha de dados técnicos do dodecano.	291
I.7	Folha de dados técnicos do decanoato de metilo.	292
I.8	Folha de dados técnicos do dodecanoato de metilo.	293
I.9	Folha de dados técnicos do 2-(metilamino)benzoato de metilo.	294
I.10	Folha de dados técnicos do nonanal.	295
I.11	Folha de dados técnicos da vanilina.	296
I.12	Mistura: 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, <i>N,N</i> ,3,5-tetrametilnilina e 2-(metilamino)benzoato de metilo.	297
I.13	Mistura (continuação): 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, <i>N,N</i> ,3,5-tetrametilnilina e 2-(metilamino)benzoato de metilo.	298
I.14	Mistura (continuação): 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, <i>N,N</i> ,3,5-tetrametilnilina e 2-(metilamino)benzoato de metilo.	299

Lista de Tabelas

2.1	Composição isotópica dos elementos com maior interesse na autenticidade de géneros alimentícios, determinada por espectrometria de massa.	6
2.2	Exemplos de plantas mais comuns nos três grupos descritos, C ₃ , C ₄ e CAM e respectivas gamas das razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$	13
3.1	Alguns tipos comuns de adulteração em alimentos e bebidas e respectivos métodos isotópicos de detecção	50
3.2	Comparação de algumas características para um conjunto de técnicas mais frequentemente utilizadas na determinação da autenticidade de géneros alimentícios (tabela adaptada).	55
3.3	Alguns métodos oficiais baseados nas técnicas isotópicas para detecção da adulteração.	60
4.1	Guias ISO	70
4.2	Guias e documentos técnicos internacionais	70
4.3	Algunas amostras de intercomparação distribuídas pela IAEA (tabela adaptada).	80
5.1	Tempos de Retenção, t_R , dos compostos na mistura. Coluna não polar HP-5MS.	94
5.2	Tempos de Retenção, t_R , dos compostos na mistura. Coluna polar HP-INNOWax.	94
5.3	Características metrológicas dos métodos utilizados.	102
5.4	Valores de $z - score$, obtidos pelo laboratório, na determinação de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) em várias matrizes de géneros alimentícios. Método EA/IRMS.	103
5.5	Dados experimentais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) da participação do INETI nos FIT-PTS para várias matrizes de géneros alimentícios. Método EA/IRMS.	105

6.1	Compostos estudados para a selecção da mistura do tipo de Grob	112
6.2	Composição química elementar dos compostos candidatos a MRC	115
6.3	Descrição dos compostos estudados	116
6.4	Distribuição dos parâmetros isotópicos analisados pelos laboratórios que participaram no Ensaio Circular	117
6.5	Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para os onze compostos puros relativos ao Ensaio Circular	118
6.6	Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para os compostos puros. Ensaio Circular.	118
6.7	Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por GC/IRMS para os compostos puros e em mistura, utilizando as colunas cromatográficas não polar (HP-5MS) e polar (HP INNOWax). Tomou-se como valor de referência o valor de $\delta^{13}\text{C}$ obtido por EA/IRMS. Ensaio Circular.	121
6.8	Resumo dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por EA/IRMS e GC/IRMS para compostos puros e em mistura utilizando as colunas polar HP INNOWax e apolar HP-5MS). Tomou-se como valor de referência o valor $\delta^{13}\text{C}$ de EA/IRMS	124
6.9	Valores de F_{calc} , F_{crit} (95 %) e P calculados pela ANOVA bifatorial (laboratórios e colunas cromatográficas) relativos aos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para os compostos puros. Análise por GC/IRMS.	125
6.10	Valores de F_{calc} , F_{crit} (95 %) e P calculados através da ANOVA bifatorial (laboratórios e composto puro ou em mistura). Análise por GC/IRMS.	126
6.11	Valores de t_{calc} , t_{crit} (teste- t bilateral, 95 %) e P para comparação dos métodos de EA/IRMS e de GC/IRMS.	127
6.12	Limite de repetibilidade, r , e desvio padrão da repetibilidade, s_r , calculados a partir dos dados do teste de homogeneidade por EA/IRMS	129
6.13	Teste de estabilidade no longo prazo. Razão das médias às temperaturas de -20°C , $+04^\circ\text{C}$ e $+20^\circ\text{C}$, relativas aos compostos com uma estimativa de incerteza associada	140
6.14	Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) resultantes do ECS por EA/IRMS	154
6.15	Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para a mistura do tipo Grob obtidos por GC/IRMS	167
6.16	Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para a vanilina obtidos por GC/IRMS	172
6.17	Comparação das técnicas EA/IRMS e GC/IRMS. Parâmetros de desempenho	174
6.18	Valores de s_r , r , s_R e R (‰) para as técnicas de EA/IRMS e GC/IRMS	177
6.19	Incertezas estimadas para EA/IRMS e GC/IRMS	177

A.1	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	212
A.2	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	213
A.3	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	214
A.4	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilaniolina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	215
A.5	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.	216
A.6	Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	217
A.7	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	218
A.8	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	219
A.9	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	220
A.10	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	221
A.11	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros	222
B.1	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por EA-IRMS para os compostos puros. Ensaio Circular	224
C.1	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.	225
C.2	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	226
C.3	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	226

C.4	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilaniлина. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	227
C.5	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	227
C.6	Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	228
C.7	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	228
C.8	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	229
C.9	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	229
C.10	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	230
C.11	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1	230
C.12	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	231
C.13	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	231
C.14	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	232
C.15	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilaniлина. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	232

C.16	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	233
C.17	Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	233
C.18	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	234
C.19	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	234
C.20	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	235
C.21	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	235
C.22	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2	236
C.23	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	236
C.24	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	237
C.25	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	237
C.26	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	237
C.27	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	238

C.28 Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	238
C.29 Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	238
C.30 Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	239
C.31 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	239
C.32 Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	239
C.33 Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1	240
C.34 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	240
C.35 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	240
C.36 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	241
C.37 <i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	241
C.38 4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	241
C.39 Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	242

C.40	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	242
C.41	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	242
C.42	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	243
C.43	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	243
C.44	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2	243
C.45	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	244
C.46	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	244
C.47	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	244
C.48	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	245
C.49	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	245
C.50	Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	245
C.51	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	246
C.52	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	246
C.53	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	246
C.54	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	247

C.55	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1	247
C.56	1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	247
C.57	2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	248
C.58	2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	248
C.59	<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	248
C.60	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	249
C.61	Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	249
C.62	Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	249
C.63	Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	250
C.64	2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	250
C.65	Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	250
C.66	Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2	250
E.1	Tabela ANOVA unifactorial	255
E.2	Tabela ANOVA bifactorial	257
F.1	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por GC-IRMS.	260
G.1	Laboratórios que participaram no ECS	265
G.2	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 1-Octanol obtidos por EA/IRMS no ECS	267
G.3	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2,6-Dimetilfenol obtidos por EA/IRMS no ECS	268
G.4	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2,6-Dimetilanilina obtidos por EA/IRMS no ECS	269

G.5	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do <i>N,N,3,5</i> -Tetrametilnilina obtidos por EA/IRMS no ECS	270
G.6	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo obtidos por EA/IRMS no ECS	271
G.7	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Dodecano obtidos por EA/IRMS no ECS	272
G.8	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Decanoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS	273
G.9	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Dodecanoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS	274
G.10	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2-(Metilamino)benzoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS	275
G.11	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Nonanal obtidos por EA/IRMS no ECS	276
G.12	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Vanilina obtidos por EA/IRMS no ECS	277
G.13	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 1-Octanol obtidos por GC/IRMS no ECS	278
G.14	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 2,6-Dimetilanilina obtidos por GC/IRMS no ECS	278
G.15	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de <i>N,N,3,5</i> -Tetrametilnilina obtidos por GC/IRMS no ECS	279
G.16	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Dodecano obtidos por GC/IRMS no ECS	279
G.17	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Decanoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS	280
G.18	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Dodecanoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS	280
G.19	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 2-(Metilamino)benzoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS	281
G.20	Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Vanilina obtidos por GC/IRMS no ECS	281
H.1	Tabela <i>z</i> -score-1 relativo a GC/IRMS	283
H.2	Tabela <i>z</i> -score-2 relativo a EA/IRMS	284

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação e Contexto

A fraude acompanha as transacções comerciais ao longo dos séculos. Quem perde nessas situações é o consumidor que tem de se basear no rótulo do produto para obter informação sobre um dado produto. No entanto há que garantir a veracidade dessa informação.

Nas últimas décadas muitos estudos e esforços têm sido feitos para desenvolver métodos analíticos fiáveis para a determinação da autenticidade de alimentos e bebidas à venda no mercado.

De entre esses métodos destacam-se as técnicas de análise de isótopos estáveis, mais especificamente a espectrometria de massa de razões isotópicas (IRMS), que têm sido profusamente utilizadas na determinação das razões isotópicas dos elementos carbono, oxigénio, hidrogénio e azoto, e já provaram dar respostas em muitas situações controversas. Nalguns casos específicos, as técnicas isotópicas são métodos oficiais usados para resolver disputas nacionais e internacionais em áreas como os vinhos e as bebidas espirituosas.

A Europa lidera, a nível mundial, a aplicação dos métodos de análise de isótopos estáveis para o controlo da autenticidade de alimentos e bebidas, sendo alguns já métodos de rotina em Laboratórios de Referência neste domínio.

A implementação correcta destes métodos é assim essencial, pois os seus resultados podem ser fundamentais para evitar disputas entre Estados Membros e para garantir o controlo de géneros alimentícios importados de outros países.

A mais recente das técnicas isotópicas, a cromatografia em fase gasosa hifenada a espectrometria de massa de razões isotópicas (GC/IRMS) é extremamente versátil, pois alia a capacidade da cromatografia para a separação dos compostos de misturas complexas com a elevada precisão da espectrometria de massa de razões isotópicas na determinação das razões de isótopos estáveis. Esta técnica tem sido aplicada essencialmente na área dos aromas

e dos óleos essenciais mas tem fortes potencialidades para muitas mais aplicações.

Contudo, ainda não existem Materiais de Referência Certificados (MRC) para a técnica de GC/IRMS e porque “no data is better than bad data” segundo a filosofia do National Institute of Standards and Technology (NIST), impõe-se a necessidade de MRC específicos quer para a rastreabilidade dos resultados analíticos obtidos por GC/IRMS, quer para o desenvolvimento de novos métodos para futuras aplicações na área da autenticidade alimentar e para a detecção de fraudes.

Deste modo torna-se evidente a necessidade de MRC específicos para GC/IRMS.

Este trabalho insere-se no âmbito de um projecto financiado pela Comissão Europeia cujo título oficial é “Gas Chromatography Coupled to Stable Isotope ratio Mass Spectrometry (GC/IRMS) to Check for Food and Beverage Authenticity”, Suitable Reference Materials to Ensure Measurement Intercomparability, Project N° GRD2-2000-31814, financiado pela Comunidade Europeia dentro do Programa “Competitive and Sustainable Growth” do 5º Programa Quadro (1998-2002).

De salientar, no entanto, que as partes correspondentes às determinações de $\delta^{13}\text{C}$ relativas aos testes de homogeneidade, de estabilidade no longo e no curto prazo bem como a participação nos Ensaio Circular e Exercício de Certificação Simulado (ECS) foram realizadas no Laboratório de Química Analítica Orgânica e de Síntese (LAQAS) do Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI), pela redactora desta dissertação.

1.2 Objectivos

Tal como já referido, os métodos analíticos que medem as razões de isótopos estáveis encontram-se entre as metodologias analíticas mais sofisticadas e disponíveis para a determinação da autenticidade de bebidas e alimentos e já provaram ser particularmente eficazes na detecção de adulterações de alimentos e bebidas.

O principal objectivo deste trabalho de investigação foi o de estudar a exequibilidade de uma mistura padrão do tipo Grob constituída por compostos orgânicos com diferentes funcionalidades (especificada no ponto 6.2), para aplicação futura como Material de Referência Certificado para a determinação da razão isotópica $\delta^{13}\text{C}$ pela técnica isotópica de GC/IRMS.

Resume-se em seguida os principais objectivos desta tese:

- Identificar os compostos (compostos da mistura de Grob e/ou outros), que cumprem os requisitos de material de referência para GC/IRMS, baseado nas necessidades dos utilizadores.
- Definir e otimizar os métodos necessários para a certificação dos materiais. A certificação será feita com base nas medições por EA/IRMS e GC/IRMS. Os valores das

razões isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por EA/IRMS serão tomados como os valores de referência para os valores das razões isotópicas obtidos por GC/IRMS.

- Demonstrar a exequibilidade da produção futura de MRC num pequeno lote de ensaio sujeito a testes de estabilidade e de homogeneidade e a um Exercício de Certificação Simulado, ECS, de acordo com as linhas de orientação publicadas pela União Europeia.^{5,6}
- Estabelecer, de forma clara, os valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ para os diferentes compostos individuais e da mistura (e uma estimativa preliminar da respectiva incerteza) e o seu domínio de aplicação, incluindo especificações relativamente à precisão e à exactidão.
- Produzir uma Folha de Dados Técnicos (“Technical Data Sheet”) para a mistura candidata a MRC contendo, para além dos valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ para certificação e uma estimativa da sua incerteza, os requisitos necessários para a sua produção futura e ainda as recomendações técnicas sobre as formas de transporte e de armazenamento adequadas.

O planeamento experimental foi efectuado de acordo com o guia BCR (BCR Guidelines for the Production and Certification of CRMs) preparado pela Comissão Europeia relativo à produção de MRC.^{5,6}

1.3 As Contribuições desta Tese

O principal produto final deste trabalho de investigação foi a disponibilização de valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$, com uma estimativa da sua incerteza associada, dos compostos presentes numa mistura candidata a MRC para a técnica de GC/IRMS, constituída por sete compostos com diferentes funcionalidades nomeadamente, 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, *N,N*,3,5-tetrametilanolina e 2-(metilamino)benzoato de metilo e, ainda, o valor de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ para a vanilina pura.

Foi também possível obter valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$, com uma estimativa da sua incerteza associada, para os compostos puros nomeadamente, 1-octanol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, nonanal, *N,N*,3,5-tetrametilanolina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo, 2-(metilamino)benzoato de metilo e vanilina para a técnica de EA/IRMS.

Estes dados foram compilados em Folhas de Dados Técnicos (apresentadas no Apêndice I) contendo ainda informação sobre o tamanho e o tipo de embalagem recomendados, sobre as condições de armazenamento e o número estimado das unidades a serem produzidas no caso de uma futura certificação.

Um dos principais produtores de MR(C), o Institute for Reference Materials and Measurements da Comissão Europeia, IRMM, em Geel, na Bélgica, foi abordado para a possível

produção e certificação destes Materiais de Referência Certificados.

1.4 Estrutura da Tese

Esta dissertação está dividida em sete capítulos.

O primeiro, Introdução, visa enquadrar o trabalho apresentado, procurando justificar a necessidade do estudo efectuado e referindo os principais objectivos subjacentes à sua realização.

No segundo capítulo dá-se uma perspectiva dos isótopos estáveis na natureza, os diferentes tipos de fraccionamento isotópico e faz-se uma abordagem individual dos isótopos do carbono, azoto, oxigénio e hidrogénio sobre a informação que resulta do fraccionamento dos isótopos destes elementos.

No Capítulo 3 é feita uma breve abordagem sobre o estado da arte da espectrometria de massa de razões isotópicas, onde são descritas as diferentes técnicas isotópicas hífenadas mais utilizadas no âmbito da determinação da autenticidade alimentar e de algumas das suas aplicações nos diferentes domínios da ciência. Serão ainda abordados alguns assuntos considerados relevantes no contexto desta dissertação, *e.g.*, a garantia e o controlo da qualidade e o cálculo de incertezas.

No Capítulo 4 faz-se uma abordagem sobre Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC) de um modo geral, particularizando para o caso dos MR(C) de isótopos estáveis e sua importância para a técnica de GC/IRMS.

No Capítulo 5 são apresentados os materiais e metodologias analíticas subjacentes à realização deste trabalho.

O Capítulo 6 é constituído pelos resultados obtidos e pela sua discussão.

O sétimo e último capítulo é constituído pelas conclusões mais importantes e por sugestões para trabalhos futuros neste domínio.

Capítulo 2

Isótopos Estáveis

A demonstração da existência de isótopos estáveis remonta a 1913 quando J. J. Thomson,⁷ numa experiência com tubos cheios de néon, pôs em evidência dois de três isótopos deste gás, com as massas atômicas de 20 e 22. Aston⁸ ao descobrir o terceiro isótopo, o ^{21}Ne , confirmou os resultados de Thomson seis anos antes.

No mesmo ano (1913), F. Soddy⁹ e A. Fleck introduziram o termo isótopo, do grego *isos* mesmo e *topos* lugar. Este termo descreve bem a propriedade dos elementos que, apesar de terem massas diferentes, ocupam o mesmo lugar na tabela periódica pois têm a mesma estrutura electrónica e o mesmo número de prótons. Só o número de neutrões difere. A massa atômica de um elemento não é mais do que a massa média da mistura dos isótopos presentes na natureza. A partir dos trabalhos de Aston,¹⁰ a pesquisa sobre os isótopos começou e ao mesmo tempo começaram as pesquisas de formas de os medir.

Em 1950 Nier¹¹ conduziu os seus estudos no primeiro espectrómetro de massa dedicado à medida das razões isotópicas do C, N e O. Estudos posteriores revelaram que as abundâncias médias observadas na natureza apresentam desvios sistemáticos das abundâncias médias naturais devido a fraccionamento isotópico resultante dos processos físicos, químicos e bioquímicos.

A composição isotópica inicial dos sistemas planetários são uma função dos processos nucleares que ocorrem nas estrelas. Ao longo do tempo, estas composições variaram nos ambientes terrestres originadas pelos processos de decaimento radioactivo, interacções dos raios cósmicos e das actividades antropogénicas tais como o processamento de combustíveis nucleares, acidentes nucleares e testes de armas químicas. As técnicas de medição das razões de isótopos estáveis foram primeiramente usadas nas ciências geológicas para datação e só mais tarde é que estas investigações se estenderam à biologia e botânica, permitindo desenvolver novas teorias sobre os processos bioquímicos que ocorrem na natureza, com base na medição da abundância natural dos isótopos estáveis contidos na matéria orgânica das plantas.

Estes estudos puseram em evidência três vias fotossintéticas nomeadamente C_3 (Cal-

vin), C₄ (Hatch-Slack) e CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas, “Crassulacean Acid Metabolism”) que se encontram descritas com mais pormenor mais à frente neste capítulo.

Na matéria orgânica, os principais elementos são C, H, O, N e S, e apresentam-se na forma de isótopos estáveis ¹³C, ¹²C; ¹H, ²H; ¹⁸O, ¹⁷O, ¹⁶O; ¹⁵N, ¹⁴N; ³⁶S, ³⁴S, ³³S, ³²S ou de isótopos instáveis ³H; ¹⁴C. Na natureza predominam as formas mais leves. As abundâncias isotópicas relativas encontradas na natureza para os elementos com mais interesse no domínio alimentar encontram-se referidas na Tabela 2.1 definindo-se abundância isotópica pela expressão,

$$R = \frac{\text{abundância do isótopo raro}}{\text{abundância do isótopo mais abundante}} \quad (2.1)$$

Normalmente o símbolo R é acompanhado de um expoente que se refere ao isótopo que se está a considerar,¹² exemplificando para o caso do carbono na molécula do dióxido de carbono,

$${}^{13}R_{(CO_2)} = \frac{{}^{13}CO_2}{{}^{12}CO_2} \quad (2.2)$$

A abundância relativa dos isótopos estáveis na biomassa e portanto nos géneros alimen-

Tabela 2.1: Composição isotópica dos elementos com maior interesse na autenticidade de géneros alimentícios, determinada por espectrometria de massa.¹³

Número Atómico	Símbolo	Número de Massa	Composição Isotópica Representativa (% Átomos)
1	H	1	99,9885
		2	0,0115
6	C	12	98,93
		13	1,07
7	N	14	99,636
		15	0,364
8	O	16	99,757
		17	0,038
		18	0,205
16	S	32	94,99
		33	0,75
		34	4,25
		36	0,01

tícios, varia de acordo com factores externos (geológicos, climáticos e ecológicos) e com factores internos (vias sintéticas, posição na cadeia alimentar. . .). A razão dos isótopos de um elemento específico que as plantas ou animais absorvem do exterior deixa uma marca característica que define o ambiente onde cresceram, o ambiente que em termos comerciais define a origem e a autenticidade de um produto.

2.1 Fraccionamento Isotópico

As abundâncias isotópicas dos elementos sofrem variações na natureza devido aos processos de fraccionamento como foi demonstrado por Urey.^{14,15} Em 1961, Craig publicou aquele que foi o seu marco histórico, ao descobrir que os isótopos do hidrogénio e do oxigénio são fraccionados por processos meteorológicos previsíveis (ver ponto 2.3).¹⁶

O fraccionamento isotópico também designado por outros autores como discriminação isotópica (enriquecimento ou empobrecimento de um isótopo relativamente a outro) é definido como a variação nas razões da abundância dos isótopos originado por processos físicos, químicos e biológicos. Esta variabilidade natural das abundâncias isotópicas é consequência das diferentes propriedades físicas e químicas do isótopo mais leve relativamente ao isótopo mais pesado, para um dado elemento.

Estas diferenças de propriedades físicas e químicas dos compostos isotópicos são causadas pelas diferenças de massa do núcleo atómico e, têm consequências, de que as principais são:¹²

- As moléculas contendo o isótopo mais pesado movem-se mais lentamente e portanto a sua velocidade de difusão é mais baixa. Por outro lado, a frequência de colisão com outras moléculas - condição primária para ocorrer uma reacção química - é mais pequena para as moléculas mais pesadas. Esta é uma das razões pela qual, em regra, as moléculas mais leves reagem mais rapidamente.
- As moléculas mais pesadas têm normalmente maiores energias de ligação. São exemplos deste fenómeno $^1\text{H}_2^{18}\text{O}$ e $^1\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$, que têm pressões de vapor mais baixas do que $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ pelo que as primeiras evaporam menos facilmente. Em quase todas as reacções químicas as espécies isotópicas leves reagem mais rapidamente que as mais pesadas. Por exemplo, $\text{Ca}^{12}\text{CO}_3$ dissolve-se mais rapidamente numa solução ácida do que $\text{Ca}^{13}\text{CO}_3$.

Num equilíbrio isotópico entre dois compostos químicos o isótopo mais pesado está geralmente concentrado no composto com maior peso molecular. Em determinadas condições, as moléculas poliatómicas podem ter um poço de energia potencial mais profundo para a molécula que contém os elementos mais leves. Nestes casos a energia de ligação da molécula mais pesada é menor e, conseqüentemente, a pressão de vapor vem mais baixa para as espécies isotopicamente mais pesadas. A este fenómeno chama-se 'efeito isotópico inverso'.¹²

Exemplos práticos do 'efeito isotópico inverso' são as elevadas pressões de vapor do $^{13}\text{CO}_2$ na fase líquida e a mais baixa solubilidade de $^{13}\text{CO}_2$ em água do que $^{12}\text{CO}_2$, ambos à temperatura ambiente. A temperaturas mais elevadas, as diferenças entre as energias de ligação das moléculas isotópicas tornam-se mais pequenas, resultando em efeitos isotópicos mais pequenos que podem mesmo desaparecer.

A partição dos isótopos estáveis entre duas substâncias A e B pode ser exprimida pelo

factor de fraccionamento α :

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B} \quad (2.3)$$

onde R é a razão entre o isótopo pesado e o leve, *e.g.*, $^2\text{H}/^1\text{H}$ ou $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Os valores de α são muito próximos de 1. Assim, embora o carbono-12 e o carbono-13 ocorram na natureza numa razão de 98,882 para 1,108, se esta razão for medida em produtos metabólicos, tal como acontece em testes de fármacos, a razão encontrada será ligeiramente diferente da fornecida pelas tabelas, uma vez que as reacções metabólicas diferenciam entre ^{12}C e ^{13}C .

É possível distinguir entre dois tipos principais de fraccionamento, o fraccionamento isotópico físico e o fraccionamentos isotópico químico, e dentro deste último o fraccionamento isotópico cinético e o fraccionamento isotópico termodinâmico ou de equilíbrio.

2.1.1 Efeitos Isotópicos Físicos

As grandezas físicas ligadas à massa são claramente afectadas pela diferença de massa entre os isótopos. O isótopo mais leve de um dado elemento desloca-se mais rapidamente que o seu isótopo pesado. O fraccionamento durante os processos físicos resulta das diferenças na velocidade das moléculas isotópicas do mesmo composto; as moléculas mais leves difundem-se e evaporam mais rapidamente.

Os fraccionamentos isotópicos de origem física encontram-se frequentemente em processos de separação ou purificação, de difusão, evaporação e congelação. A difusão do CO_2 ou da H_2O no ar é um exemplo natural do tipo de fraccionamento por difusão.

2.1.2 Efeitos Isotópicos Químicos

Durante uma reacção seja ela química ou bioquímica, as diferenças de massa podem influenciar a velocidade da reacção (efeito cinético) ou o estado de energia do sistema (efeito termodinâmico).

2.1.2.1 Efeito Isotópico Termodinâmico (ou de Equilíbrio)

O fraccionamento isotópico ocorre em qualquer reacção termodinâmica (de equilíbrio) por causa das diferentes velocidades da reacção para as diferentes espécies moleculares. O resultado é o desproporcionamento da concentração de um isótopo relativamente ao outro num lado da reacção que é expresso pelo factor de fraccionamento já referido e, exprimido, neste caso, pela razão das razões de isótopo do reagente e produto.

Um efeito isotópico termodinâmico favorece a acumulação do isótopo mais pesado num dado componente de um sistema em equilíbrio. Nos processos de equilíbrio o composto formado vem mais enriquecido no isótopo mais pesado. A regra para este efeito é que o

isótopo mais pesado vai preferencialmente para o composto químico em que este vai ficar mais fortemente ligado. Assim, quando o CO_2 está em equilíbrio com H_2O e os átomos de oxigénio trocam, o ^{18}O concentra-se na molécula de CO_2 .¹⁷

O fraccionamento no equilíbrio envolve a redistribuição dos isótopos entre várias espécies ou compostos num processo de equilíbrio ou numa reacção. Quando o equilíbrio é estabelecido, a velocidade das reacções directa e inversa são iguais e as abundâncias isotópicas nos reagentes e produtos mantêm-se constantes (mas geralmente não idênticas).

O reagente e o produto podem ser diferentes compostos químicos ou diferentes fases de um mesmo composto. Um exemplo típico na natureza de um processo de equilíbrio é a condensação da água da chuva nas núvens. Durante as mudanças de fase, a razão entre os isótopos pesados e leves, nas moléculas, varia nas duas fases. Por exemplo, à medida que o vapor de água condensa (num processo de equilíbrio), os isótopos mais pesados da água, ^{18}O e ^2H , concentram-se na fase líquida enquanto que os isótopos mais leves ^{16}O e ^1H tendem para a fase de vapor.¹⁸

2.1.2.2 Efeitos Isotópicos Cinéticos

Fala-se de efeitos isotópicos cinéticos quando o fraccionamento de um elemento resulta das diferenças de massa atómica dos isótopos na velocidade de uma reacção. Duas causas são possíveis: a primeira porque as moléculas que contêm os isótopos mais leves são mais rápidas que as que contêm os isótopos mais pesados. A segunda causa tem a ver com o facto de que as ligações químicas são mais fortes com os átomos mais pesados relativamente aos correspondentes mais leves.

Estes efeitos de fraccionamento são principalmente determinados pelas energias de ligação dos compostos originais em que, durante os processos físicos, as moléculas isotopicamente mais leves têm velocidades maiores e menores energias de ligação; nos processos químicos as moléculas mais leves reagem mais rapidamente que as mais pesadas (produtos enriquecidos nos isótopos mais leves e reagentes nos mais pesados).

Os isótopos mais leves formam ligações mais fracas das moléculas que constituem e portanto estas são mais facilmente quebradas permitindo que reajam mais depressa. Assim, nas reacções que são reguladas pela cinética, os isótopos mais leves estão concentrados nos produtos. A temperaturas elevadas, a constante de equilíbrio para a troca isotópica tende para a unidade, *i.e.*, quando $T \rightarrow \infty$, $K \rightarrow 1$ pois pequenas diferenças na massa são menos importantes quando todas as moléculas têm energias cinética e vibracional muito elevadas.

Isto demonstra-se matematicamente a partir da equação 2.4 que relaciona a massa e a força da ligação (na forma de energia de activação, E), onde k é a constante de velocidade da reacção, μ é a massa reduzida, E é a energia de activação e o asterisco refere-se à espécie mais pesada. T é a temperatura absoluta e R a constante dos gases perfeitos.

$$\frac{k}{k^*} = \sqrt{\frac{\mu^*}{\mu}} \times e^{\frac{E-E^*}{RT}} \quad (2.4)$$

Na maior parte dos casos, a razão das constantes cinéticas é superior à unidade ($\mu^* > \mu$ e $E^* > E$) e os produtos da reacção serão enriquecidos no isótopo mais leve.

O fraccionamento isotópico cinético resulta de processos físicos ou químicos irreversíveis. Como exemplos destacam-se a evaporação da água com remoção imediata do vapor, para evitar posterior contacto com a água; a absorção e a difusão de gases e as reacções irreversíveis como é o caso da precipitação rápida da calcite.

A maior parte dos processos de fraccionamento isotópico que ocorrem na natureza não são puramente cinéticos e nestes casos referem-se como fraccionamento de 'não-equilíbrio'. A evaporação da água dos oceanos não é um processo irreversível pois o vapor de água condensa. Em 1965 Craig e Gordon¹⁹ propuseram pela primeira vez um modelo para explicar os efeitos isotópicos durante a evaporação. Este modelo é considerado a pedra angular para o entendimento dos efeitos isotópicos do ciclo hidrológico global.

Os processos de fraccionamento que ocorrem na natureza resultam geralmente de efeitos isotópicos no equilíbrio.

No que respeita aos processos biológicos, estes são geralmente irreversíveis sendo excelentes exemplos de reacções isotópicas cinéticas. Os organismos utilizam preferencialmente as espécies isotópicas mais leves devido à mais baixa energia necessária para quebrar as ligações das moléculas resultando num fraccionamento significativo entre o substrato (mais pesado) e o produto (mais leve).²⁰

A partir do que foi exposto é possível tecer-se algumas conclusões nomeadamente,¹²

1-Nos processos cinéticos (irreversíveis) a fase ou composto formado é empobrecida no isótopo mais pesado em relação à fase ou composto inicial.

2- Nos processos isotópicos de equilíbrio (reversíveis) não se pode prever com certeza qual a fase ou composto que está enriquecido ou empobrecido no isótopo mais pesado. Contudo, a fase densa (a fase líquida relativamente ao vapor) ou o composto com massa molecular mais elevada (CaCO_3 em relação a CO_2) contém, geralmente, uma concentração mais elevada do isótopo mais pesado.

3- Como regra, o fraccionamento decresce com o aumento da temperatura, podendo mesmo desaparecer.

2.1.2.3 Outros Efeitos Isotópicos

Os efeitos isotópicos cinéticos e termodinâmicos traduzem os fraccionamentos produzidos durante uma reacção química ou bioquímica, dos processos de difusão, adsorção, evaporação e de mudanças de estado. Em contrapartida, existem outras situações de fraccionamento que podem ser provocadas por fenómenos que alteram o equilíbrio numa reacção tais como, a variação instantânea da temperatura ou o deslocamento de um produto ou reagente numa reacção. Este tipo de fraccionamento de não-equilíbrio não é previsível segundo as regras pré-determinadas.

As reacções enzimáticas, por serem processos irreversíveis, provocam fraccionamentos deste tipo. São de facto as reacções enzimáticas que ocorrem na natureza que têm maior interesse e das quais se tira partido, graças à variabilidade que introduzem em termos de fraccionamento nos produtos bioquímicos e conseqüentemente, com interesse na área da genuinidade/autenticidade de géneros alimentícios. Um exemplo dessas reacções é a fotossíntese (ver equação 2.5) que introduz, para alguns tipos de plantas, um grau de fraccionamento de cerca de 10 ‰, dado que o valor de $\delta^{13}\text{C}$ (a notação delta, δ , encontra-se descrita no ponto 3.3 do Capítulo 3) dos açúcares é cerca de -17 ‰ e o valor de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico é de cerca de -7 ‰ (valor considerado na ausência de actividades industriais).²¹

2.2 O Carbono e a Origem Botânica

Em 1953 Craig²² descobriu que plantas diferentes continham quantidades diferentes de ^{13}C embora nessa altura não fosse claro a razão de tais diferenças. Em 1970 Hatch e Slack²³ identificaram uma via para a fixação do dióxido de carbono da atmosfera que constituiu uma base racionalista para explicar aquelas diferenças. Smith e Epstein em 1971²⁴ verificaram que todas as plantas eram empobrecidas em ^{13}C relativamente ao carbono atmosférico que as plantas usavam, devido ao fraccionamento dos isótopos ^{13}C e ^{12}C durante a fixação do CO_2 pelas plantas. Como já referido, na ausência de actividades industriais considera-se como valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ para o CO_2 atmosférico como sendo aproximadamente de -7 ‰. Os dois processos fundamentais do ciclo do carbono que provocam fraccionamento isotó-

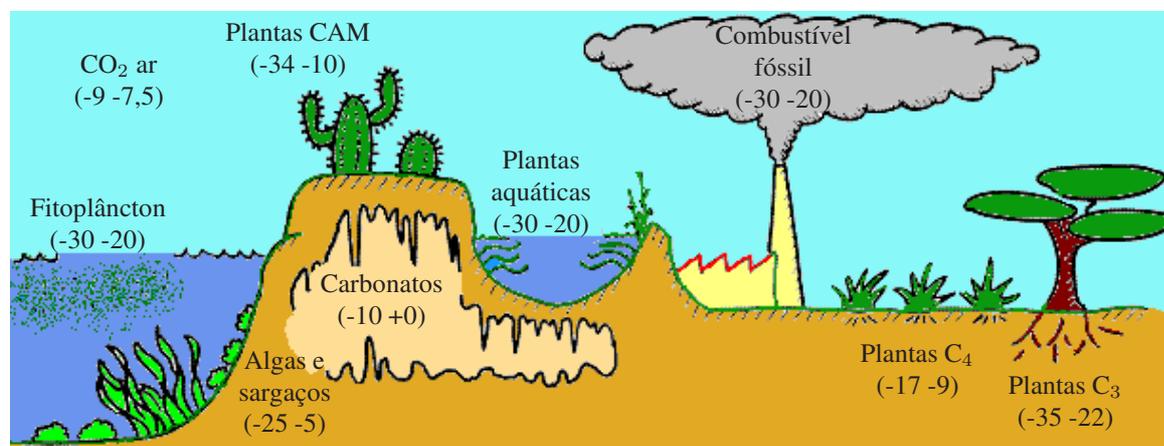
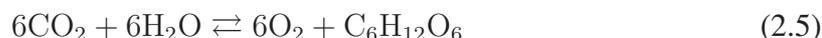


Figura 2.1: Variação da composição isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) no ambiente e na biosfera (adaptado de [http://web.udl.es/usuarios/x3845331/invest_copia\(1\).htm](http://web.udl.es/usuarios/x3845331/invest_copia(1).htm); consultado em 12/06/2006).

pico são a assimilação do carbono pelos organismos vivos e as variações entre a atmosfera e a hidrosfera. Enquanto que o primeiro fenómeno provoca um empobrecimento em ^{13}C , o outro produz um enriquecimento em ^{13}C . Um terceiro processo que se produz em menor escala, mas com muito interesse é o fraccionamento ligado aos metabolismos dos vegetais e animais.

No caso das plantas, é a assimilação do dióxido de carbono feito por elas para realizar a fotossíntese (equação 2.5) que produz fraccionamento isotópico,²⁵



O carbono-13 do CO_2 atmosférico sofre, principalmente, fraccionamento durante a formação dos açúcares. Durante a fotossíntese a formação das ligações C-C é favorecida para os átomos de carbono mais leves e portanto com maior mobilidade. Desta forma os produtos orgânicos derivados das plantas (celulose, açúcares, metabolitos secundários) são mais empobrecidos em ^{13}C e terão valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais baixos que o CO_2 atmosférico, $\delta^{13}\text{C}$ plantas $< -7 \text{‰}$ (em relação ao padrão Pee Dee Belemnite, PDB, especificado no ponto 4.7.1.2).

Foram identificados e caracterizados três ciclos fotossintéticos principais com base nos diferentes modos de assimilação do CO_2 nomeadamente, o ciclo de Calvin, o ciclo de Hatch-Slack e o ciclo do Metabolismo Ácido das Crassuláceas, CAM (Crassulacean Acid Metabolism) que por sua vez designam os diferentes tipos de plantas tais como plantas C_3 , C_4 e CAM.^{26,27} Estes 3 grupos de plantas caracterizam-se por possuírem valores de $\delta^{13}\text{C}$ bem distintos.

A Figura 2.1 apresenta a variação da composição isotópica dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ no ambiente e na biosfera. A Tabela 2.2 mostra exemplos de plantas mais comuns nos três grupos descritos, C_3 , C_4 e CAM. Cerca de 95 % das plantas pertencem ao grupo das plantas C_3 e menos de 1 % ao grupo das plantas C_4 . Seguidamente descrevem-se de forma sucinta cada um destes ciclos fotossintéticos.

Nas plantas superiores, praticamente todo o dióxido de carbono é assimilado através de uma única via - o ciclo redutor das pentoses - cuja sequência de reacções foi esclarecida por Calvin e seus colaboradores e daí ser também conhecido por ciclo de Calvin,²⁸ ciclo de Calvin-Benson ou ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Figura 2.2). As plantas que seguem este metabolismo de assimilação do CO_2 designam-se por plantas do tipo C_3 porque o dióxido de carbono fixado forma um composto intermediário com 3 átomos de carbono. O CO_2 atmosférico, uma vez dentro do citoplasma, combina-se com a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP) pela acção da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase (ou RuBisCO) e na presença de luz, produzindo duas moléculas de ácido fosfoglicérico (primeiro produto estável sintetizado). É este composto de 3 átomos de carbono que dá o nome ao mecanismo de C_3 .

O ciclo C_3 é típico de espécies originárias de zonas frias ou temperadas, ver exemplos na Tabela 2.2. Estas mostram uma gama de variação de $\delta^{13}\text{C}$ compreendida entre -23 e -40 ‰.

Outra via de fixação do CO_2 é a via dos ácidos dicarboxílicos em C_4 , também conhecida por ciclo C_4 (pois os primeiros compostos intermediários sintetizados a partir do CO_2 são constituídos por 4 átomos de carbono, por analogia com o ciclo C_3), e por ciclo de Hatch-Slack^{23,28,29}(Figuras 2.3 e 2.4).

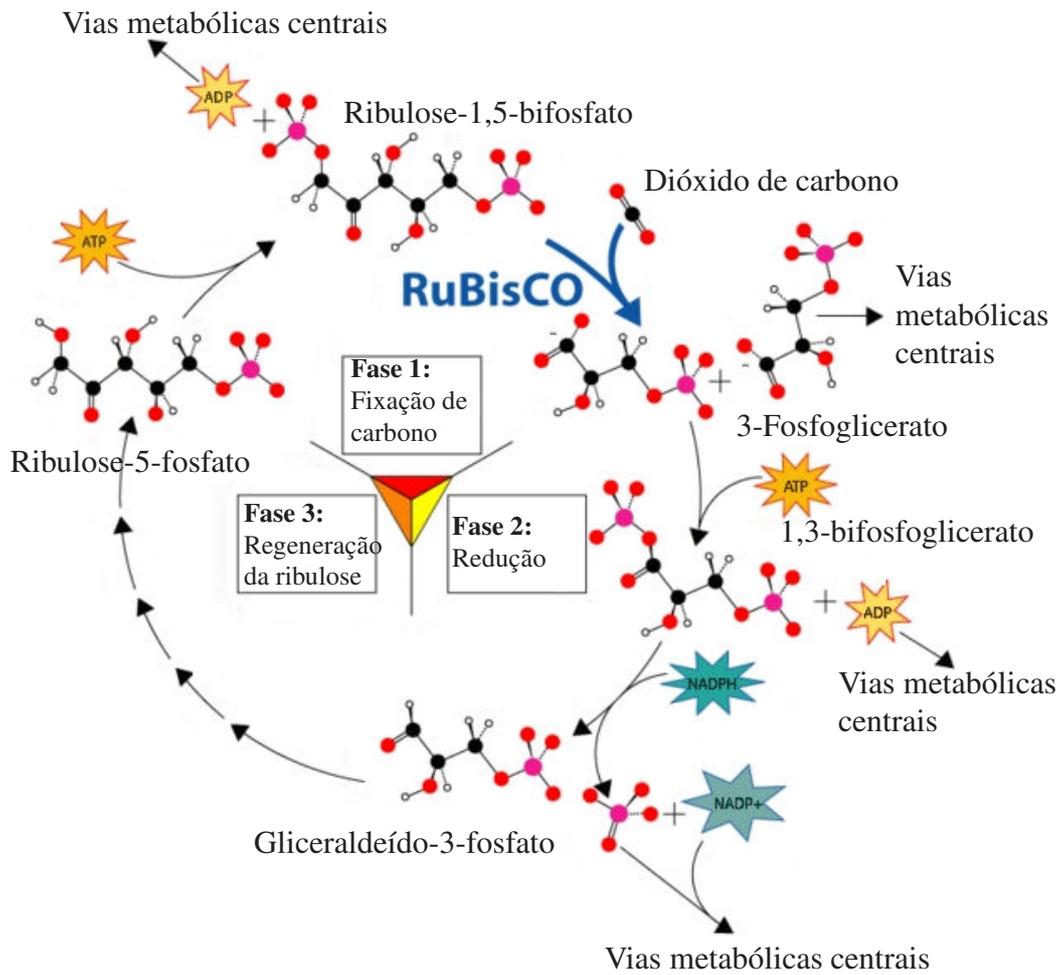


Figura 2.2: Esquema simplificado do ciclo de Calvin, plantas do tipo C_3 (adaptado de <http://fig.cox.miami.edu/cmallery/150/phts/reverse2.htm>; consultado em 15/01/2008).

Tabela 2.2: Exemplos de plantas mais comuns nos três grupos descritos, C_3 , C_4 e CAM e respectivas gamas das razões isotópicas de $\delta^{13}C$.²⁸

Fracionamento Isotópico, $\delta^{13}C$		
Plantas tipo C_3 -23 a -40 ‰	Plantas tipo C_4 -9 a -19 ‰	Plantas CAM -9 a -40 ‰
Beterraba, trigo, amendoim, cevada, batata, ameixa, uva, arroz, centeio, soja, feijão, girassol	Cana de açúcar, milho, milho-paíção, sorgo	Agave, ananás, cacto, baunilha

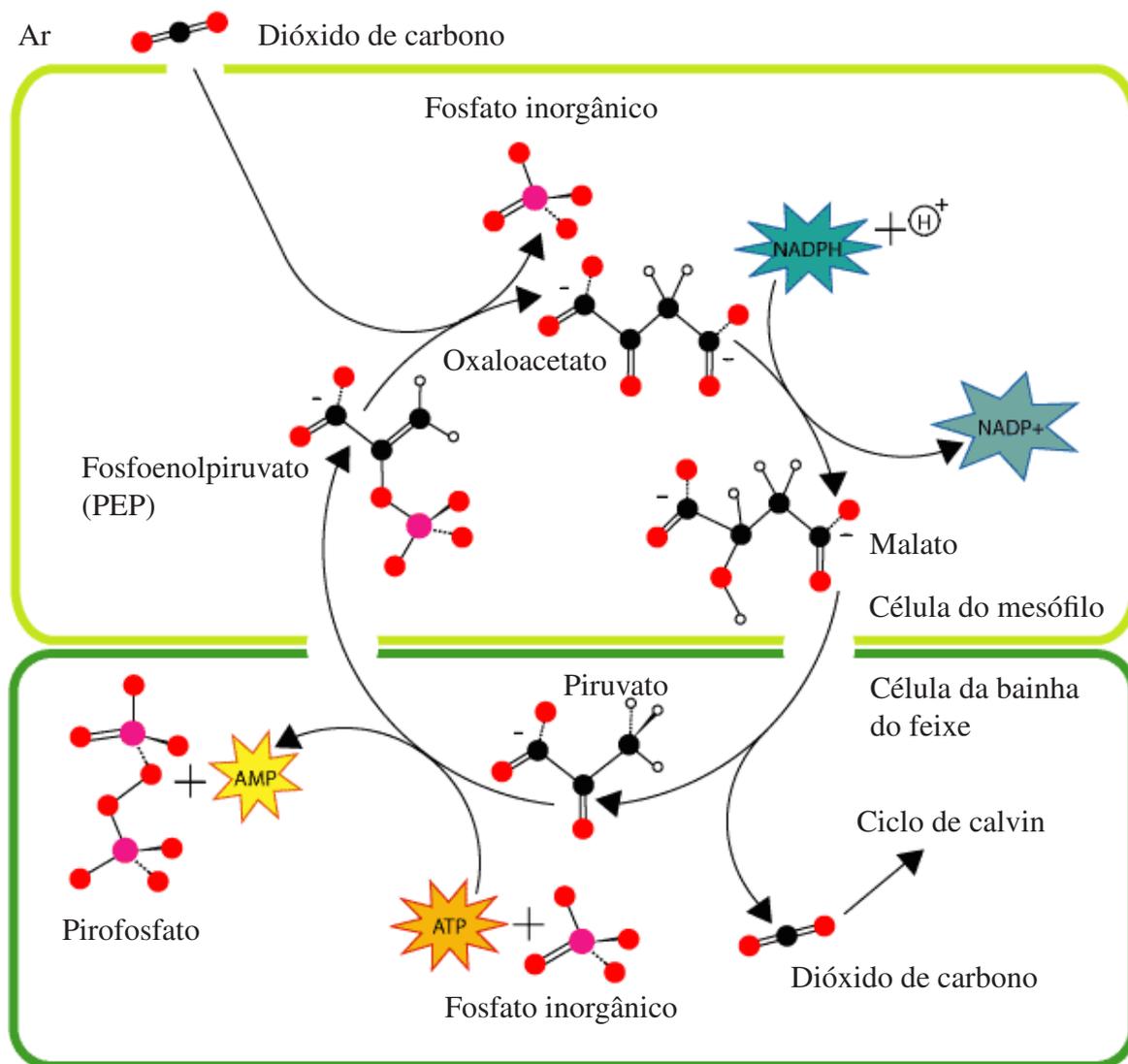


Figura 2.3: Esquema representativo do ciclo de Hatch-Slack, plantas do tipo C₄ (adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/C4_carbon_fixation; consultado em 23/02/2008).

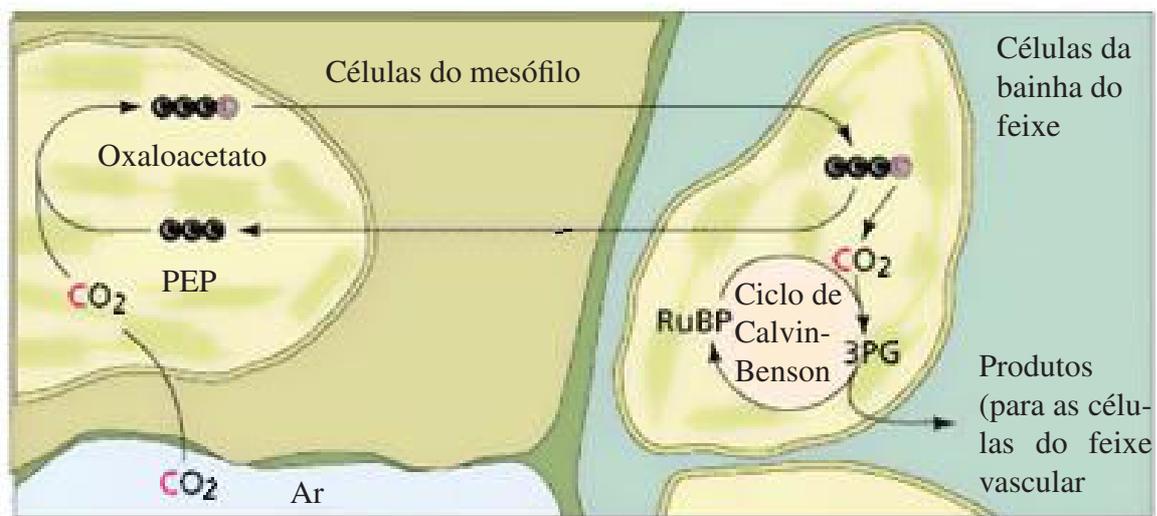


Figura 2.4: A fotossíntese das plantas do tipo C_4 envolve a separação, no espaço e no tempo, da fixação do dióxido de carbono e da síntese dos hidratos de carbono (adaptado de <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm>; consultado em 11/01/2008).

A fixação inicial do CO_2 atmosférico sob a acção do fosfoenolpiruvato (PEP)–carboxilase, conduz à formação do ácido oxaloacético que é imediatamente convertido nos ácidos málico e aspártico. Estes ácidos (com 4 átomos de carbono) são de seguida descarboxilados e o CO_2 armazenado nas paredes celulares, é libertado e depois recuperado pela RuBP para seguir o ciclo de Calvin. Os dois ciclos, a fixação do CO_2 e o ciclo de Calvin ocorrem em diferentes tipos de células como se pode observar na Figura 2.4. A fixação do dióxido de carbono dá-se nas células do mesófilo e o ciclo de Calvin ocorre nas células da bainha.^{23,29} As plantas que utilizam este mecanismo são designadas por plantas do tipo C_4 .

As plantas do tipo C_4 são principalmente originárias de climas tropicais.³⁰ Embora existam em minoria, as plantas C_4 são das espécies mais intensivamente cultivadas pelo Homem. Estas plantas são bastante mais enriquecidas em carbono-13 que as plantas tipo C_3 e apresentam valores compreendidos entre -9 ‰ e -19 ‰.

Finalmente, o terceiro grupo de plantas vulgarmente conhecido por CAM (Crassulacean Acid Metabolism) possuem as mesmas enzimas que as plantas do grupo C_3 e C_4 mas alternam estes mecanismos durante a noite e o dia. Durante a noite o CO_2 é inicialmente fixado pela PEP-carboxilase em ácidos C_4 e durante o dia o CO_2 libertado vai fixar-se na RuBP segundo o ciclo das plantas C_3 , Figura 2.5.

Assim, será de esperar que as plantas CAM que fixam o CO_2 atmosférico quase exclusivamente durante a noite, via a PEP-carboxilase, apresentem valores de $\delta^{13}\text{C}$ semelhantes aos valores das plantas C_4 , ao passo que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das plantas em que a contribuição da fixação do CO_2 durante a noite é pequena, assemelhar-se-ão aos das plantas do tipo C_3 .³¹

As plantas mais conhecidas pertencentes ao grupo das CAM crescem em locais desér-

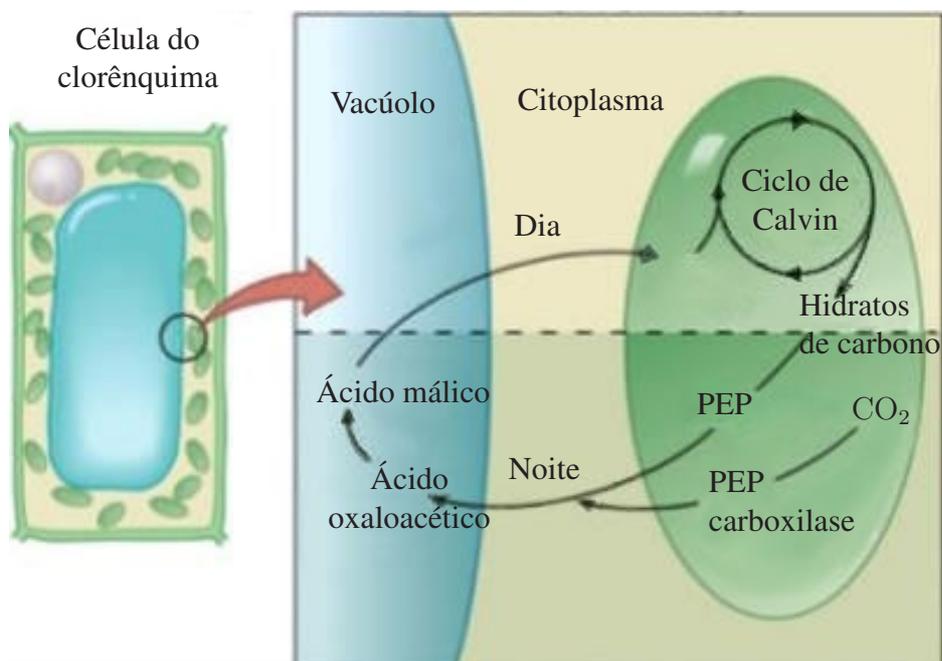


Figura 2.5: Representação do processo de fotossíntese nas plantas CAM (adaptado de <http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio111/metabolism.htm>; consultado em 22/02/2008).

ticos de que são exemplo os cactos. Outras plantas típicas CAM são o ananás e a baunilha. Como será de esperar o intervalo de valores de $\delta^{13}\text{C}$ é mais amplo e sobrepõe-se com os intervalos das plantas C_3 e C_4 abrangendo um intervalo de -40 ‰ a -9 ‰.²⁸

Estes grupos de plantas, distinguem-se pelas diferenças de conformação dos tecidos foliares representados nas Figuras 2.6 e 2.7 para as plantas do tipo C_3 e C_4 respectivamente.

A disponibilidade da água, a humidade relativa, a temperatura, são outros factores que influenciam a composição isotópica das plantas, na medida em que podem intervir na abertura dos estomas. Situações de seca provocam nas plantas C_3 um fechamento dos estomas (“stress” hídrico), conduzindo a um enriquecimento isotópico. O mesmo efeito nas plantas tipo C_4 provoca o oposto.

É importante acrescentar que a composição isotópica do CO_2 atmosférico, ao qual se atribuiu um valor médio de -7 ‰, pode variar ligeiramente de local para local. É o caso das florestas densas, onde o valor de $\delta^{13}\text{C}$ pode descer a cerca de -11 ‰ devido à contribuição do dióxido de carbono resultante da decomposição da matéria orgânica.

Nas grandes cidades com elevada população, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ pode diminuir mais ainda (cerca de 2-8 ‰) pois o CO_2 proveniente dos combustíveis fósseis (petróleo) é mais pobre em carbono-13 e a sua contribuição faz baixar o valor total de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 das vilas e centros industriais e por conseguinte influencia a composição isotópica das plantas que crescem nas cercanias.

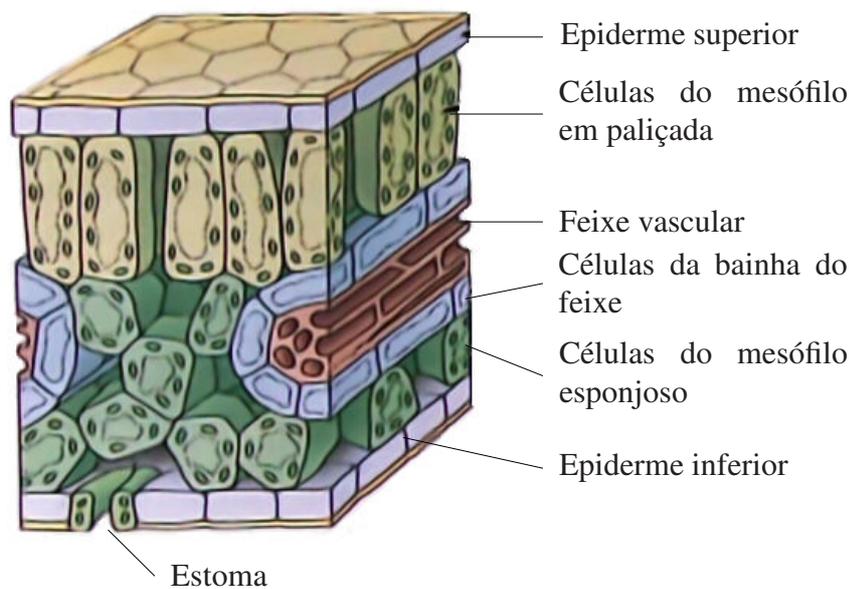


Figura 2.6: Fisiologia do tecido foliar de uma planta do tipo C_3 (adaptado de <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm>; consultado em 19/02/2008).

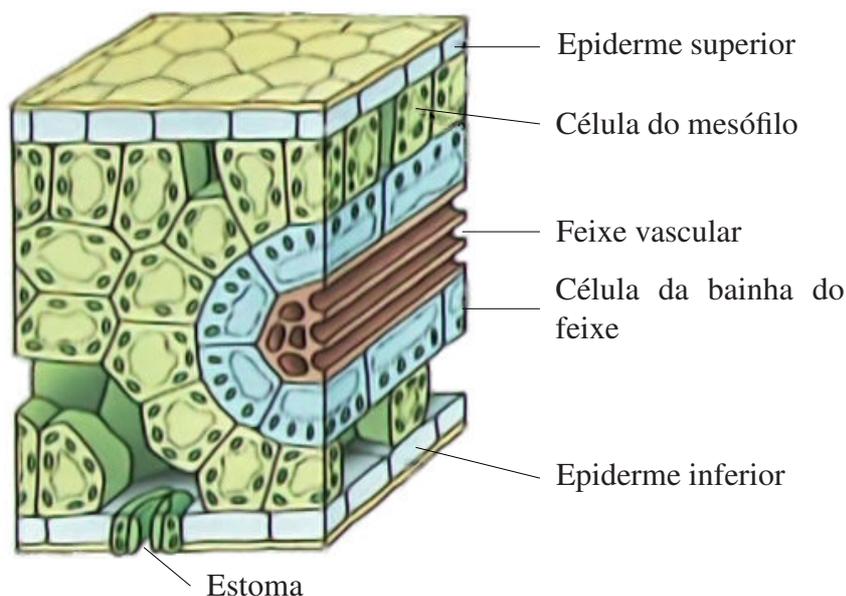


Figura 2.7: Fisiologia do tecido foliar de uma planta do tipo C_4 (adaptado de <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/BotanicalSciences/Photosynthesis/Photosynthesis/Photosynthesis.htm>; consultado em 19/02/2008).

A Figura 2.8 representa um modelo do fracionamento isotópico do carbono na dieta à base de plantas dos tipos C_3 , C_4 e CAM e o fracionamento isotópico do carbono entre a dieta e os diferentes tecidos de mamíferos herbívoros (nível trófico ou nível de nutrição). *E.g.*, os valores de $\delta^{13}C$ de mamíferos e de aves cuja alimentação é conhecida, a diferença

de $\delta^{13}\text{C}$ entre o colagénio e a dieta é de cerca de +5 ‰. Esta diferença poderá indicar que a composição isotópica do colagénio é mais controlada por componentes particulares da alimentação, tais como as proteínas, que pela alimentação como um todo. Deste modo é possível traçar o tipo de alimentação em fósseis de animais.³² O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ do CO_2 atmosférico revela também variações ao longo dos anos.

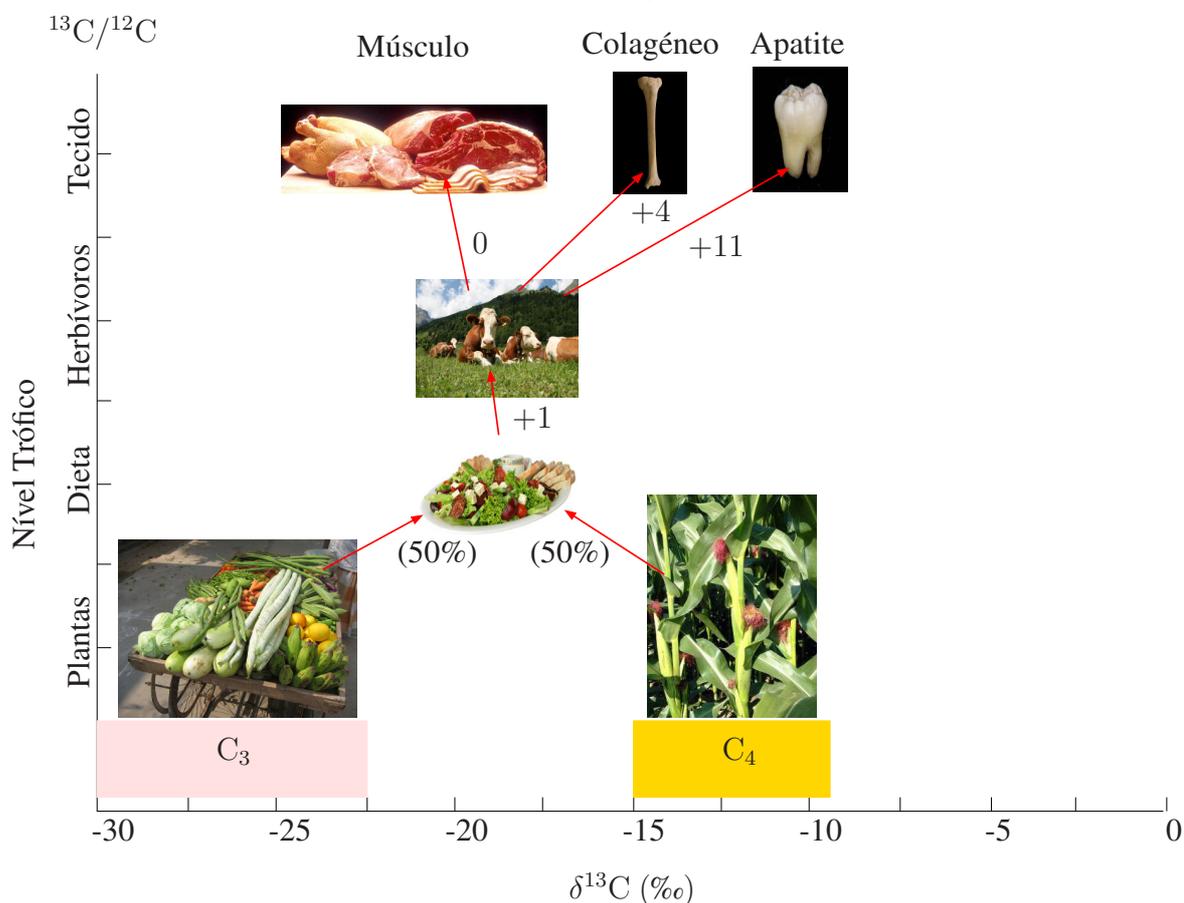


Figura 2.8: Modelo do fracionamento isotópico de ^{13}C na dieta, *e.g.*, à base das plantas do tipo C_3 e C_4 , e o fracionamento do carbono entre a dieta e os diferentes tecidos de mamíferos herbívoros³² (figura adaptada).

A Figura 2.9 mostra a composição isotópica do carbono para alguns materiais e padrões.³³

2.3 Oxigénio e Deutério e a Origem Geográfica

O oxigénio é o elemento mais abundante no planeta quer no mundo orgânico quer no mundo inorgânico. As águas marinhas e meteóricas (termo da geologia para designar a água da chuva) constituem o único reservatório de hidrogénio e uma parte do oxigénio do planeta e assim, estes dois elementos têm um destino comum. São também os mesmos processos que fraccionam os seus isótopos estáveis pesados, ^2H e ^{18}O .

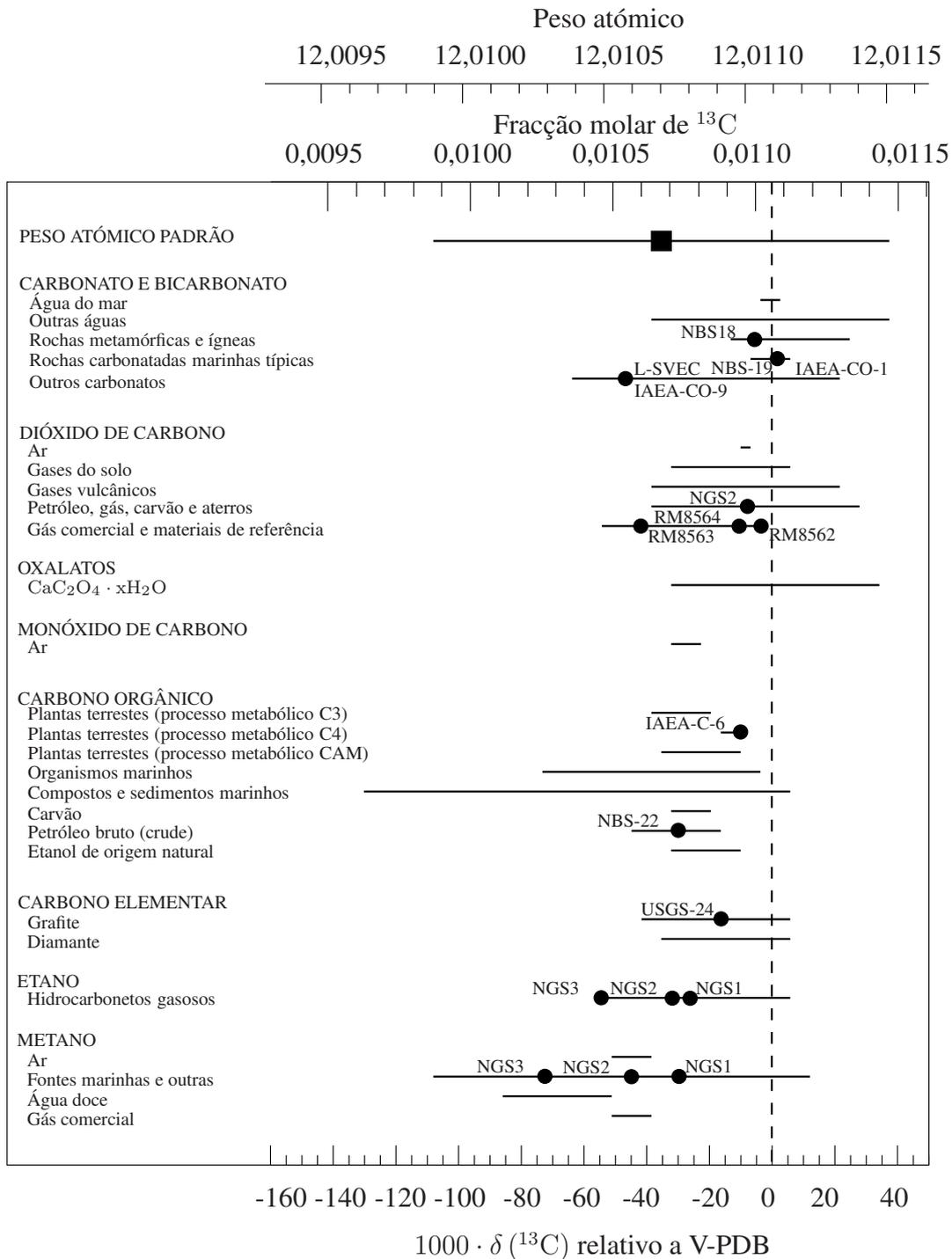


Figura 2.9: Composição isotópica do carbono e o peso atômico de alguns materiais que contêm carbono³³ (figura adaptada). Indicam-se os termos originais que constam dos trabalhos referidos, em que algumas das expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas.

As Figuras 2.10 e 2.11 mostram as variações naturais dos isótopos de oxigénio e de hidrogénio relativamente a SMOW, respectivamente.

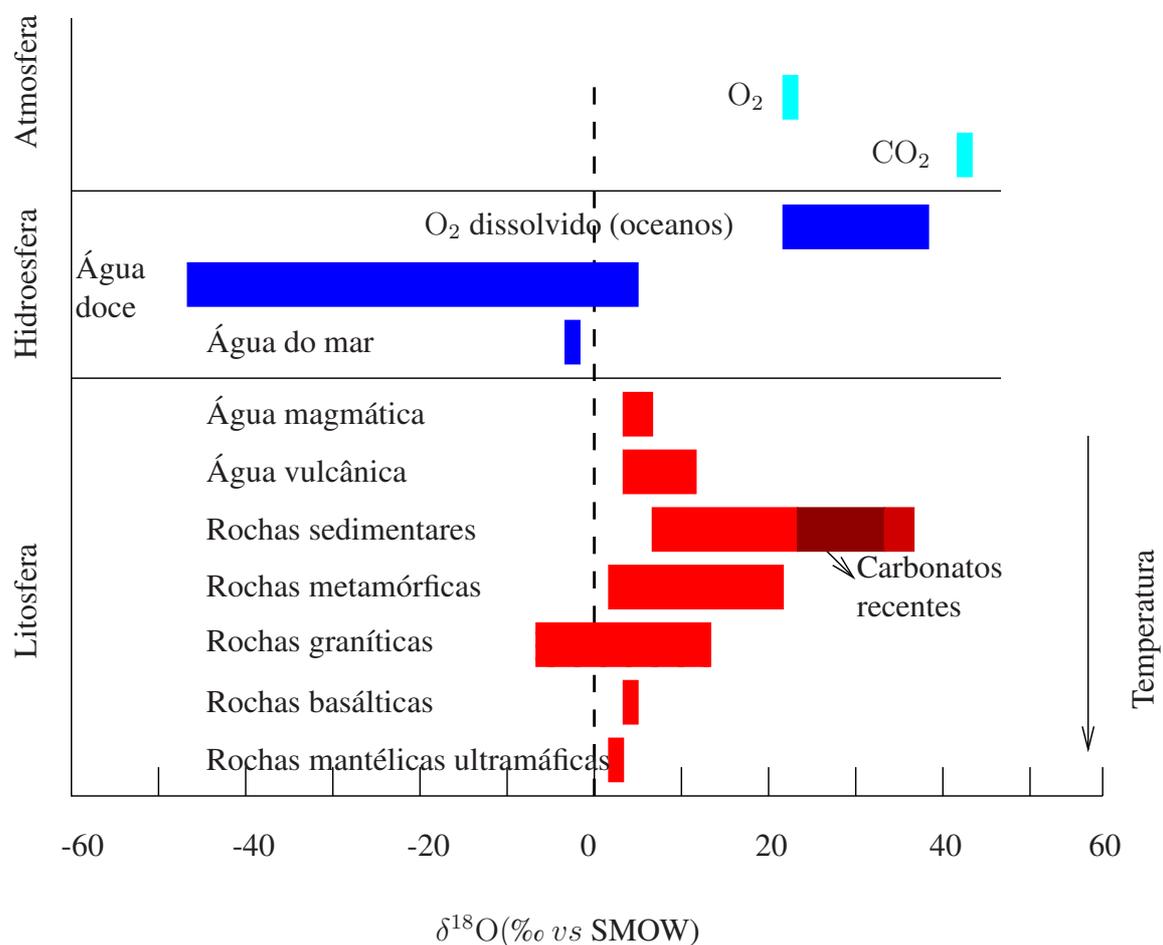


Figura 2.10: Variação natural dos isótopos de oxigénio relativamente a SMOW (adaptado de <http://geoweb.tamu.edu>; consultado em 07/05/2007). Indicam-se os termos originais que constam dos trabalhos referidos, em que algumas das expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas, *e.g.*, carbonatos recentes (modern carbonates), água magmática (magmatic water).

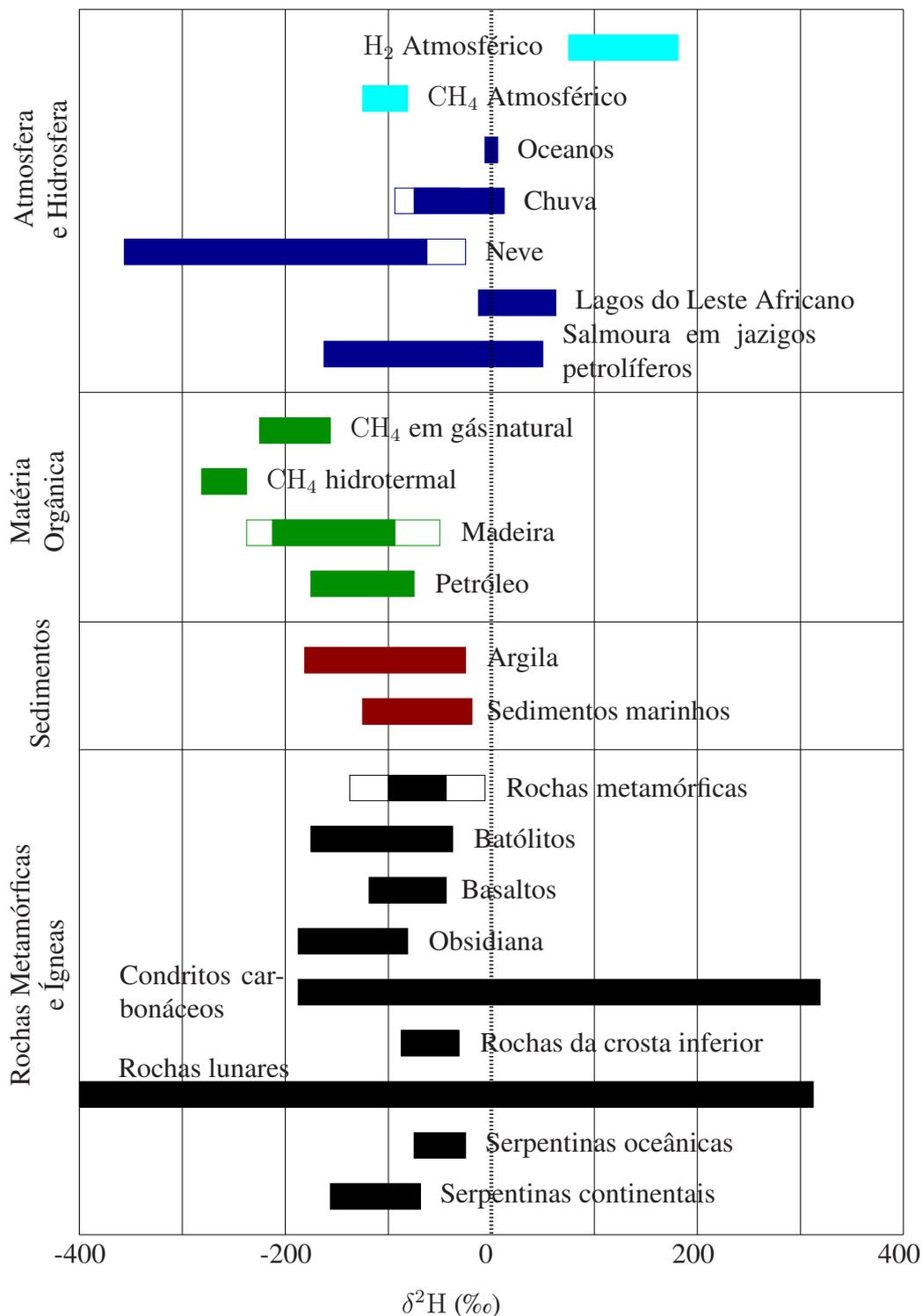


Figura 2.11: Variação natural dos isótopos de hidrogénio relativamente a SMOW (adaptado de <http://geoweb.tamu.edu>; consultado em 12/12/2007). As seguintes expressões são apresentadas de forma simplificada, como melhor se adapta a este tipo de tabelas genéricas, mas incluem-se os termos originais que constam da referência: Salmoura em jazigos petrolíferos (oil field brines) e serpentinas oceânicas e continentais (oceanic e continental serpentines) que é diferente da rocha serpentinito.

Em 1961 Craig^{16,34} verificou que havia diferenças nos teores de oxigénio-18 relativamente ao oxigénio-16 nas águas provenientes de diferentes zonas do globo.

O fraccionamento cinético destes isótopos é muito semelhante ao do carbono ou seja, observa-se fraccionamento devido à maior velocidade de difusão das moléculas mais leves.

A maior diferença foi detectada entre a água oriunda da região equatorial e a água originária dos pólos. Os teores dos dois isótopos nestas águas é determinado pela extensão do fraccionamento durante os processos de evaporação e de condensação. O isótopo mais leve evapora mais rapidamente no Equador e quando esta água condensa e finalmente cai, na forma de chuva, a altitudes mais altas está já empobrecida no isótopo de oxigénio mais pesado.

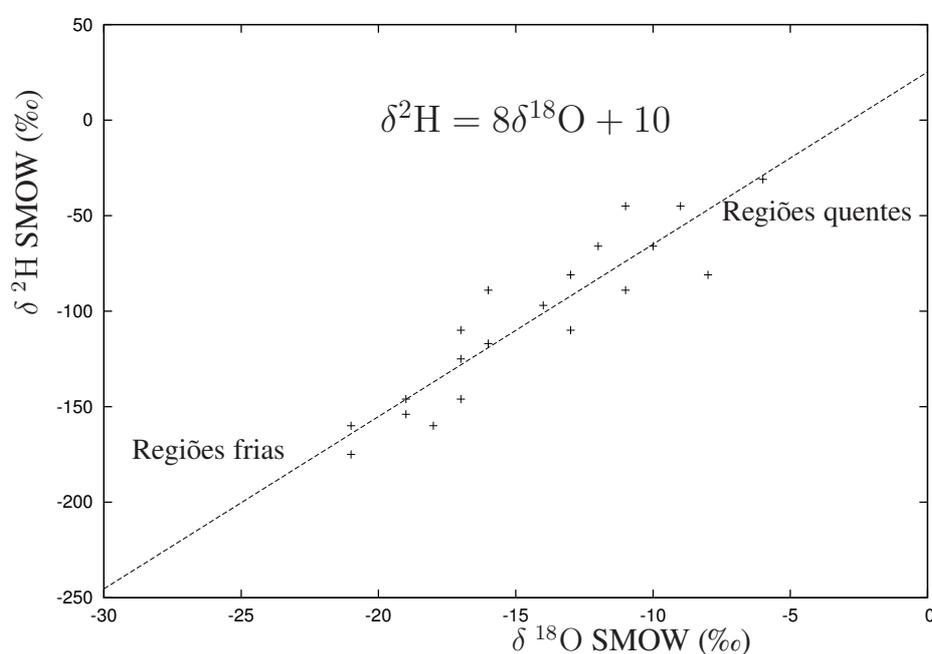


Figura 2.12: Linha meteórica da água. As regiões quentes são caracterizadas por valores mais positivos de valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ e as regiões mais frias por valores mais negativos. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ são reportados ao padrão SMOW (adaptado de <http://www.biology.duke.edu/bio265/jlh/abiotic/html>; consultado em 13/03/2008).

A relação entre $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nas águas naturais do globo segue uma relação linear previsível de acordo com a seguinte equação,^{16,34}

$$\delta^2\text{H} = 8\delta^{18}\text{O} + 10 \quad (2.6)$$

como se mostra na Figura 2.12. Esta relação é designada como 'linha meteórica da água'. Desvios a esta relação podem revelar perturbações no ciclo hidrológico. As variações nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ das águas dos oceanos e nas calotas polares, têm sido utilizadas para inferir sobre as variações climáticas há milhares de anos atrás. A principal causa de fraccionamento da água e dos seus isótopos está relacionada com a mudança de estado físico, entre as fases líquida e vapor, por evaporação e condensação. Simplificando: os isótopos mais pesados

são mais dificilmente extraídos da fase líquida até à fase gasosa e, além disso, condensam mais facilmente. Por outro lado, os equilíbrios de fase são influenciados pela temperatura.

Por conseguinte, a variabilidade dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ das águas meteóricas está ligada com os ciclos de evaporação dos oceanos e com as condensações sucessivas que originam as precipitações. A composição isotópica da água oceânica, de -1 a 0,7 ‰,³⁵ é próxima do padrão de referência Vienna-Standard Mean Ocean Water, V-SMOW, para o qual se estipulou valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ de zero ‰ (ver Capítulo 4).

Provocado pela influência da temperatura, pode constatar-se um ‘efeito de latitude’ no fraccionamento: quanto maior a proximidade dos pólos, maior o empobrecimento das águas meteóricas em oxigénio-18 e em hidrogénio-2 (valores de $\delta^{18}\text{O}$ -30 ‰ na Antártida como mostra a Figura 2.13).

A Figura 2.14 mostra o efeito directo da temperatura na variabilidade dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ nas massas de água evaporadas dos mares.

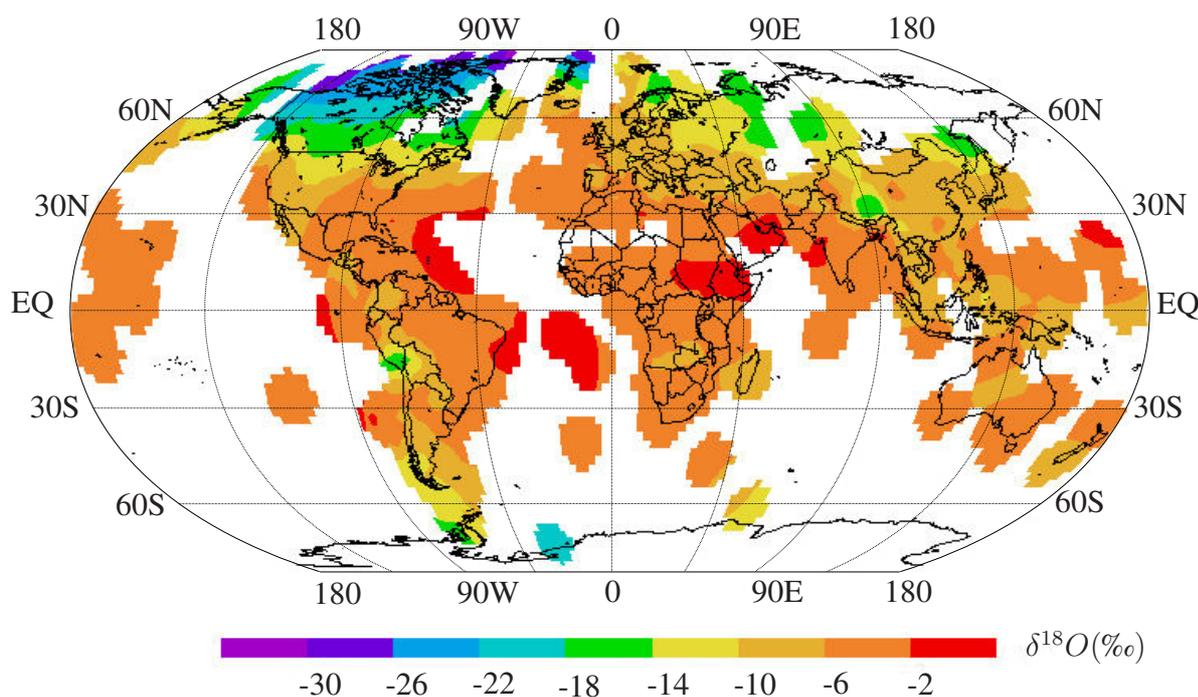


Figura 2.13: Distribuição da média ponderada anual dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação no globo terrestre (adaptado de GNIP Maps and Animations, IAEA, Vienna (2001), em <http://isohis.iaea.org>; consultado em 28/04/2008).

No ciclo hidrológico da água (representado na Figura 2.15) os processos típicos de evaporação e de condensação transmitem-lhe ‘impressões digitais’ isotópicas que permitem prever a composição isotópica da água de determinadas zonas do globo.³⁶ E.g., para maiores

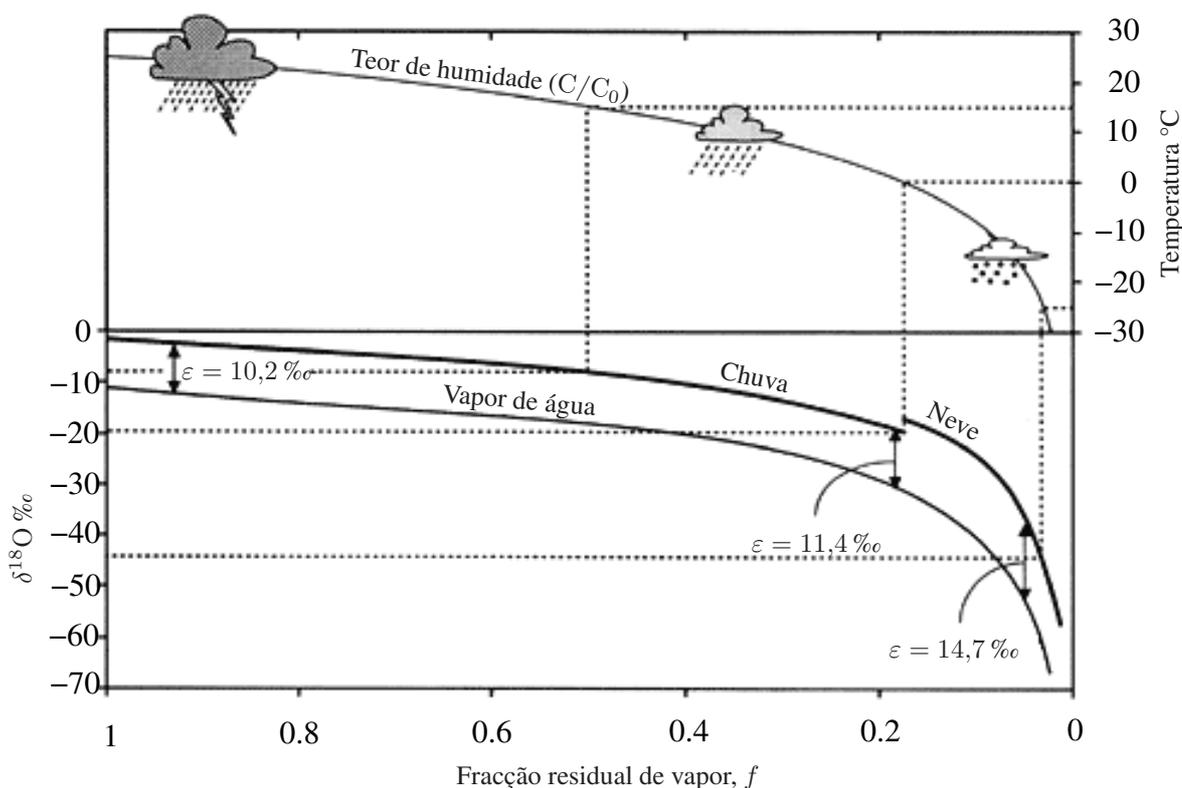


Figura 2.14: Variação no teor de $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação com um valor inicial de $\delta^{18}\text{O}_{\text{vapor}} = -11 \text{‰}$ à temperatura de 25 °C e um valor final de temperatura de -30 °C . A 0 °C o fracionamento isotópico entre a neve e o vapor de água substitui o fracionamento entre a precipitação e o vapor. As linhas a tracejado ligam $\delta^{18}\text{O}$ da precipitação com a temperatura de condensação. ϵ é o factor de enriquecimento³⁵ (figura adaptada).

altitudes as temperaturas decrescem pelo que a ‘marca’ isotópica da origem da água resulta mais negativa, *i.e.*, mais empobrecida em $\delta^{18}\text{O}$. Para latitudes mais elevadas, à medida que se caminha para os pólos, observa-se igualmente um decréscimo nos teores de oxigénio-18 da água, neste caso, devido ao decréscimo de insolação e ao abaixamento da temperatura. Os desvios ao ‘efeito latitude’ são provocados pelo ‘efeito continental’ como mostra a Figura 2.16. O ‘efeito continental’ diz respeito às massas de água que, ao deslocarem-se da superfície do mar em direcção ao continente, sofrem os efeitos da topografia e as características específicas do clima. O resultado é que as precipitações ao longo das cotas marítimas são enriquecidas nos isótopos mais pesados em relação às regiões continentais, mais frias (empobrecimento médio em $\delta^{18}\text{O}$ de aproximadamente $-2,8 \text{‰}$ para cada 1000 km de distância das cotas).

Uma outra contribuição geográfica para o fracionamento, é o ‘efeito da altitude’. Uma vez no interior do continente, as massas de água empobrecem ainda mais em $\delta^{18}\text{O}$, aproximadamente $-0,15 \text{‰}$ a $-0,5 \text{‰}$ por cada aumento de 100 m de altitude.

A variação dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^2\text{H}$ provocada pela mudança das estações não é

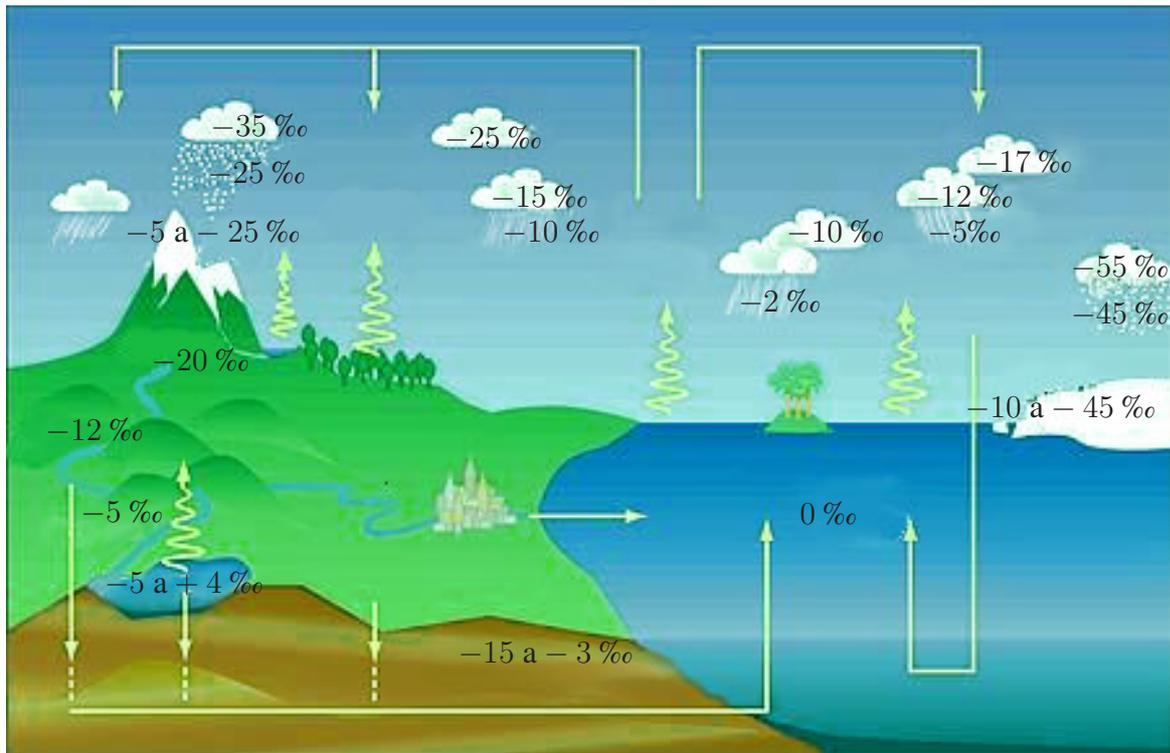


Figura 2.15: Esquema simplificado do fracionamento isotópico do oxigênio no ciclo global da água (adaptado de <http://www.leo.lehigh.edu/>; consultado em 17/07/2007).

de todo negligenciável. No período mais quente e seco, o aumento da temperatura conduz a um enriquecimento dos isótopos pesados, principalmente nas zonas continentais.

As águas subterrâneas têm uma composição isotópica semelhante à média anual das precipitações, dependem de factores geográficos (altitude, latitude, distância dos oceanos ou continentalidade) mas não de factores sazonais. A Figura 2.17 representa os principais processos de fracionamento e valores típicos de $\delta^{18}\text{O}$ num clima temperado.

O fracionamento isotópico durante as transições de fase (vapor-líquido-sólido) é dependente da temperatura.

A razão $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água presente nas plantas está, em geral, dependente do local onde a planta cresce, da latitude, dos padrões da chuva e em particular da difusão através das membranas e da evaporação na fronteira folha/ar. No último caso, o isótopo mais leve é perdido preferencialmente e a água torna-se enriquecida no isótopo mais pesado relativamente à água subterrânea. O conhecimento da composição isotópica da água com diferentes origens pode ajudar os fisiologistas a determinar a origem da água utilizada pelas plantas.

No caso dos isótopos de oxigênio e de hidrogênio presentes em várias moléculas, as proporções específicas destes isótopos são dependentes principalmente das condições climáticas e geográficas e, não da origem botânica, contrariamente ao carbono, pelo que estes isótopos são fundamentais na investigação da origem geográfica.³⁷

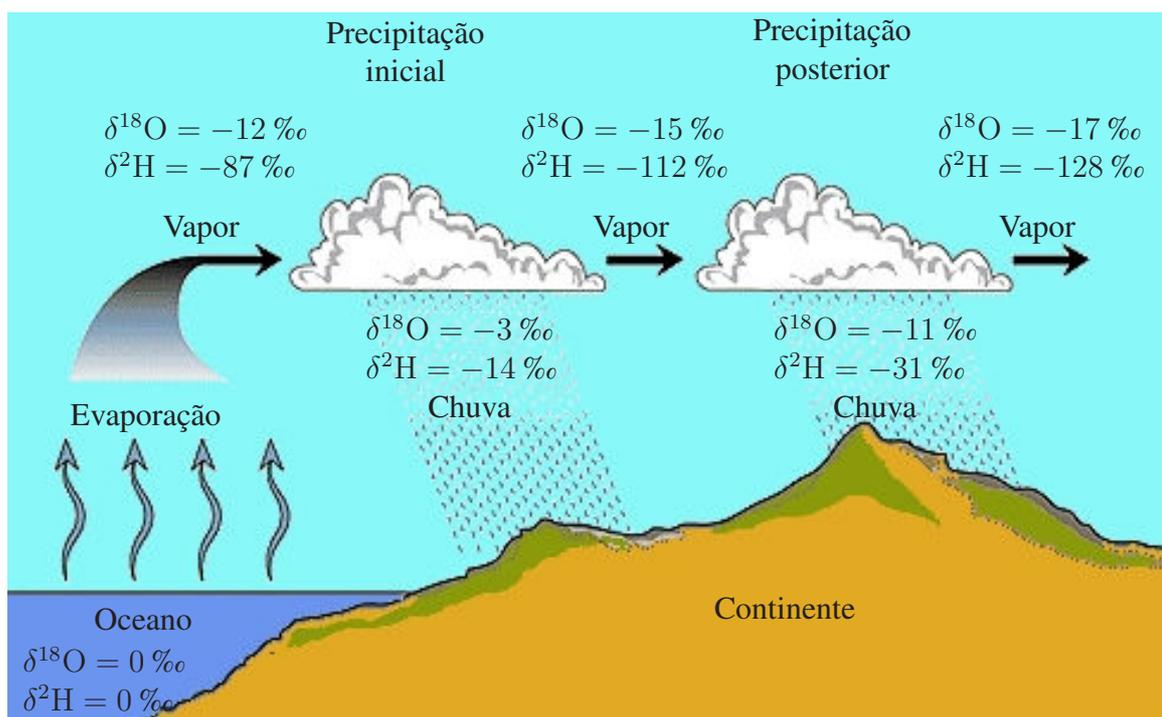


Figura 2.16: Esquema representativo do ‘efeito continental’. Fraccionamento isotópico de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^2\text{H}$ da precipitação quando se afasta do oceano em direcção ao continente (adaptado de <http://www.sahara.arizona.edu/programs/isotopes/oxygen.html>; consultado em 01/04/2008).

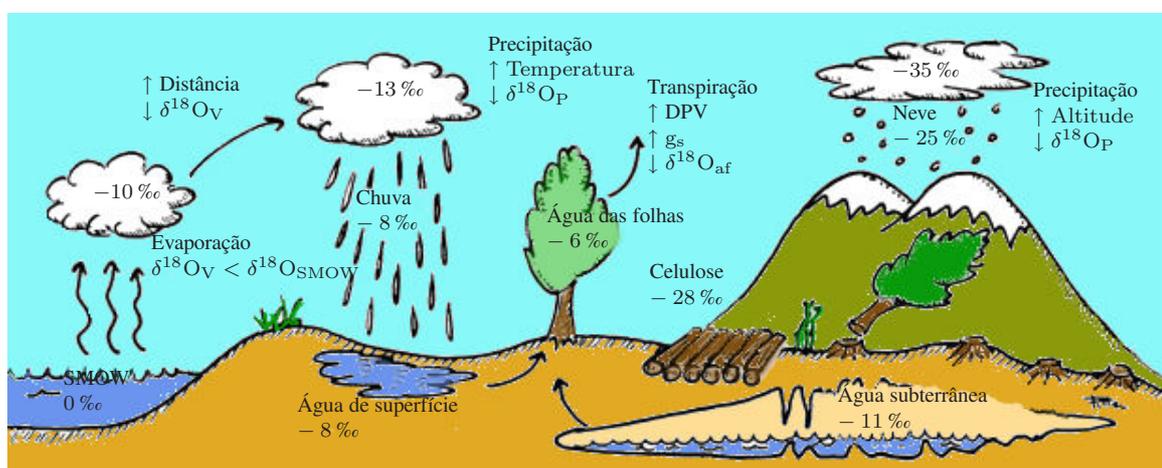


Figura 2.17: Principais processos de fraccionamento e valores típicos de $\delta^{18}\text{O}$ num clima temperado. $\delta^{18}\text{O}_{\text{V}}$, $\delta^{18}\text{O}_{\text{P}}$ e $\delta^{18}\text{O}_{\text{af}}$ correspondem aos valores de $\delta^{18}\text{O}$ no vapor de água, na precipitação (chuva ou neve) e água das folhas, respectivamente; DPV, o défice da pressão de vapor e g_s a conductância estomatal (adaptado de [http://web.udl.es/usuarios/x3845331/invest_copia\(1\).htm](http://web.udl.es/usuarios/x3845331/invest_copia(1).htm); consultado em 01/04/2008).

As plantas utilizam as águas de superfície que resultam da precipitação, de rios ou das

infiltrações nos solos. Como consequência, pode-se esperar que os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ da água vegetal sejam um marcador da origem geográfica de um género alimentício.

É importante assinalar que no caso do oxigénio as plantas também utilizam como fontes o CO_2 e o O_2 do ar. Contudo, estas duas fontes têm valores de $\delta^{18}\text{O}$ praticamente constantes, de +40,3 ‰ a +42,5 ‰, de acordo com a latitude e a altitude, para o CO_2 e de +23,5 ‰ a +23,8 ‰ para o O_2 pelo que o teor de $\delta^{18}\text{O}$ da água das plantas apenas será, em princípio, influenciado pela água absorvida pelas raízes.³⁸

2.4 Azoto e a sua Variabilidade na Natureza

O reservatório natural do azoto, N_2 , é o azoto molecular, presente no ar atmosférico, constituindo cerca de 78 % do total. O azoto tem dois isótopos estáveis, ^{14}N e ^{15}N sendo este último apenas cerca de 0,4 % do N_2 atmosférico.

O azoto é transformado em diversas formas e estados de oxidação devido, sobretudo, a processos físicos e pela acção de microorganismos que metabolizam os compostos azotados em azoto inorgânico (nitrato e amoníaco) e azoto orgânico (aminoácidos e proteínas). O padrão de referência isotópico é o azoto molecular do ar logo, praticamente todo o azoto acessível à superfície do planeta tem o valor de $\delta^{15}\text{N}=0$ ‰. A variabilidade natural situa-se em volta deste valor como mostra a Figura 2.18.

A Figura 2.18 apresenta a distribuição de $\delta^{15}\text{N}$ na natureza de alguns compostos e padrões. Uma primeira diferenciação entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas decorre do facto de poderem fixar ou não o azoto.

Como se pode observar na Figura 2.19 enquanto as leguminosas têm valores de $\delta^{15}\text{N}$ muito próximo de zero, as espécies subterrâneas (*e.g.*, batata e cenoura) apresentam valores mais elevados, visto que as suas fontes de azoto provêm do solo, e portanto, de formas azotadas já fraccionadas, tal como os nitratos.³² A mesma figura dá também uma ideia do fraccionamento do azoto presente na cadeia trófica. À medida que se sobe nesta cadeia mais forte é o enriquecimento em ^{15}N (+3 ‰ em cada etapa). O isótopo mais leve ^{14}N , é mais fácil de eliminar logo, o ^{15}N acumula-se nos tecidos. Assim os animais carnívoros apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados que os herbívoros de que se alimentam.

Este tipo de mecanismo pode fornecer indicações sobre o regime alimentar de um animal, para despistar, *e.g.*, se na carne à venda no mercado, o animal foi criado com farinhas de origem animal, ou se foi criado em pastagem, ou ainda, se um peixe é selvagem, ou de criação em aquacultura.

O principal factor de fraccionamento na agricultura tem a ver com a prática de utilização de fertilizantes. De facto, os adubos artificiais são fabricados a partir do N_2 do ar (ureia, amoníaco, nitrato de amónio e nitrato de potássio). Estes produtos de síntese possuem teores fracos de $\delta^{15}\text{N}$, entre -0,2 ‰ e +2 ‰, enquanto que os adubos de origem animal (estrupe) apresentam teores superiores variando de +5 ‰ a +8 ‰.³⁹

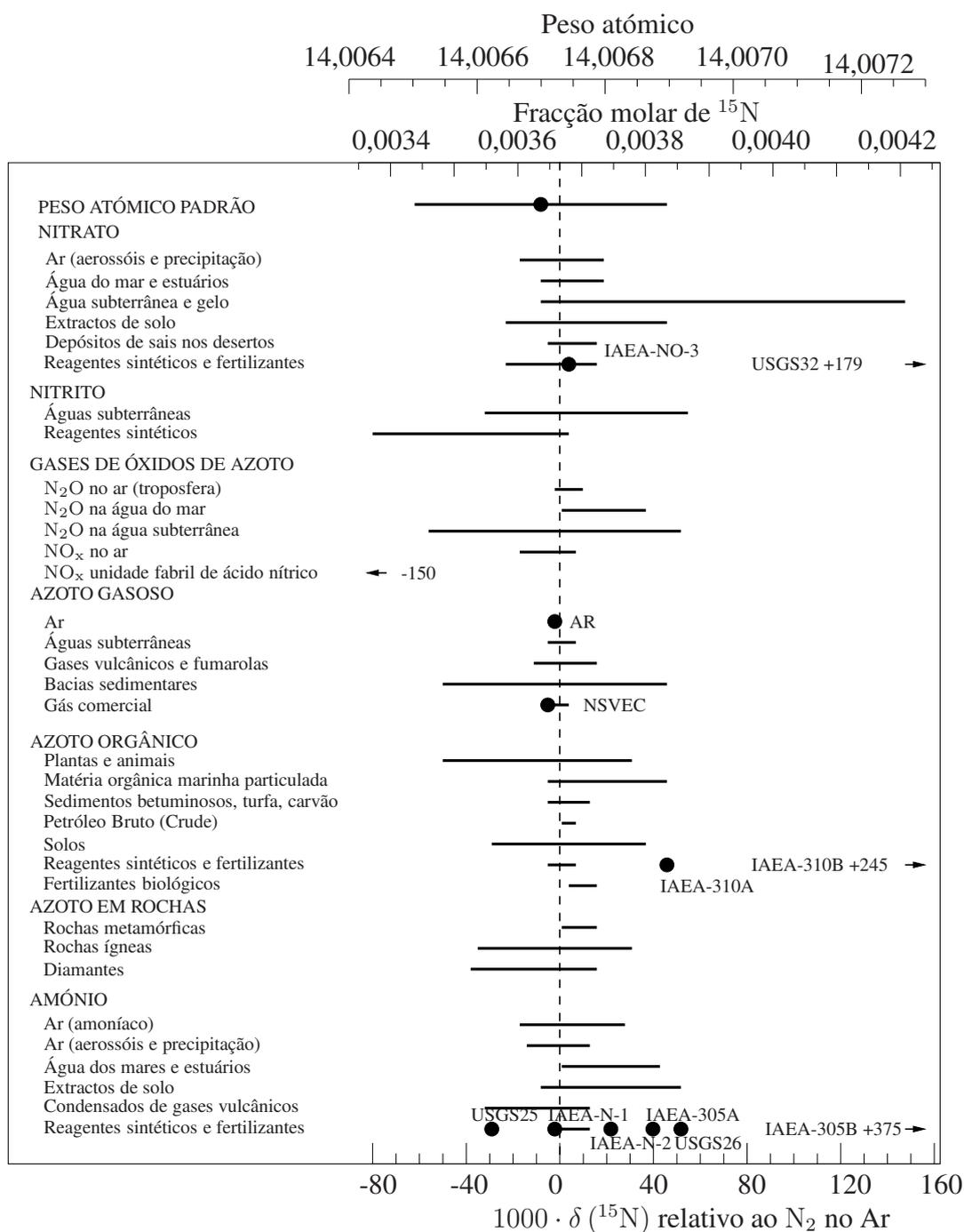


Figura 2.18: Composição isotópica de azoto de alguns compostos e padrões de referência e a sua distribuição na natureza³³ (figura adaptada).

A Figura 2.20 mostra a gama normal dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ das principais fontes de origem de nitrato. O nitrato com origem em fertilizantes à base de amoníaco, de matéria orgânica presente no solo e de estrumes de animais, mostram a sobreposição dos valores de $\delta^{18}\text{O}$ pelo que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ permitem uma melhor discriminação. Contrariamente, o nitrato com origem em fertilizantes à base de nitrato ou da atmosfera, são facilmente

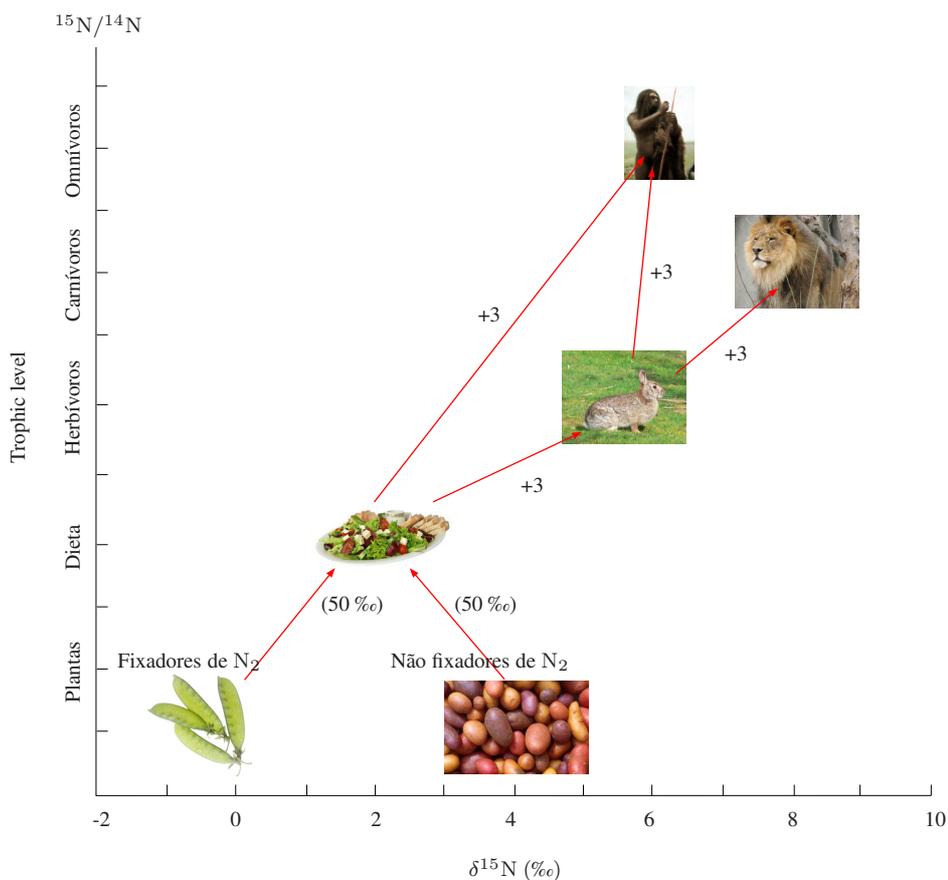


Figura 2.19: Modelo do fraccionamento do azoto nas plantas e do fraccionamento dos isótopos de azoto presente no colagénio entre diferentes níveis tróficos incluindo, herbívoros, carnívoros e omnívoros³² (figura adaptada).

discriminados do nitrato microbiano pelos valores de $\delta^{18}\text{O}$ enquanto que os valores de $\delta^{15}\text{N}$ se sobrepõem.¹⁸ Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas estão geralmente correlacionados com os valores de nitratos e de amoníaco presentes no solo da cultura respectiva.

2.4.1 Processos de Fraccionamento Isotópico do Azoto

Alguns processos que afectam a composição isotópica do azoto são os seguintes:^{18,40}

- **Fixação:** o termo fixação de N refere-se aos processos que convertem o N_2 não reactivo noutras formas de azoto, *e.g.*, a actividade bacteriana da enzima nitrogenase nas plantas leguminosas. Introduce um grau de fraccionamento de cerca -3 ‰ a +1 ‰ nas plantas leguminosas.
- **Assimilação:** a assimilação refere-se geralmente à incorporação pelos organismos e plantas, de compostos que contêm azoto (NO_x , NH_3) embora alguns investigadores vejam a fixação do azoto como uma forma especial de assimilação. Os óxidos de azoto

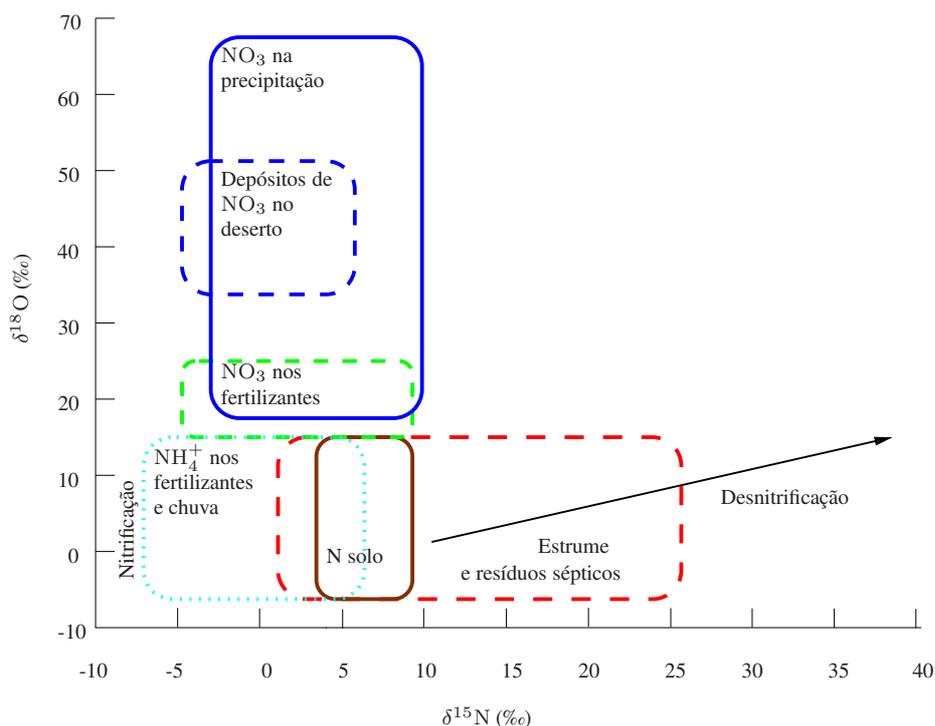


Figura 2.20: Esquema das gamas típicas de valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de nitrato com diferentes origens. A nitrificação a partir de fertilizantes seguida de precipitação e na presença de resíduos orgânicos podem originar gamas elevadas de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (adaptado de <http://www.rcamnl.wr.usgs.gov/isoig/isopubs/itchch16.html>; consultado em 03/04/2008).

são reduzidos ao ião amônio NH_4^+ e de seguida incorporados no material orgânico. A assimilação favorece a incorporação de ^{14}N e introduz um fraccionamento médio de aproximadamente $-0,5\text{‰}$. Este fraccionamento é negligenciável nas plantas.

- Resíduos animais: observa-se com frequência que os animais são ligeiramente enriquecidos em ^{15}N relativamente à sua dieta o que é normalmente expresso como uma ‘piada isotópica’ “you are what you eat plus 3 ‰” (mais ou menos em volta deste valor). Este aumento de $\delta^{15}\text{N}$ nos tecidos animais deve-se essencialmente à excreção do isótopo mais leve, ^{14}N , na urina.^{41,42}
- Plantas: os seres N-autotróficos (autotrófico designa um ser vivo que produz o seu próprio alimento) podem utilizar uma variedade de materiais desde compostos inorgânicos puros (NH_4 , NO_3 , N_2 e NO_2) a aminoácidos e, dependendo das condições ambientais, podem apresentar uma vasta gama de valores de $\delta^{15}\text{N}$. A maior parte das plantas têm valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre -5‰ e $+2\text{‰}$. As plantas que fixam o azoto da atmosfera têm valores de $\delta^{15}\text{N}$ de cerca de 0‰ a $+2\text{‰}$, próximo do valor de $\delta^{15}\text{N}$ do N_2 atmosférico. Os seres N-heterotróficos (oposto de autotróficos) (*e.g.*, *fungus*) que utilizam o azoto orgânico na forma de aminoácidos, geralmente, têm valores de $\delta^{15}\text{N}$ superiores ao azoto do solo.

Capítulo 3

Estado da Arte/Técnicas Isotópicas

Na natureza, a variação da razão dos isótopos estáveis é muito pequena. No entanto estes isótopos são muito importantes como rastreadores/marcadores (do inglês “tracers”), podendo proporcionar-nos uma fonte de informação abundante acerca de processos que acontecem actualmente ou que aconteceram no passado.

Esta possibilidade tornou-se exequível com o desenvolvimento das técnicas isotópicas nomeadamente a espectrometria de massa de razões isotópicas (Isotope Ratio Mass Spectrometry -IRMS) e a técnica de fraccionamento isotópico natural específico - ressonância magnética nuclear (Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance, SNIF-NMR) (esta última não foi utilizada neste trabalho). De Laeter *et al.*⁴³ procuram demonstrar as potencialidades da espectrometria de massa de razões isotópicas como uma metodologia analítica única para aplicação nos diversos domínios da ciência.

Os espectrómetros de massa e as técnicas de preparação de amostras para medidas de razões de isótopos estáveis, inicialmente utilizados só por um pequeno grupo de cientistas, são actualmente utilizados em muitos laboratórios nas mais diversas áreas, das quais se destacam o controlo da autenticidade de alimentos e bebidas, a geologia, a arqueologia, a hidrologia, o ambiente, estudo de processos biológicos, a atmosfera, a ciência forense, entre muitas outras.

Estas técnicas isotópicas sofisticadas baseiam-se na medição das razões de isótopos estáveis nomeadamente $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ e podem dar informações muito úteis acerca da origem geográfica e botânica de muitos géneros alimentícios, fazendo parte das metodologias analíticas mais poderosas usadas para a detecção de contrafacção/autenticidade de alimentos, sendo capazes de discriminar a origem geográfica dos produtos e de detectar a adulteração com compostos sintéticos e a aplicação de práticas de produção agrícolas ilegais.

Um dos contributos mais recentes para o grupo de técnicas isotópicas, é a técnica hifenada de cromatografia em fase gasosa com a espectrometria de massa de razões isotópicas (GC/IRMS) que alia o poder de separação da cromatografia à detecção precisa das razões

isotópicas, tornando possível a análise dos componentes individuais de misturas complexas.

A Europa ocupa a primeira posição na aplicação de métodos analíticos com base nas técnicas de isótopos estáveis para a análise de géneros alimentícios, sendo muitos deles já métodos oficiais, de fiscalização e controlo de produtos alimentares.

A implementação correcta dos métodos isotópicos é importante para evitar conflitos entre os Estados Membros e assegurar o controlo dos produtos importados de outros países. Assim, a qualidade das medições das razões isotópicas é essencial nos laboratórios oficiais o que requer a utilização de Materiais de Referência (MR) ou Materiais de Referência Certificados (MRC) específicos, que permitam calibrar o sistema e garantir a qualidade e a comparação de resultados entre diferentes laboratórios e ainda o desenvolvimento de novos métodos para novas aplicações.

A detecção de fraudes e a autenticidade de géneros alimentícios tem sido, e continua a ser, uma questão em aberto. Estes delitos (infracções) levantam, ao mesmo tempo, dois problemas, um de saúde pública e outro de danos económicos (fraude económica) à custa de produtores honestos. Não há praticamente produtos (vinho, queijo, bebidas alcoólicas ou não, mel,...) que não sejam potenciais alvos de falsificação.

O desenvolvimento de novas tecnologias cada vez mais sofisticadas ou de novos métodos para a determinação de autenticidade de produtos alimentares continua em passo acelerado, com uma consciência cada vez maior por parte dos consumidores relativamente à segurança alimentar e ao problema da autenticidade. A aplicação dos métodos de análise de isótopos tornou-se uma arma crucial no combate à fraude por adulteração.

Ao longo desta tese o termo ‘género alimentício’ é aplicado em consonância com o Regulamento (CE) N°178/2002⁴⁴ de 28 de Janeiro que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios e define, no Artigo 2º, ‘género alimentício’ (ou alimento para consumo humano), como sendo qualquer substância ou produto, transformado, parcialmente transformado ou não transformado, destinado a ser ingerido pelo ser humano ou com razoáveis probabilidades de o ser. Este termo abrange bebidas, pastilhas elásticas e todas as substâncias, incluindo a água, intencionalmente incorporadas nos géneros alimentícios durante o seu fabrico, preparação ou tratamento.

3.1 Técnicas Analíticas para a Determinação das Razões de Isótopos Estáveis

3.1.1 Isotopólogos ou Isotopómeros?

Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC,⁴⁵ isotopólogos são moléculas que diferem entre si apenas na composição isotópica.⁴⁶

Os isotopómeros (o termo é uma contracção de isómeros isotópicos) são isómeros que diferem um do outro apenas nas posições dos elementos isotópicos. Assim, os isotopómeros têm sempre a mesma massa. As definições de isotopólogo e de isotopómero apresentam alguma controvérsia, confundindo-se por vezes as suas definições, sendo o primeiro praticamente desconhecido, pelo que já foi sugerida a sua eliminação a favor do segundo.

De acordo com o acima descrito tome-se como exemplo, os isotopólogos do CO₂. Estes são ¹²C¹⁶O₂ de m/z 44; ¹²C¹⁶O¹⁷O e ¹³C¹⁶O₂ de m/z 45; ¹²C¹⁶O¹⁸O, ¹²C¹⁷O₂ e ¹³C¹⁷O¹⁶O de m/z 46. É estatisticamente pouco provável encontrar dois isótopos naturais menos abundantes na mesma molécula. Assim os dois isotopólogos ¹²C¹⁷O₂ e ¹³C¹⁶O¹⁷O são praticamente negligenciáveis dado trabalhar-se nas abundâncias naturais.

Parece então óbvio, que para as medições das razões isotópicas ¹³C/¹²C numa amostra serem correctas, é fundamental ter em conta as contribuições dos isotopólogos.

Os “softwares” que processam os dados provenientes do IRMS estão preparados para resolver esse problema e introduzem automaticamente os factores de correcção que eliminam as contribuições indesejáveis. A correcção mais comum para a determinação de δ¹³C foi desenvolvida por Craig em 1957⁴⁷ que faz a correcção ao isotopólogo contendo o isótopo oxigénio-17 para CO₂ de m/z 45 (ver ponto 3.2).

3.1.2 A Espectrometria de Massa IRMS

Se um ião de massa m e carga z é acelerado por um potencial V e injectado num campo magnético uniforme B , então o ião é forçado a mover-se numa órbita circular de raio r . O movimento é definido pela seguinte equação normalmente adequada em espectrómetros de sector,⁴⁸

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (3.1)$$

Num espectrómetro deste tipo a combinação dos campos eléctrico e magnético permite seleccionar os iões com dada massa e carga. Este princípio é a base de todos os espectrómetros de massa de sector magnético.

Para analisar por espectrometria de massa uma amostra as suas moléculas necessitam de ser ionizadas. Nos espectrómetros de massa de sector magnético os iões obtidos por ionização/fragmentação das moléculas são acelerados por um campo eléctrico, deflectidos por um campo magnético e finalmente, detectados. Estes processos têm lugar no espectrómetro de massa que se pode dizer que é basicamente constituído por 3 partes separadas: a fonte, o analisador e o colector que no caso do IRMS é um colector múltiplo, “Faraday cups”.

A ionização, a formação do feixe de iões e a aceleração ocorrem na fonte, a deflecção magnética dá-se no analisador e a detecção ocorre no colector. As moléculas de uma amostra são introduzidas na fonte onde são ionizadas. Em IRMS a técnica de ionização utilizada é a ionização electrónica (EI) pelo que será esta que irá ser descrita.

A ionização electrónica é feita pela acção de um filamento que emite electrões. A

colisão ou uma grande aproximação entre um electrão e uma molécula da amostra pode originar a formação de um ião negativo (captação de um electrão) da molécula ou, pelo contrário, originar a remoção de um electrão da molécula e formar um ião positivo. São estes iões positivos, com carga +1, que são usados em IRMS,



Os catiões radicais obtidos podem sofrer fragmentação. No entanto, em IRMS utilizam-se parâmetros de fonte que privilegiam a sua formação, sem a energia suficiente para fragmentar, dado que é sobre estes catiões radicais que serão realizadas as medições.

A espectrometria de massa de razões isotópicas dedica-se à medição das razões isotópicas pelo que a precisão é crucial para medir as pequenas variações de razões de isótopos. Esta precisão é alcançada graças à comparação permanente entre a razão isotópica do composto a medir e a razão isotópica de um composto de referência.

Além disso, os campos aplicados nestes aparelhos são constantes, garantindo deste modo um rendimento de ionização também constante. A detecção por “Faraday cups” que detectam simultaneamente todos os iões de isotopólogos de razões m/z diferentes (*e.g.*, 44, 45 e 46 para $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ou $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ e $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) contribui largamente para a precisão da medida, já que todas as variações ao nível da fonte afectam do mesmo modo cada um dos isotopólogos. O sinal eléctrico gerado, proporcional à quantidade de iões formados, é amplificado, enviado ao computador e tratado pelo “software” que controla todas as partes do sistema.

Este método é usado pelos espectrómetros de massa de razões isotópicas para medir o feixe maioritário devido às espécies isotópicas mais abundantes de uma molécula e os feixes minoritários resultantes das espécies menos abundantes. Uma diferença crucial entre instrumentos convencionais e os de razões isotópicas é que nestes últimos, o produto que se pretende analisar é conhecido e os campos eléctrico e magnético são mantidos constantes para que as variações isotópicas duma espécie química sejam medidas com elevada precisão.

Resumidamente, são as seguintes as etapas para obtenção de um espectro de IRMS:

- Introdução do gás (amostra).
- Ionização electrónica.
- Separação dos iões por um campo electromagnético em função da massa/carga, m/z .
- Detecção dos iões de massa diferente pelo multicolector constituído por “Faraday cups”.
- Produção de um sinal eléctrico.

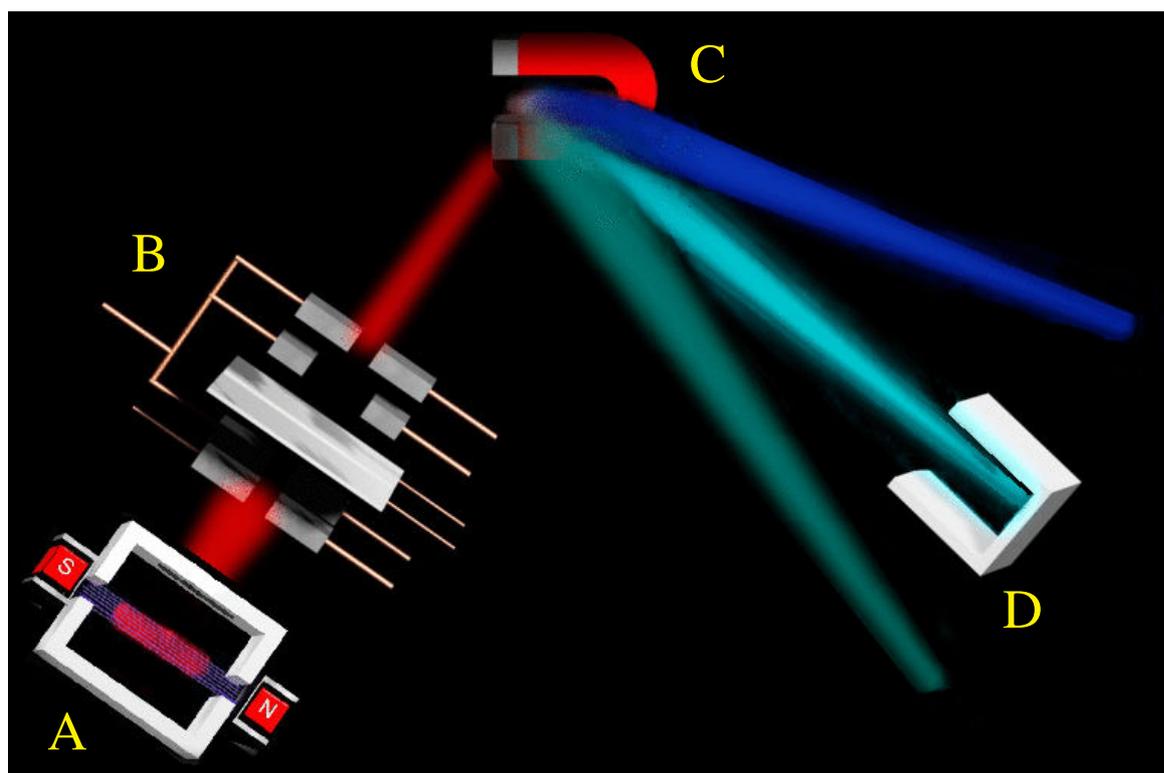


Figura 3.1: Ilustração esquemática de um IRMS e dos processos em curso em cada uma das suas partes constituintes. Os íons são gerados e acelerados na fonte, A, focados pelo sistema óptico B, deflectidos pelo analisador, C, (constituído por um campo magnético) de acordo com a sua razão m/z e finalmente detectados pelos multicolectores de Faraday, D (adaptado de uma imagem gentilmente fornecida pela GV Instruments).

3.1.3 Espectrómetros de Massa de Razões Isotópicas

O fenómeno natural do fraccionamento isotópico tem sido explorado pelas técnicas isotópicas nomeadamente a espectrometria de massa de razões isotópicas.⁴⁹ A determinação das razões isotópicas com a exactidão e precisão necessárias requer o uso de espectrómetros de massa dotados de sistemas especiais para a preparação e introdução de amostras, assim como ópticas iónicas de alta dispersão para a focagem, análise e detecção.

O espectrómetro de IRMS inicialmente desenvolvido por Nier em 1940⁴³ foi concebido para medir, de forma exacta, determinadas massas sequencialmente na amostra e na referência.

Um espectrómetro de massa de razões isotópicas é constituído, basicamente, como já atrás referido, por um sistema de introdução da amostra, uma fonte de íons, um analisador para separação dos íons pela sua razão massa/carga, e por um detector. As amostras a analisar são introduzidas por meio de um sistema de introdução na fonte de ionização, onde são ionizadas via ionização electrónica, e aceleradas a vários kV. Seguidamente são separadas por um campo magnético e detectadas por “Faraday cups” posicionados ao longo do plano

de imagem do espectrómetro de massa (Figura 3.1).⁵⁰

A especificidade de um espectrómetro de massa de razões isotópicas é o resultado de factores prévios ao multicolector, especialmente em resultado de processos de focagem do feixe. A Figura 3.2 permite visualizar o que acontece aos diferentes feixes de iões e como se dirigem para os colectores respectivos.

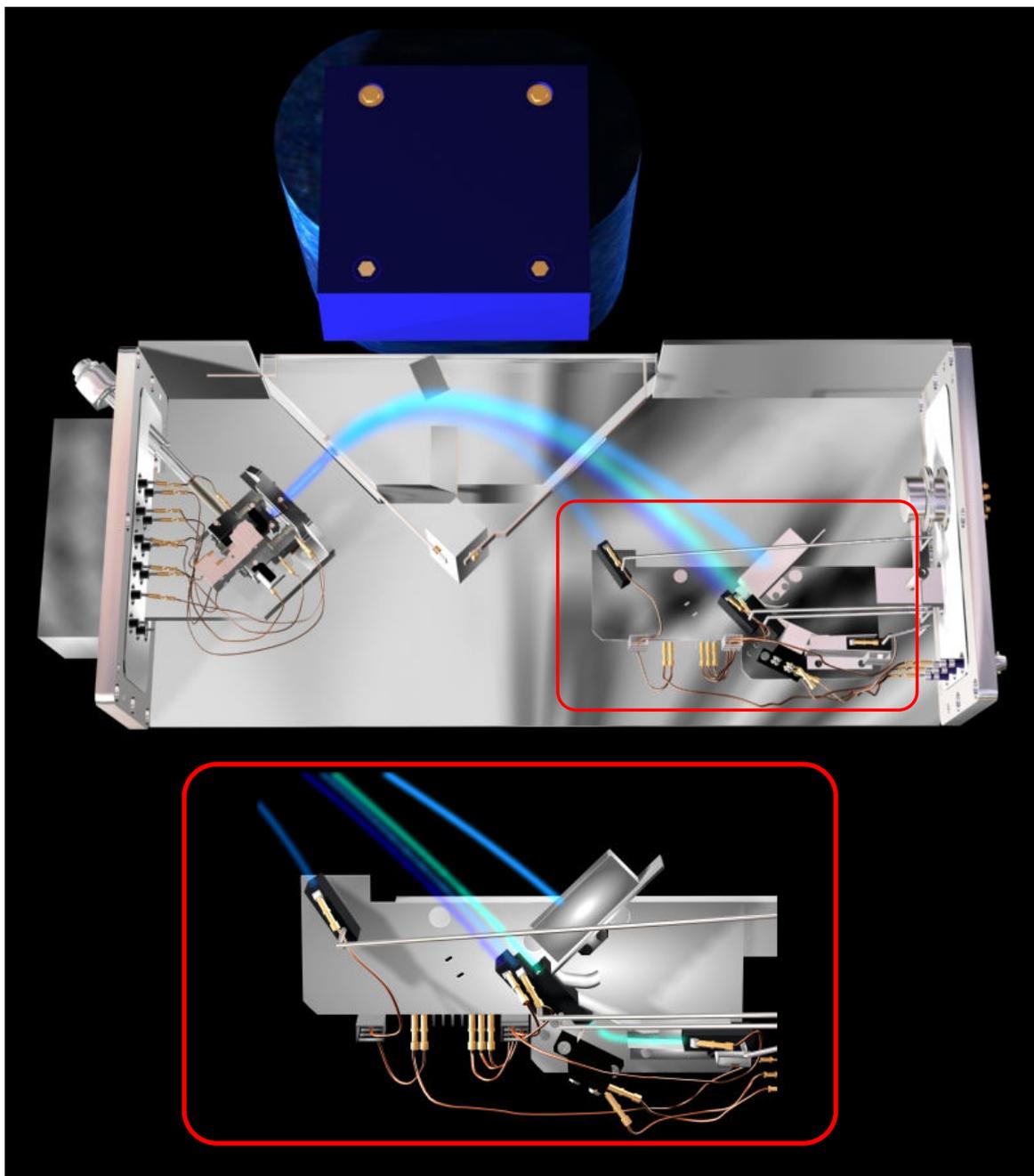


Figura 3.2: Imagem do trajecto do feixe de iões num sistema de IRMS (Isoprime) e um “zoom” dos trajectos dos feixes de iões em direcção aos diferentes “Faraday cups” (adaptada de uma imagem gentilmente fornecida pela GV Instruments).

A utilização de um colector universal triplo permite analisar simultaneamente as razões m/z dos isótopos de N_2 (28 e 29), O_2 (32, 33 e 34), CO_2 (44, 45 e 46), SO_2 (64 e 66), CO (28 e 30) ou N_2O (44, 45 e 46) sem qualquer ajuste dos colectores ou dos amplificadores (Figura 3.3). O modelo IsoPrimeTM tem ainda um colector adicional para medir m/z 2 (1H_2) em modo de “Dual-Inlet” (dupla entrada, uma para a amostra e outra para a referência). O desenvolvimento de sistemas de IRMS de fluxo contínuo (CF-IRMS) constituiu um

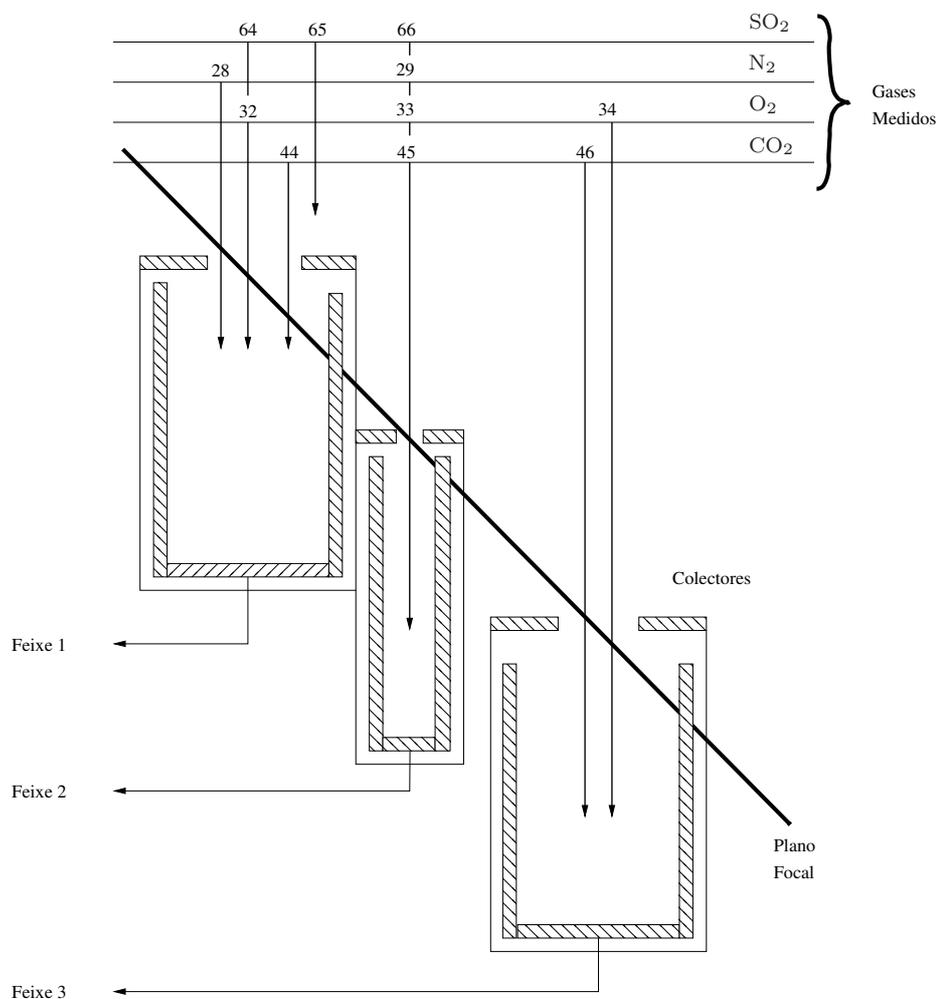


Figura 3.3: Esquema dos multicollectores “Faraday cups” e as respectivas correspondências em termos de m/z dos diferentes isotópologos para os gases CO_2 , SO_2 , O_2 e N_2 (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).

enorme progresso nos equipamentos de IRMS, dado que o fluxo proveniente de um analisador elementar ou de um cromatógrafo em fase gasosa pode ser introduzido de uma forma contínua num espectrómetro de massa, só sendo interrompido para a injeção de pulsos de gás de referência (designação usada para o gás de verificação do IRMS), *e.g.*, CO_2 .^{51,52} Tal não acontece nos equipamentos de dupla entrada, que são equipamentos “off-line”.

Na Figura 3.4 encontra-se representado um esquema simplificado comparativo de um espectrómetro de massa de razões isotópicas de sistemas de introdução de amostra: de fluxo

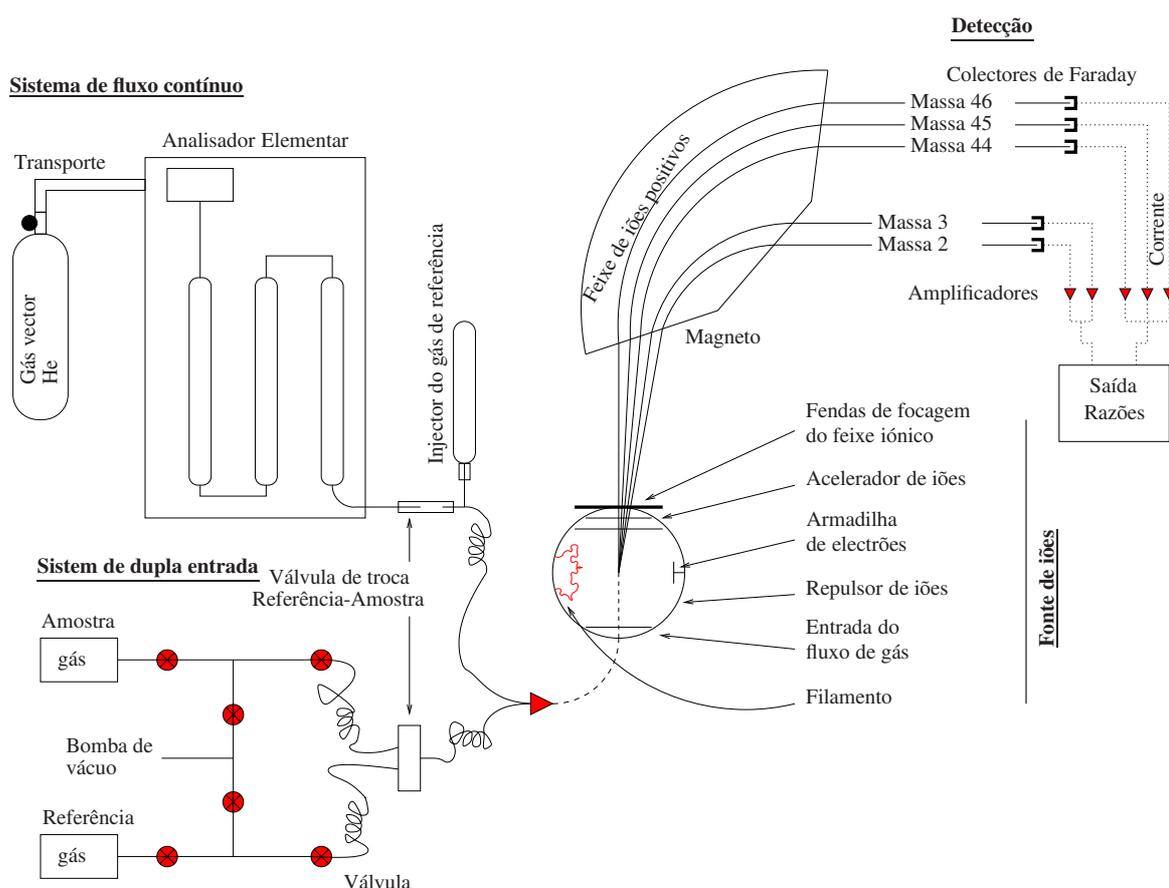


Figura 3.4: Representação esquemática da comparação entre um equipamento de fluxo contínuo (CF) e um de dupla entrada (“Dual Inlet”)³⁵ (figura adaptada).

contínuo e de dupla entrada.

Um dos principais problemas nos sistemas de CF-IRMS consiste na determinação do isotópologo $^1\text{H}^2\text{H}$ do hidrogénio de m/z 3 na presença de grandes quantidades do gás de arrastamento hélio, com m/z 4 ($^4\text{He}^+$).⁵⁰ O pico deste último é demasiado elevado sobrepondo-se ao pico de $^1\text{H}^2\text{H}$ de razão m/z 3. Para contornar este problema os fabricantes de equipamentos de IRMS, e no caso particular a Micromass, actualmente GV Instruments, desenvolveu um filtro electrostático (ESF) que reduz a sobreposição do pico do hélio, possibilitando a medição precisa do isotópologo de hidrogénio de razão m/z 3 ($^1\text{H}^2\text{H}$).⁵³

Este filtro está localizado entre a fenda do colector e o “Faraday cup” focado para detectar a razão m/z 3 (o mesmo colector que detecta a razão m/z 46). Na Figura 3.5 exemplifica-se o percurso de um ião de hélio após colisão com moléculas de gás de hélio. Esta deflecte o ião hélio que passa através da fenda do colector da m/z 3 ($^1\text{H}^2\text{H}$) mas, uma vez que perdeu energia durante a colisão, não é transmitido pelo filtro de energia e não entra no colector da m/z 3, sendo o efeito surpreendente, como se mostra na Figura 3.6.

A abundância de carbono-13 é medida na molécula de CO_2 . Neste caso, a molécula

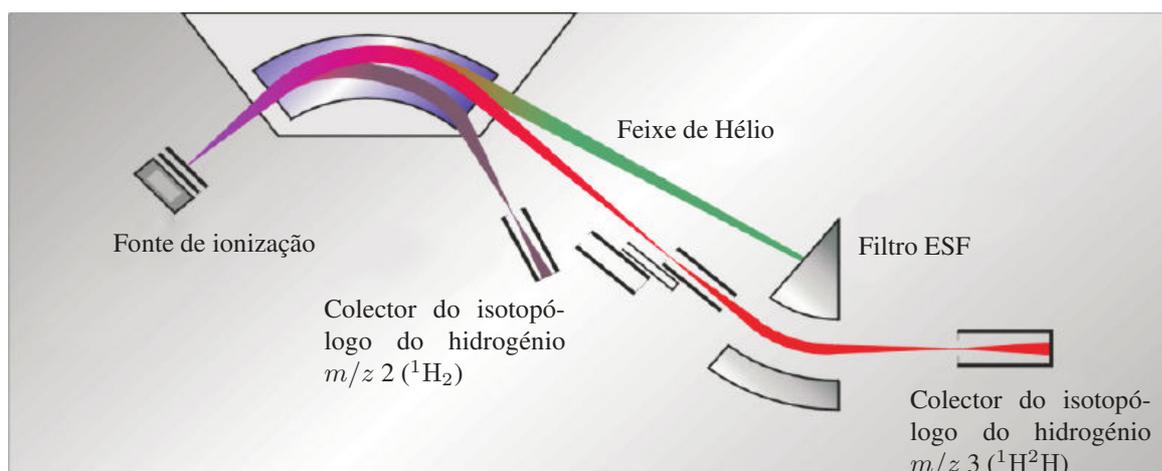


Figura 3.5: Efeito do filtro electrostático (ESF) exemplificado para o percurso de um ião hélio após colisão com moléculas do gás He,⁵³ (figura adaptada).

mais abundante $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ encontra-se na m/z 44 enquanto que a molécula $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ se encontra na m/z 46. A molécula menos abundante $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ é observada na m/z 45 tal como a molécula mais abundante $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$. As determinações em CO_2 são feitas apenas para carbono-13 e não para oxigénio-17, através da correcção automática efectuada pelos espectrómetros.

O sistema de introdução foi concebido para manusear gases puros principalmente CO_2 , N_2 , H_2 e SO_2 mas também O_2 , CO entre outros pelo que é necessário usar sistemas especiais de preparação de amostras que permitam dispor do elemento de interesse na forma de gás antes da análise por IRMS. Esta questão será tratada no ponto seguinte.

3.1.4 Técnicas Hifenadas com IRMS

As amostras a analisar devem apresentar-se no IRMS na forma de um gás puro, o que requer o uso de sistemas complexos para a preparação de amostras antes da sua introdução e análise isotópica. Ao longo dos tempos os equipamentos de IRMS têm vindo a ser melhorados substancialmente. As técnicas que têm sido desenvolvidas têm como principal objectivo a conversão quantitativa da amostra pois esta é uma possível fonte de erros. A conversão a 100% é a melhor garantia para a eliminação de efeitos de fraccionamento isotópico durante o processo de conversão.

3.1.4.1 EA/IRMS

O analisador elementar foi o primeiro sistema “on-line” hifenado ao IRMS, EA-IRMS. Pode funcionar em condições operatórias de combustão ou de pirólise permitindo medir os teores isotópicos dos elementos constituintes da amostra na sua totalidade. Seguidamente

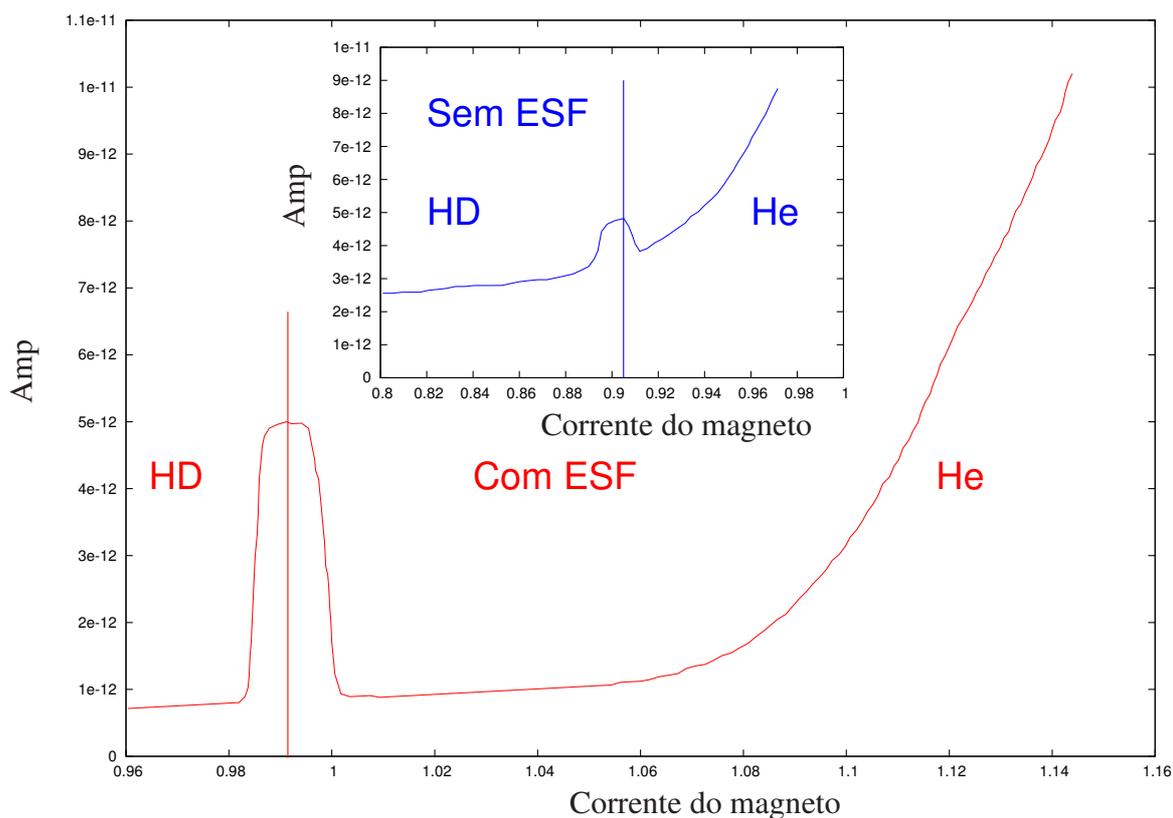


Figura 3.6: Comparação entre a ausência e a presença do filtro ESF na determinação do isotópico do hidrogênio m/z 3, 53 (figura adaptada).

faz-se uma breve descrição da técnica EA/IRMS nos modos de combustão e de pirólise.

Princípio da EA/IRMS em modo de combustão

A Figura 3.7 representa um diagrama esquemático de um analisador elementar em modo de combustão. Permite determinar as razões isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. As amostras e padrões quer no estado sólido quer no estado líquido são pesadas numa cápsula de estanho que é colocada no carrocel (amostrador automático). Quando este é accionado a amostra cai, por ordem da sequência previamente preparada, dentro do reactor de combustão que se encontra na gama de temperaturas de 1020-1100 °C, dependendo da espécie elementar a analisar.

A amostra e a cápsula fundem numa atmosfera temporariamente enriquecida em oxigénio. Os produtos da combustão passam pelo catalisador de combustão, CrO_3 , utilizando um fluxo de hélio constante. Os produtos de oxidação, entre os quais CO_2 e, no caso da amostra ou padrão conterem azoto, NO_x , passam então pelo tubo de redução mantido à temperatura de 650 °C, contendo cobre, onde os óxidos de azoto (NO , N_2O e N_2O_2) são reduzidos a N_2 e o excesso de oxigénio é removido.

Os gases resultantes, CO_2 , N_2 , SO_2 e H_2O passam através de um filtro de perclorato de magnésio para remoção da água (armadilha) são separados através de uma coluna cromato-

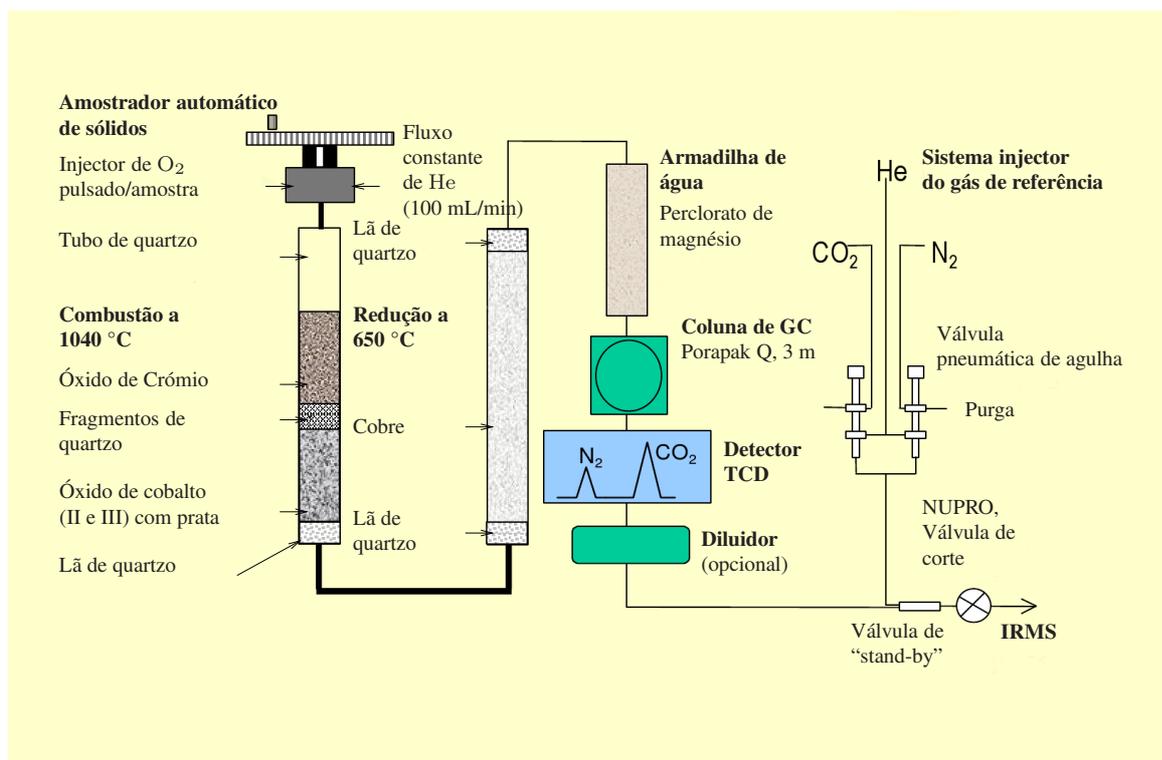


Figura 3.7: Esquema simplificado de um sistema hifenado EA/IRMS em modo de combustão para determinação das razões isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).

gráfica de enchimento, passam pelo detector de condutividade térmica (TCD) que permite visualizar a separação entre os picos do carbono e do azoto e, por fim, entram no espectrómetro de massa de razões isotópicas onde são medidas as razões isotópicas do carbono, do azoto e do enxofre, relativamente a um gás de referência (por exemplo, CO_2 para determinar ^{13}C e N_2 para determinar ^{15}N) previamente calibrado com padrões internacionais e portanto de composição conhecida.

Princípio da EA/IRMS em modo de pirólise

A determinação da razão isotópica do oxigénio total é baseada na técnica de Schütze-Unterzaucher.^{54,55} Esta técnica corresponde à pirólise em modo de CF com uma conversão completa da água e compostos de carbono para monóxido de carbono, CO . As diferenças fundamentais do modo de pirólise relativamente ao modo de combustão residem no tipo de reactor utilizado e no seu enchimento. No modo de pirólise o reactor exterior é constituído por cerâmica e dentro deste encontra-se um tubo de carbono vítreo (“glassy carbon”). No enchimento deste tubo utilizam-se pequenos fragmentos de carbono vítreo (“glassy carbon chips”).

A Figura 3.8 mostra um diagrama esquemático da técnica “on-line” EA/IRMS em modo de pirólise. A pirólise dá-se na ausência de oxigénio (a decomposição química ocorre pela acção da temperatura) e permite medir as razões isotópicas $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Os produtos

formados durante a pirólise dependem da composição elementar da matriz da amostra e podem incluir CO, CO₂, H₂ e NO. Na pirólise usam-se temperaturas do reactor superiores

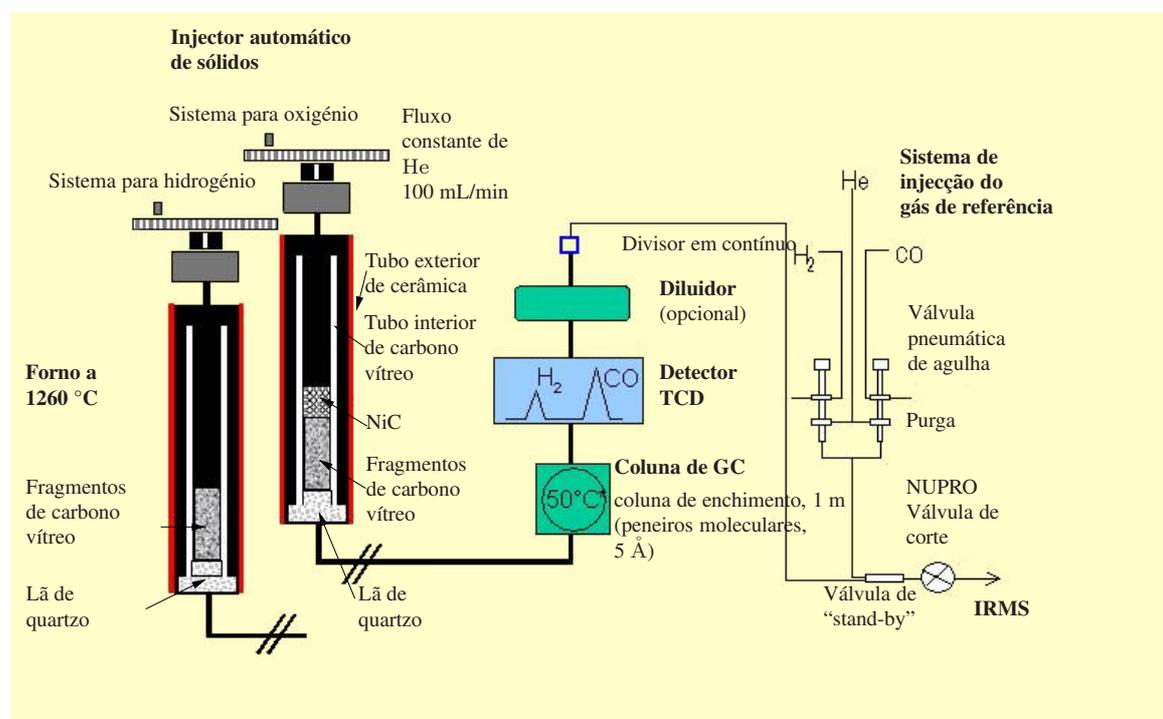


Figura 3.8: Esquema simplificado de um sistema hifenado EA-IRMS em modo de pirólise para determinação das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).

às do modo de combustão, normalmente entre 1250 e 1300 °C dependendo das marcas dos equipamentos.

Neste caso utilizam-se cápsulas de prata para introduzir as amostras e padrões.

O CO resultante é detectado nos colectores que medem as razões m/z 30 e m/z 28 e o H₂ medido nos colectores para m/z 2 e para m/z 3. Esta técnica é muito aplicada na análise de géneros alimentícios de que é exemplo a detecção de adição de água a sumos, leite, de entre outros.⁵⁶

3.1.4.2 GC/IRMS

O acoplamento de cromatógrafos em fase gasosa (GC) com espectrómetros de massa de razões isotópicas (IRMS) com interface de combustão (GC/C/IRMS) para determinação das razões isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ou com uma interface de pirólise (GC/P/IRMS), para determinação das razões isotópicas $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ constitui uma das mais versáteis técnicas isotópicas pois combina o poder de separação das técnicas cromatográficas com as elevadas precisão e exactidão na determinação das razões de isótopos estáveis por IRMS.⁵⁷

O sistema com interface de pirólise (GC/P/IRMS) encontra-se ainda em fase de desenvolvimento pelo que muito poucos laboratórios utilizam esta técnica. É claro que a grande vantagem de GC/C/IRMS relativamente a EA/IRMS é a de analisar compostos individuais embora em termos de robustez fique ainda, no presente, muito aquém da técnica de EA/IRMS. O sistema hifenado GC/IRMS tornou as análises de amostras complexas muito mais rápidas, evitando procedimentos analíticos de preparação das amostras muito morosos. A primeira aplicação de GC/C/IRMS no controlo da autenticidade e controlo de géneros alimentícios e de aditivos alimentares foi realizada em 1984 em Paris, nos laboratórios de pesquisa Pernod-Ricard, onde foi demonstrada a exequibilidade desta técnica para estudos da variação isotópica do carbono na abundância natural. No entanto a sua implementação comercial só ocorreu por volta de 1988.⁵⁸ A Figura 3.9 representa o sistema de fluxo contínuo de um cromatógrafo em fase gasosa hifenado a IRMS com interface de combustão (GC/C/RMS). O eluente proveniente do GC passa por um forno de combustão (ou pirólise no caso dos sistemas GC/P/IRMS - interface de pirólise) que converte os compostos orgânicos em CO_2 e H_2O (ou CO e H_2 no modo de pirólise).

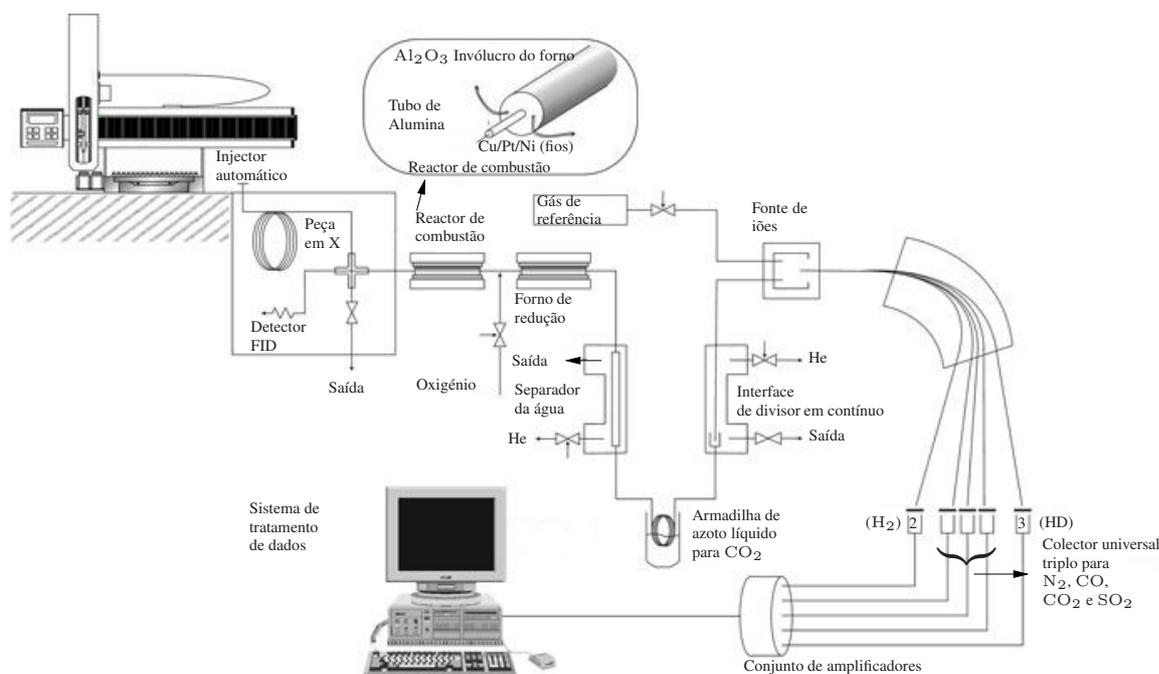


Figura 3.9: Esquema simplificado de um sistema de GC/C/IRMS (cromatografia em fase gasosa hifenada a espectrometria de massa de razões isotópicas com interface de combustão) (adaptado de <http://www.bris.av.uk/>; consultado em 16/05/2006).

A água é retida numa armadilha geralmente um tubo de nafion (que é constituído por um copolímero de tetrafluoretileno sulfonado) ou azoto líquido e o CO_2 entra no IRMS. Antes e depois da eluição dos picos das amostras é injectado gás de verificação CO_2 ou CO ou H_2 (dependendo do parâmetro isotópico que se está a determinar) mediante um dispositivo automático que facilita uma quantificação correcta das medições das razões de isótopos estáveis.

Um detector de ionização de chama (FID) instalado no GC permite visualizar previamente a separação dos componentes da mistura sendo só enviado ao IRMS o composto ou compostos que se pretende analisar. Uma vez que ainda não existem Materiais de Referência Certificados para a técnica de GC/IRMS é prática corrente calibrar estes equipamentos com um gás de verificação, como é o caso do CO₂ para determinação das razões isotópicas ¹³C/¹²C.

Até à data, esta técnica encontrou numerosas aplicações na área dos aromas nomeadamente de café, de canela, de amêndoa amarga e nos aromas de óleos essenciais de coentro, alfazema, mandarin, bergamota de entre outros.⁵⁹⁻⁶⁴ Um dos primeiros trabalhos de aplicação foi realizado sobre a vanilina^{60,65-71} que é certamente o aroma mais difundido na indústria alimentar mas também nas indústrias farmacêutica e cosmética.

Nos últimos anos o âmbito de aplicação de GC/IRMS tem-se alargado a outras áreas, como é o caso do ambiente (análise de poluentes ambientais, *e.g.*, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, PAH^{72,73}) ou outros poluentes tais como compostos orgânicos voláteis (VOCs),⁷³ na análise forense em particular na detecção de esteróides anabolizantes em bovinos⁷⁴⁻⁷⁷ ou de corticosteróides em cavalos de corrida⁷⁸. A derivatização⁷⁹ de compostos presentes nas matrizes que se pretendem analisar permitiu alargar o campo de aplicação da técnica GC/IRMS a outro tipo de compostos nomeadamente aminoácidos⁸⁰ nos solos,^{81,82} proteínas e polissacáridos,⁸³ vinhos, sumos de fruta⁸⁴ e azeite^{85,86} de entre outras.

No entanto, é no domínio da autenticidade de géneros alimentícios que se encontram, actualmente, na literatura, cada vez mais aplicações no domínio da autenticidade tais como a tequila (feita a partir do agave),^{87,88} o glicerol presente no vinho,⁸⁹ a origem do CO₂ em vinhos espumantes,^{90,91} a autenticidade do whisky⁹² e a adulteração de óleos vegetais de amendoim, palma, colza, soja, milho e girassol.^{93,94}

3.1.4.3 Método de Equilíbrio com CO₂. Análise de $\delta^{18}\text{O}$

A água é o componente mais abundante dos géneros alimentícios e dos fluidos biológicos. Assim, a composição isotópica da água naqueles produtos pode ser muito útil para rastrear a origem de um produto e a natureza das transformações que ocorrem nas diferentes etapas de um processo. A determinação da razão isotópica ¹⁸O/¹⁶O na água constitui uma das mais importantes aplicações da espectrometria de massa de razões isotópicas. As aplicações são muito diversas e vão desde estudos da variação da abundância natural no ciclo hidrológico, até ao controlo da autenticidade de bebidas, ao uso de rastreadores/marcadores enriquecidos em oxigénio-18 nos estudos metabólicos de animais e seres humanos, entre muitas outras.

O método mais comum para a determinação de $\delta^{18}\text{O}$ é o método por equilíbrio com CO₂. Este método primeiramente proposto por Cohn and Urey (1938)⁹⁵ foi usado mais tarde por Epstein e Mayeda (1953)⁹⁶ para a determinação da razão isotópica de ¹⁸O/¹⁶O em águas naturais.



Figura 3.10: Equipamento para determinação da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ pelo método de Equilíbrio com CO_2 (equipamento em uso no INETI/LAQAS).

A Figura 3.10 mostra um equipamento do método Equilíbrio com CO_2 . Antes da reacção é adicionado CO_2 de razão isotópica conhecida à amostra de água ou outra matriz contendo água, por exemplo vinho ou sumos de fruta, em recipiente adequado onde permanece em contacto durante um período que pode variar entre 6-25 horas até atingir o equilíbrio, dependendo da temperatura a que o ensaio é efectuado, e que pode variar entre 25-40 °C. A Figura 3.11 exemplifica a preparação dos frascos para a determinação de $\delta^{18}\text{O}$ na água contida em amostras de vinhos, água e sumos de fruta (condições experimentais utilizadas no INETI).

Durante o tempo de contacto ocorrem trocas isotópicas entre CO_2 e H_2O até se atingir o equilíbrio representado pela equação 3.2,⁹⁷



Uma vez atingido o equilíbrio o CO_2 no espaço de cabeça é removido e analisado no IRMS. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ da água contida nos sumos de fruta, nos vinhos, bebidas espirituosas são ferramentas muito úteis para determinação da origem geográfica ou detectar adulterações, como é o caso da adição de água ao vinho (processo conhecido por diluição). Esta técnica tem a vantagem de utilizar quantidades diminutas de amostra e de padrões.

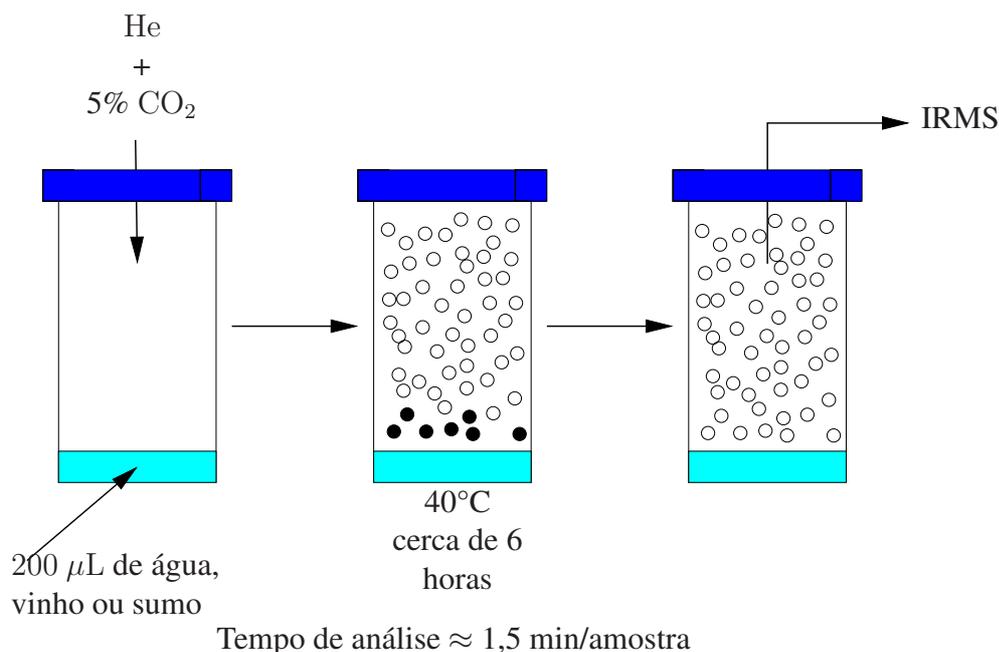


Figura 3.11: Preparação das amostras para determinação de $\delta^{18}\text{O}$ pelo método Equilíbrio com CO_2 . As condições experimentais apresentadas são as utilizadas no INETI.

Dependendo das marcas de equipamentos, 200µL pode ser suficiente.

Tal como na técnica hifenada EA/IRMS (e GC/IRMS - uso de misturas internas ou de gás de referência calibrado) as amostras são analisadas relativamente a padrões internacionais, neste caso padrões de águas nomeadamente, Vienna-Standard Mean Ocean Water (V-SMOW), Standard Light Antarctic Precipitation (SLAP) e Greenland Ice Sheet Precipitation (GISP). O fornecimento dos padrões internacionais é controlado e cada laboratório só pode adquirir padrões de três em três anos pelo que se deverão usar em rotina padrões secundários de águas naturais previamente calibrados relativamente aos primeiros. O Capítulo 4 aborda os diferentes tipos de materiais padrão disponíveis para IRMS.

3.2 Correção de Iões com a Mesma Massa na Determinação de CO_2 (Correção de Craig)

Apesar de ser necessário fazer correções na determinação das razões isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, apenas se apresenta a correção utilizada quando se determina CO_2 pois neste trabalho apenas se apresentam resultados de $\delta^{13}\text{C}$. As equações para a correção de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{13}\text{C}$ no CO_2 relativa à presença de iões interferentes de massa igual foi referido por Craig em 1957,⁴⁷ Gonfiantini em 1981⁹⁸ e Santrock *et al.* em 1985.⁹⁹

Quando se analisa CO_2 pode haver contribuição, para a mesma massa, de outras espécies isotópicas que não a de interesse (ver ponto 3.1.1) pelo que terá que ser feita uma correção. Por exemplo, para m/z 45 existem duas espécies com esta massa nomeadamente

$^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (a nossa espécie de interesse pois estamos a determinar a razão entre os isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e a espécie $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ que não tem interesse pelo que a razão m/z 45 deverá ser corrigida relativamente àquela espécie. O mesmo se passa para m/z 46 quando se determina $\delta^{18}\text{O}$. Para esta massa contribuem as espécies $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ e $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ no entanto só a primeira interessa.

No caso do padrão internacional PDB usado para a determinação de CO_2 , há uma contribuição na m/z 45 devido ao isótopo ^{17}O de cerca de 6 %. Da mesma forma, 0,2 % da m/z 46 provém de espécies isotópicas contendo ^{13}C e ^{17}O mas não ^{18}O . Para m/z superiores a 46 as abundâncias são negligenciáveis uma vez que se trabalha nas abundâncias naturais.

Para um colector triplo que mede uma amostra com razão isotópica próxima do padrão de PDB a fórmula para correcção será, de acordo com Craig,⁴⁷

$$\delta^{13}\text{C} = 1,0676\delta(45/44) - 0,0338\delta^{18}\text{O}$$

e

$$\delta^{18}\text{O} = 1,0010\delta(46/44) - 0,0021\delta^{13}\text{C}$$

Santrock e Hayes⁹⁹ sugeriram um algoritmo alternativo para a conversão das razões m/z 45 e m/z 46 para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ mas que ainda não teve reconhecimento internacional, apesar de ser uma opção nas correcções existentes nos equipamentos de IRMS. Estas correcções são efectuadas automaticamente pelos “softwares” de IRMS.

3.3 Razão Isotópica. A Notação δ

Já foi referido que as variações na abundância isotópica dos isótopos estáveis encontradas em processos naturais são muito pequenas. Devem portanto utilizar-se unidades de medida adequadas.

Em 1950, McKiney¹⁰⁰ introduziu uma notação especial que permite manipular mais facilmente as razões isotópicas. Introduziu a escala delta, δ , que exprime em ‰, *per mil*, do latim *per mille*, o desvio das razões isotópicas relativamente a substâncias de referência ou padrão, de acordo com a equação seguinte,

$$\delta_{s/r}(\text{‰}) = [R_s/R_r - 1] \times 10^3(\text{‰}) \quad (3.3)$$

onde R corresponde à razão isotópica entre o isótopo estável mais pesado e o isótopo estável mais leve, s designa a razão isotópica da amostra e r a razão isotópica da referência ou padrão.

Para os elementos leves, carbono, oxigénio, azoto e hidrogénio, R é dado pelas razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ respectivamente. Assim, no caso do carbono

representa-se por $\delta^{13}\text{C}$, do oxigénio por $\delta^{18}\text{O}$ e assim por diante. Um valor positivo de δ significa que a razão do isótopo mais pesado relativamente ao mais leve é maior na amostra do que no padrão e um valor de δ negativo terá o significado oposto.

A notação δ proporciona uma forma adequada de exprimir as pequenas diferenças relativas nas razões isotópicas entre amostras e padrões medidas por espectrometria de massa de razões isotópicas.⁴⁶ A maior parte dos ‘isotopistas’ são extremamente sensíveis ao uso incorrecto da terminologia isotópica e o imortal Harmon Craig escreveu uma quintilha^(a) sobre isso mesmo.¹⁸

3.4 Normalização das Medidas Isotópicas

Com vista a facilitar a comparação de resultados de razões de isótopos entre diferentes laboratórios, foi necessário normalizar os resultados a uma escala internacional. Isto foi conseguido pela introdução de materiais de referência padrão, nomeadamente SMOW (Standard Mean Ocean Water) para oxigénio e deutério (actualmente V-SMOW, Vienna-Standard Mean Ocean Water da IAEA), PDB (Pee Dee Belemnite - estrutura de calcite interna de um fóssil Belemnitella americana de formação do Cretácio Pee Dee na Carolina do Sul.) para carbono, CDT (Canion Diablo Troilite) para enxofre e ar atmosférico para azoto.

Todos os padrões utilizados em métodos isotópicos estão calibrados relativamente a estes padrões que se estipulou terem valores de $\delta = 0 \text{‰}$. A composição dos isótopos de carbono e oxigénio é determinada pela análise do CO_2 onde as diferenças relativas entre as razões das voltagens dos feixes referentes aos isotopólogos entre a amostra e os gases de referência são relacionadas com a Equação 3.3. Um algoritmo de redução de dados converte as medições de $^{45}\text{CO}_2$ e $^{46}\text{CO}_2$ em valores de ^{13}C e ^{18}O padronizados contra a escala do Vienna-Pee Dee Belemnite (V-PDB).¹⁰¹

Na análise de isótopos estáveis, a calibração é feita utilizando materiais de referência escolhidos de tal modo que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$ ou outra, seja semelhante à gama dos valores esperados para as amostras. Quando se usa mais do que um padrão os seus valores das razões isotópicas deverão enquadrar as gamas de valores de δ das amostras. (Os padrões para isótopos estáveis encontram-se descritos com mais detalhe no Capítulo 4).

(a)

*There was a young man from Cornell
Who pronounced every “delta” as “del”
But the spirit of Urey
Returned in a fury
And transferred that fellow to hell*

3.5 Aplicações da Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas

Nos últimos 15 anos os espectrómetros de massa de razões isotópicas ficaram comercialmente mais disponíveis crescendo assim a sua utilização em laboratórios oficiais para detecção de fraudes e adulteração nos laboratórios de controlo de adulteração de géneros alimentícios, em laboratórios oficiais para a detecção de “doping” nos desportistas¹⁰² (International Olympic Committee, IOC) em laboratórios forenses para rastrear a origem de drogas como a cocaína e a heroína^{103,104} e a “ecstasy”,^{105,106} entre muitas outras.¹⁰⁷

As aplicações das técnicas de determinação de razões isotópicas de isótopos estáveis de elementos leves, H, C, N, O, S, são incontáveis e nos mais diversos domínios nomeadamente, na autenticidade de géneros alimentícios,^{108,109} na geologia,^{110–113} na ciência forense,¹¹⁴ na arqueologia,^{115,116} na hidrologia,¹² no meio ambiente,^{117,118} na medicina,¹¹⁹ na agricultura,¹¹⁷ nos ecossistemas,¹²⁰ na ecologia vegetal,¹²¹ na antropologia,¹²² na farmacologia,¹²³ na ecologia animal,¹²⁴ no estudo de processos metabólicos,^{38,125,126} entre muitos outros.

Refira-se que a aplicação das técnicas isotópicas para a determinação da origem geográfica necessita, quase sempre, de bases de dados de parâmetros isotópicos das regiões geográficas que se pretende investigar sobre um dado produto.

Seguidamente apresentam-se algumas das principais áreas de aplicação de IRMS abordando com mais detalhe a área dos géneros alimentícios por ser esta a aplicação de interesse neste trabalho.

3.5.1 Autenticidade de Géneros Alimentícios

De certa forma, este assunto tem vindo já a ser abordado ao longo desta tese. Na área da autenticidade alimentar o número de aplicações da técnica de IRMS com sucesso é hoje em dia muito vasto.

Tal como já foi apresentado no Capítulo 2, nas plantas que realizam o ciclo de Calvin-Benson, plantas do tipo C₃, ocorre um empobrecimento de cerca de 19 ‰ em $\delta^{13}\text{C}$ relativamente ao $\delta^{13}\text{C}$ do CO₂ atmosférico, enquanto que nas plantas que utilizam o mecanismo de Hatch-Slack, ou plantas do tipo C₄, só ocorre um empobrecimento de cerca de 4 ‰.

Esta diferença nos valores das razões dos isótopos permite-nos detectar fraudes ou adulterações de géneros alimentícios e diferenciar os diferentes tipos de alimentação do ser humano ou dos outros animais uma vez que diferentes regiões geográficas irão reflectir-se num diferente empobrecimento isotópico nos seus diversos tecidos.^{127–130}

Assim, numerosas matrizes alimentares têm sido objecto de investigação em termos de composição isotópica e têm sido detectadas vários tipos de fraudes de géneros alimentícios

que seriam dificilmente controláveis de outra forma (ver Tabela 3.1 a título de exemplo). Por outro lado, estas técnicas podem contribuir para tipificar os produtos destinados a receber as marcas de qualidade DOP, IGP e ETG.^{94,131–136} Portugal é um dos países da Europa que apresenta mais produtos DOP e IGP.¹³⁷ Os estudos pioneiros sobre bebidas fermentadas

Tabela 3.1: Alguns tipos comuns de adulteração em alimentos e bebidas e respectivos métodos isotópicos de detecção.

Produto	Adulteração comum	Deteção
Sumo de fruta	Adição de água	¹⁸ O IRMS
Sumo de fruta	Adição de açúcar	¹³ C IRMS, SNIF-NMR
Mel	Adição de açúcar (milho, cana)	¹³ C IRMS
Baunilha natural	Adição de baunilha síntese	¹³ C IRMS, SNIF-NMR
Bebidas Espirituosas	Origem botânica	¹³ C IRMS, SNIF-NMR
Vinho	Diluição com água	¹⁸ O IRMS
Vinho	Chaptalização	¹³ C IRMS, SNIF-NMR

são relativos aos vinhos e, é sem dúvida, sobre estes que mais aplicações se encontram na literatura. Salientam-se os métodos para o controlo da chaptalização¹³⁸ (adição de açúcares exógenos ao mosto antes da fermentação para aumento do grau alcoólico) e para o controlo da adição de água (para aumentar o seu volume). Com vista à determinação da autenticidade do vinho e de sumos de fruta a União Europeia regulamentou a análise de ²H/¹H, ¹³C/¹²C e ¹⁸O/¹⁶O.^{139,140} Posteriormente a UE aprovou a construção de um Banco de Dados (Wine Databank) de valores isotópicos, onde se incluem as razões ¹⁸O/¹⁶O e ¹³C/¹²C, dos vinhos provenientes dos países produtores dos Estados Membros, com vista a melhorar a eficiência no controlo do mercado dos vinhos na Europa.¹⁴¹ Estes dados têm permitido denunciar (e investigar) situações de chaptalização e da adição de água e, em conjunto com técnicas quimiométricas, inferir sobre a origem geográfica dos vinhos.^{142–156} Uma outra importante aplicação na matriz vinhos consiste na detecção de adição de glicerol sintético ao vinho dada a sua perigosidade para o ser humano,^{157–159} e na identificação da origem geográfica e botânica de etanol industrial (e.g., de açúcar de cana, tapioca, milho e trigo).¹⁶⁰

A técnica de IRMS tem sido intensivamente utilizada nas matrizes vínicas e em mostos quer na determinação da origem geográfica, através de resultados de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^2\text{H}$, quer na determinação da autenticidade e/ou adulteração através de dados de $\delta^{13}\text{C}$ (origem botânica). Ainda nas bebidas fermentadas encontram-se diversas aplicações de que são exemplo os vinhos,^{161–163} as bebidas espirituosas¹⁶⁴ e a cerveja.¹⁶⁵

Os estudos alargaram-se, no entanto, a outros tipos de matrizes susceptíveis de falsificação como os sumos de fruta nomeadamente,¹⁶⁶ sumos de laranja por adição de açúcar de cana (detectada pela razão dos isótopos ¹³C/¹²C),^{167,168} sumos de maçã¹⁶⁹ por adição de xaropes de custos mais baixos e sumos de ananás⁸⁴ (tem sido detectada através dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$).

Também o mel é facilmente adulterado por adição de açúcar^{170–172}, o que constitui um grave problema económico para países produtores de mel com fins de exportação, como é

o caso da Turquia, e é possível conhecer a origem geográfica do chá,¹⁷³ do café,¹⁷⁴ do arroz^{175,176} e identificar a origem, natural ou sintética, do ácido *L*-tartárico que é um composto natural presente em muitos frutos especialmente nas uvas.¹⁷⁷

Ultimamente os métodos isotópicos encontraram aplicações em matrizes mais complexas nomeadamente, na caracterização de produtos animais tais como leite,^{127,178,179} queijo,^{136,179,180} carne,¹⁸¹⁻¹⁸⁹ e peixe,^{129,190,191} quer do ponto de vista de origem geográfica, quer do regime alimentar. A técnica de IRMS tornou possível distinguir entre peixe selvagem e peixe de aquacultura, entre animais alimentados em pastagem ou à base de concentrados, a autenticidade de queijos regionais típicos, e muitas outras. A maior parte das aplicações aqui referenciadas são utilizadas para inferir sobre a origem geográfica de um dado produto e para tal é necessário recorrer a bases de dados de valores dos isótopos em estudo das regiões, previamente construídas, ou para detectar adulterações/autenticidade. Em 2001 Andreas Rossmann¹⁹² publicou um artigo de revisão muito completo que cobre os últimos vinte cinco anos sobre as diferentes utilizações e os resultados das medidas de razões isotópicas dos elementos leves, para caracterizar e autenticar uma grande variedade de géneros alimentícios. Depois deste outros artigos de revisão têm sido elaborados.¹⁹³⁻¹⁹⁶

3.5.2 Hidrologia e Meteorologia

O fraccionamento isotópico que se produz em sucessivos ciclos de evaporação, transporte, precipitação e filtração da água na natureza, conduz a diferentes enriquecimentos isotópicos em função da temperatura, da altitude e da latitude.

A partir da análise de pequenas variações na abundância isotópica do ²H e do ¹⁸O em amostras de água, podem obter-se informações muito valiosas sobre a história dos aquíferos subterrâneos e os seus movimentos, bem como o intercâmbio com águas superficiais, assim como sobre a formação de glaciares, o movimento das núvens, a precipitação, o ciclo hidrológico da água e ainda sobre a variação global do clima.^{12,36,197,198}

Em Portugal a caracterização geo-hidrológica da área geotermal de Chaves é feita através de dados de $\delta^{18}\text{O}$ e de $\delta^2\text{H}$,¹⁹⁹ e são determinadas, mensalmente, as razões isotópicas ¹⁸O/¹⁶O da água de precipitação em estações previamente estabelecidas que fazem parte da rede Global Network Isotope Precipitation (GNIP) para a construção do Banco de Dados Isotópico, e faz-se o estudo isotópico de sistemas aquíferos.¹⁸⁸

3.5.3 Geologia e Paleoclimatologia

Não é por acaso que o maior número de aplicações da espectrometria de massa de razões isotópicas, encontradas na literatura, se encontram no domínio da geologia. É que esta técnica foi primeiramente aplicada nesta área e só posteriormente se pensou na aplicação a outras áreas que não as geociências.

Nas rochas sedimentares, as variações de ¹³C e ¹⁸O guardam a informação sobre a sua

gênese e história. Os teores de ^{18}O das rochas ígneas e metamórficas estão relacionados com a temperatura a que se formaram.

Em geral, as rochas ou fósseis formados ou alterados em contacto com água, a determinada temperatura, contêm informação sobre esses acontecimentos através dos seus teores em ^2H e ^{18}O . O estudo de ^{18}O em fósseis marinhos proporciona uma medida da temperatura oceânica na época da sua formação, dado que o equilíbrio entre ^{18}O da água e do carbonato, que precipitou para formar a concha do fóssil, deixou reflectida esta temperatura. Os isótopos presentes nos ossos dos fósseis são excelentes marcadores paleoclimáticos.¹¹⁰

3.5.4 Ecologia

A ecologia é uma outra área com muitas e interessantes aplicações do uso dos isótopos estáveis. Os isótopos estáveis do C, N, H, O e S que ocorrem naturalmente nos tecidos dos animais têm sido usados como marcadores intrínsecos na rastreabilidade da origem da sua alimentação e das rotas de migração de aves migratórias. Neste último caso têm sido usados com sucesso na migração e movimento de insectos, aves, mamíferos terrestres e marinhos. Esta abordagem baseia-se no facto dos animais que migram transportarem consigo marcadores isotópicos que podem estar relacionados com o local geográfico. *E.g.*, os marcadores isotópicos das penas, do pêlo e das unhas reflectem a dieta correspondente à altura em que foram criadas ao passo que o músculo reflecte a alimentação das últimas semanas e o colagénio do osso a alimentação durante o tempo de vida do animal.^{200–203} As técnicas dos isótopos estáveis têm sido intensivamente utilizadas no estudo das rotas de aves migratórias ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$) dado que estes padrões nas penas e nos ossos são consistentes com a variação geográfica da composição isotópica do meio ambiente, *i.e.*, com a água da precipitação, plantas e solos.

Os ovos são outra potencial fonte de investigação importante da dieta isotópica uma vez que estes são formados a partir de nutrientes contidos nas últimas refeições da fêmea.²⁰⁴ Também nos seres humanos é possível rastrear o seu movimento, através da análise de urina, do pêlo facial e do cabelo. Esta aplicação tem interesse em análise forense.²⁰⁵

A reconstrução do historial isotópico da dieta de animais pela análise de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no pêlo,²⁰⁶ o efeito da dieta e da fisiologia nos valores de $\delta^{18}\text{O}$ dos dentes de herbívoros,²⁰⁷ a análise do cabelo humano ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$)²⁰⁸ e no pêlo do gado bovino,²⁰⁹ são actualmente das principais aplicações na domínio da ecologia. Outra aplicação muito curiosa baseada neste fenómeno, é a origem de dentes de elefante, através do estudo isotópico do marfim, o qual transporta informação isotópica sobre a alimentação e, consequentemente, sobre a região de procedência do animal.²¹⁰

Foi possível diferenciar entre populações urbanas do Brasil e do Estados Unidos pelos padrões geográficos da alimentação humana apesar de não ser uma alimentação típica mas sim uma ‘alimentação dos supermercados’, a partir de dados de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{15}\text{N}$ das unhas.²¹¹ Estudos da migração da truta salmonada,²¹² e o tipo de alimentação de peixes,¹²⁹ são igualmente realizados por IRMS.

3.5.5 Outras Áreas

Na agricultura as principais aplicações referem-se a estudos da fixação do azoto pelas plantas e às diferentes origens do azoto a partir de fertilizantes e utilização de aminoácidos, proteínas vegetais e azoto não proteico em alimentação animal.⁴⁰

No meio ambiente o chamado efeito “GreenHouse” ou efeito de estufa provocado pelo aumento do nível de CO₂ na atmosfera pode ser estudado utilizando as técnicas de análise isotópica de ¹³C, para identificar a origem do CO₂ atmosférico. Também a origem de contaminantes orgânicos tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), os compostos orgânicos voláteis (VOCs) e os poluentes orgânicos persistentes (POPs) pode ser caracterizada por IRMS.^{213–216}

Na medicina uma importante aplicação é a determinação de ¹³C no CO₂ da respiração após administração de ureia marcada com ¹³C, como prova da presença da bactéria *Helicobacter Pylori* no estômago. Esta bactéria é responsável por diversos tipos de gastrites e de alguns cancros no estômago. Este é, sem dúvida, o método de diagnóstico de infecção pela *H. pylori* não invasivo mais usado em adultos e crianças.²¹⁷

Na arqueologia é possível a datação de objectos de madeira através da contagem do número de anéis das árvores (dendrocronologia). Pode-se ir até milhares de anos atrás.²¹⁸

Na análise de elementos Terras Raras a separação dos elementos terras raras do lantânio ao lutécio constitui um desafio analítico significativo. Pela escolha do isótopo adequado a medir é possível analisar com exactidão todos os elementos Terras Raras num curto espaço de tempo.

As variações na abundância dos isótopos estáveis podem constituir prova na análise forense e no terrorismo doméstico e internacional. Como exemplos refere-se a origem geográfica e o movimento de pessoas, o local de produção de microorganismos patogénicos e a origem de explosivos recuperados de materiais detonados ou não.²¹⁹

Finalmente, uma aplicação promissora e que já deu os primeiros passos, consiste na detecção da contrafacção de fármacos e na infracção de patentes. Como é sabido, a contrafacção de fármacos é um problema mundial grave. Dados estatísticos relativamente recentes publicados pela Comissão Europeia mostraram que a apreensão de géneros alimentícios e de fármacos, fora das fronteiras da UE cresceu 77 % entre os anos de 2002 e 2003.²²⁰ Com a utilização de dados isotópicos foi possível distinguir três vias de síntese do Topiramato, um antiepiléptico,²²¹ estudar a origem geográfica e diferentes processo de fabrico do ácido acetilsalicílico,²²⁰ caracterizar ingredientes farmacêuticos activos (APIs) nomeadamente, Triptofano, Tropicamida, Hidrocortisona e Quinina HCL.¹²³

O número e a diversidade de aplicações da espectrometria de massa de razões isotópicas nos diversos domínios da ciência é infinito, não sendo possível falar sobre todas elas.

3.6 Outras Técnicas para a Determinação da Autenticidade

O desenvolvimento de novas técnicas para a determinação da autenticidade de géneros alimentícios continua a bom ritmo para dar resposta às preocupações crescentes dos consumidores sobre as questões da autenticidade e da segurança alimentar e pode encontrar-se vários artigos (alguns de revisão) que comparam as diferentes técnicas mais vulgarmente utilizadas.^{137,222–226}

Apesar de as técnicas isotópicas, em particular a espectrometria de massa de razões isotópicas nas suas diferentes versões apresentarem, de longe, o maior número de aplicações neste domínio, outras técnicas, ópticas ou espectroscópicas, têm também sido utilizadas e algumas delas já mais recentemente como é o caso do infravermelho próximo (NIR).^{222,227,228}

A Tabela 3.2 apresenta algumas das técnicas principais usadas com sucesso na autenticidade de géneros alimentícios e dá um panorama dos prós e contras para cada uma delas.^{225,226}

Pela análise da Tabela 3.2 constata-se que a técnica de IRMS é uma das metodologias mais vantajosas para aplicações no domínio que tem vindo a ser referido. Para além disso, pelo facto de se medirem especificidades como é o caso dos isótopos é muito difícil de a iludir.

Uma outra técnica que tem sido utilizada na identificação das espécies de origem dos géneros alimentícios é a técnica de reacção em cadeia da polimerase, PCR, *e.g.*, na autenticidade de peixe²²⁹. Contudo é necessário ter muito cuidado na selecção da sequência de oligonucleótidos e, por outro lado, o ADN sob análise deve ser muito puro pelo que se devem ter cuidados especiais na sua preparação senão corre-se o risco dos resultados finais virem alterados.

A espectroscopia de infravermelho, IR, é considerada uma técnica sensível e rápida, em particular quando usa a transformada de Fourier, FTIR, e foi aplicada para a medição da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no CO_2 do ar²³⁰ e para a determinação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^{17}\text{O}$ em N_2O , na mesma matriz.²³¹ Haisch, em 1994,²³² utilizou a espectroscopia de infravermelho não dispersiva (NDIR) na medição da razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ no CO_2 da respiração.

Normalmente, o tratamento dos dados analíticos obtidos por estas técnicas requer a aplicação de técnicas quimiométricas. No caso do IRMS, no entanto, é possível a determinação da origem geográfica de produtos alimentares sem recorrer necessariamente ao uso da análise quimiométrica dos dados.

Todas as técnicas aqui apresentadas têm vantagens e limitações. Uma vez que não existe uma metodologia analítica que dê uma resposta eficaz a todas as situações com que os investigadores se deparam, a situação ideal seria a combinação de diferentes técnicas mas essa situação seria muito onerosa. Após algum estudo da bibliografia nesta área dir-se-ia que as perspectivas, em termos de técnicas analíticas com utilização na determinação

Tabela 3.2: Comparação de algumas características para um conjunto de técnicas mais frequentemente utilizadas na determinação da autenticidade de géneros alimentícios,^{225,226} (tabela adaptada).

Técnicas	Sensibilidade	Simplicidade	Tempo de análise	Custo	Aplicabilidade	Autenticidade					
						Compostos	Identificação/perfil	Espécies/Varietade	Origem geográfica	Processos de fabrico	Aplicações
<i>MS</i>											
IRMS	+	+/-	+/-	-	+	Vários	i+p	✓	✓	✓	vinho, sumos de fruta, salmão, carne, queijo, leite, mel, azeite e aromas
ICP-MS	+	+/-	+	-	+	Elementos	i+p		✓		
PTR-MS	+	+	+	-	-	Voláteis	p		✓		
GC-MS	+	+	+/-	-	+	(Semi) voláteis	i+p		✓		
<i>Espectroscopia</i>											
NMR	-	+/-	+/-	-	-	Vários	i+p	✓	✓	✓	
IR	+/-	+	+	+	+	Vários	p	✓	✓	✓	vinho, mel e sumos de fruta
Fluorescência	+	+	+	+	-	Vários	p	✓	✓		queijo
Atómica	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Elementos	i+p		✓		
<i>Separação</i>											
HPLC	+/-	+	+/-	+	+	Vários	p	✓	✓		queijo, vinho e azeite
GC	+	+	+/-	+	+	(Semi) voláteis	p	✓	✓		
CE	-	+	+/-	+	-	Vários	p		✓		
<i>Outras</i>											
Tecnologia de sensores	-	+	+	+/-	+/-	Voláteis	p	✓	✓	✓	azeite, vinho, mel e carne
PCR	+	+/-	+/-	+	-	ADN	i+p	✓			
Análises sensoriais	+/-	+/-	-	-	-	Vários	p		✓		

da autenticidade de géneros alimentícios, indicam que as técnicas de IRMS, SNIF-NMR e Nariz Electrónico (instrumento para a análise de aromas que simula o olfacto humano) oferecem o maior potencial para o desenvolvimento de novos protocolos neste domínio. O desenvolvimento contínuo estratégico de novas aplicações focar-se-á, provavelmente, no potencial destas técnicas em conjunto com a análise quimiométrica.

3.7 A Autenticidade Alimentar no Contexto Sócio-Político Internacional

Os nossos antepassados já se preocupavam com a aplicação de regras que protegessem os consumidores de práticas desonestas na venda de géneros alimentícios. Evidências disso são, por exemplo, a existência de tabuletas assírias, que descreviam o método a ser usado na determinação correcta do peso e nas medidas de cereais; os pergaminhos egípcios em que constavam as indicações (rotulagem) que tinham que acompanhar determinados géneros alimentícios. Os antigos atenienses inspeccionavam a pureza e sanidade dos seus vinhos e cervejas.

Os romanos tinham um sistema estatal de controlo de géneros alimentícios bem organizado para a protecção dos consumidores contra fraudes e má produção.

Na Europa, durante a Idade Média, foram aprovadas leis relacionadas com a qualidade e segurança dos ovos, salsichas, queijo, cerveja, vinho e pão. A fraude é talvez um reflexo da condição humana pois de uma maneira ou de outra tem caminhado a par com as transações comerciais ao longo dos séculos.

Existe em toda a Europa uma imensa riqueza e variedade de produtos alimentares. Mas quando um produto adquire uma reputação que ultrapassa fronteiras, é possível que tenha de se defrontar no mercado com produtos copiados que usurpam o seu nome. Esta concorrência desleal não só desencoraja os produtores como também induz o consumidor em erro. Por essa razão, a Comunidade Europeia criou o Regulamento (CE) N° 2081/92,²³³ onde definiu sistemas de protecção e de valorização dos géneros alimentícios (DOP, IGP e ETG).

- A Denominação de Origem Protegida (DOP) é o nome de um produto cuja produção, transformação e elaboração ocorrem numa área geográfica delimitada com um saber fazer reconhecido e verificado.
- Na Indicação Geográfica Protegida (IGP), a relação com o meio geográfico subsiste pelo menos numa das fases da produção, transformação ou elaboração. Além disso, o produto pode beneficiar de uma boa reputação tradicional.
- A Especialidade Tradicional Garantida (ETG) não faz referência a uma origem mas tem por objecto distinguir uma composição tradicional do produto ou um modo de produção tradicional.

Mercados cada vez mais competitivos e a pressão do consumidor para produtos cada vez menos processados e mais naturais, motivou a indústria alimentar a desenvolver novos géneros alimentícios, ingredientes e processos.

Com a expansão do mercado global, e o crescimento das transações o número de casos de géneros alimentícios contrafeitos por meio de adição de produtos externos mais baratos ou práticas de rotulagem incorrectas, cresceu enormemente, causando prejuízos económicos

avultados, quer para os produtores honestos, quer para os consumidores desconhecedores deste tipo de fraude.

A segurança e a qualidade alimentar são temas que preocupam todos os cidadãos da União Europeia e de todo o mundo, sendo a qualidade/genuinidade dos géneros alimentícios um dos factores mais importantes que determinam a aceitação, a atracção e a compra de um produto pelo consumidor.

Estas questões têm sido alvo de preocupação na União Europeia, que se tem reflectido nos Programas Quadro de Investigação e Desenvolvimento principalmente nos últimos três, 5ºPQ, 6ºPQ e 7ºPQ, ao ser um dos temas prioritários.

No 6ºPQ a autenticidade (nos domínios da qualidade e da segurança alimentar) foi um assunto prioritário "... para além da avaliação da conformidade com a rotulagem (detecção de fraudes e adulterações), verificando-se uma grande necessidade de julgar a eficácia e/ou os efeitos secundários de suplementos alimentares e géneros alimentícios funcionais. A crescente popularidade dos géneros alimentícios biológicos exige a disponibilização de métodos adequados para avaliar a autenticidade...". No 7ºPQ uma das áreas prioritárias do Centro de Investigação da Comissão Europeia, o Joint Research Center (JRC) dentro do Área "Security and Freedom" apresenta como um dos temas Food and Feed Safety and Quality.

3.7.1 Autenticidade de Géneros Alimentícios

O termo autêntico significa 'verdadeiro'.

Autenticidade significa 'qualidade do que é conforme à verdade'.

Um 'alimento autêntico' pode ser definido como aquele que tem a sua natureza, substância e qualidade descritas.²³⁴

Género Alimentício Adulterado "... se qualquer constituinte foi retirado em parte ou na sua totalidade; ou se qualquer substância tenha sido parte ou totalmente substituída; ou se qualquer substância foi adicionada ou misturada tal que aumente o seu peso ou a sua quantidade ou reduzir a sua qualidade ou força ou aparentá-lo melhor ou de maior valor do que é..."²³⁴

O processo de alterar ou substituir um material alimentar tal que altera a sua composição mas que é descrito como puro é designado como adulteração económica.

A força motriz por detrás de qualquer adulteração é a substituição de um ou mais componentes mais caros por outro(s) mais barato(s); o objectivo é geralmente vender um produto mais barato por um de custo mais elevado.

Um exemplo típico é o caso da vanilina que é um dos aromas mais utilizados na indústria alimentar. A vanilina natural é cerca de 100 vezes mais cara que a vanilina sintética o que mostra como este tipo de adulteração é extremamente lucrativa.

A adulteração pode mesmo colocar a saúde dos consumidores em risco como é o caso da adição de dietilenoglicol ao vinho.

Os principais tipos de adulteração encontram-se nas seguintes áreas: área das espécies/variedade que é talvez a fonte mais óbvia de produtos não-autênticos (ex. sumos, peixe, azeite); região de origem (muitos géneros alimentícios embalados na UE, dão grande ênfase ao nome regional do produto como é o caso particular dos vinhos); processos (certos tipos de processos são mais eficientes ou baratos, pode até, haver vantagem em utilizá-lo na produção mas, de acordo com o rótulo, o processo ser outro); fraudes industriais (certos produtos possuem propriedades que os tornam demasiado vulneráveis à fraude como é o caso dos sumos de fruta que podem ser diluídos com soluções açucaradas); marcas (muito comum nos whiskies).

A lista de géneros alimentícios adulterados é difícil de compilar e varia continuamente com o lançamento de novos produtos. Fraudes com produtos mais baratos e na designação da origem geográfica, assolam muitos produtos nomeadamente o vinho, os sumos de fruta, o azeite, o queijo, a manteiga, o peixe, a carne entre outros.

3.7.2 Normas Para Géneros Alimentícios

O Codex Alimentarius é um programa misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (WHO) que estabelece as normas de segurança dos géneros alimentícios que servem de referência ao comércio internacional dos géneros alimentícios.²³⁵

Entre 1954 e 1958, a Áustria dedicou-se activamente à criação do Codex Alimentarius Europaeus e em 1961, o Conselho do Codex Alimentarius Europaeus resolveu propôr à FAO e à WHO, a adopção das normas alimentares desenvolvidas pelo referido códex. É nesse mesmo ano que a Conferência FAO, com o apoio da WHO, da Comissão Económica para a Europa (Economic Commission for Europe - ECE), da Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Económica (Organization for Economic Co-operation and Development - OECD) e do Conselho do Codex Alimentarius Europaeus, estabelece o Codex Alimentarius e resolve criar um programa internacional de normalização alimentar. Nessa altura, foi estabelecida a Comissão do Codex Alimentarius e solicitada colaboração da WHO, num programa de normalização alimentar.

Em Maio de 1963, a Assembleia Mundial de Saúde reconheceu a importância da WHO em todos os aspectos de saúde relacionados com os géneros alimentícios. Considerando ser da sua responsabilidade estabelecer normas alimentares, aprovou o programa conjunto FAO/WHO de Normalização Alimentar e adoptou os estatutos da Comissão do Codex Alimentarius.

A Comissão do Codex Alimentarius (CAC) é um corpo intergovernamental, formado por representantes dos governos de todos os países membros e o seu principal objectivo é o de proteger a saúde dos consumidores e assegurar boas práticas no comércio de géneros

alimentícios, através do seu contributo para a harmonização internacional de normas - estabelecimento de normas internacionais para os géneros alimentícios - e outros documentos, que podem ser recomendados aos Governos dos seus Estados Membros e associados e da promoção da coordenação de todos os trabalhos empreendidos pelas organizações governamentais, não governamentais e internacionais, em matéria de normas alimentares, bem como corrigir e/ou actualizar, finalizar, propôr e publicar essas normas. Esta Comissão é a responsável pelo Codex Alimentarius.²³⁵

3.7.3 Legislação da União Europeia

Sendo a União Europeia o maior importador e exportador de géneros alimentícios do mundo, segundo a FAO,²³⁶ esta mostra grande preocupação com todos os fenómenos que podem impedir o crescimento do comércio alimentar internacional e atrasar a harmonização do seu mercado doméstico.

Por esta razão a Comissão Europeia estabeleceu várias directivas que apontam as boas práticas para transformação dos géneros alimentícios e sua comercialização: Directiva 2001/54/CE²³⁷ para extractos de café e de chicória; Regulamento (CE) N° 2348/91²³⁸ base de dados para recolha de dados de SNIF-NMR em produtos vίνicos; Regulamento (CE) N° 1410/2003 de 7 de Agosto de 2003²³⁹ que altera o Regulamento (CE) N° 1622/2000²⁴⁰ que estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) N° 1493/1999²⁴¹ do Conselho que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, e constitui um código comunitário das práticas e tratamentos enológicos, Regulamento (CE) da Comissão N° 2152/2001²⁴² e o N° 455/2001²⁴³ relativamente a normas de mercado e de métodos de análise de azeites, Regulamento (CE) da Comissão N° 213/2001²⁴⁴ que estabelece regras para os métodos para avaliação da análise e qualidade do leite e productos lácteos, Regulamento (CE) da Comissão N° 2491/2001²⁴⁵ relativo à produção orgânica de produtos agrícolas e géneros alimentícios, Regulamento (CE) da Comissão N° 2601/2001²⁴⁶ que regista as designações DOP e IGP para designar a origem de produtos agrícolas e géneros alimentícios, a Directiva 2000/13/CE²⁴⁷ relativa à rotulagem de géneros alimentícios (o rótulo deverá descrever detalhadamente a natureza e a caracterização exacta do produto).

Também o Livro Branco²⁴⁸ sobre a segurança dos alimentos, abrange todos os sectores da cadeia alimentar, incluindo a produção de alimentos para animais, de modo a existir um método completo e coeso de segurança alimentar ‘da exploração agrícola até à mesa’ ou a expressão ainda mais conhecida ‘do prado ao prato’. Por forma a ‘dar corpo’ à resolução destas preocupações, a União Europeia, publicou o Regulamento (CEE) N° 178/2002⁴⁴ de 28 de Janeiro que ‘determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos - EFSA (European Food Safety Authority) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios’.

Operacional desde 2005 a EFSA é o novo corpo oficial da UE para tratar das questões relacionadas com a segurança e a protecção do consumidor. As directivas acima dizem respeito às práticas de rotulagem e aos métodos de processamento com o objectivo de evitar

Tabela 3.3: Alguns métodos oficiais baseados nas técnicas isotópicas para detecção da adulteração.

Tipo de Amostra	Parâmetro Isotópico	Método de Análise	Referência
Vinho	Etanol, (D/H) _I ^a , (D/H) _{II} ^b R ^c	SNIF-NMR	Regulamento EC 2676/90, ¹³⁸ anexo 8
Vinho	Etanol, ¹³ C	IRMS	Regulamento EC 440/2003, ¹³⁹ anexo 2
Vinho	Água, ¹⁸ O	IRMS	(Regulamento EC 822/97) ¹⁴⁰
Sumo de fruta	Etanol, (D/H) _I , (D/H) _{II} , R	SNIF-NMR	AOAC método 995.17 ²⁵¹
Sumo de fruta	Etanol, ¹³ C	IRMS	AOAC método 2004.01 ²⁵³
Sumo de fruta	Acúcares, ¹³ C	IRMS	ENV 12140 (CEN/TC174N108) ²⁴⁹
Sumo de fruta	Água, ¹⁸ O	IRMS	ENV 12141 (CEN/TC174N109) ²⁵⁰
Mel	Mel e proteínas, ¹³ C	IRMS	AOAC método 991.41 ²⁵⁴

^a A razão isotópica (D/H) do grupo metilo na molécula de etanol, (D/H)_I, é característica do tipo de açúcares fermentado e portanto da origem botânica;

^b A razão isotópica (D/H) do grupo metileno na molécula do etanol, (D/H)_{II}, reflecte a influência do clima e da água de fermentação;

^c R representa a distribuição relativa do deutério nas duas posições do etanol [R = 3 × (D/H)_{II}/(D/H)_I].

que os consumidores sejam enganados em particular no que está relacionado com a natureza, identificação, propriedades, composição, origem e método de produção dos géneros alimentícios. Estes documentos são meramente bases legais e não oferecem guias dos métodos analíticos para avaliar a qualidade ou autenticidade de géneros alimentícios.

Para tal, a Comunidade Europeia criou regulamentos oficiais para produtos específicos que adoptam os métodos e técnicas isotópicas no domínio da autenticidade de géneros alimentícios. O primeiro Regulamento diz respeito ao controlo da origem e autenticidade dos vinhos recorrendo ao uso das técnicas isotópicas de IRMS e de SNIF-NMR Regulamentos (CE) N° 2676/90,¹³⁸ N°822/97,¹⁴⁰ N° 440/2003,¹³⁹ o CEN/TC174 n°108²⁴⁹ e 109,²⁵⁰ e o método AOAC 995.17²⁵¹ para o controlo de sumos de fruta. A Tabela 3.3 apresenta alguns dos métodos analíticos oficiais da União Europeia que usam as técnicas isotópicas e são já métodos de rotina em muitos laboratórios que têm como missão fiscalizar e garantir a autenticidade de géneros alimentícios.²⁵²

3.7.4 Em Portugal

Em Portugal a indústria alimentar ocupa um espaço importante na economia nacional. Após a adesão de Portugal à União Europeia, a construção do mercado único em 93 obrigou o sector a um esforço de harmonização de todas as regras de manuseamento, de fabrico e de apresentação, nomeadamente nas regras de rotulagem, de higiene e de aditivos.

A insuficiência de matéria prima nacional com as características necessárias à indústria, leva a que muitas se abasteçam essencialmente de produtos agrícolas importados. Esta situação significa uma fragilidade para a própria indústria, o gosto e a cultura portuguesa mantém algumas preferências no sector alimentar pelos produtos nacionais em particular os tradicionais. No que respeita a Agências de Fiscalização na área da adulteração e segurança alimentar, em Portugal, o Decreto-Lei nº 180/2000²⁵⁵ de 10 de Agosto cria a Agência para a Qualidade e Segurança Alimentar, AQSE. Desde a sua criação, a Agência manteve-se apenas no papel, não sendo notória qualquer actividade. Em Dezembro de 2005 o Decreto-Lei nº 237/2005²⁵⁶ cria a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, ASAE, que é a autoridade administrativa nacional especializada no âmbito da segurança alimentar e da fiscalização económica e tem por missão a garantia de legalidade da actuação dos agentes económicos nos sectores alimentar e não alimentar, a defesa da saúde pública e da segurança dos consumidores através da promoção de acções de natureza preventiva e repressiva em matéria de infracções contra a qualidade, genuinidade, composição, aditivos alimentares e outras substâncias e rotulagem dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, e velar pelo cumprimento das normas legais que disciplinam as actividades económicas.

A ASAE colabora com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA).

3.8 Garantia e Controlo da Qualidade

A Garantia da Qualidade (GQ) e o Controlo da Qualidade (CQ) associados à análise química são conceitos cada vez mais importantes e estão associados à responsabilidade de se produzirem resultados analíticos fiáveis que possam ser usados em tomadas de decisão importantes.

Pode-se definir a Garantia da Qualidade como o conjunto de acções para planear a posterior tarefa de execução analítica ou seja, que visa a obtenção de resultados fiáveis. Um programa de GQ adequado deve abranger as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Um laboratório, para produzir dados consistentemente fiáveis, deve implementar um programa apropriado de procedimentos de garantia da qualidade. Os métodos analíticos devem ser validados como adequados ao uso, antes de serem utilizados no laboratório.

O Controlo da Qualidade (CQ) inclui todas as operações técnicas e as actividades que são utilizadas para preencher os requisitos da Qualidade, assegurando a precisão e a exactidão adequadas dos resultados para a aplicação pretendida.²⁵⁷ O CQ é uma parte do programa da Garantia da Qualidade.

Qualquer Laboratório Analítico para ter certeza nos resultados que produz, deve possuir um sistema de Controlo da Qualidade. O CQ pode ser externo ou interno, como irá ser explicado de seguida.

3.8.1 Controlo da Qualidade

3.8.1.1 CQ Externo

Considera-se CQ externo o conjunto das “acções de CQ efectuadas pelo laboratório mas cuja realização depende de uma intervenção (ou participação) exterior ao laboratório”.

Estas acções são indispensáveis para o laboratório se situar na comunidade laboratorial internacional e têm geralmente como objectivo avaliar a exactidão dos resultados produzidos. A participação em programas de ensaios de proficiência (definido como: métodos para verificar o desempenho do laboratório através de testes interlaboratoriais²⁵⁸) fornece aos laboratórios um meio objetivo de avaliar e demonstrar a confiabilidade dos dados por eles produzidos.

3.8.1.2 CQ Interno

O CQ interno compreende o conjunto das “acções de CQ cuja implementação depende apenas da vontade e meios do laboratório e não de um factor externo”. As acções de CQ interno visam controlar a precisão dos resultados produzidos pelo laboratório.

Do CQ interno fazem parte a análise de duplicados de amostras, introdução de amostras cegas juntamente com a sequência a analisar, utilização de MR internos ou MR de laboratório, padrões de controlo internos entre outras. Se possível, convém que todos os resultados analíticos sejam rastreáveis a MR(C) preferencialmente a Materiais de Referência Certificados. Quando não existam disponíveis MRC é recomendável que a rastreabilidade (definida em 4.4.1) seja estabelecida em relação a um método normalizado ou validado. A construção de cartas de controlo é internacionalmente aceite como um dos meios mais eficazes de exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos e para detectar erros.

Os MRC são cada vez mais o pilar no CQ e os ensaios interlaboratoriais de aptidão e a rastreabilidade das medições a padrões nacionais e internacionais são passos fundamentais para a aceitação de resultados analíticos. O conceito de rastreabilidade liga-se com a necessidade de se obter resultados comparáveis com outros laboratórios, o que é imprescindível para a implementação efectiva das medidas de controlo e repressão da fraude.

3.9 Cálculo das Incertezas

Na literatura pode encontrar-se diversas abordagens para o cálculo das estimativas das incertezas associadas a um resultado ou a um método analítico.^{259–274}

A noção de incerteza de um resultado é antiga no domínio da Metrologia mas é bastante recente na área da Química. Quando se apresenta o resultado da medição de uma grandeza

física, é necessário dar alguma indicação da qualidade do resultado de modo a que se possa julgar da confiança que se deve depositar nesse resultado. O melhor índice da qualidade de uma medida é dada pela sua incerteza. A incerteza caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que se mede. Segundo o GUM²⁵⁹ “Incerteza da medida é o parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza medida”.

São várias as abordagens mais vulgarmente utilizadas na quantificação da incerteza da medição. São elas:²⁶⁰

- a abordagem passo a passo, ou em inglês “bottom-up”;
- a abordagem baseada em informação de dados interlaboratoriais;
- a abordagem baseada em dados da validação e/ou Controlo da Qualidade do método analítico sobre dados intralaboratoriais.

Qualquer uma destas metodologias pode ser usada pelos laboratórios desde que demonstrem que são tecnicamente válidas e aplicáveis aos métodos em estudo. A escolha da metodologia de cálculo será função da informação e dos dados disponíveis no laboratório.

Capítulo 4

Materiais de Referência (MR) e Materiais de Referência Certificados (MRC)

4.1 Introdução

A importância cada vez maior da química analítica na sociedade moderna, tem-se traduzido no desenvolvimento de acções com vista a melhorar a qualidade dos resultados analíticos e a garantir a sua qualidade ao cliente final.

Em todas as medições que executa, o analista tem que demonstrar a qualidade do seu trabalho, *i.e.*, que o seu método conduz a resultados fiáveis e rastreáveis (ver definição de rastreabilidade em 4.4.1). Isso só é possível pela comparação da amostra real com um material de composição conhecida, ou seja, um material de referência, MR, também conhecido como material de referência de laboratório, MRL, ou com um material de referência certificado, MRC (as definições de MR e MRC encontram-se descritas em 4.3).

A importância da utilização e, conseqüentemente, da produção e certificação de MR foi fortemente sentida na União Europeia. Com o lançamento dos Programas Quadro para Investigação e Desenvolvimento, o programa comunitário existente relacionado com as actividades de produção e de certificação de MR, designado por Programa BCR (Bureau Communautaire de Référence) adaptou o seu âmbito à política europeia e às necessidades da sociedade, o que se reflectiu na mudança de nome para Measurement and Testing, no 3º Programa Quadro (1990-1994), e Standards, Measurements and Testing no 4º Programa Quadro (1994-1998).

No 5º Programa Quadro (1998-2002), esta actividade fez parte de um programa mais abrangente chamado “Competitive and Sustainable Growth” que foi um dos quatro Programas Temáticos, e conhecido como Measurements & Testing Generic Activity.²⁷⁵

Reportando à actualidade, o 7º Programa Quadro de I&DT (2007-2013), apresenta a área dos Materiais como um dos pilares de um dos dez Temas do Programa Específico “Cooperação” - “Nanociências, Nanotecnologias, Materiais e Novas Tecnologias de Produção” (NMP), que também apoia a área da Metrologia, através da Coordenação de Actividades, nomeadamente em benefício da investigação industrial. Um outro Tema que apoia a área da Metrologia é o Tema “Tecnologias da Informação e da Comunicação” (TIC).

Apesar do número de MR disponível ser já muito elevado, estudos efectuados, através de inquéritos, a laboratórios de vários países europeus, mostraram que muitos ainda não estão familiarizados com eles. Existe uma grande confusão entre MR e MRC. Muitos dos laboratórios inquiridos declararam que ainda não utilizam MRC porque não têm conhecimento da sua utilidade.²⁷⁶⁻²⁷⁸

Medidas fiáveis saem caras, mas más medições custam ainda mais. Podem dar origem a diagnósticos médicos errados, podem trazer partes opostas a tribunal, entre muitos outros problemas. Boas medições são a chave da produtividade. Os MRC são uma forma de ‘casar’ a economia com a exactidão, no interesse de todos.

As análises químicas executadas sob um controlo da qualidade intensivo, constituem uma evidência científica em numerosas situações, nas quais é necessário a tomada de decisões importantes, das quais se salientam:

- o destino de certos materiais e produtos,
- o diagnóstico de doenças nos seres humanos,
- o estabelecimento da violação de uma lei ou regulamento (suporte para acções em tribunal). *E.g.*, em 1997 na Austrália, foram usados dados isotópicos pelo Supremo Tribunal para comparação de amostras de *Cannabis* e em Inglaterra, no ano de 2002, para comparar lotes de “ecstasy”.¹²³
- a culpabilização de indivíduos em crimes graves (prova forense). . .

O reconhecimento de resultados analíticos além fronteiras é muito difícil, se não existirem critérios resultantes de acordos internacionais, que permitam avaliar as competências de um laboratório. O laboratório deve criar um sistema de qualidade adequado e isso passa pelo uso de MRC. Os materiais de referência são uma das pedras angulares da química analítica e constituem um pilar fundamental no controlo e na garantia da qualidade de dados analíticos.

Os Padrões da cultura ocidental foram criados pelos Gregos no séc. V a.c.. Um desses padrões, que ainda hoje é uma medida de homem, é o Hercules de Ephesus²⁷⁹. Para a química analítica os MR são os seus padrões.

4.2 O início...

A história dos materiais de referência está fortemente ligada ao desenvolvimento da química analítica. No séc. XIX a pureza dos compostos químicos era muito pobre comparada com o que é hoje e, por isso, tinham que ser especificados os materiais purificados adequados como padrões primários para a análise volumétrica.

Um dos primeiros exemplos, com este propósito, foi usado por Gay Lussac em 1824. Um pouco mais tarde, Sorensen (1887) propôs critérios para a selecção de padrões químicos primários, que foram posteriormente elaborados por Wagner em 1903. Curiosamente, os seus critérios são muito semelhantes aos usados actualmente.²⁸⁰ Uma das primeiras tentativas de aplicação de um MR biológico, ocorreu em Londres, por volta de 1880, na análise de gordura em leite, para identificação da sua adulteração por adição de água.²⁸⁰ Nessa altura o leite era vendido a granel e pelo menos 20 % encontrava-se adulterado com água.

Desde então, verificou-se uma consciencialização crescente da necessidade de MR por parte dos investigadores nas mais diversas áreas, nomeadamente na medicina, nas indústrias emergentes (materiais, aço e ferro), na geoquímica, na biologia etc., mas só por volta de 1950 é que se iniciou a preparação de MR biológicos.

Em 1901, o U. S. National Bureau of Standards (NBS)- actualmente o National Institute of Standards and Technology (NIST)- nasce da elevada procura de padrões, por parte das indústrias emergentes e em 1951 já se tinham preparado 541 MR, dos quais 200 eram de ligas metálicas e minérios e 204 eram hidrocarbonetos ou petróleo.

Noutras partes do mundo iam surgindo organismos virados para a produção de materiais de referência para a indústria metalúrgica, nomeadamente, na Europa, o Reino Unido (Bureau of Analyzed Samples, BAS), Alemanha (Federal Institute of Materials Research and testing, BAM), França (Bureau National de Métrologie e o Institute de Recherches de la Sidérurgie Française) e Polónia (Committee on Standardization and Measures) e, na Ásia, mais propriamente no Japão (Japanese Iron and Steel Institute).

A partir de 1950, a necessidade e, consequentemente, a procura crescente de MR alargou-se a todas as áreas científicas, pelo que foram criados novos organismos, dos quais se destacam o U. S. Geological Survey (USGS) nos Estados Unidos da América, e a International Atomic Energy Agency (IAEA) em Viena, na Áustria. Outros já existentes (tal como o NIST) alargaram o seu campo de produção, pelo que a utilização de MR de matrizes biológicas nas áreas da Farmácia, da Medicina e da Biologia, só começou por esta altura.

Com a criação de instituições nacionais e internacionais nos finais de 1960, iniciou-se uma nova era de produção de MR. A título de exemplo refere-se The National Bureau of Standards (NBS), que apresentou o primeiro MR botânico, de folhas de orquídea, no ano de 1971.

Nos anos de 1970 a 1980, outras organizações iniciaram programas de desenvolvimento de MR e MRC biológicos, ambientais e alimentares, e foram o U. S. Department of Agriculture, Agriculture Canada e o U. S. Food and Drug Administration, em cooperação com

o NIST, que produziram os primeiros MR alimentares.

No início dos anos 70, a Comunidade Económica Europeia (CEE) estabeleceu um programa de MRC alargado à comunidade, que visava colocar sob a coordenação do Community Bureau of Reference (BCR) as diversas actividades de MR existentes. O BCR produziu o primeiro MR biológico em 1983. Depois deste, foi preparado no Joint Research Center de Ispra, JRC, um número muito elevado de materiais candidatos a MR biológicos e ambientais.

O elevado número de MR produzidos levou à formação, em 1975, do ISO Council Committee on Reference Materials (ISO-REMCO), encarregue de estabelecer as linhas orientadoras internacionais relacionadas com os princípios da certificação, dos métodos a utilizar, necessidades, disponibilidade e nomenclatura.²⁸¹

Em cooperação com laboratórios Europeus qualificados, o BCR iniciou a produção e a certificação de MR alimentares. Em 1984 o Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), foi incumbido de preparar MR de elevada qualidade em condições economicamente mais atractivas e, em 1999, o número de MRC era de 570, incluindo materiais isotópicos e nucleares.²⁸⁰

Em meados dos anos 80, o aparecimento de Padrões de Qualidade (Quality Standards), da Gestão da Qualidade e esquemas de Acreditação, criaram um “boom” na necessidade de MR e MRC. Segundo dados do COMAR (Code d’Indexation des Matériaux de Référence) de Maio de 2008, existem mais de 11000 MRC de cerca de 200 produtores distribuídos por 27 países.

A procura de MR e MRC continua a crescer. À medida que a análise química tradicional se move para a bioquímica e biologia molecular a procura de MR não diminuiu, a questão é: “qual é o próximo?”.

4.3 O que é um MR(C)?

De acordo com o guia ISO 30,²⁸² um material de referência certificado, MRC, e um material de referência, MR, definem-se como:

- Material de referência (MR): Material ou substância com um ou mais valores das suas propriedades suficientemente homogéneos e bem definidos para a calibração de um instrumento, e a avaliação de um método de medição, ou para a atribuição de valores a materiais.
- Material de referência certificado (MRC): Material de referência, acompanhado por um certificado, do qual uma ou mais propriedades são certificadas por um procedimento que estabelece a sua rastreabilidade a uma realização exacta da unidade na qual os valores da propriedade se exprimem e para a qual cada um dos valores certificados é acompanhado de uma incerteza para um dado intervalo de confiança.

Nota: Todos os MRC correspondem à definição de “padrão” dada no VIM.¹

Os requisitos básicos para qualquer Material de Referência adequado ao fim a utilizar são:

- ser semelhante, na matriz e no analito, (análise qualitativa ou quantitativa) às amostras a analisar;
- ser homogéneo;
- ser estável dentro do período de utilização.

Grande parte dos MRC são chamados “MRC-matriz”,²⁸⁰ indicando que foram preparados a partir de materiais naturais e, para estes casos, é impossível rastrear ao sistema SI (como é o caso dos MR biológicos ou alimentares).²⁸³

A diferença chave entre um MRC e um MR está relacionada com a sua rastreabilidade. No caso ideal, a cadeia da rastreabilidade vai até ao Sistema Internacional de Unidades, SI. No entanto, isto só é exequível para alguns MRC.

Praticamente, todas as medições analíticas são rastreáveis aos MRC, que por sua vez podem ser rastreáveis ao sistema SI, durante a sua produção e certificação.

4.4 Normas Internacionais e Definições

A International Organization for Standardization, ISO, estabeleceu em 1973 a primeira comissão de trabalho, REMPA (Working Party of Reference Materials), dedicada ao desenvolvimento de materiais de referência. Em 1975, esta comissão tornou-se na Comissão política designada por ISO REMCO (ISO Committee on Reference Materials), cujo principal objectivo foi o de promover e harmonizar, a nível internacional, a produção a aplicação e o mercado de vendas dos materiais de referência.²⁸⁴

Inicialmente dividida em 6 grupos, a ISO REMCO opera actualmente através de três sub-comissões:

- Harmonização e Coordenação Internacional
- Guias Técnicos
- Classificação e transferência de conhecimentos/experiência.

Todos os projectos Europeus de Materiais de Referência se devem basear nos guias internacionalmente aceites, os guias ISO 30-35,^{282,285-289} Tabela 4.1. Para uma utilização correcta destes guias ISO, é essencial ter conhecimento de outros 2 documentos:

- “The International Vocabulary of basic and general terms in Metrology”, VIM,¹ que define a terminologia usada nos Guias ISO
- “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement”, GUM.²⁵⁹

Tabela 4.1: Guias ISO

ISO	Ano	Conteúdo
ISO Guide 30 ²⁸²	1992	Terms and definitions used in connection with reference materials.
ISO Guide 31 ²⁸⁵	2000	Reference materials - Contents of certificates and labels.
ISO Guide 32 ²⁸⁶	1997	Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials.
ISO Guide 33 ²⁸⁷	2000	Uses of certified reference materials.
ISO Guide 34 ²⁸⁸	2000	General requirements for the competence of reference materials producers.
ISO Guide 34/Cor 1 ²⁹⁰	2003	General requirements for the competence of reference materials producers. Technical Corrigendum 1.
ISO Guide 35 ²⁸⁹	2006	Certification of reference materials. General and statistical principles.

Para além da ISO, muitas outras organizações (que não de normalização, mas mais de âmbito político), têm produzido guias ou documentos técnicos sobre materiais de referência. É o caso da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), WHO (World Health Organization), EA (European co-operation for Accreditation), ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) e IAEA (International Atomic Energy Agency), Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Lista de alguns guias e documentos técnicos internacionais

Organização	Documento
IUPAC	Orange Book “Recommended reference materials for the realization of physico chemical properties”, 1997 ²⁹¹ .
WHO	“Guidelines for the preparation and characterization and establishment of international and other standards on reference reagents for biological substances”, 2006 ²⁹²
EA	EA 04/14 2003 “The selection and use of reference materials” ²⁹³
ILAC	ILAC 12.2000 “ILAC requirements for the competence of reference materials producers” ²⁹⁴ .
IAEA	IAEA 1999 “The use of matrix reference materials in environmental analytical processes” ²⁹⁵ .

O livro “Orange Book” da IUPAC é usado como guia de referência nos documentos 84/449/CEE²⁹⁶ de 25 de Abril de 1984 e 92/69/CEE²⁹⁷ de 31 de Julho de 1992 para classificação, embalagem e rotulagem de substâncias perigosas (estes documentos estão disponíveis em <http://europa.eu.int/eur-lex>).

Apesar de o Bureau Communautaire de Reference (BCR) ter sido criado pela Comissão Europeia em 1973, o seu primeiro guia para a produção de materiais de referência, intitulado Standards Measurements and Testing Program: BCR/48/93:1994 “Guidelines for the Production and Certification of BCR Reference Materials” só foi publicado em 1994.⁵

Há mais de 10 anos que grupos internacionais tais como EURACHEM (rede de organizações europeias com o objectivo de estabelecer um sistema de rastreabilidade internacional das medidas químicas e promover as boas práticas da qualidade), European Association of National Metrology Institutes (EURAMET), Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC) e Consultative Committee for Amount of Substance (CCQM) comissão do Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), procuram construir uma infra-estrutura de suporte aplicada à química, baseada na abordagem metrológica.

4.4.1 Definições

Seguidamente apresentam-se algumas definições relevantes no âmbito deste trabalho, de acordo com o VIM (a maior parte).¹

- **Padrão internacional:** Padrão reconhecido por um acordo internacional para servir de base à fixação internacional dos valores de outros padrões da grandeza a que respeita.
- **Padrão nacional:** Padrão reconhecido por uma determinação legal nacional para servir de base, num dado país, à fixação dos valores de outros padrões da grandeza a que respeita.

Nota: Frequentemente, o padrão nacional constitui também um padrão primário num país.

- **Padrão primário:** padrão que é designado ou é largamente reconhecido como possuindo as mais elevadas qualidades metrológicas, e cujo valor é aceite sem referência a outros padrões da mesma grandeza.

Nota: O conceito de padrão primário é válido tanto para unidades de base como para unidades derivadas.

- **Padrão secundário:** padrão cujo valor é fixado por comparação com um padrão primário da mesma grandeza.
- **Padrão de referência:** Padrão, em geral da mais elevada qualidade metrológica disponível num dado local, ou organização, do qual derivam as medições aí efectuadas.
- **Padrão de trabalho:** Padrão que é utilizado correntemente para calibrar ou verificar medidas materializadas, instrumentos de medição ou materiais de referência.

Nota 1. Um padrão de trabalho é usualmente calibrado por comparação com um valor de referência.

Nota 2. Um padrão de trabalho utilizado correntemente para garantir que as medições são efectuadas correctamente é denominado padrão de verificação.

- **Calibração:** conjunto de operações que estabelecem, em condições especificadas, a relação entre valores de grandezas indicados por um instrumento de medição ou sistema de medição, ou valores representados por uma medida materializada ou um material de referência e os correspondentes valores realizados pelos padrões.

Nota: O resultado da calibração pode ser registado num documento, por vezes chamado certificado de calibração ou relatório de calibração.

- **Rastreabilidade:**²⁹⁸ propriedade do resultado de uma medição ou valor de um padrão, que consiste em poder relacionar-se com referências determinadas, geralmente padrões nacionais ou internacionais, por intermédio de uma cadeia ininterrupta (chamada de cadeia de rastreabilidade) de comparações, tendo todas as incertezas determinadas. No caso das medições químicas, a unidade SI é a mole. Os MRC para análise química constituem a ligação chave na cadeia de rastreabilidade.
- **Ensaio de certificação:**²⁹⁹ Ensaio interlaboratorial no qual um grupo de laboratórios seleccionados analisam um material candidato a MR, por métodos que produzem incertezas pequenas, com o propósito de produzir um valor de referência da propriedade do material.

4.5 MR(C) para quê?

Um material de referência permite a comparação de uma amostra real com um material conhecido, quando se identifica e quantifica uma determinada substância. As principais aplicações dos MRC podem ser agrupadas nas seguintes categorias:³⁰⁰

- Avaliação e verificação da precisão e exactidão de métodos de análise.
- Avaliação da rastreabilidade de resultados analíticos.
- Cálculo da estimativa da incerteza.
- Desenvolvimento de métodos de referência.
- Avaliação do campo de aplicação dos métodos.
- Validação de métodos específicos e desenvolvimento de novos, ou melhoramento de métodos já existentes.
- Calibração directa de métodos e equipamentos.
- Calibração de padrões de trabalho (padrões internos).
- Verificação do desempenho do laboratório.

Para além da exigência de uso de MRC, os laboratórios acreditados necessitam ainda de utilizar MRLs (Materiais de Referência de Laboratório), para verificar o desempenho dos seus métodos analíticos ao longo do tempo. Idealmente, deveriam existir MR e MRC para cada tipo de análise. Contudo, isso está ainda muito longe da realidade e, por isso, muitas análises são realizadas sem o controlo de MR(C).

A utilização correcta e o conhecimento por parte do utilizador das limitações de um MRC, podem ser muito úteis na identificação de fontes de erro, em análise química. Cada vez mais, os MRC são ferramentas essenciais utilizadas na comparação e na rastreabilidade de resultados necessários à implementação da legislação Europeia e de normalização, para a protecção da saúde pública e do ambiente, para a optimização de processos industriais e para a promoção do mercado internacional.^{301,302}

Uma descrição mais detalhada do uso de MR está disponível nos guias ISO 32 e 33^{286,287} e ainda noutros artigos da especialidade.^{300,301,303,304}

4.6 Princípios Gerais de Produção de Materiais de Referência

As bases teóricas para a preparação e uso de MR encontram-se pormenorizadamente descritas nos guias ISO 30 a 35^{282,285-289} e nos guias BCR.^{5,6}

Em termos gerais, os principais passos envolvidos na preparação de um MR são os seguintes:

- Definir o MR nomeadamente, a matriz, os valores de propriedade a serem certificados e a concentração desejada.
- Definir um procedimento de amostragem.
- Definir o procedimento de preparação da amostra.
- Seleccionar o protocolo experimental adequado para os testes de homogeneidade e de estabilidade.
- Estudar a viabilidade da produção do MR.
- Planear a caracterização do MR (por exemplo, através de estudos interlaboratoriais).
- Amostragem.
- Realizar teste de homogeneidade.
- Realizar teste de estabilidade.
- Caracterizar o MR.

- Tratar os resultados relativos aos testes de homogeneidade e de estabilidade, e à caracterização. Determinação da estimativa da incerteza.
- Emitir um certificado e, se apropriado, um relatório de certificação, com informação sobre a homogeneidade, a estabilidade, os valores de propriedade a certificar e a sua rastreabilidade ao Sistema Internacional de Unidades, SI.

O produtor disposto a certificar um material de referência deve ser capaz de demonstrar que o composto ou mistura de compostos candidatos é homogêneo. Assim, deverão ser testadas, de acordo com o guia ISO 35,²⁸⁹ a homogeneidade de quantidades significativamente representativas de um lote do material candidato a material de referência, a homogeneidade específica, nas duas situações: interunidades e intra-unidades.

É necessária uma avaliação da estabilidade dos valores de propriedade do material (*e.g.*, o valor de $\delta^{13}\text{C}$) de referência a intervalos periódicos, após caracterização, para confirmar que todos os valores se mantêm desde a produção até ao uso final (estabilidade no longo prazo).

Os valores de propriedade a serem verificados deverão ser medidos periodicamente, idealmente numa gama de condições nas quais o material será posteriormente armazenado antes da distribuição aos utilizadores (estabilidade no curto prazo). Os efeitos da luz, a mistura, o aquecimento e o tempo, devem ser quantificados para que se possam fornecer conselhos sobre localização de armazenagem e prazo de validade (teste de estabilidade acelerado por irradiação e choques térmicos e no longo prazo).

As amostras deverão ser analisadas em condições de repetibilidade.

É recomendado^{5,6} que, antes de se passar à certificação de um material, seja feito um estudo preliminar da sua exequibilidade (do inglês, “feasibility study”) do futuro candidato a MR. Encontra-se disponível na literatura informação detalhada sobre os métodos para testar a homogeneidade e a estabilidade de MR.^{5,6,289}

4.7 MR para Isótopos Estáveis

A maioria dos MR de isótopos estáveis são compostos quimicamente puros e, geralmente, é o desvio relativo da razão isotópica relativo a um padrão, expresso como valores δ , que tem interesse e não a sua razão isotópica absoluta.

Os MR disponíveis para as técnicas isotópicas são sulfatos, carbonatos, sulfuretos, nitratos, grafite ou polietileno, puros; ou naturais quase puros, *e.g.*, água, açúcar, celulose, silicatos, entre outros. Alguns destes materiais são MR primários que definem escalas convencionais a que se reportam as medições. Tomemos como exemplo o V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water), que por acordo internacional, foi definido como sendo o zero na escala delta.

A IAEA e o IRMM, já produziram vários MR de isótopos estáveis para determinação das razões isotópicas dos isótopos de H, C, O e N. Todos os valores dos MR Isotópicos fornecidos pelo IRMM são rastreáveis ao sistema SI, pelo que as medições isotópicas corrigidas com estes MR de razões isotópicas apresentam incertezas menores.²⁸⁰

Tendo por base as definições apresentadas no ponto 4.4.1, e particularizando para os MR isotópicos, estes podem ser agrupados de acordo com as seguintes categorias e definições:³⁰⁵

- Padrões de referência primários - materiais naturais (ex. V-SMOW) ou virtuais (*e.g.*, SMOW), relativamente aos quais são expressas as variações relativas das razões de isótopos estáveis em compostos naturais, usando a notação delta.
- Materiais de calibração - Compostos sintéticos ou naturais que foram rigorosa e cuidadosamente calibrados com padrões de referência primários, para os quais os valores de calibração foram internacionalmente adoptados. São usados para definir o positivo e negativo da escala delta à volta de zero e, portanto, exprimem os resultados das determinações da composição isotópica relativamente aos padrões de referência primários. São utilizados para verificar o espectrómetro de massa e servem como controlo interno dos resultados analíticos.
- Materiais de intercomparação - compostos naturais ou sintéticos, que permitem aos laboratórios a verificação periódica da qualidade das medições realizadas, incluindo a reprodutibilidade, a longo prazo, da preparação da amostra para uma série de matrizes diferentes, por comparação com os obtidos por outros laboratórios. Os materiais de intercomparação cobrem um largo espectro de matrizes químicas e uma gama larga de valores de razões isotópicas. A sua composição isotópica é considerada a média dos resultados de todos os laboratórios (resultados obtidos em condições de reprodutibilidade), após eliminação de valores aberrantes.

Os materiais usados para a calibração das medidas isotópicas dos padrões de referência, para os elementos mais leves, V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water), SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation), NBS-19 (Calcite) e IAEA-S-1 (Sulfureto de prata) necessitam de ser caracterizados e as suas razões isotópicas absolutas devem ser determinadas. Isto permite, em princípio, verificar se a composição isotópica do material varia com o tempo e preparar novos materiais com razões isotópicas idênticas ou muito próximas, de preferência antes de se esgotarem, ou se as condições de armazenamento e de manuseamento são adequadas para a sua conservação a longo prazo.

Nos últimos 40 anos a IAEA preparou uma variedade enorme de materiais de referência e de intercomparação de isótopos estáveis, para a determinação da composição isotópica de compostos naturais.³⁰⁶ Os parágrafos seguintes descrevem, com mais detalhe, os diferentes tipos de materiais de referência isotópicos disponíveis.

4.7.1 Materiais de Referência Primários

Os padrões de referência primários usados para exprimir as variações naturais da composição isotópica dos cinco elementos, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, são o SMOW, PDB, CDT e N_2 atmosférico.

4.7.1.1 SMOW (Standard Mean Ocean Water)

Já em 1953, foi sugerido usar como referência para as medições das razões de isótopos do oxigénio e do hidrogénio, uma “água média do oceano”. No entanto, dado que não existe uma “água média do oceano”, este conceito foi redefinido por Craig, em 1961,³⁴ que definiu a hipotética Standard Mean Ocean Water, SMOW. A sua composição isotópica foi definida como uma média pesada das medidas disponíveis da composição isotópica das principais massas oceânicas. Mas, visto que o SMOW não passou de um conceito, e nunca existiu como uma amostra real, não podia ser usado para a calibração de medidas laboratoriais.

Em 1961, Craig definiu SMOW como o Padrão de Referência Primário para expressar as variações relativas de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^2\text{H}/^1\text{H}$ em águas naturais, mas não tardou que fosse utilizado para todos os materiais naturais, inclusivé na determinação da razão $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$ (esta razão isotópica tem particular interesse em materiais extraterrestres).^{306,307}

Antes de 1961, o padrão de referência utilizado para as medições isotópicas de oxigénio era o CO_2 , resultante do tratamento do PDB com ácido fosfórico a 100 %. Este CO_2 tinha uma composição isotópica em oxigénio, muito próxima do CO_2 em equilíbrio com SMOW a 25 °C pelo que foi relativamente fácil mudar de um para outro.

A definição de SMOW foi baseada num padrão de água conhecido como NBS-1, uma amostra de água do River Potomac, Washington D.C., originalmente depositado no National Bureau of Standards, o actual NIST. O valor encontrado por Craig para as razões isotópicas absolutas de SMOW foram de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = (1993,4 \pm 2,5) \times 10^{-6}$ e $^2\text{H}/^1\text{H} = (158 \pm 2) \times 10^{-6}$.^{306,308}

O padrão SMOW era, em princípio, um excelente padrão de referência primário, especialmente para a análise de águas, pois o oceano tem uma composição isotópica uniforme, e corresponde a cerca de 97 % da água presente na crosta terrestre, além de ser a maior fonte de todas as águas que fazem parte do ciclo hidrológico.³⁰⁶ Também para o hidrogénio, o oceano é o maior reservatório na Terra.

A grande desvantagem do SMOW é que nunca existiu como uma amostra de água real, relativamente à qual as medições não podiam ser calibradas. Além disso, a composição isotópica de NBS-1 (padrão de água existente), era bastante diferente do SMOW, o que poderia introduzir um erro não negligenciável na fixação do zero nas escalas de $\delta^2\text{H}$ e de $\delta^{18}\text{O}$, o que teria sido particularmente prejudicial para a intercomparação de medidas de amostras de água do oceano. Havia ainda algumas dúvidas sobre o estado de conservação do padrão NBS-1.

Estes problemas foram superados com a preparação do novo padrão V-SMOW (ponto 4.7.2.1), que por ter uma composição isotópica praticamente idêntica à definida para o SMOW, fez com que se tornasse no padrão de referência primário para expressar as variações dos isótopos estáveis de oxigênio e de hidrogênio.

4.7.1.2 PDB (Pee Dee Belemnite)

O PDB consiste num carbonato de cálcio marinho de uma belemnite do Cretácio, *Belemnitella americana*, da formação Pee Dee, na Carolina do Sul. Em 1959, Craig²³ determinou as razões isotópicas do CO₂ para o PDB, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 11237,2 \times 10^{-6}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O} = 2079 \times 10^{-6}$.^{306,308}

As razões isotópicas do PDB são muito próximas do calcário de origem marinha que é consideravelmente enriquecido em ^{13}C relativamente aos compostos orgânicos. Em particular, a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ é muito próxima da do bicarbonato dissolvido no oceano, que por sua vez, controla a composição isotópica do carbono no CO₂ atmosférico (este corresponde só a cerca de 2 % do primeiro).

O CO₂ atmosférico e o bicarbonato presente no oceano constituem as duas grandes fontes de materiais de partida de carbono para os processos envolvidos no ciclo biogeoquímico do carbono. Assim, o PDB é para o carbono o equivalente ao SMOW para os isótopos de oxigênio e hidrogênio. Resta dizer que o PDB está esgotado faz muito tempo e foi substituído por outros materiais calibrados relativamente a ele.

4.7.1.3 N₂ Atmosférico

O azoto atmosférico é extremamente homogêneo do ponto de vista da composição isotópica e é um excelente padrão de referência primário para a determinação das variações isotópicas do azoto estável.^{306,307} A atmosfera é o maior reservatório terrestre de azoto sendo também a principal fonte deste elemento em processos naturais ou controlados pelo Homem (produção de fertilizantes).

4.7.1.4 CDT (Canyon Diablo Troilite)

O CDT consiste num sulfureto de ferro, FeS (troilite), presente no meteorito de ferro do Canyon Diablo no Arizona, Estados Unidos. O enxofre meteorítico foi tomado como padrão de referência, porque a sua razão isotópica $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ apresentava variações muito pequenas e correspondia à razão isotópica média do enxofre terrestre.³⁰⁶

A razão $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ do CDT é de 22,2. O CDT é consideravelmente empobrecido em ^{34}S (cerca de 20 ‰) relativamente ao sulfato marinho, que é o reservatório isotopicamente mais homogêneo que existe na crosta terrestre. Tal como o PDB, o CDT também já está

esgotado, no entanto, tem sido mantido como MR, dado que todos os resultados publicados estão expressos relativamente a ele (tal como com o PDB).

4.7.2 Materiais de calibração

Dos quatro padrões de referência primários, acima descritos, o SMOW nunca esteve fisicamente disponível, e o PDB e o CDT já estão esgotados faz muito tempo. Para que fosse possível a calibração de medidas relativamente a estes padrões, a IAEA distribuiu materiais que foram cuidadosamente calibrados contra aqueles e cujos valores foram internacionalmente aceites e adoptados. Estes materiais de calibração incluem duas amostras de água (V-SMOW e SLAP), uma de calcite (NBS-19) e duas amostras de sulfureto de prata (IAEA-S-1 e IAEA-S-2).

4.7.2.1 V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)

Em 1967, o padrão SMOW já não estava disponível e a IAEA encarregou Craig e Weiss de prepararem um novo Padrão de Referência Primário, V-SMOW, com composição isotópica semelhante ao SMOW.^{306,308}

Esta água foi obtida a partir da mistura de água do oceano Pacífico (latitude 0° e longitude 180° em Julho de 1967), com pequenas quantidades de outras águas, até atingirem a composição isotópica desejada.

Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ do padrão V-SMOW foram definidos. Os valores de $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ do SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation) foram fixados por convenção. Ambos definem a escala delta V-SMOW/SLAP.

Actualmente, o V-SMOW é o principal material de calibração para as determinações das variações isotópicas do oxigénio e do deutério, em compostos naturais, e o principal padrão de referência primário para exprimir estas variações.

4.7.2.2 SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation)

A fim de facilitar as medições de intercalibração de hidrogénio-2 e oxigénio-18, em amostras de água naturais, e para melhorar a intercomparação de resultados obtidos em diferentes laboratórios, foi estabelecido em 1966, pela IAEA, para além da preparação do V-SMOW, a preparação de um segundo padrão de água, o SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation), com uma composição isotópica muito empobrecida no isótopo mais pesado (relativamente ao V-SMOW), e próxima do limite observado nas águas naturais. O SLAP foi obtido a partir da fusão de uma amostra de neve recolhida no Pólo Sul.^{306,308}

A composição isotópica obtida, a partir de análises interlaboratoriais realizadas por laboratórios devidamente seleccionados, do SLAP relativamente ao V-SMOW é de $\delta^{18}\text{O} =$

$-55,50\text{‰}$ e $\delta^2\text{H} = -428,0\text{‰}$.

Neste momento encontram-se já disponíveis os novos padrões isotópicos internacionais V-SMOW 2 e SLAP 2, substitutos dos já esgotados V-SMOW e SLAP, respectivamente. Estes dois padrões foram preparados pela mistura de águas naturais e as suas composições isotópicas de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, foram ajustadas o mais possível aos valores de V-SMOW e de SLAP. Só por curiosidade, refira-se que foram produzidos mais de 270 L de cada, e preparadas cerca de 5000 ampolas de vidro (consultar o site <http://www.iaea.org/>).

4.7.2.3 NBS-19 (Calcite)

O padrão de carbonato de cálcio, NBS-19, é distribuído para a calibração das determinações de $\delta^{13}\text{C}$ e de $\delta^{18}\text{O}$. Estando o PDB extinto, o padrão NBS-19 foi calibrado indiretamente contra o PDB.

Por consenso internacional, a composição isotópica do NBS-19, relativo a um hipotético V-PDB (Vienna-PDB), suposto ser idêntico ao PDB, foi fixada como $\delta^{13}\text{C} = +1,95\text{‰}$ e $\delta^{18}\text{O} = -2,20\text{‰}$. As razões isotópicas absolutas do NBS-19 não foram determinadas. O valor de $\delta^{18}\text{O}$ de V-PDB versus V-SMOW é $30,9\text{‰}$. O padrão NBS-19 foi preparado na Califórnia, no instituto USGS, por moagem de um mármore branco de origem desconhecida.

4.7.2.4 IAEA-S-1 e IAEA-S-2 (Sulfureto de prata)

Os padrões de sulfureto de prata, IAEA-S-1 e IAEA-S-2, foram preparados na Nova Zelândia no “Institute of Geological and Nuclear Sciences” e são utilizados para a determinação das variações isotópicas do enxofre.

4.7.3 Materiais de intercomparação

Na Tabela 4.3 encontram-se listados alguns materiais de intercomparação distribuídos pela IAEA em que n representa o número de amostras analisadas, δ_m o valor médio de δ e σ o desvio padrão, após eliminação de valores aberrantes (o critério foi de 2σ).

O material de intercomparação mais utilizado é, sem dúvida, o GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation), e corresponde a uma amostra de água com uma composição isotópica intermédia entre o V-SMOW e o SLAP, *i.e.*, $\delta^{18}\text{O} = -24,8\text{‰}$ e $\delta^2\text{H} = -189,5\text{‰}$.^{306,308} O valor de GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation) baseia-se na escala V-SMOW/SLAP e resultou de três exercícios de intercomparação.

Os materiais de intercomparação de carbono com composição isotópica na gama dos compostos orgânicos naturais são o polietileno, IAEA-CH-7, a sacarose, IAEA-CH-6, a

Tabela 4.3: Algumas amostras de intercomparação distribuídas pela IAEA³⁰⁶ (tabela adaptada).

Nome	Natureza	Isótopo	$\delta_m \text{‰}$	$\sigma \text{‰}$	n	Referência
GISP	Água	² H	-189,73	0,87	44	V-SMOW
		¹⁸ O	-24,784	0,075	46	V-SMOW
NBS-18	Calcite	¹³ C	-5,029	0,49	16	V-PDB
		¹⁸ O	-23,035	0,172	17	V-PDB
IAEA-CO-1	Calcite	¹³ C	2,480	0,025	10	V-PDB
		¹⁸ O	-2,437	0,073	11	V-PDB
IAEA-CO-8	Calcite	¹³ C	-5,749	0,063	12	V-PDB
		¹⁸ O	-22,667	0,187	13	V-PDB
IAEA-CO-9	Carbonato de cálcio	¹³ C	-47,119	0,149	10	V-PDB
		¹⁸ O	-15,282	0,093	10	V-PDB
LSVEC	Carbonato de lítio	¹³ C	-46,479	0,150	11	V-PDB
		¹⁸ O	-26,462	0,251	10	V-PDB
USGS-24	Grafite	¹³ C	-15,994	0,105	8	V-PDB
NBS-22	Óleo de parafina	¹³ C	-29,739	0,124	8	V-PDB
IAEA-CH-7	Polietileno	¹³ C	-31,826	0,114	18	V-PDB
IAEA-CH-6	Sacarose	² H	-100,33	2,05	6	V-SMOW
		¹³ C	-10,431	0,126	16	V-PDB
NBS-28	Quartzo	¹⁸ O	9,579	0,092	8	V-SMOW
NBS-30	Biotite	¹⁸ O	5,243	0,245	4	V-SMOW
		² H	-65,70	0,27	3	V-SMOW
IAEA-N-1	Sulfato de amónio	¹⁵ N	0,538	0,186	11	N ₂ atmosférico
IAEA-N-2	Sulfato de amónio	¹⁵ N	20,343	0,473	11	N ₂ atmosférico
IAEA-N-1	Nitrato de potássio	¹⁵ N	4,613	0,191	3	N ₂ atmosférico
NBS-123	Esfarelite	³⁴ S	17,088	0,308	13	CDT
NBS-127	Sulfato de bário	³⁴ S	20,315	0,357	10	CDT
		¹⁸ O	9,337	0,319	3	V-SMOW

grafite, USGS-24 e o óleo de parafina, NBS-22. Estes materiais, e muitos outros, não mencionados e produzidos pelo IRMM, pelo NIST ou outros organismos vocacionados para o efeito, encontram-se descritos na literatura com mais detalhe,^{306,309-312} podendo ser consultados em websites específicos.³¹³⁻³¹⁵

Em 2006, Tyler B. Coplen *et al.*,³¹⁶ apresentaram um estudo em que recalcularam os valores de $\delta^{13}\text{C}$, normalizados ao padrão L-SVEC (carbonato de lítio; $\delta^{13}\text{C} = -46,6 \text{‰}$), para vários materiais de referência incluindo o polietileno, IAEA-CH-7, indicando o valor de $\delta^{13}\text{C} = -32,15 \text{‰}$ e para a sacarose, IAEA-CH-6, o valor de $\delta^{13}\text{C} = -10,45 \text{‰}$. À data da escrita desta tese ainda não havia qualquer indicação, por parte da IAEA, relativa à adopção destes novos valores.

4.8 Importância de MRC para GC/IRMS

Tal como já referido neste trabalho, as técnicas de isótopos estáveis têm sido profusamente utilizadas, nas últimas décadas, nas mais diversas áreas, em especial na determinação da autenticidade/adulteração de géneros alimentícios, e tem sido reconhecido pelos laboratórios oficiais destas áreas a necessidade de Materiais de Referência Isotópicos Certificados para garantir e avaliar a qualidade dos seus resultados analíticos.^{304,317}

Actualmente, não existem ainda MRC disponíveis para a técnica de GC/IRMS, pelo que a calibração de resultados obtidos num sistema de GC/IRMS é feita com um gás pré-calibrado (CO₂ para determinação de $\delta^{13}\text{C}$) geralmente calibrado por EA/IRMS com um padrão externo, *e.g.* o padrão de calcite NBS-19. Contudo, este processo tem a desvantagem de não entrar em linha de conta com o fraccionamento isotópico, introduzido pelo sistema GC-interface de combustão/pirólise.

Assim, no caso dos laboratórios equipados apenas com sistemas de GC/IRMS, a falta de um sistema analítico robusto, como é o caso do analisador elementar hifenado a IRMS (EA/IRMS), pode colocar alguns constrangimentos na qualidade dos resultados. Além disso, mesmo que exista um sistema de EA/IRMS, este não tem em conta possíveis fraccionamentos isotópicos relacionados com o sistema de GC-interface.

Perante esta situação, torna-se claro que o desenvolvimento de materiais de referência certificados para sistemas GC/IRMS são de primordial importância, quer para o controlo dos resultados analíticos, quer para o desenvolvimento de novas aplicações.

Sem materiais de referência, será muito difícil manter a técnica de GC/IRMS como uma metodologia a usar nos estudos de autenticidade, principalmente num contexto oficial, bem como desenvolver a sua utilização.

Capítulo 5

Metodologias Analíticas

Neste capítulo faz-se referência aos métodos analíticos utilizados para levar a cabo o trabalho de investigação aqui apresentado. Uma descrição detalhada deste tipo de sistemas foi já apresentado no Capítulo 3 pelo que neste capítulo apenas se descrevem os materiais, as condições operatórias e de funcionamento das metodologias analíticas utilizadas, EA/IRMS e GC/C/IRMS.

É também apresentado o protocolo experimental que está na base da produção de MRC nomeadamente os testes de homogeneidade e de estabilidade nas diferentes condições e ainda o Ensaio de Certificação Simulado (ECS).

5.1 Determinações de $\delta^{13}\text{C}$ por IRMS

5.1.1 Equipamentos Utilizados

O espectrómetro de massa de razões isotópicas usado é da marca Micromass, modelo IsoprimeTM, Figura 5.1. Hifenado com este IRMS e a funcionar em sistema de fluxo contínuo (CF) há:

- Analisador elementar, marca EuroVector, modelo Euro EA 3000(Figura 5.3) equipado com um detector de condutividade térmica (TCD) que permite visualizar a separação dos picos do carbono e do azoto (no caso do composto a analisar conter azoto) e se necessário, variar a temperatura da coluna para uma melhor separação. Estes picos têm que estar separados quando o gás é enviado para o IRMS.

A coluna para separação dos picos do azoto e do carbono é uma coluna de enchimento SSHP com 3 m de comprimento, para análise de carbono e azoto. Os gases usados são: hélio (gás de arrastamento para o EA), oxigénio necessário para o processo de combustão e ar comprimido para funcionamento das válvulas do injetor do gás de



Figura 5.1: Espectrómetro de massa de razões isotópicas da marca Micromass, modelo Isoprime™.

referência, CO₂, e para mover o carrocel (amostrador automático) que contém as cápsulas com as amostras e padrões a analisar.

- Diluidor da marca Micromass (Esquema na Figura 5.2). O diluidor apresenta a vantagem de se poder pesar maiores quantidades de amostra. Devido ao elevado teor de carbono nas moléculas orgânicas, formando assim grandes quantidades de CO₂, recomenda-se a utilização do diluidor. Outra importante vantagem do diluidor é que permite analisar em simultâneo C e N na mesma amostra. Dado que normalmente nas matrizes orgânicas a concentração de carbono é muito maior do que a de azoto, usa-se o diluidor só para a análise do carbono após ter saído o pico do azoto que é muito mais pequeno.
- Cromatógrafo em fase gasosa, da marca Agilent, modelo 6890, equipado com detector de ionização de chama, FID (Flame Ionization Detector), Figura 5.4, injetor “split”/“splitless”. Os gases para funcionamento do FID são hidrogénio e ar.
- Injetor automático, da marca Agilent, modelo 7683.
- Interface de aquecimento, da marca Micromass que faz a ligação ao forno de combustão.
- Forno de combustão, da marca Micromass que, juntamente com a interface de aquecimento, faz a ligação do GC ao IRMS.

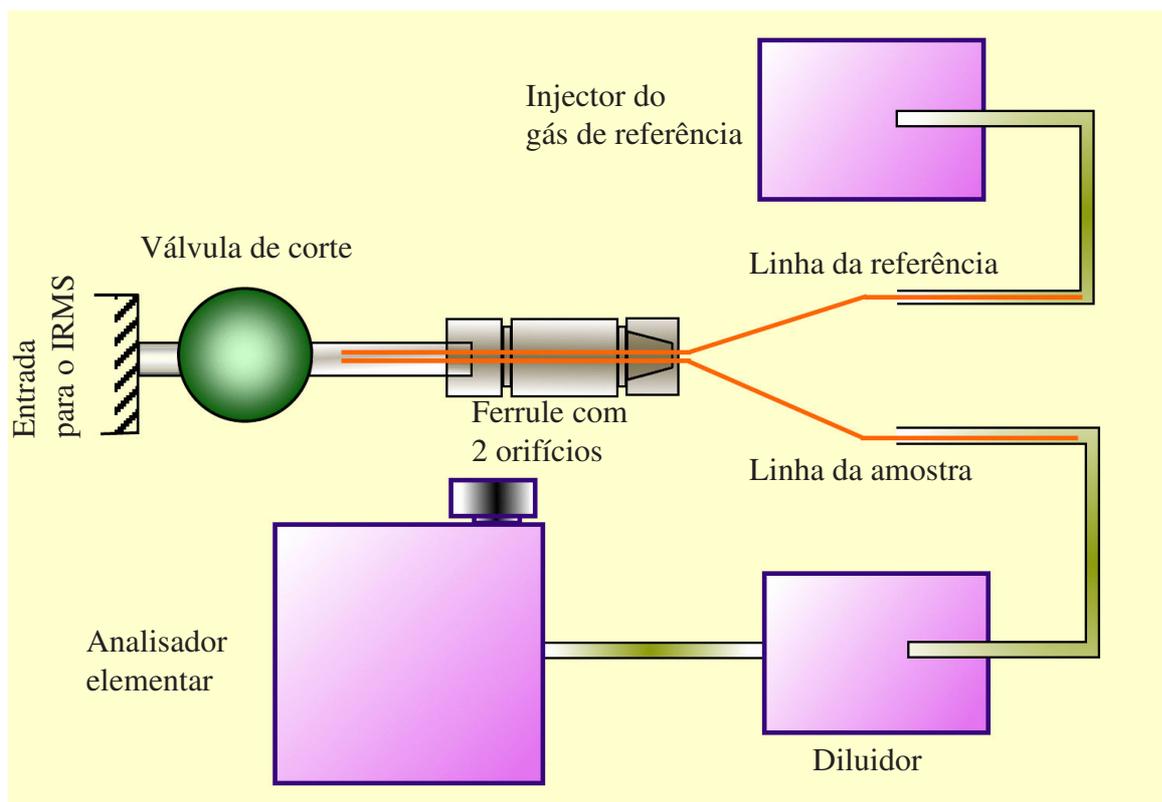


Figura 5.2: Esquema representativo do sistema hifenado EA/IRMS com diluidor (adaptado de um esquema gentilmente fornecido pela GV Instruments).

Equipamento Complementar

- UPS, Unidade de Alimentação Ininterrupta (Uninterrupted Power Supply), marca IMV, Modelo D10-11.
- Balança analítica da marca Sartorius, modelo M2P (Max=2g).
- Acessório para fechar cápsulas da marca: Elementar.

O “software” utilizado para o EA/IRMS é o Optima EA^(a) versão 1.67-4 e para o GC/C/IRMS é o GC versão 1.67-4, sobre o sistema operativo OS2 da IBM^(b).

5.1.2 Verificação do IRMS

Diariamente, antes de se proceder à análise das amostras, é verificada a operacionalidade do espectrómetro de massa de razões isotópicas efectuando primeiro um teste de

^(a)<http://www.gvinstruments.co.uk/>

^(b)<http://www-306.ibm.com/software/os/warp/>



Figura 5.3: Analisador elementar da marca EuroVector, modelo Euro EA.

estabilidade e de seguida um teste de linearidade. A Figura 5.5 apresenta o organigrama deste procedimento.

Para testar a estabilidade, injectam-se directamente no espectrómetro cerca de 3 pulsos do gás de referência CO_2 , à pressão de trabalho. O teste de linearidade difere do primeiro, na medida em que se utilizam três pressões do gás CO_2 diferentes.

Quando o valor da amplitude da razão 45/44 (quando se determina $\delta^{13}\text{C}$) for superior a 0,3 ‰ ajustam-se as condições dos parâmetros da fonte procedendo do seguinte modo: ajustar primeiro a Tensão de Extracção (“Extraction Voltage”) e depois a Tensão do Repulsor de Iões (“Ion Repeller Voltage”) até se obter estabilidade e linearidade. Só quando aquela amplitude se encontrar abaixo ou igual a 0,3 ‰ é que se procede à análise das amostras.



Figura 5.4: Cromatógrafo em fase gasosa da marca Agilent e interface de combustão hifenado ao IsoprimeTM.

5.1.3 Medição de $\delta^{13}\text{C}$ por EA/IRMS

Todos os consumíveis usados no analisador elementar são da marca EuroVector. O enchimento dos reactores de oxidação e de redução são preenchidos do seguinte modo (no sentido ascendente do tubo (Figura 5.6):

- Reactor de redução: 10 mm de lã de quartzo, cobre reduzido até cerca de 50 mm do início do tubo, 50 mm de lã de quartzo ou “quartz turnings”. Este tubo fica completamente cheio.
- Reactor de oxidação: 10 mm de lã de quartzo, 60 mm de óxido de cobalto (II e III) e prata, 10 mm de lã de quartzo, 100 mm de óxido de crómio (III) (Cr_2O_3) e 10 mm de lã de quartzo. Perfaz um total de 190 mm de enchimento.

As amostras e os padrões são pesados em quantidade suficiente (cerca de 0,5 mg de amostra e de polietileno e cerca de 0,6 mg do padrão secundário de sacarose) para produzir um pico de intensidade na gama de 5-12 nA para a razão m/z 44, para dentro de cápsulas de estanho (dimensão 5x9 mm) as quais são fechadas com o acessório adequado para o efeito e introduzidas sequencialmente no amostrador automático de cápsulas do analisador elementar. A Figura 5.7 representa o organigrama do processo da pesagem.

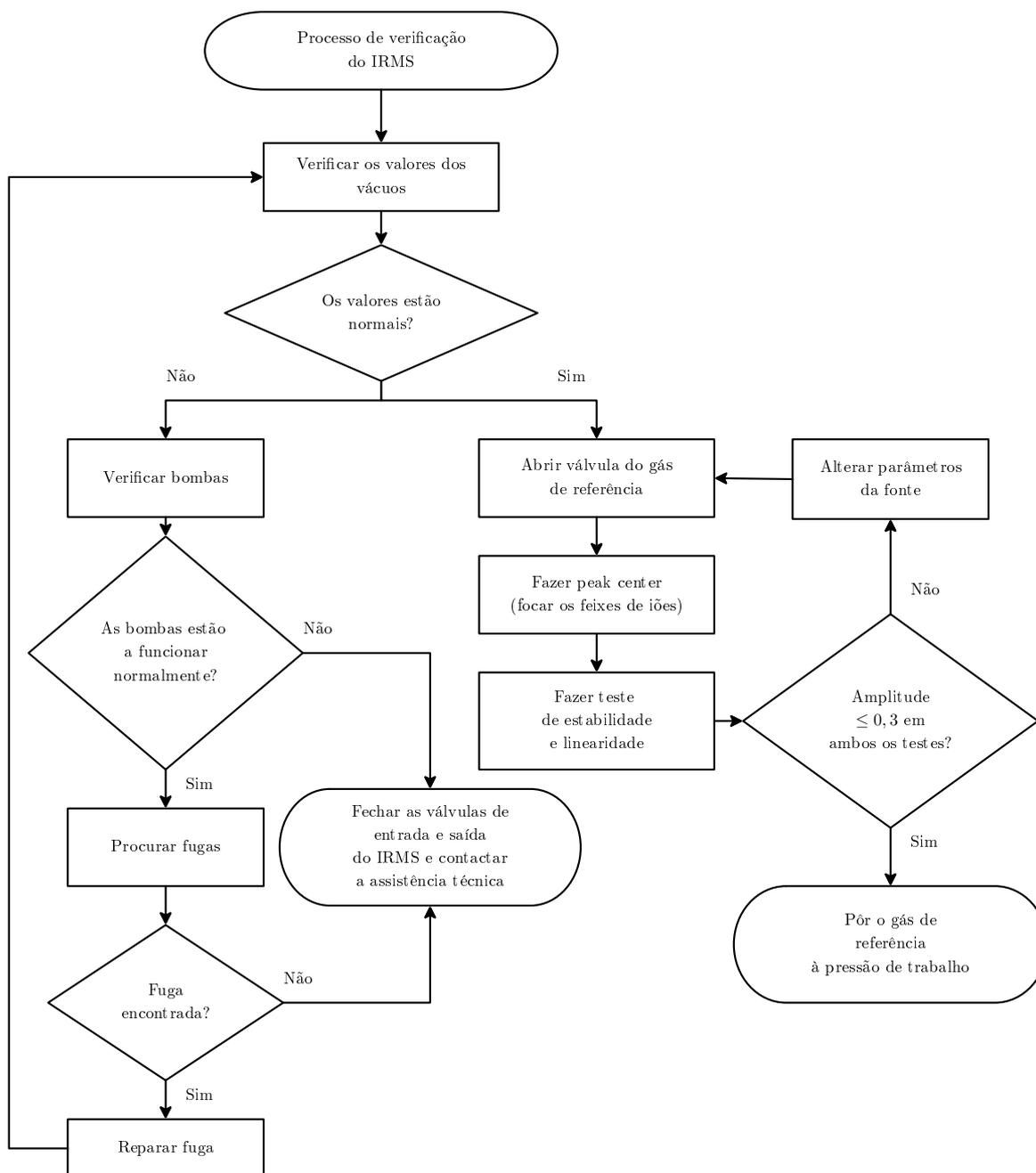


Figura 5.5: Organograma do procedimento de verificação do estado de operacionalidade do IRMS.

Os padrões utilizados nas sequências analíticas foram o padrão internacional de polietileno, IAEA-CH-7 que apresenta um valor de $\delta^{13}\text{C} = -31,8 \text{‰}$, e um padrão interno de sacarose previamente calibrado com o polietileno e com um padrão internacional de sacarose, IAEA-CH-6 ($\delta^{13}\text{C} = -10,4 \text{‰}$), com um valor de $\delta^{13}\text{C} = -24,72 \text{‰}$.

Normalmente, o padrão internacional de sacarose IAEA-CH-6 só é utilizado para calibrar o padrão secundário de sacarose. A sequência de análise é construída de modo a que

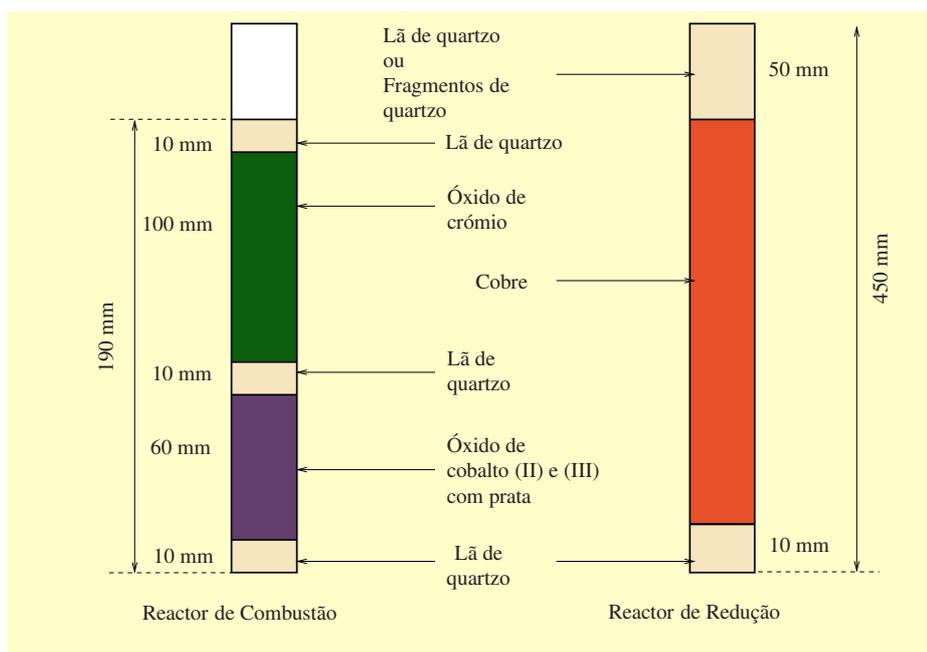


Figura 5.6: Enchimento dos reatores de combustão e de redução do analisador elementar.

os padrões precedam e procedam a série das amostras, *i.e.*, padrões no início e no final da sequência. Dado que o método é muito robusto, não se justifica introduzir padrões no meio da sequência.

A amostra sofre combustão e é convertida em CO_2 e H_2O , num forno de oxidação à $\theta = 1040\text{ }^\circ\text{C}$, passando então através de um forno de redução à $\theta = 650\text{ }^\circ\text{C}$ (para eliminar o excesso de oxigénio utilizado na combustão e para converter os óxidos de azoto em azoto). O CO_2 foi transferido com corrente de hélio (pureza 99,999 % e caudal de 100 mL/min), para uma coluna de GC (SS HP para carbono e azoto) à temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$ (para uma boa separação entre o pico do azoto e o pico do carbono no caso dos compostos que possuam azoto).

O gás CO_2 é então transferido para o sistema CF-IRMS. As amostras e padrões são analisadas em duplicado, e todas as amostras são corrigidas ao valor do branco (cápsula de estanho vazia). O teor de carbono-13 é determinado no CO_2 resultante da combustão completa da amostra.

As abundâncias dos principais isotopólogos de razões m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), m/z 45 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ e $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$) e m/z 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), decorrentes das diversas combinações possíveis dos isótopos ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C e ^{12}C , são determinadas a partir das correntes iónicas medidas nos três colectores diferentes do IRMS. As contribuições dos isotopólogos $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ e $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ podem ser desprezadas devido à sua fraca abundância natural. A corrente iónica correspondente a m/z 45 é corrigida de forma a tomar em conta a contribuição do $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, calculada em função da intensidade da corrente medida para m/z 46, atendendo às abundâncias relativas de ^{18}O e ^{17}O (correção de Craig, discutida no ponto 3.2).

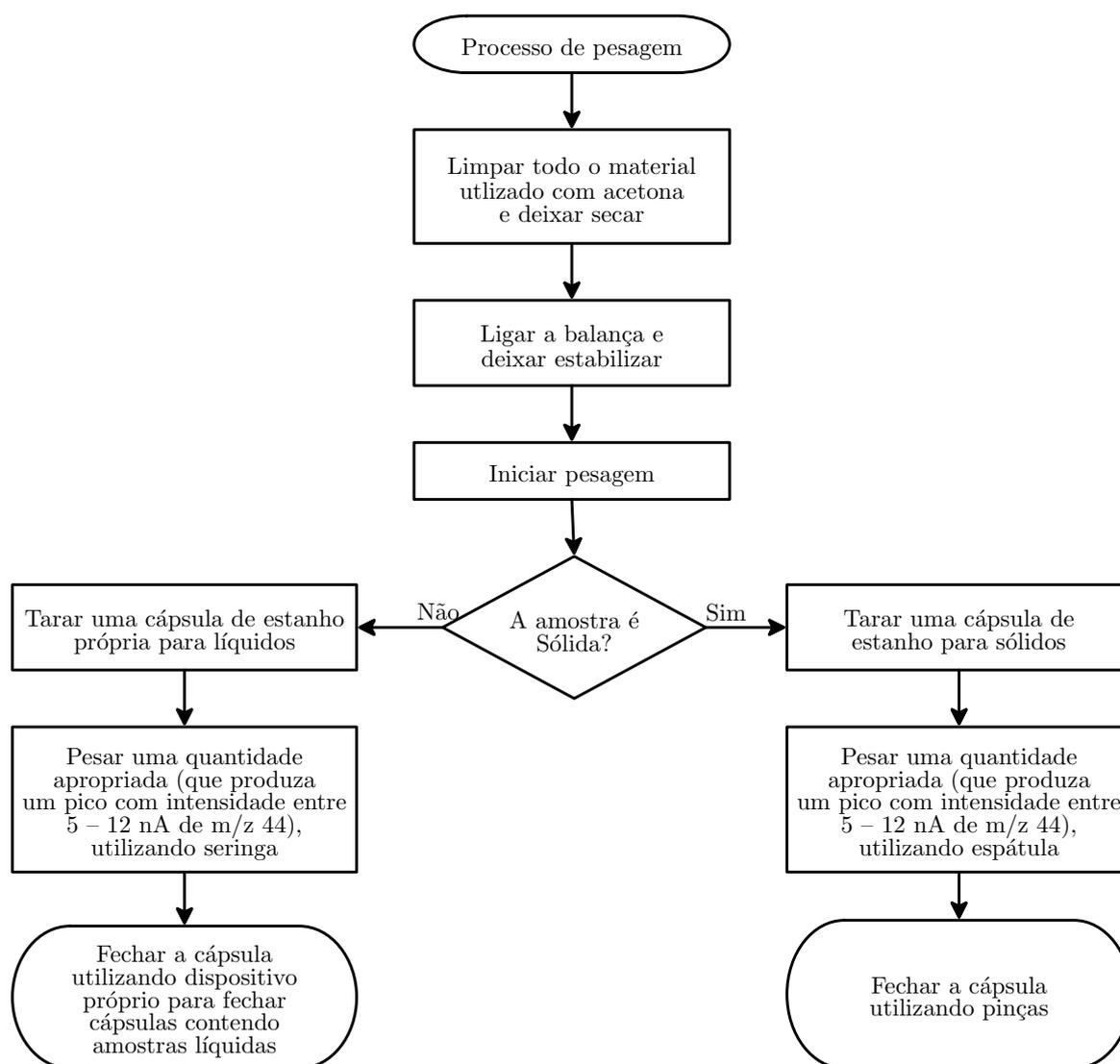


Figura 5.7: Organograma correspondente ao procedimento da pesagem.

A comparação com uma referência, calibrada pela referência internacional V-PDB, permite o cálculo do teor de carbono-13 na escala relativa de $\delta^{13}\text{C}$.

Terminada uma sequência analítica, os valores $\delta^{13}\text{C}$ obtidos (resultados brutos) são corrigidos relativamente aos valores dos padrões, através do traçado de uma recta de regressão linear, de valores brutos em função dos valores tabelados/determinados dos padrões. Introduzindo-se os valores brutos das amostras obtêm-se os valores de $\delta^{13}\text{C}$ corrigidos para as amostras.

Antes da eluição dos picos das amostras é injectado o gás de referência, CO_2 , (cujo valor de $\delta^{13}\text{C}$ foi previamente determinado com o padrão de polietileno) mediante um dispositivo automático, que facilita uma quantificação correcta das medidas das razões de isótopos estáveis.

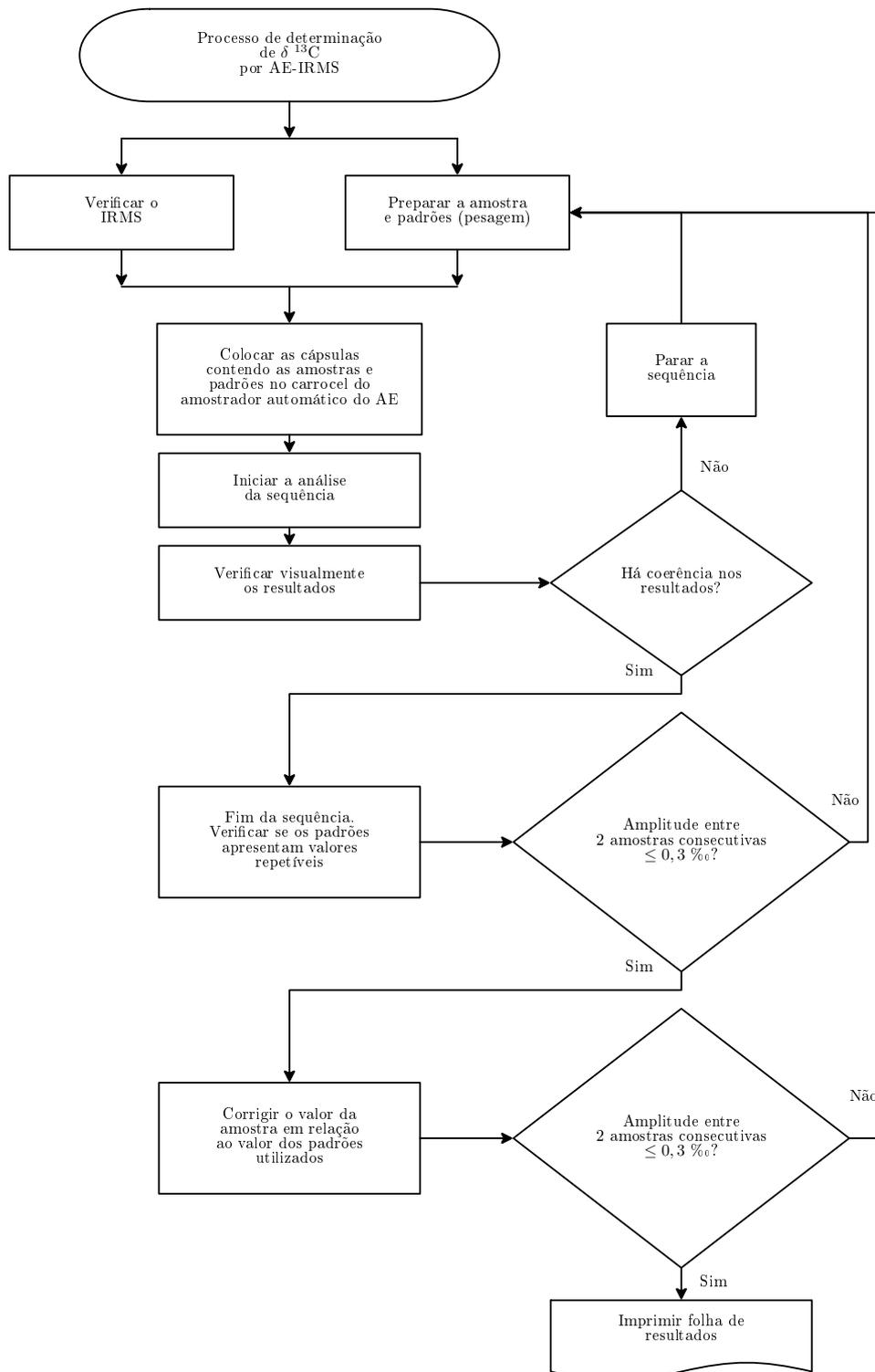


Figura 5.8: Organograma do procedimento de análise de $\delta^{13}\text{C}$ por EA-IRMS.

As amostras foram repetidas sempre que a amplitude entre duas medições consecutivas era maior que 0,3 ‰, em módulo (de acordo com o CQ implementado no Laboratório e apresentado no ponto 5.2.2).

A Figura 5.8 resume o procedimento de análise de $\delta^{13}\text{C}$ por EA/IRMS.

5.1.4 Medicões de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/C/IRMS

Na análise por GC/C/IRMS, os compostos individuais ou misturas foram pesados e dissolvidos em MTBE (10 mL) a uma concentração aproximada de 0,02 % por composto e as soluções foram analisadas em duas colunas cromatográficas diferentes, uma não polar e outra polar, designadas por A e B respectivamente, com as seguintes características:

- coluna A (não polar): 30 m \times 0,25 mm DI \times 0,5 μm de espessura, HP-5MS (metilsiloxano com 5 % de fenil reticulado),

- coluna B (polar): 30 m \times 0,25 mm DI \times 0,5 μm de espessura, HP-INNOWax (polietileno glicol reticulado).

As condições cromatográficas utilizadas na coluna não polar A foram:

- temperatura do detector, FID: 250 °C;
- temperatura do injector: 250 °C;
- fluxo de hélio: 1,8 mL/min;
- programa de temperaturas: 40 °C (1 min) - 7 °C/min - 200 °C (5 min);
- modo de injeção: “splitless”;
- volume injectado: 0,2 μL .

As condições cromatográficas utilizadas na coluna polar B foram:

- temperatura do detector, FID: 250 °C;
- temperatura do injector: 250 °C;
- fluxo de hélio: 1,8 mL/min;
- programa de temperaturas: 40 °C (1 min) - 10 °C/min - 220 °C (7 min);
- modo de injeção: “splitless”;
- volume injectado: 0,4 μL .

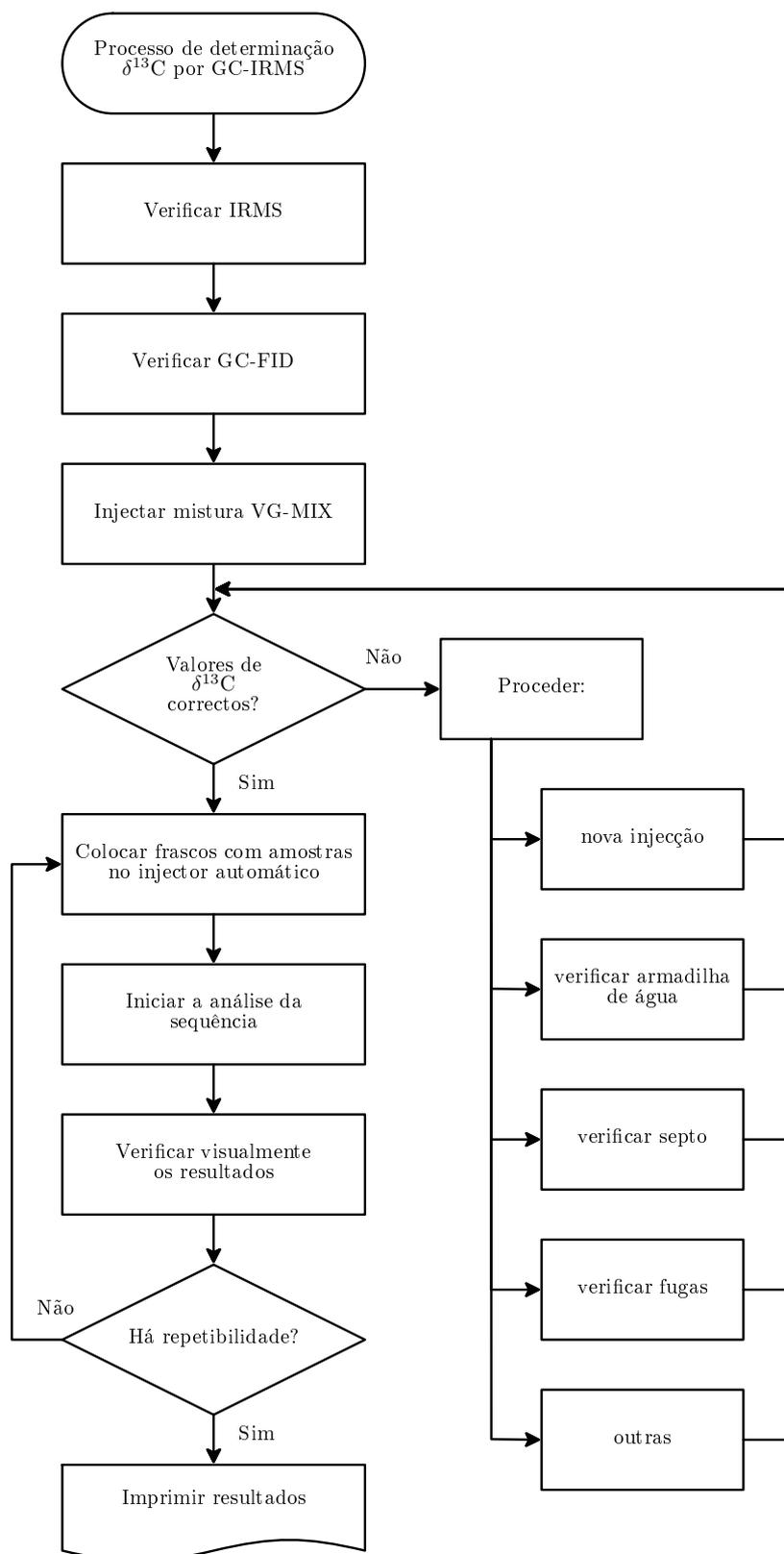


Figura 5.9: Organograma do procedimento para determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por GC-IRMS.

Tabela 5.1: Tempos de Retenção, t_R , dos compostos na mistura. Coluna não polar HP-5MS.

Composto	Tempo de retenção, t_R (s)
1-Octanol	822
2,6-Dimetilanilina	991
Dodecano	1027
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina	1144
Decanoato de metilo	1186
2-(metilamino)benzoato de metilo	1299
Dodecanoato de metilo	1403

Tabela 5.2: Tempos de Retenção, t_R , dos compostos na mistura. Coluna polar HP-INNOWax.

Composto	Tempo de retenção, t_R (s)
Dodecano	592
1-Octanol	934
Decanoato de metilo	972
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina	1089
Dodecanoato de metilo	1115
2,6-Dimetilanilina	1175
2-(metilamino)benzoato de metilo	1405

A Figura 5.9 representa o organigrama de procedimento de medição de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS.

As soluções preparadas quer dos compostos puros quer da mistura foram injectadas primeiro no sistema GC-FID para se encontrarem as condições cromatográficas óptimas de separação dos compostos da mistura antes de serem analisados no IRMS. A interface de aquecimento operou a $\theta = 350^\circ\text{C}$ e o forno de combustão a $\theta = 900^\circ\text{C}$. O reactor de combustão encontra-se cheio com óxido de cobre.

Para eliminação da água proveniente da combustão das amostras, usou-se um tubo de membrana de nafion (polímero sintético de tetrafluoretileno sulfonado) ou uma armadilha contendo azoto líquido. A água foi depois removida da membrana pela passagem de hélio com fluxo em contra corrente relativamente ao gás da amostra.

A mistura relativa ao Ensaio de Certificação Simulado foi analisada na coluna polar B em condições de reprodutibilidade, mais concretamente, em 3 dias diferentes.

Na verificação do sistema de GC/C/RMS utilizou-se uma mistura teste interna de compostos orgânicos disponibilizada pela Micromass, VG-MIX, constituída por decano ($\delta^{13}\text{C} = -28,6\text{‰}$), undecano ($\delta^{13}\text{C} = -26,7\text{‰}$), dodecano ($\delta^{13}\text{C} = -28,6\text{‰}$) e decanoato de metilo ($\delta^{13}\text{C} = -30,5\text{‰}$) em n-hexano a 1 % v/v. Os tempos de retenção dos compostos da mistura nas colunas utilizadas encontram-se nas Tabelas 5.1 e 5.2.

5.1.5 Operações de Manutenção do Analisador Elementar

O equipamento de análise elementar necessita de uma manutenção regular e atenção especial no que respeita aos reactores de oxidação e de redução e da armadilha de água nomeadamente:

- Mudar o enchimento do reactor de redução por cada 300 amostras analisadas.
- Mudar o enchimento do reactor de combustão por cada 1000 amostras analisadas. De 300 em 300 amostras retirar as cinzas, isto é, quando se muda o enchimento do reactor de redução retiram-se as cinzas do reactor de combustão e repõe-se o enchimento e lâ de quartzo até perfazer a altura inicial.
- Mudar o enchimento da armadilha de água(perclorato de magnésio) após 300 amostras analisadas.

Quando se mudam os enchimentos dos reactores é necessário, antes de iniciar o trabalho, verificar se há fugas. Caso alguma seja detectada esta terá que ser resolvida.

5.2 Garantia da Qualidade

Em Química Analítica a Garantia da Qualidade pode ser entendida como o conjunto de acções pré-estabelecidas para garantir a confiança quanto ao cumprimento dos requisitos da qualidade.

5.2.1 Análise dos Pontos Críticos dos Processos

Na análise e na avaliação das principais etapas dos métodos analíticos EA/IRMS e GC/C/IRMS de acordo com a metodologia e critérios estabelecidos recorreu-se ao uso de Diagramas de Ishikawa onde são indicadas todas as possíveis fontes e causas de desvio que afectam os resultados obtidos. O Diagrama de Ishikawa ou Espinha-de-peixe também conhecido como Diagrama de Causa e Efeito, é uma ferramenta gráfica que permite estruturar hierarquicamente as causas de determinado problema ou oportunidade de melhoria quando se fala de Controlo da Qualidade (CQ).³¹⁸ A Figura 5.10 representa o Diagrama de Causa e Efeito e descreve os pontos críticos associados ao detector de IRMS. Este é comum aos dois métodos de análise utilizados neste trabalho.

A Figura 5.11 representa o Diagrama de Causa e Efeito e descreve os pontos críticos do método EA/IRMS.

A Figura 5.12 representa o Diagrama de Causa e Efeito e descreve os pontos críticos do método GC/C/IRMS.

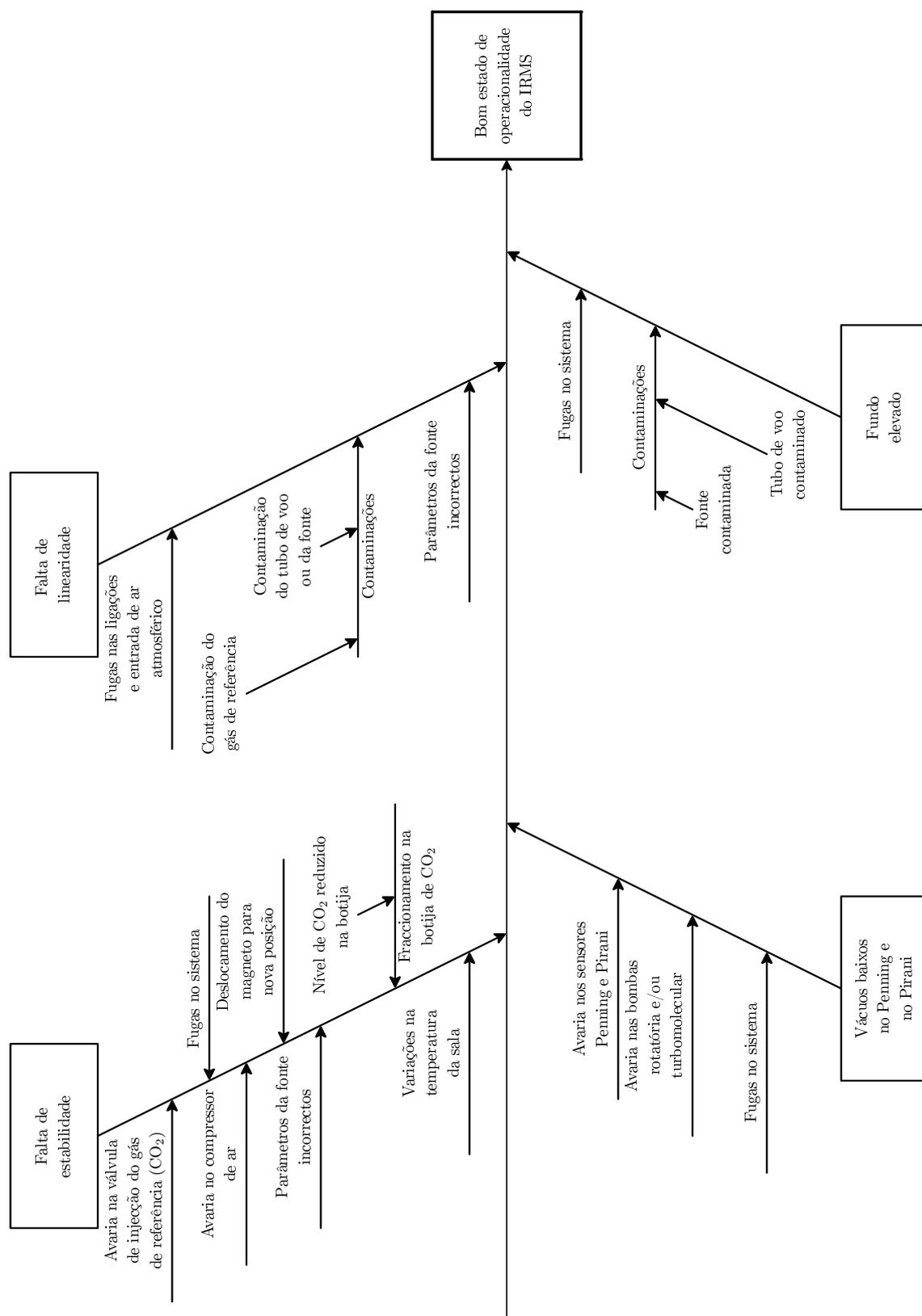


Figura 5.10: Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o IRMS.

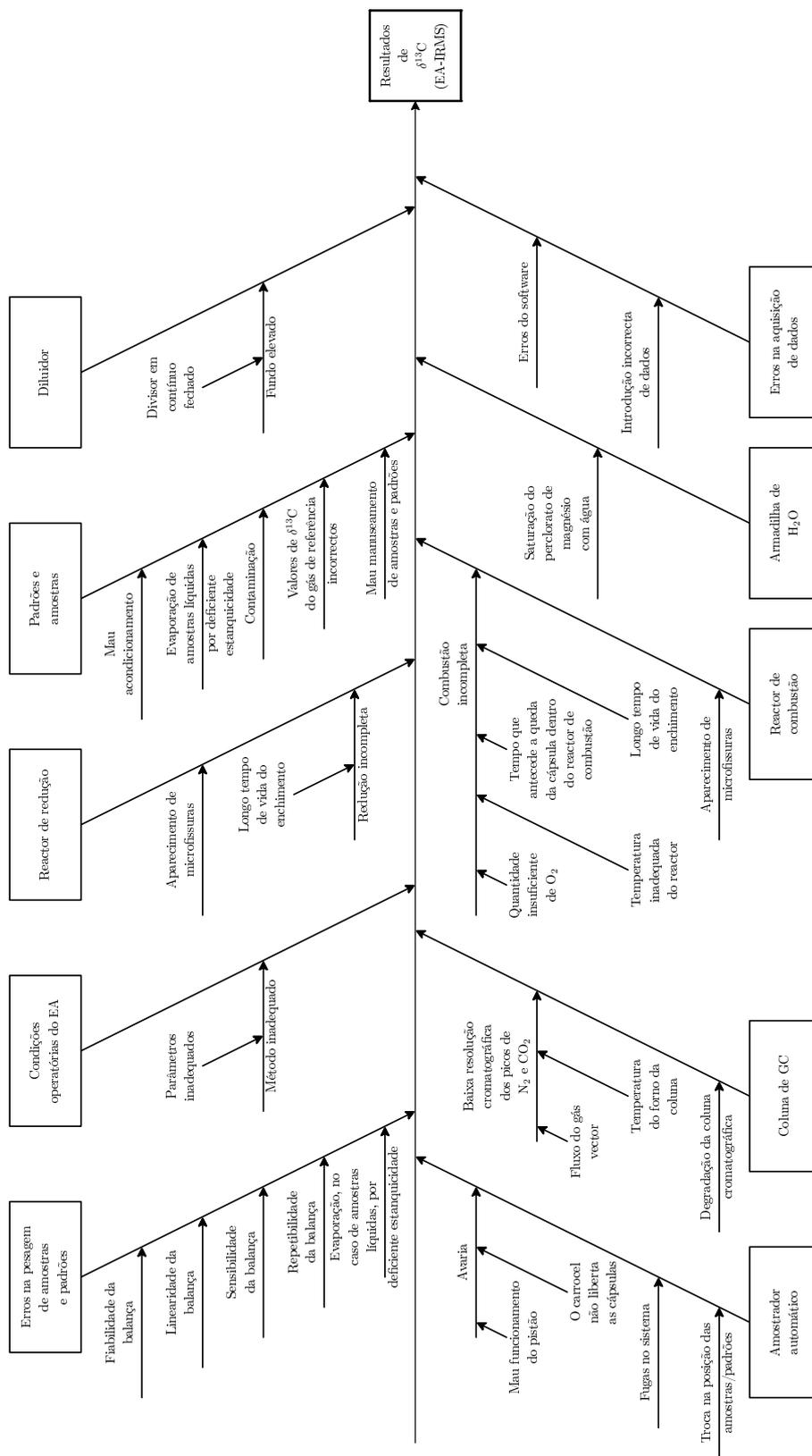


Figura 5.11: Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o método EA/IRMS.

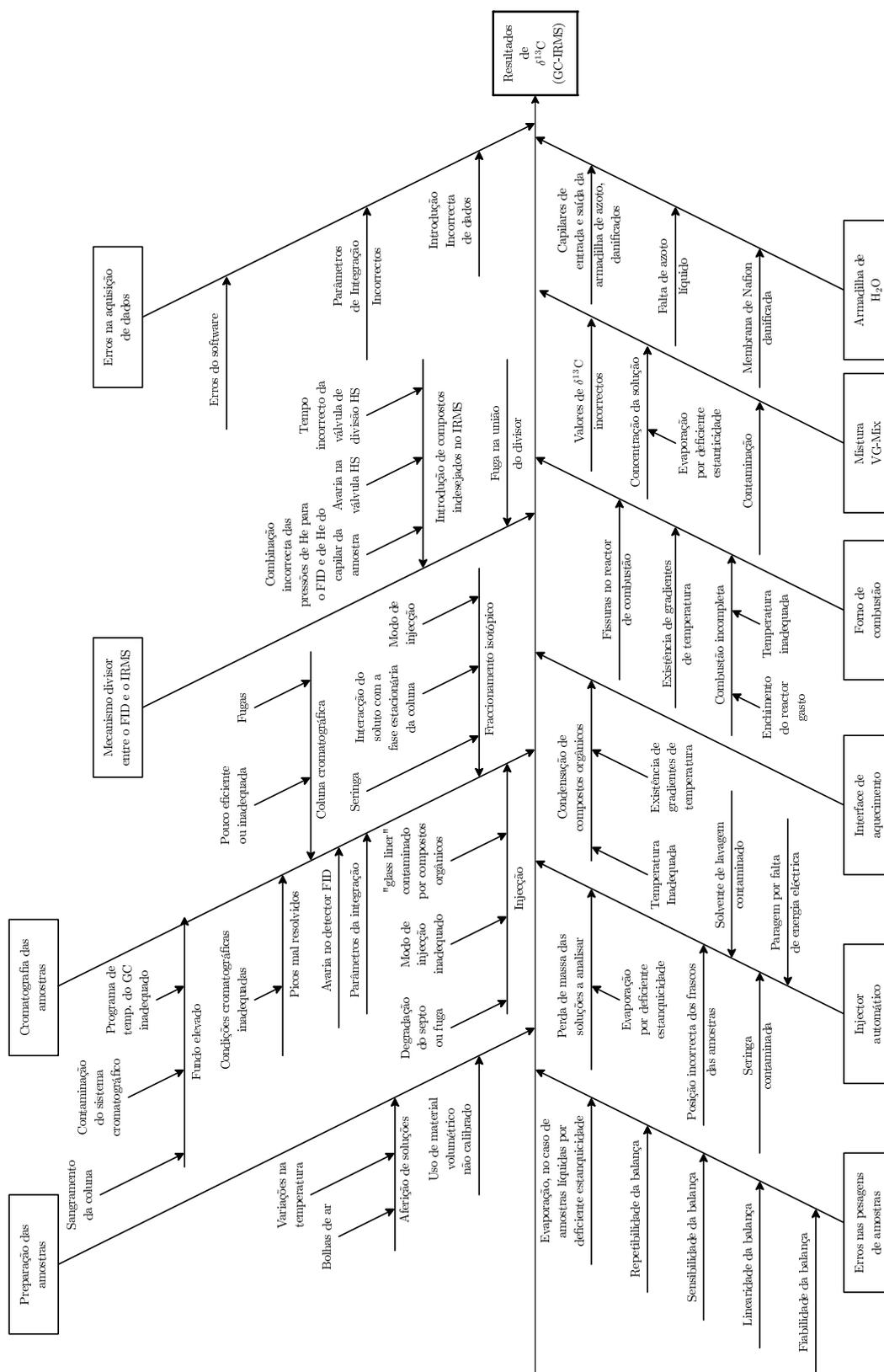


Figura 5.12: Diagrama de Ishikawa ou Diagrama de Causa e Efeito para o método GC/IRMS.

Todas as fontes de desvio acima representadas são controladas durante a análise de amostras a fim de evitar resultados incorrectos. Assim, com base nos diagramas de Ishikawa descrevem-se seguidamente as principais fontes de erro e o respectivo controlo.

5.2.1.1 Bom Estado de Operacionalidade do IRMS

Para qualquer análise química que seja efectuada por técnicas hifenadas ao IRMS é fundamental que este esteja em boas condições de operacionalidade. Para tal é necessário que o ruído de fundo esteja dentro dos valores recomendados, $< 3 \times 10^{-11}$ A. Este valor pode ser mais elevado no caso de haver contaminações, *e.g.*, no tubo de voo ou na fonte, ou fugas nas ligações dos capilares que transportam os gases.

O mesmo acontece com os valores dos baixo e alto vácuos, dados pelo sensores do pirani e do penning respectivamente, que deverão estar dentro dos valores especificados ($\approx 10^{-3}$ mbar e $2-5 \times 10^{-6}$ mbar). Diariamente estes valores são confirmados visualmente. As fugas são detectadas com gás argon.

É fundamental também que o detector de IRMS esteja estável e linear (intensidade dos picos coerentes com a quantidade de amostra). Diariamente é feito o teste de estabilidade e de linearidade tal como está descrito no ponto 5.1.2. Previamente os feixes de iões foram centrados aos respectivos multicolectores. Enquanto o IRMS não apresentar valores de estabilidade e de linearidade dentro dos critérios previamente estabelecidos, não são analisadas amostras.

A sala onde se encontram estes equipamentos encontra-se termoestabilizada para evitar variações de temperatura as quais influenciam a estabilidade e a linearidade do IRMS como consequência de desvios da focagem dos feixes iónicos aos multicolectores.

5.2.1.2 EA/IRMS

- Reactores de combustão e de redução e armadilha de água

Os reactores de combustão e de redução e a armadilha de água constituem os principais componentes que podem contribuir para os desvios ao resultado correcto no método EA/IRMS (as fontes de desvio do IRMS já foram discutidas acima). O número de amostras analisadas por cada um destes componentes pode ser monitorizado no painel frontal do EA. Deste modo sabe-se quando mudar o enchimento dos reactores e da armadilha de água. O ponto 5.1.5 que descreve as operações de manutenção do analisador elementar refere precisamente como controlar estas fontes de desvio.

- Condições dos parâmetros do EA

Diariamente são verificadas as condições de funcionamento do EA nomeadamente as pressões do hélio, as temperaturas dos fornos dos reactores a temperatura do forno da coluna de enchimento, entre outras.

- As fugas nas ligações dos reactores de combustão e de redução e na armadilha de água, ou outras, podem ser detectadas no EA que tem uma opção para detectar fugas.

No entanto, antes de se analisar uma sequência de amostras e de padrões, é primeiramente analisada uma cápsula com um padrão, geralmente polietileno, que permite controlar todo o sistema, incluindo o funcionamento do injector automático, e se as condições do método são as adequadas, *e.g.*, para separação dos picos de azoto e dióxido de carbono. Permite ainda conhecer a quantidade de padrão/amostra a ser pesada (sempre feito em matrizes analisadas pela primeira vez) para que produza um pico de razão m/z 44 com intensidade dentro da gama 5-12 nA e ainda ajustar o valor de $\delta^{13}\text{C}$ do gás de referência.

Quando se analisam amostras no estado líquido, após fecho da cápsula esta é pesada e mantida durante algum tempo dentro da balança para detectar eventual fuga.

O ruído de fundo e o branco (cápsula vazia) são subtraídos no cálculo das razões isotópicas.

5.2.1.3 Método GC/IRMS

No método GC/IRMS considera-se como principais factores de desvio os seguintes:

- Cromatografia das amostras

É fundamental que o CO_2 dos diferentes compostos, após combustão, a serem analisados no IRMS estejam bem separados. Assim, antes de qualquer amostra ser analisada por IRMS é primeiro analisada no GC com o detector FID para se encontrar a melhor resolução entre os picos cromatográficos dos diferentes compostos e só depois é enviado para análise por IRMS através do fecho da válvula “Heart split”, HS. Esta válvula permite variar a análise entre GC-FID e GC/IRMS.

- Interface de aquecimento

A interface de aquecimento que está colocada antes do forno de combustão e este último contém o reactor de combustão, deve estar a uma temperatura de pelo menos 50°C acima da temperatura máxima usada no programa de temperaturas do GC para evitar que haja condensação dos compostos orgânicos antes de entrarem no tubo de combustão.

- Forno de combustão

O óxido de cobre que enche o reactor de combustão deve estar em quantidade suficiente e a temperatura do forno suficientemente elevada para que a combustão das amostras seja completa. Neste caso é o óxido de cobre que fornece o oxigénio necessário à combustão. Normalmente este tubo permite analisar cerca de 600 amostras.

- Armadilha de água

Foram utilizadas dois tipos de armadilhas de água alternando-se quando alguma apresentava problemas (*e.g.*, fugas: membrana de nafion ou azoto líquido em Dewar. Quando se usou o azoto líquido houve o cuidado de manter o nível do azoto no Dewar. A membrana de nafion é limpa de água com hélio em contra corrente relativamente à corrente do gás das amostras.

- Mistura VG-MIX

A injeção prévia da mistura VG-MIX permite controlar o sistema global GC/C/IRMS. A análise das amostras só foi efectuada quando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos compostos da mistura, relativamente aos valores recomendados pela Micromass, estivessem em conformidade com o critério de aceitação do controlo da qualidade do laboratório, *i.e.*, $\leq 0,5 \text{ ‰}$.

O ruído de fundo é subtraído para o cálculo das razões isotópicas.

5.2.2 Controlo da Qualidade

O controlo da qualidade (CQ) pode considerar-se como o conjunto das técnicas e actividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade.²⁵⁷ Na Tabela 5.3 encontram-se compilados os pontos críticos, os critérios de verificação e as medidas correctivas referentes aos métodos utilizados.

Para além dos controlos verificados e referidos acima antes de se analisar amostras, foi estabelecido um procedimento de Controlo da Qualidade.

Controlo externo

As acções associadas ao CQ externo são indispensáveis para um laboratório se situar na comunidade laboratorial e têm, geralmente, como objectivo avaliar a exactidão dos resultados produzidos.

Assim, o laboratório participa periodicamente, três vezes/ano, em ensaios de proficiência europeus específicos para as técnicas isotópicas, mais concretamente no Food Analysis using Isotopic Techniques-Proficiency Testing Scheme (FIT-PTS). É ainda de salientar que os resultados obtidos pelo laboratório na participação destes ensaios têm mostrado o seu elevado desempenho, apresentando valores de $z - score$, normalmente, abaixo ou muito próximo de 1. A Tabela 5.4 resume as matrizes analisadas e os valores de $z - score$ obtidos pelo laboratório na determinação de $\delta^{13}\text{C}$ nos últimos 3 a 4 anos.

A balança de apoio às pesagens das amostras e padrões para o analisador elementar é calibrada anualmente por entidade competente e certificada para o efeito, neste caso a Soquímica.

Tabela 5.3: Características metroológicas dos métodos utilizados.

Método	Pontos de controlo	Crítérios de Aceitação	Medidas Correctivas
IRMS	Estabilidade	Amplitude das razões $45/44 \leq 0,3\%$	Reajustar parâmetros da fonte
	Linearidade	Amplitude das razões $45/44 \leq 0,3\%$	Reajustar parâmetros da fonte
	Vácuo	“Penning”: $2 - 5 \times 10^{-6}$ mbar	Procurar fugas
	Vácuo	“Pirani”: $\approx 10^{-3}$ mbar	Procurar fugas
	Ruído de fundo (análise de CO ₂)	$< 3 \times 10^{-11}$ A	Procurar fugas
	Intensidade do pico da água	$< 5 \times 10^{-10}$ A	Deixar estabilizar/verificar armadilhas de água
EA/IRMS	Padrões internacionais	Diferença de $\delta^{13}\text{C}$ relativamente ao valor especificado: $\leq 0,5\%$	Repetir a análise
	Réplicas	Amplitude entre duas análises consecutivas: $\leq 0,3\%$	Repetir a análise
	Armadilha de água	< 300 amostras analisadas	Mudar o perclorato de magnésio
	Reactor de combustão	< 300 amostras analisadas	Remover as cinzas
	Reactor de combustão	< 1000 amostras analisadas	Mudar o enchimento
	Reactor de redução	< 300 amostras analisadas	Mudar o enchimento
	Intensidade dos picos	5 – 12 nA	Repetir a análise com nova pesagem
GC/IRMS	Réplicas	Amplitude entre duas injeções consecutivas: $\leq 0,5\%$	Repetir a análise
	Mistura VG-MIX	Diferença de $\delta^{13}\text{C}$ relativamente aos valores recomendados: $\leq 0,5\%$	Repetir análise

Controlo interno

As acções relacionadas com o CQ interno de um laboratório visam controlar a precisão dos resultados produzidos.

Neste caso concreto as acções de CQ interno no laboratório são:

- Todas as análises são efectuadas em duplicado e em triplicado caso se justifique (*e.g.*, em amostras muito heterogéneas onde a repetibilidade pode ser afectada).

Tabela 5.4: Valores de $z - score$, obtidos pelo laboratório, na determinação de $\delta^{13}C$ (‰) em várias matrizes de géneros alimentícios. Método EA/IRMS.

Matriz	$\delta^{13}C$ (‰)	$z - score$
Vinho	-26,59	0,04
Polpa de sumo de fruta	-26,46	-0,35
Mel	-26,04	-0,37
Vinho doce	-27,08	-0,11
Vinho doce	-26,61	1,23
Proteína	-17,94	-0,15
Polpa de sumo de fruta	-25,74	0,51
Mel	-26,33	0,01
Whisky	-25,65	0,16
Mel	-25,87	-0,14
Vinho seco	-27,70	0,11
Polpa de sumo de fruta	-15,18	-1,08
Mel	-25,36	-0,36
Vinho doce	-28,73	-0,32
Proteína	-23,43	-0,49
Vodka	-27,47	0,49
Mel	-25,22	-0,23

- Uso frequente de Materiais de Calibração (por exemplo, V-SMOW e SLAP na determinação de $\delta^{18}O$) e de Materiais de Intercomparação (como é o caso do IAEA-CH-7 e IAEA-CH-6, polietileno e sacarose respectivamente), na determinação de $\delta^{13}C$. Utilização do padrão de polietileno, IAEA-CH-7, no início e no fim de todas as sequências analisadas por EA/IRMS.
- O valor de $\delta^{13}C$ para os padrões internacionais deve ser $\leq 0,5$ ‰ do valor especificado.
- Amplitude das médias dos padrões usados no início e no fim da sequência, deve ser $\leq 0,3$ ‰.
- Amplitude entre duas análises consecutivas de amostras e padrões deve ser $\leq 0,3$ ‰.
- Manutenção da bomba rotatória (mudança de óleo quando necessário).
- Manutenção do compressor (drenagem da água de duas em duas semanas).
- Critério de aceitação dos valores de $\delta^{13}C$ para a mistura VG-MIX: diferença relativamente aos valores recomendados pela Micromass deve ser $\leq 0,5$ ‰.

5.3 Análise Estatística

No tratamento estatístico dos resultados utilizou-se o Microsoft Office EXCEL 2003 e um “software” específico utilizado pelos produtores de materiais de referência, o Soft CRM,³¹⁹ versão 1.2.2, desenvolvido durante um projecto europeu, SMT4-CT98-6533, e que se encontra disponível na internet a partir do site <http://www.eie.gr/>. Este “software” foi desenvolvido com base no Guia ISO 35,²⁸⁹ no GUM,²⁵⁹ na ISO 5725-2³²⁰ e nos Guias BCR.^{5,6}

No Apêndice D apresentam-se algumas breves notas explicativas sobre os testes estatísticos utilizados.

5.4 Cálculo das Estimativas das Incertezas

No cálculo da estimativa da incerteza associada ao método EA/IRMS, optou-se por aplicar a abordagem que envolve dados interlaboratoriais resultantes, neste caso, da participação do LAQAS nos ensaios de proficiência acima referidos.

A estimativa da incerteza padrão associada ao método EA/IRMS foi calculada como sendo o desvio padrão das diferenças entre o valor obtido pelo INETI e o valor alvo, em que este último corresponde à média robusta de todos os valores do estudo interlaboratorial.

Os dados experimentais usados neste cálculo encontram-se na Tabela 5.5 e correspondem a valores de $\delta^{13}\text{C}$ de matrizes diversas, nomeadamente, vinho, bebidas espirituosas, mel e polpa de sumos de fruta.

Pode-se considerar que a componente da estimativa da incerteza combinada, $u(c)$ é^{260,263}

$$s = u(c) \quad (5.1)$$

e seguidamente, calcular a incerteza expandida, U , de acordo com o VIM,¹ pela equação seguinte,

$$U = k \times u(c) \quad (5.2)$$

onde k é o factor de cobertura, que toma o valor 2 para um nível de confiança, n.c., de 95 %.

No cálculo da estimativa da incerteza associada ao método de GC/IRMS usou-se a mesma abordagem. Neste caso os dados de $\delta^{13}\text{C}$ utilizados são provenientes do Exercício de Certificação Simulado.

Tabela 5.5: Dados experimentais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) da participação do INETI nos FIT-PTS para várias matrizes de géneros alimentícios. Método EA/IRMS.

Matriz	INETI	Valor alvo
Whisky	-25,60	-25,75
Sumo de fruta	-26,40	-26,68
Mel	-26,00	-25,89
Vodka	-28,50	-28,36
Mel	-25,30	-25,08
Vinho	-27,30	-27,32
Vinho	-26,70	-26,76
Polpa de sumo de fruta	-26,90	-26,28
Mel	-26,00	-25,99
Vodka	-27,47	-27,59
Vinho doce	-28,73	-28,65
Vinho seco	-27,70	-27,73
Mel	-25,36	-25,27
Vinho doce	-27,08	-27,05
Vinho doce	-26,59	-26,60
Vinho doce	-26,91	-26,92

5.5 Protocolo Experimental dos Testes de Homogeneidade e de Estabilidade e do Ensaio de Certificação Simulado

5.5.1 Teste de Homogeneidade

- Homogeneidade interunidades

Um pequeno lote de cada composto puro foi preparado e dividido em 4 sub-lotes. Cada sub-lote foi analisado pelos diferentes laboratórios. Foram analisadas 6 unidades/composto, em duplicado.

- Homogeneidade intra-unidades

De cada sub-lote foram analisadas 2 unidades/composto/laboratório e cada unidade foi medida 6 vezes (6 réplicas).

As amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas.

5.5.2 Teste de Estabilidade

Os guias BCR^{5,6} recomendam que as amostras ou unidades (dos lotes) dos compostos candidatos a MRC, sejam expostas a condições que acelerem qualquer processo que conduza à sua degradação ou modificação. Assim, foram consideradas as seguintes situações para o teste de estabilidade:

- estabilidade no longo prazo,
- resistência a choques térmicos,
- irradiação com luz UV.

5.5.2.1 Estabilidade no longo prazo

Foram realizadas medições da razão isotópica $\delta^{13}\text{C}$ após 3, 6 e 9 meses de armazenamento, às temperaturas de +20 °C, +04 °C e -20 °C. A amostra de Referência foi mantida a -80 °C (condição de não degradação) durante o mesmo tempo.

5.5.2.2 Resistência a choques térmicos

Neste ensaio, 2 amostras de cada composto foram ciclicamente alternadas entre as temperaturas de -20 °C e +40 °C, por um período de 16 horas (8 horas a cada temperatura), durante 2 semanas. Após cada período de 8 horas, o composto permaneceu à temperatura ambiente, durante 8 horas para arrefecer ou descongelar, até ser posto na outra temperatura extrema.

Foram analisadas 2 unidades de cada composto.

5.5.2.3 Irradiação com luz UV

Neste ensaio as amostras foram continuamente irradiadas com luz directa de UV às temperaturas de +20 °C e +40 °C por um período de 4 semanas. As amostras de Referência foram preparadas em simultâneo e mantidas às mesmas temperaturas, na ausência de luz UV. Foram analisadas 2 unidades/composto e para cada temperatura.

5.6 Ensaio de Certificação Simulado

Foram enviadas instruções gerais acerca dos compostos a analisar a todos os laboratórios que participaram neste Exercício de certificação Simulado. Contudo, cada um teve que as adaptar ao seu caso particular no que respeita aos equipamentos. Assim, foi estipulado:

- Analisar os dez compostos e a vanilina por EA/IRMS. Fazer 3 medidas em condições de reprodutibilidade, *i.e.*, em dias diferentes.
- Analisar duas amostras de vanilina por GC/IRMS, em triplicado e em condições de reprodutibilidade. Preparar as soluções de vanilina em éter *terc*-butílico e metílico (MTBE).

- Analisar a mistura contendo os sete compostos, previamente preparada em MTBE, em triplicado e em condições de reprodutibilidade.

Capítulo 6

Materiais de Referência para GC/IRMS

6.1 Estudo da exequibilidade de produção de MRC para GC/IRMS

6.1.1 Introdução

É no contexto das necessidades sentidas, por parte dos laboratórios analíticos ligados ao controlo da autenticidade de géneros alimentícios, de Materiais de Referência Certificados para a técnica de GC/IRMS, que surgiu este trabalho de investigação, cujo principal objectivo foi o de estudar a exequibilidade de produzir MRC adequados para a técnica de GC/IRMS.

Tal como anteriormente referido este estudo foi efectuado ao abrigo de um projecto Europeu, financiado pela Comunidade Europeia dentro do Programa “Competitive and Sustainable Growth” do 5º Programa Quadro de Investigação e Desenvolvimento da União Europeia (1998-2002).

Salienta-se que este Programa Quadro deu especial ênfase ao controlo de alimentos e de fármacos e introduziu uma nova abordagem, sendo financiadas apenas as actividades de investigação ligadas a estudos de exequibilidade, “feasibility studies”. A produção e a certificação de materiais de referência em larga escala só seria considerada se o estudo de exequibilidade o justificasse. Neste Programa Quadro, a importância dos MRC estava ligada ao apoio às políticas comunitárias, à normalização, à luta antifraude, à rastreabilidade e à calibração.²⁷⁵

No que se refere ao 5º PQ, este apresentava uma nova abordagem, faseada, de um candidato a MRC que era constituída por 3 passos:

1. Expressão de interesse.

O interesse na pesquisa de MR podia ser expresso via uma Expressão de Interesse

(EOI), enviada por qualquer organização.

2. Estudo de exequibilidade.

A fase de investigação consistia no desenvolvimento de um material (preparação, estudos de estabilidade, e homogeneidade) e num estudo colaborativo envolvendo vários laboratórios e finalmente na preparação de um protocolo final (incluindo recomendações), para a futura produção do MRC.

3. Produção

Finalizado o estudo de viabilidade, e dependendo dos resultados obtidos, o consórcio, uma terceira parte ou a Comissão Europeia, através do IRMM, podiam decidir sobre a produção do MRC. A produção seria efectuada de acordo com os requisitos de qualidade internacional, constantes do guia ISO 34.²⁸⁸

O estudo da viabilidade dos compostos candidatos a MRC que irá ser apresentado ao longo deste capítulo está dividido em duas fases.

Numa primeira fase, realizou-se o Ensaio Circular onde foram determinadas as razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^2\text{H}$, por EA/IRMS de todos os compostos puros e dos submetidos aos testes de homogeneidade e de estabilidade no curto prazo e estabilidade no longo prazo, conforme os guias “BCR Guide for Production of Certified Reference Materials”.^{5,6}

As mesmas razões isotópicas foram posteriormente analisadas nos compostos puros utilizando a técnica de GC/IRMS, com interface de combustão no caso do $\delta^{13}\text{C}$.

Na segunda fase, os compostos puros e a mistura do tipo Grob seleccionada constituída por 7 compostos (1-octanol, 2,6-dimetilanilina, *N,N*,3,5-tetrametanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, 2-(metilamino)benzoato de metilo) foram submetidos a um ensaio de certificação, Ensaio de Certificação Simulado (ECS) que envolveu vários laboratórios. Este ensaio de certificação visa a obtenção de valores de consenso (dado ser um estudo de exequibilidade e não de certificação) com as estimativas das respectivas incertezas.

O trabalho da presente dissertação refere-se apenas aos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pelas duas técnicas isotópicas hifenadas EA/IRMS e GC/C/IRMS (com interface de combustão). Ocasionalmente serão referidos alguns dos resultados analíticos de outros laboratórios, mas apenas como termo de comparação. A finalidade do presente trabalho, como já indicado anteriormente, é demonstrar a exequibilidade de uma mistura do tipo Grob, como material de referência para aplicação em GC/IRMS, que possa ser utilizada para otimizar as condições cromatográficas, para rastrear as medidas de GC/IRMS e para testar a influência da interface de combustão.

6.2 Selecção dos compostos químicos

A mistura de Grob é uma mistura constituída por doze compostos orgânicos com diferentes polaridades e funcionalidades e é usada, em rotina, para verificação do desempenho de colunas cromatográficas novas ou em uso. A mistura designada por geral é constituída pelos seguintes compostos: 2,3-butanodiol, *n*-decano, undecano, di-ciclo-hexilamina, 2,6-dimetilanilina, 2,6-dimetilfenol, ácido 2-etil-hexanóico, decanoato de metilo, undecanoato de metilo, *n*-nonanal, dodecanoato de metilo e 1-octanol. Uma segunda mistura, denominada de mistura modificada para fases não polares exclui o nonanal e o *n*-dodecano substitui o *n*-undecano.³²¹

Para o Ensaio Circular da mistura do tipo Grob a desenvolver foram, inicialmente, seleccionados 16 compostos, segundo a sua pureza, estabilidade química e homogeneidade, de acordo com as instruções dos guias ISO 30-35.^{282,285-289} Foram também tidas em conta outras características tais como, a estereoquímica *cis/trans*, a resolução cromatográfica de razões enantioméricas e o comportamento cromatográfico de estereoisómeros. Além disso, alguns dos compostos seleccionados têm larga aplicação na indústria dos aromas, quer para alimentos quer para perfumes, como são o caso da vanilina, e do 2-(metilamino)benzoato de metilo, este último é um aroma característico do óleo de mandarin.^{63,64}

No final foram seleccionados onze compostos (entre os dezasseis) com base na mistura de Grob (1-octanol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo e nonanal) e vanilina, e ainda outros contendo oxigénio e azoto (*N,N*,3,5-tetrametilamnilina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo e 2-(metilamino)benzoato de metilo) para que a mistura final abrangesse a calibração dos seguintes diferentes isótopos: ²H/¹H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N.

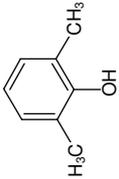
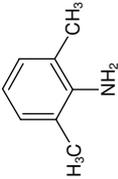
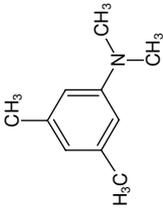
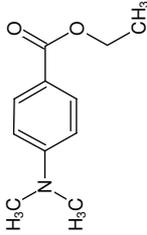
A opção pela mistura de Grob tinha a vantagem de os compostos estarem disponíveis comercialmente e ser adequada para a técnica de cromatografia em fase gasosa (GC).

Na Tabela 6.1, apresenta-se a lista completa dos compostos, estando assinalados com asterisco os compostos que foram seleccionados para a identificação da mistura a certificar no Exercício de Certificação Simulado. A vanilina foi introduzida neste estudo devido à sua importância e interesse no campo da autenticidade alimentar.

A composição química elementar e a descrição destes compostos podem ser consultadas na Tabela 6.2 e na Tabela 6.3 respectivamente.

Cada laboratório recebeu 1 mL de cada composto, excepto de *N,N*,3,5-tetrametilamnilina do qual, por ser muito caro, apenas receberam 100 μ L.

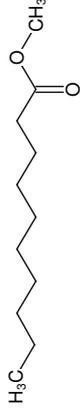
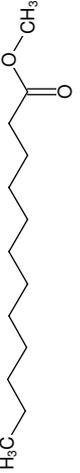
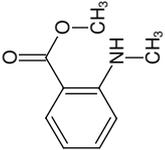
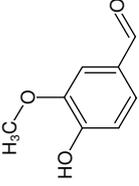
Tabela 6.1: Compostos estudados para a seleção da mistura do tipo de Grob.

Nº	Nome	Fórmula	Fórmula estrutural	Observações
01	1-Octanol(*)	C ₈ H ₁₈ O		
02	2,6-Dimetilfenol(*)	C ₈ H ₁₀ O		
03	2,6-Dimetilanilina(*)	C ₈ H ₁₁ N		
04	N,N,3,5-Tetrametilaniolina(*)	C ₁₀ H ₁₅ N		Adicionado para aumentar o número de compostos contendo azoto.
05	4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo(*)	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂		Adicionado para aumentar o número de compostos contendo azoto.
06	Dodecano(*)	C ₁₂ H ₂₆		

Continua página seguinte...

(*) – Compostos seleccionados para o estudo de exequibilidade.

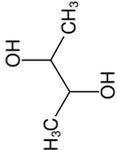
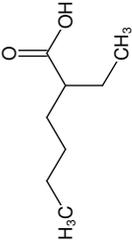
Tabela 6.1 – Continuação

Nº	Nome	Fórmula	Fórmula estrutural	Observações
07	Decanoato de metilo(*)	$C_{11}H_{22}O_2$		
08	Dodecanoato de metilo(*)	$C_{13}H_{26}O_2$		
09	2-(Metilamino)benzoato de metilo(*)	$C_9H_{11}NO_2$		Adicionado para aumentar o número de compostos contendo azoto.
10	Nonanal(*)	$C_9H_{18}O$		
11	Vanilina(*)	$C_8H_8O_3$		Material de referência potencialmente útil em aplicações de autenticidade alimentar.
12	Decano	$C_{10}H_{22}$		Inadequado nas condições usadas.
13	Undecano	$C_{11}H_{24}$		Inadequado nas condições usadas.

Continua página seguinte...

(*) – Compostos seleccionados para o estudo de exequibilidade.

Tabela 6.1 – Continuação

Nº	Nome	Fórmula	Fórmula estrutural	Observações
14	Álcool D(-)-2,3-butanodiol	$C_4H_{10}O_2$		Inadequado nas condições usadas.
15	Ácido 2-etilhexanóico	$C_8H_{16}O_2$		Inadequado nas condições usadas.
16	Di-ciclo-hexilamina	$C_{12}H_{23}N$		Inadequado nas condições usadas.

(*) – Compostos selecionados para o estudo de exequibilidade.

Tabela 6.2: Composição química elementar dos onze compostos puros candidatos a MRC.

Compostos	Fórmula	M_r	%C	%O	%H	%N
1-Octanol	$C_8H_{18}O$	130	73,8	12,3	13,8	—
2,6-Dimetilfenol	$C_8H_{10}O$	122	78,7	13,1	8,2	—
2,6-Dimetilanilina	$C_8H_{11}N$	121	79,3	—	9,1	11,6
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilani- lina	$C_{10}H_{15}N$	149	80,5	—	10,1	9,4
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	$C_{11}H_{15}NO_2$	193	68,4	16,6	7,8	7,3
Dodecano	$C_{12}H_{26}$	170	84,7	—	15,3	—
Decanoato de metilo	$C_{11}H_{22}O_2$	186	71,0	17,2	11,8	—
Dodecanoato de metilo	$C_{13}H_{26}O_2$	214	72,9	15,0	12,1	—
2-(Metilamino)benzoato de metilo	$C_9H_{11}NO_2$	165	65,5	19,4	6,7	8,5
Nonanal	$C_9H_{18}O$	142	76,1	11,3	12,7	—
Vanilina	$C_8H_8O_3$	152	63,2	31,6	5,3	—

Tabela 6.3: Descrição dos compostos estudados.

Composto	Fornecedor	Referência Fornecedor	Pureza	N° lote	Quantidade	Tipo	Toxicidade	Quantidade/"vial"
1-Octanol	Fluka	74848	≥ 99,5%	422511/1	500 mL	líquido	Perigoso/Irritante	1 mL
2,6-Dimetilfenol	Fluka	41350	≥ 98%	421442/1	1 Kg	sólido	Tóxico/perigoso ambiente	0,5 g
2,6-Dimetilanilina	Fluka	39520	≥ 98%	408430/1	1 L	líquido	Tóxico	1 mL
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametil-anilina	Fluka	87752	≥ 97%	417949/1	10 mL	líquido	Nocivo	0,1 mL
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	Fluka	39120	≥ 98%	356266/1	100 g	sólido	Irritante	0,5 g
Dodecano	Fluka	44020	≥ 98%	419745/1	500 mL	líquido	Nocivo	1 mL
Decanoato de metilo	Fluka	21480	≥ 97%	404178/1	500 mL	líquido	Perigoso	1 mL
Dodecanoato de metilo	Fluka	61700	≥ 98%	364842/1	1 L	líquido	Nocivo	1 mL
2-(Metilamino)benzoato de metilo	Fluka	65820	~ 98%	362949/1	500 mL	líquido	Fototóxico	1 mL
Nonanal	Fluka	76310	sem informação	381307/1	100 mL	líquido	Irritante	1 mL
Vanilina	Fluka	94750	≥ 98%	405529/1	500 g	sólido	Nocivo	0,5 g

6.3 Laboratórios Participantes no Ensaio Circular

A Tabela 6.4, apresenta o consórcio dos laboratórios participantes no Ensaio Circular com a respectiva atribuição do parâmetro isotópico analisado. Por uma questão de confidencialidade foram atribuídas letras, A-E, em substituição dos verdadeiros nomes dos laboratórios correspondendo a letra C ao INETI.

Todos os laboratórios que participaram no estudo possuem experiência nas técnicas isotópicas e, alguns deles, também na certificação de materiais de referência,³²²⁻³²⁴ quer por participação em projectos anteriores semelhantes, quer por relações muito estreitas com a IAEA e com o IRMM, dois dos principais produtores de materiais de referência de isótopos estáveis.

Tabela 6.4: Distribuição dos parâmetros isotópicos analisados pelos laboratórios que participaram no Ensaio Circular.

Participantes	D/H	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
A			
B			
C			
D			
E			

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ nos Compostos Puros por EA/IRMS. Ensaio Circular

Este estudo visa estabelecer parâmetros de exactidão e precisão da técnica de EA/IRMS para os onze compostos puros.

Os resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ nomeadamente os valores médios e os desvios padrão (s) encontram-se compilados na Tabela 6.5.

Observa-se que a gama de valores de $\delta^{13}\text{C}$ para os compostos analisados varia entre -28,41 ‰, para o 1-octanol, e -37,51 ‰ para o 2-(metilaminobenzoato de metilo). A re-

Tabela 6.5: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para os onze compostos puros relativos ao Ensaio Circular.

Composto	Fórmula	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	
		média	s^a
1-Octanol	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	-28,41	0,05
2,6-Dimetilfenol	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	-30,32	0,16
2,6-Dimetilanilina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$	-30,42	0,06
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}$	-33,69	0,03
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	-30,35	0,15
Dodecano	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	-32,21	0,14
Decanoato de metilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	-31,49	0,07
Dodecanoato de metilo	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	-30,44	0,06
2-(Metilamino)benzoato de metilo	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	-37,51	0,11
Nonanal	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	-30,98	0,05
Vanilina	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	-28,68	0,11

^a Desvio padrão**Tabela 6.6:** Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para os compostos puros. Ensaio Circular.

Composto	Fórmula	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
		N^a	média	s^b	s_{exp}^c
1-Octanol	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	4	-28,34	0,12	0,062
2,6-Dimetilfenol	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	4	-30,56	0,19	0,093
2,6-Dimetilanilina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$	4	-30,44	0,10	0,051
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilnilina	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}$	4	-33,74	0,09	0,046
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	4	-30,34	0,08	0,039
Dodecano	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	4	-32,19	0,15	0,076
Decanoato de metilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	4	-31,51	0,09	0,043
Dodecanoato de metilo	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	4	-30,48	0,13	0,063
2-(Metilamino)benzoato de metilo	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	4	-37,51	0,18	0,089
Nonanal	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	4	-30,84	0,19	0,097
Vanilina	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	4	-28,93	0,19	0,097

^a Número de laboratórios.^b Desvio padrão^c Desvio padrão experimental da média

petibilidade é boa para os compostos analisados e sempre menor que a precisão do método, 0,25 ‰.¹⁶⁶ Para termo de comparação com estes resultados, apresentam-se na Tabela 6.6 as médias finais de $\delta^{13}\text{C}$, os desvios padrão (s) e os desvios padrão experimental da média (s_{exp}) relativos ao Ensaio Circular.

Os resultados globais correspondentes a este ensaio podem ser consultados no Apêndice B. Verifica-se que os valores médios constantes na Tabela 6.5 são muito semelhantes às médias finais obtidas no Ensaio Circular (Tabela 6.6) e mostram o bom desempenho do INETI

neste estudo. A repetibilidade interlaboratórios é menor que 0,25 ‰ e está de acordo com o descrito na literatura¹⁶⁶. Observa-se também que os desvios padrão experimental das médias, s_{exp} , são muito baixos e variam entre 0,039 ‰ para o 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo e o valor máximo de 0,097 ‰ para os compostos nonanal e vanilina. Estes resultados revelam a robustez da técnica de EA/IRMS mesmo quando são utilizados equipamentos de marcas diferentes.

A repetibilidade intralaboratórios (Tabela B.1 no Apêndice B) encontra-se igualmente abaixo da precisão do método, 0,25 ‰.

6.4.2 Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ nos Compostos Puros e na Mistura por GC/IRMS. Ensaio Circular

Os objectivos deste estudo foram:

- definir a composição de uma mistura apropriada como MRC para GC/IRMS, e
- estabelecer as condições experimentais de análise da mistura definida.

6.4.2.1 Estudo das Condições Cromatográficas Adequadas e da Identificação da Mistura

Como já foi referido no Capítulo 5 referente às Metodologias Analíticas, foram seleccionadas duas colunas com polaridades diferentes, uma não polar, HP-5MS (reticulado com 5% PH ME Siloxane) e outra polar HP-INNOWax (polietileno glicol reticulado). Pretendia-se estudar qual a coluna cromatográfica mais adequada e que permitiria obter melhor separação dos compostos da mistura. Estudaram-se as condições cromatográficas adequadas e já descritas em 5.1.4.

Dos dezasseis compostos inicialmente escolhidos (Tabela 6.1), os compostos com a função química diol, amina e ácido (o D(-)2,3-butanodiol, o ácido 2-etil-hexanóico e a di-ciclo-hexilamina) e, o decano e o undecano, foram excluídos da mistura, devido a problemas de interferência com outros compostos, e devido à sobreposição na análise cromatográfica.

Restaram onze compostos, incluindo a vanilina, pois como já referido, esta tem grande interesse como padrão na área da autenticidade alimentar. Assim, as onze substâncias testadas para preparar a mistura final candidata à certificação como MRC foram as seguintes: 1-octanol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-dimetilanilina, *N,N*,3,5-tetrametilnilina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, 2-(metilamino)benzoato de metilo, nonanal e vanilina.

Após optimização das condições cromatográficas para as colunas A e B, estudo de interferências entre os compostos e avaliação da estabilidade no curto prazo, foi seleccionada

uma mistura para o Exercício de Certificação Simulado, ECS, constituída pelos 7 compostos seguintes: 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, *N,N*,3,5-tetrametil-anilina, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo e 2-(metilamino)benzoato de metilo.

Refira-se que um dos requisitos para a selecção da mistura candidata a MRC era que esta fosse abrangente na aplicação para a determinação de vários isótopos nomeadamente, de carbono, azoto e hidrogénio (este último tem muito interesse para a técnica GC/P/IRMS na área dos aromas). Deste modo, a selecção da mistura não teve apenas como base resultados dos isótopos de carbono mas também dos isótopos de hidrogénio e, para estes segundos, os compostos com valores de $\delta^2\text{H}$ obtidos por GC/P/IRMS que não mostravam discrepâncias significativas com os valores obtidos por EA/IRMS, correspondem precisamente aos sete compostos da mistura seleccionada.

A pureza dos compostos foi verificada por GC/MS (GC 8000 hifenado a DM 800 ambos da marca Fison e coluna cromatográfica SE 52 (30m \times 0,25mm \times 0,25 μm , análoga à coluna HP-5MS) e por GC com detector FID e coluna INNOWax (30m \times 0,25mm \times 0,5 μm). Não foram detectadas impurezas voláteis em nenhum dos compostos por qualquer dos métodos utilizados.

6.4.2.2 Medição dos Valores de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS

Este estudo teve como finalidade comparar os valores $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por GC/IRMS com os obtidos por EA/IRMS, tomando estes últimos como valores de referência, e ainda verificar se os dois métodos analíticos são ou não estatisticamente semelhantes.

Dos onze compostos seleccionados, sete foram analisados quer puros, quer em mistura, nas duas colunas cromatográficas já mencionadas. Os resultados globais podem ser consultados no Apêndice F.

Os valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ correspondentes a este estudo encontram-se na Tabela 6.7. A análise desta Tabela permite tecer algumas considerações:

- Os valores médios das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pelas duas técnicas isotópicas GC/IRMS (valor médio das diferentes condições de análise) e EA/IRMS (valores de referência) não são significativamente diferentes. As maiores diferenças foram observadas para o nonanal e para o 2-(metilamino)benzoato de metilo, 0,55 ‰ e 0,68 ‰ respectivamente. Parece haver uma tendência para valores mais positivos (enriquecidos em ^{13}C) quando se utilizou a técnica de GC/IRMS o que poderá ser interpretado como a existência de fraccionamento isotópico introduzido pelo sistema de GC. Mais adiante neste ponto apresentam-se os resultados que avaliam os dois métodos analíticos do ponto de vista estatístico.
- Os valores dos desvios padrão dos valores médios dos compostos analisados pelo método de GC/IRMS, são sempre maiores que os desvios padrão do método EA/IRMS o que significa que a reprodutibilidade é mais baixa na técnica de GC/IRMS. Este facto

Tabela 6.7: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por GC/IRMS para os compostos puros e em mistura, utilizando as colunas cromatográficas não polar (HP-5MS) e polar (HP INNOWax). Tomou-se como valor de referência o valor de $\delta^{13}\text{C}$ obtido por EA/IRMS. Ensaio Circular.

Composto		$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
		EA/IRMS ^a	GC/IRMS				
			Média	Puro	Mistura	Coluna HP 5MS	Coluna HP INNOWax
1-Octanol	Média	-28,41	-28,48	-28,73	-28,23	-28,41	-28,56
	s	0,05	0,32	0,23	0,13	0,20	0,42
2,6-Dimetilfenol	Média	-30,32	-30,52	-30,52	–	-30,38	-30,66
	s	0,16	0,18	0,18	–	0,11	0,11
2,6-Dimetilanilina	Média	-30,42	-30,27	-30,30	-30,23	-30,17	-30,36
	s	0,06	0,17	0,12	0,21	0,11	0,17
N,N,3,5-Tetrametilnilina	Média	-33,69	-33,37	-33,50	-33,25	-33,13	-33,61
	s	0,03	0,31	0,21	0,36	0,22	0,15
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	Média	-30,35	-30,05	-30,05	–	-30,04	-30,05
	s	0,15	0,19	0,19	–	0,15	0,25
Dodecano	Média	-32,21	-31,85	-31,99	-31,71	-31,67	-32,04
	s	0,14	0,30	0,38	0,09	0,10	0,33
Decanoato de metilo	Média	-31,49	-31,48	-31,73	-31,23	-31,52	-31,43
	s	0,07	0,30	0,18	0,12	0,37	0,24
Dodecanoato de metilo	Média	-30,44	-30,30	-30,44	-30,17	-30,19	-30,41
	s	0,06	0,23	0,15	0,21	0,16	0,24
2-(Metilamino)benzoato de metilo	Média	-37,51	-36,83	-36,96	-36,70	-36,45	-37,22
	s	0,11	0,47	0,29	0,61	0,31	0,18
Nonanal	Média	-30,98	-30,43	-30,43	–	-30,37	-30,49
	s	0,05	0,15	0,15	–	0,13	0,16
Vanilina	Média	-28,68	-28,91	-28,91	–	-28,87	-28,94
	s	0,11	0,15	0,15	–	0,12	0,20

^a Valor de referência.

é indicador da maior robustez da técnica EA/IRMS o que vem confirmar a necessidade de materiais de referência para GC/IRMS.

- Dos sete compostos analisados em mistura e puros, verifica-se que nos dois casos as

maiores diferenças foram para o 1-octanol e para o decanoato de metilo, *i.e.*, 0,50 ‰.

- De um modo geral, quando se utilizaram duas colunas com polaridades diferentes, uma polar e outra não polar, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ ficaram mais próximos dos valores de referência com a coluna polar. A coluna polar mostrou-se mais adequada para os compostos analisados. Os compostos mais polares com funções álcool ou funções amina não se comportaram de uma forma excepcional na coluna polar. O inverso também se verifica, os compostos menos polares não mostraram melhor comportamento na coluna não polar A.

Como termo de comparação, apresentam-se os resultados obtidos relativos ao Ensaio Circular, Tabela 6.8. Estes resultados vêm de certa forma confirmar os resultados obtidos no INETI apesar dos resultados relativos ao Ensaio Circular (em que participaram vários laboratórios) apresentarem maiores desvios. Verifica-se que os valores das razões isotópicas obtidas por GC/IRMS (valor médio obtido nas diferentes condições de análise) não são muito discrepantes. As maiores diferenças comparativamente ao valor tomado como referência, observam-se no caso dos compostos 2,6-dimetilfenol e nonanal.

Há que salientar que a dispersão interlaboratórios é maior (valores de s são bastante mais elevados) e no caso dos compostos 2,6-dimetilfenol e nonanal, a diferença para o valor de referência é já significativa. Tal deve depender do desempenho dos diferentes laboratórios e principalmente das diferentes formas de calibração do GC/IRMS dada a inexistência de MR(C). A aplicação da análise de variância, ANOVA bifactorial, permitiu avaliar a influência do laboratório, do tipo de coluna cromatográfica e das duas formas em solução, *i.e.*, puro e mistura. A análise de variância é normalmente representada numa tabela ‘Tabela ANOVA’, que indica as somas dos quadrados, as médias de quadrados, os valores esperados das médias de quadrados e a estatística F calculada através das razões das médias de quadrados dos factores subsequentes envolvidos. Todos os valores críticos dos testes t e F foram obtidos directamente das tabelas de resultados quando se aplicou a ANOVA (Apêndice E). Não sendo esse o caso, podem retirar-se os valores críticos de tabelas dos respectivos testes, contidas em bibliografia específica da técnica.

A Tabela 6.9 apresenta os valores do teste F (o teste F de Fisher compara a razão das variâncias) calculados para os compostos analisados, F_{calc} , e compara-o com o valor crítico de F , F_{crit} , para um nível de confiança de 95 %. É também apresentado o valor da probabilidade, *valor* – p , ou P para o valor de F_{calc} (o *valor* – p é a probabilidade para a qual a hipótese nula H_0 é verdadeira, em que H_0 assume que os valores médios são iguais). Pretende-se avaliar a influência das colunas cromatográficas e dos laboratórios (os factores são a coluna cromatográfica e o laboratório) para os compostos analisados puros.

Como os valores de F_{calc} para todos os compostos puros são sempre menores que o valor de F_{crit} , e os valores de P são sempre maiores que 0,05, tal significa que não existe diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos laboratórios participantes, quer se use a coluna polar quer se use a coluna apolar.

Para se estudar a influência dos compostos em mistura, aplicou-se o mesmo tipo de análise de variância, mas agora para as variáveis laboratório, puro e mistura (o efeito das

colunas cromatográficas é aleatório). Na Tabela 6.10 estão compilados os valores de F_{calc} , F_{crit} , e de P .

Verifica-se que o valor de F_{calc} é menor que o valor de F_{crit} para todos os compostos, quer o composto tenha sido analisado puro quer em mistura, excepto para o dodecanoato de metilo em que o $F_{\text{calc}} = 6,18$ e $F_{\text{crit}} = 5,05$ e $P = 0,03$. Isto indica que existe uma diferença significativa entre os resultados do decanoato de metilo fornecidos pelos laboratórios participantes, apesar do valor médio ser semelhante, para o composto analisado puro e analisado em mistura (Tabela 6.8).

Assim, é possível concluir que os resultados obtidos pela técnica de GC/IRMS nas diferentes condições, *i.e.*, colunas cromatográficas diferentes, laboratórios diferentes e compostos nas formas puro e mistura, não são estatisticamente diferentes, pelo que é possível usar a sua média global como valor final excepto no caso do dodecanoato de metilo.

A comparação estatística dos métodos EA/IRMS e GC/IRMS foi feita utilizando o teste $t - student$ adequado, conforme as variâncias eram iguais ou diferentes, após a análise das variâncias pelo teste F (teste à homogeneidade de variâncias). Na Tabela 6.11, apresentam-se os valores de t_{calc} que se compara com o valor de t_{crit} , para um nível de confiança de 95 % (o valor de t_{crit} é retirado das tabelas $t - student$ descritas na literatura para teste bilateral).

Verifica-se que os dois métodos não são estatisticamente diferentes para dez compostos mas estatisticamente diferentes para o 2,6-dimetilfenol dado que o valor de $t_{\text{calc}} = 2,80$ é superior ao valor de $t_{\text{crit}} = 2,45$.

Parece provável que os principais factores responsáveis pelas discrepâncias de valores observadas entre os laboratórios estejam relacionados com a utilização de equipamentos com características de concepção diferentes e com as diferentes condições cromatográficas utilizadas tal como já foi mencionado, pois pretendia-se trabalhar num cenário que fosse próximo da realidade. Mas, talvez mais que as condições cromatográficas diferentes, o uso de diferentes misturas teste internas para verificação dos sistemas de GC/IRMS, possa ser o factor com uma contribuição ainda mais importante.

Tabela 6.8: Resumo dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por EA/IRMS e GC/IRMS para compostos puros e em mistura utilizando as colunas polar HP INNOWax e apolar HP-5MS). Tomou-se como valor de referência o valor $\delta^{13}\text{C}$ de EA/IRMS.

Composto		$\delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$					
		EA/IRMS ^a	GC/IRMS				Coluna HP INNO wax
			Média	Puro	Mistura	Coluna HP 5MS	
1-Octanol	<i>n</i>	12	14	8	6	7	7
	Média	-28,34	-28,68	-28,66	-28,70	-28,73	-28,62
	<i>s</i>	0,12	0,94	0,99	0,96	0,79	1,13
2,6-Dimetilfenol	<i>n</i>	12	6	6	–	3	3
	Média	-30,56	-31,48	-31,48	–	-31,44	-31,52
	<i>s</i>	0,19	0,77	0,77	–	0,96	0,75
2,6-Dimetilanilina	<i>n</i>	12	9	5	4	5	4
	Média	-30,44	-30,72	-30,73	-30,71	-30,98	-30,40
	<i>s</i>	0,10	0,90	1,13	0,67	1,18	0,25
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilani- lina	<i>n</i>	12	13	7	6	7	6
	Média	-33,74	-33,84	-34,02	-33,65	-33,88	-33,80
	<i>s</i>	0,09	0,75	0,78	0,72	0,76	0,80
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)ben- zoato de etilo	<i>n</i>	12	8	8	–	4	4
	Média	-30,34	-30,36	-30,36	–	-30,46	-30,26
	<i>s</i>	0,08	0,47	0,47	–	0,67	0,16
Dodecano	<i>n</i>	12	13	7	6	7	6
	Média	-32,19	-31,83	-32,04	-31,58	-31,54	-32,05
	<i>s</i>	0,15	1,07	0,75	1,39	1,16	1,01
Decanoato de metilo	<i>n</i>	12	14	8	6	7	7
	Média	-31,51	-31,30	-31,20	-31,43	-31,18	-31,41
	<i>s</i>	0,09	1,09	0,93	1,35	1,20	1,05
Dodecanoato de metilo	<i>n</i>	12	13	7	6	7	6
	Média	-30,48	-30,20	-30,25	-30,15	-29,95	-30,50
	<i>s</i>	0,13	0,86	0,68	1,10	1,09	0,39
2-(Metilamino)benzoato de metilo	<i>n</i>	12	12	7	5	7	5
	Média	-37,51	-37,77	-37,81	-37,70	-37,63	-37,96
	<i>s</i>	0,18	0,92	0,82	1,14	1,08	0,70
Nonanal	<i>n</i>	12	8	8	–	4	4
	Média	-30,84	-31,36	-31,36	–	-31,69	-31,03
	<i>s</i>	0,19	1,12	1,12	–	1,51	0,60
Vanilina	<i>n</i>	12	7	7	–	4	3
	Média	-28,93	-28,85	-28,85	–	-28,64	-29,13
	<i>s</i>	0,19	0,44	0,44	–	0,16	0,59

^a Valor de referência.

Tabela 6.9: Valores de F_{calc} , F_{crit} (95 %) e P calculados pela ANOVA bifatorial (laboratórios e colunas cromatográficas) relativos aos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para os compostos puros. Análise por GC/IRMS.

Composto		F_{calc}	F_{crit} (95 %)	P	Observações
1-Octanol	entre laboratórios	0,43	9,28	0,74	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	0,35	10,13	0,60	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
2,6-Dimetilfenol	entre laboratórios	16,86	19,00	0,06	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	0,11	18,51	0,77	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
2,6-Dimetilanilina	entre laboratórios	2,78	161,45	0,34	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	0,58	161,45	0,58	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilani- nilina	entre laboratórios	10,38	161,45	0,19	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	69,44	161,45	0,08	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
4-(<i>N,N</i> -Dimetila- mino)benzoato de etilo	entre laboratórios	1,54	9,28	0,37	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	0,42	10,13	0,56	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Dodecano	entre laboratórios	0,42	9,28	0,75	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	1,33	10,13	0,33	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Decanoato de metilo	entre laboratórios	0,44	9,28	0,74	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	0,01	10,13	0,92	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Dodecanoato de meti- lo	entre laboratórios	1,07	19,00	0,48	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	2,81	18,51	0,24	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
2-(Metilamino)benzo- ato de metilo	entre laboratórios	15,20	19,00	0,06	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	3,06	18,51	0,22	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Nonanal	entre laboratórios	5,32	9,28	0,10	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	2,09	10,13	0,24	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Vanilina	entre laboratórios	0,90	19,00	0,53	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre colunas	1,65	18,51	0,33	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$

Tabela 6.10: Valores de F_{calc} , F_{crit} (95 %) e P calculados através da ANOVA bifatorial (laboratórios e composto puro ou em mistura). Análise por GC/IRMS.

Composto		F_{calc}	F_{crit} (95 %)	P	Observações
1-Octanol	entre laboratórios	1,15	5,05	0,44	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	0,02	6,61	0,89	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
2,6-Dimetilanilina	entre laboratórios	0,72	9,28	0,60	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	1,77	10,13	0,28	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametil- nilina	entre laboratórios	0,68	9,28	0,62	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	0,87	10,13	0,42	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Dodecano	entre laboratórios	2,41	5,05	0,18	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	0,52	6,61	0,50	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Decanoato de metilo	entre laboratórios	3,71	5,05	0,09	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	0,01	6,61	0,93	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
Dodecanoato de meti- lo	entre laboratórios	6,18	5,05	0,03	$F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}} ; P < 0,05$
	entre puro e mistura	0,02	6,61	0,90	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
2-(Metilamino)benzo- ato de metilo	entre laboratórios	3,14	9,28	0,19	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$
	entre puro e mistura	0,29	10,13	0,63	$F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}} ; P > 0,05$

Tabela 6.11: Valores de t_{calc} , t_{crit} (teste- t bilateral, 95 %) e P para comparação dos métodos de EA/IRMS e de GC/IRMS.

Composto	t_{calc}	t_{crit} (teste- t bilateral, 95 %)	P	Observações/Conclusão
1-Octanol	1,29	2,14	0,22	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
2,6-Dimetilfenol	2,80	2,45	0,03	$t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}} ; P < 0,05$ os métodos não são estatisticamente semelhantes
2,6-Dimetilanilina	0,15	2,31	0,88	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametil- nilina	0,03	2,18	0,98	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
4-(<i>N,N</i> -Dimetila- mino)benzoato de etilo	0,15	2,31	0,88	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
Dodecano	0,15	2,31	0,88	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
Decanoato de metilo	0,74	2,14	0,47	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
Dodecanoato de meti- lo	1,13	2,16	0,28	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
2-(Metilamino)benzo- ato de metilo	0,90	2,16	0,38	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
Nonanal	1,27	2,31	0,24	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes
Vanilina	0,32	2,26	0,75	$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}} ; P > 0,05$ os métodos não são estatisticamente diferentes

6.4.3 Testes de Homogeneidade e de Estabilidade

O objectivo dos testes de homogeneidade e de estabilidade é o de verificar se os compostos candidatos possuem características adequadas para serem utilizados como materiais de referência, nomeadamente se são estáveis e homogêneos. Os testes de homogeneidade e de estabilidade foram realizados de acordo com as linhas de orientação constantes nos documentos BCR.^{5,6}

6.4.3.1 Homogeneidade

Uma condição essencial para a aceitação de um candidato a material de referência é que seja homogêneo ou seja, que apresente uma composição uniforme relativamente a uma ou mais propriedades especificadas.²⁸²

Para avaliação da significância estatística da dispersão nas diferentes unidades, calculou-se uma estimativa da homogeneidade usando o teste F de Fisher que compara as variâncias do valor médio interunidades com as variâncias do valor médio intra-unidades. Esta última variância corresponde ao desvio padrão da repetibilidade (uma medida de dispersão) do método, s_r , para cada composto. O valor de F_{calc} para cada composto foi comparado com o F_{crit} , para um n.c. de 95 %, e que tem o valor de $F_{(0,05;5;11)} = 3,20$ (para um nível de significância $\alpha = 0,05$ e para 5 e 11 graus de liberdade).

As Tabelas A.1 a A.11 que mostram os resultados relativos ao teste de homogeneidade intra-unidades e interunidades podem ser consultadas no Apêndice A. Na Figura 6.1, estão representados os valores de F_{calc} obtidos para os compostos puros. Para comparação representam-se também os resultados do participante D (laboratório de referência comunitário).

Verifica-se que os valores de F_{calc} , para um nível de significância de 0,05, são sempre menores que o valor de F_{crit} , o que mostra que não há falta de homogeneidade,³²⁶ nos onze compostos analisados.

Foram calculados também os valores do desvio padrão da repetibilidade, s_r , e do limite de repetibilidade, r (ver definições no Apêndice D) a partir dos resultados intra-unidades (fórmulas de cálculo no Apêndice E). A Tabela 6.12 apresenta os valores de s_r e de r para todos os compostos. Esta estimativa da precisão é baixa para o método EA/IRMS e vem, mais uma vez, corroborar a robustez da técnica de EA/IRMS. Varia, no caso dos compostos estudados, entre 0,11 % para a 2,6-dimetilanilina e 0,33 % para o 1-octanol e o 2-(metilamino)benzoato de metilo.

Foram ainda calculados os coeficientes de variação (%) (daqui em diante designado pela sigla CV), para os resultados intra-unidades e interunidades, por aplicação da equação

$$CV = 100 \times s/x_{\text{médio}} \quad (6.1)$$

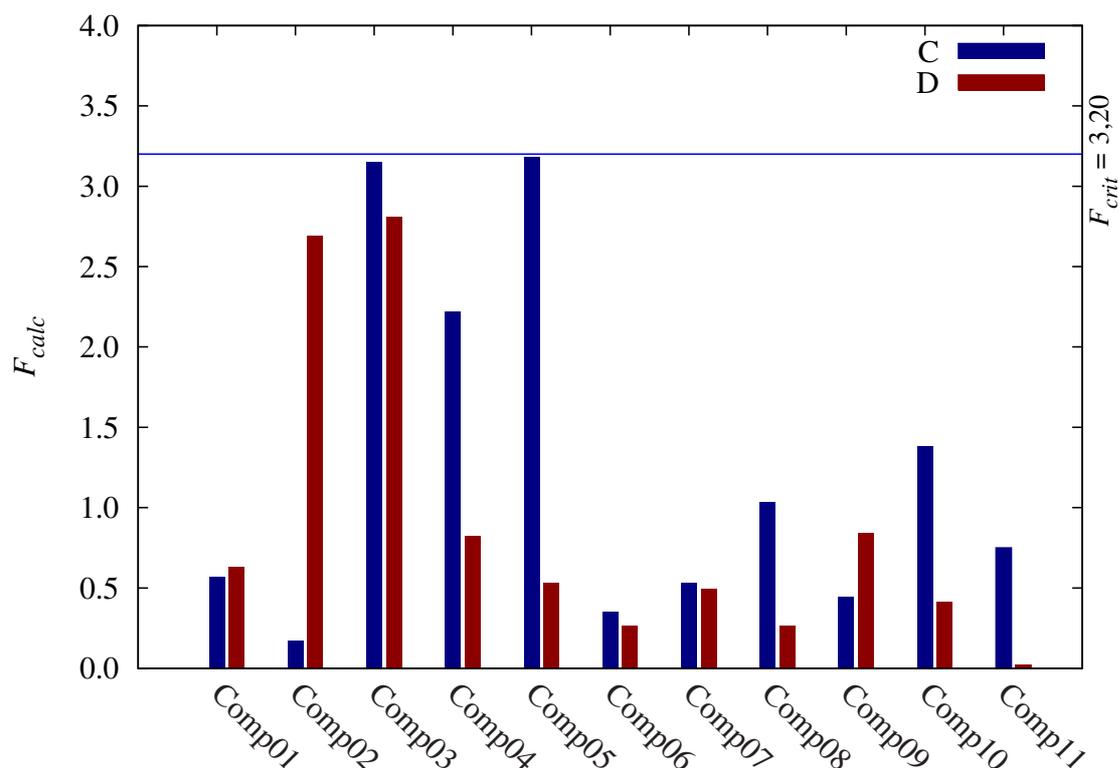


Figura 6.1: Teste de homogeneidade. Comparação dos valores de F_{calc} obtidos no INETI com os obtidos no laboratório de referência comunitário.³²⁵. $F_{crit} = 3,20$. Comp01 – 1-Octanol; Comp02 – 2,6-Dimetilfenol; Comp03 – 2,6-Dimetilanilina; Comp04 – *N,N*,3,5-Tetrametilaniлина; Comp05 – 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo; Comp06 – Dodecano; Comp07 – Decanoato de metilo; Comp08 – Dodecanoato de metilo; Comp09 – 2-(Metilamino)benzoato de metilo; Comp10 – Nonanal; Comp11 – Vanilina.

Tabela 6.12: Limite de repetibilidade, r , e desvio padrão da repetibilidade, s_r , calculados a partir dos dados do teste de homogeneidade por EA/IRMS.

Composto	r ‰	s_r ‰
1-Octanol	0,33	0,12
2,6-Dimetilfenol	0,29	0,10
2,6-Dimetilanilina	0,11	0,04
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilaniлина	0,22	0,08
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	0,18	0,06
Dodecano	0,32	0,11
Decanoato de metilo	0,26	0,09
Dodecanoato de metilo	0,23	0,08
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0,33	0,12
Nonanal	0,17	0,06
Vanilina	0,30	0,11

e, também, uma estimativa das incertezas associadas a CV, U_{CV} , através da expressão

$$U_{CV} = CV\sqrt{2n} \quad (6.2)$$

em que n é o número de réplicas.

Caso se verifique sobreposição das gamas $CV_{inter} \pm U_{CVinter}$ e $CV_{intra} \pm U_{CVintra}$, conclui-se que não há falta de homogeneidade.³²⁷⁻³²⁹

As Figuras 6.2 a 6.12 mostram que há sobreposição para todos os compostos havendo, portanto, homogeneidade. Uma vez que os valores das razões isotópicas são negativos, os valores de CV também o são. Contudo, para a construção dos gráficos, foi ignorado o sinal, por ser irrelevante para a interpretação dos mesmos.

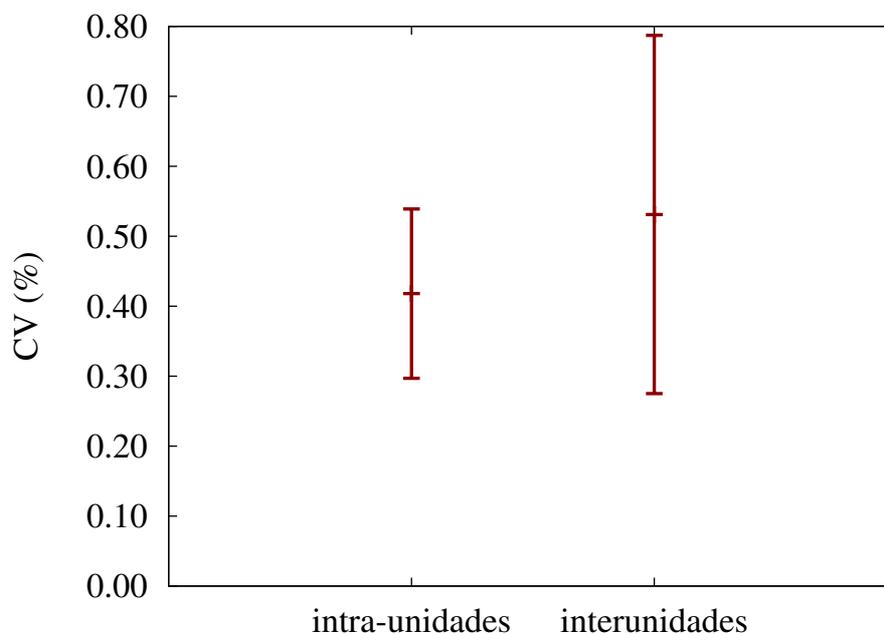


Figura 6.2: Teste de homogeneidade: 1-Octanol.

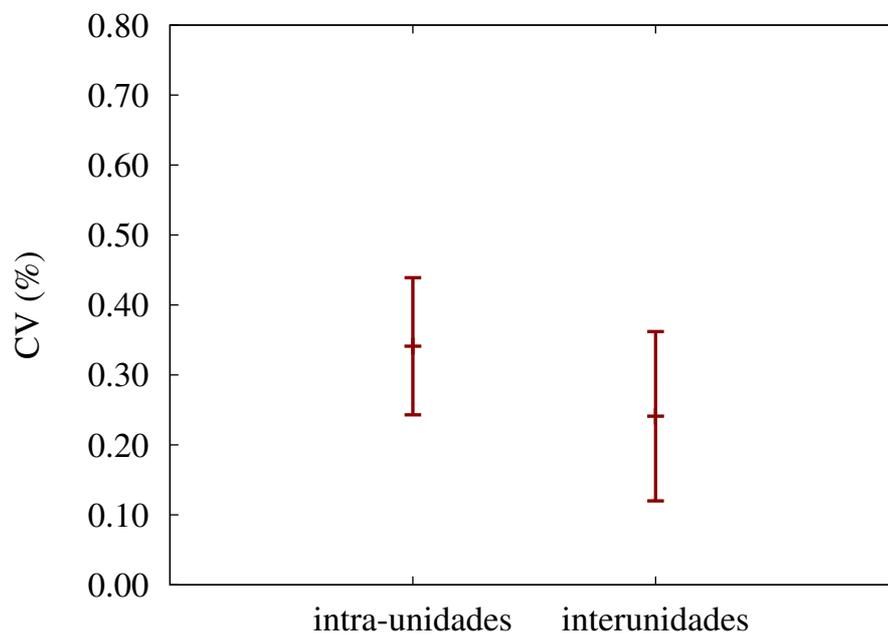


Figura 6.3: Teste de homogeneidade: 2,6-Dimetilfenol.

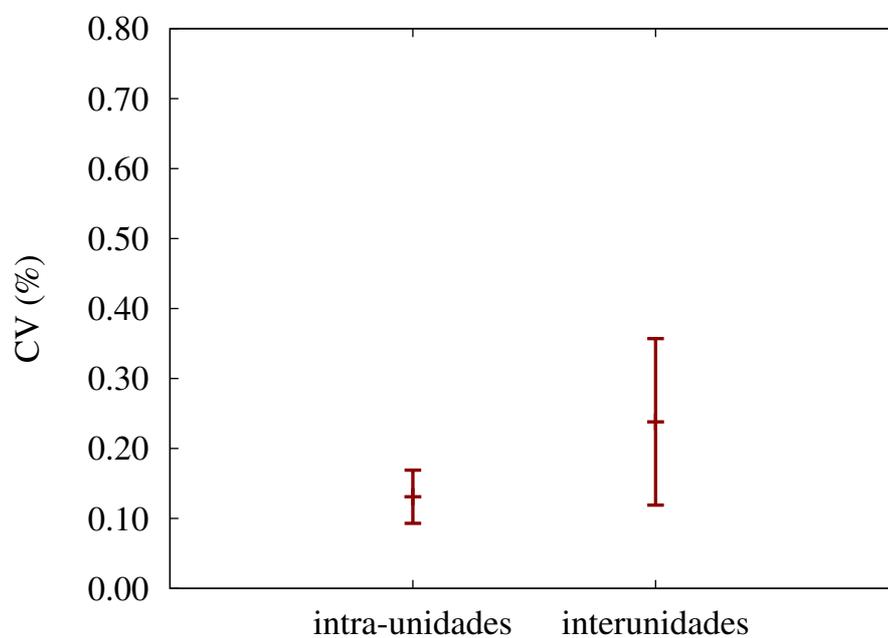


Figura 6.4: Teste de homogeneidade: 2,6-Dimetilanilina.

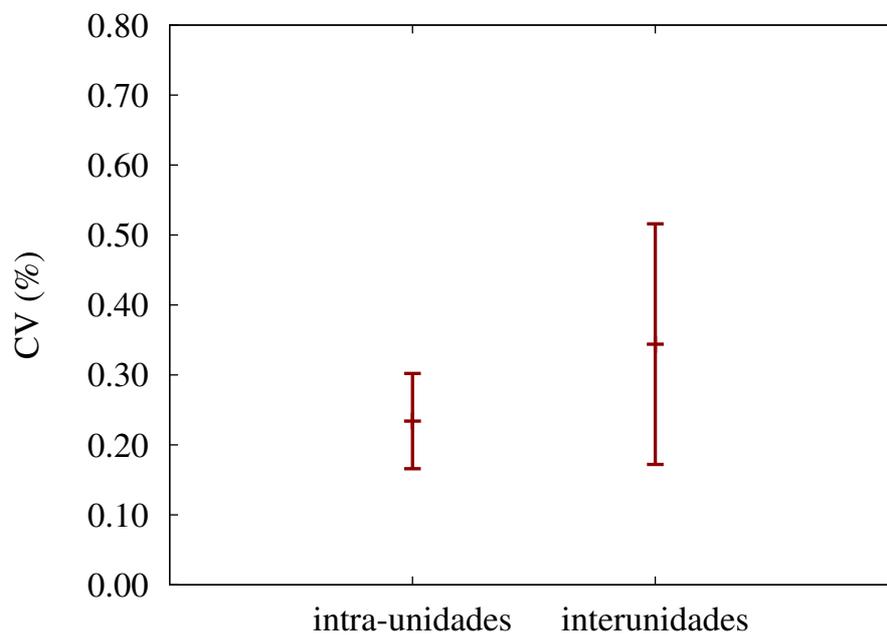


Figura 6.5: Teste de homogeneidade: *N,N,3,5*-Tetrametilnilina.

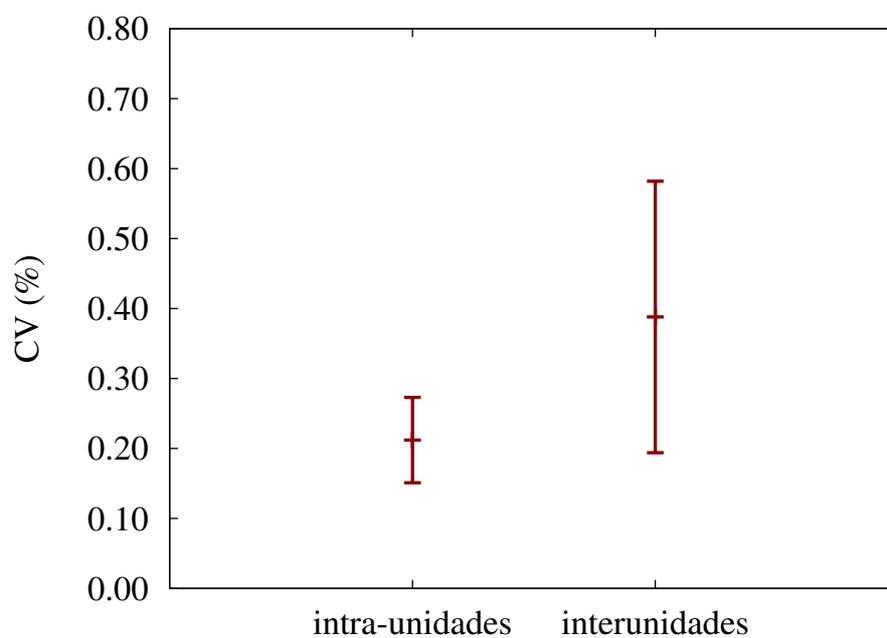


Figura 6.6: Teste de homogeneidade: 4-*(N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo.

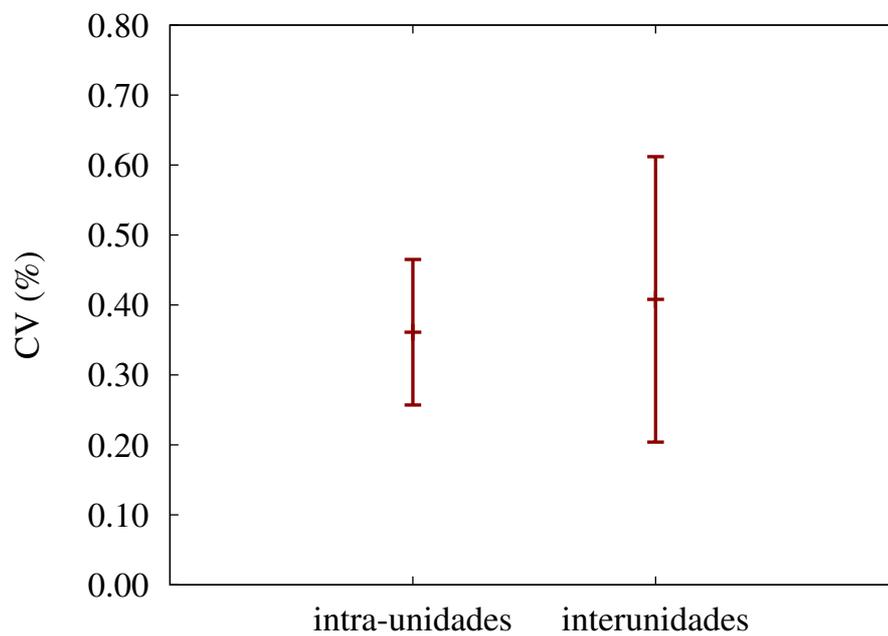


Figura 6.7: Teste de homogeneidade: Dodecano.

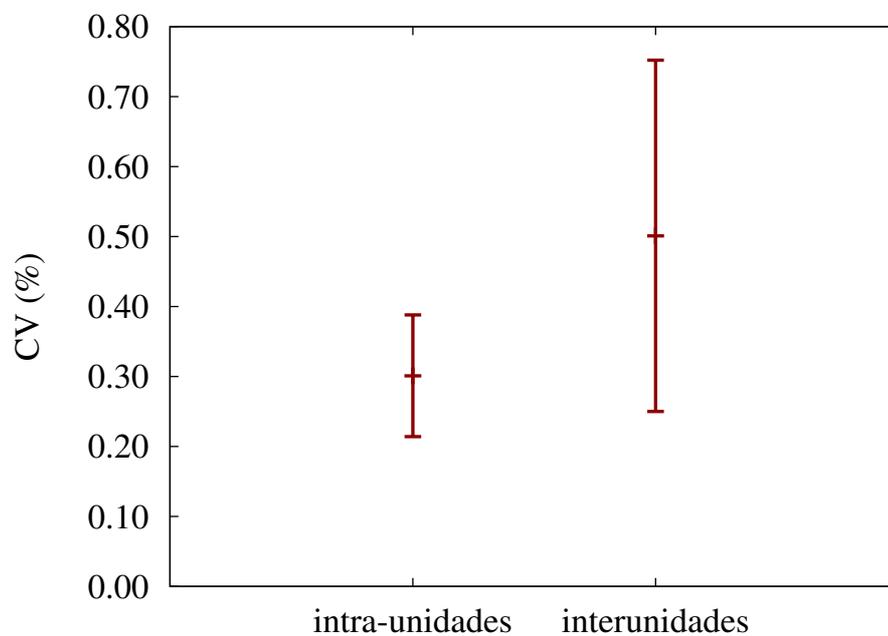


Figura 6.8: Teste de homogeneidade: Decanoato de metilo.

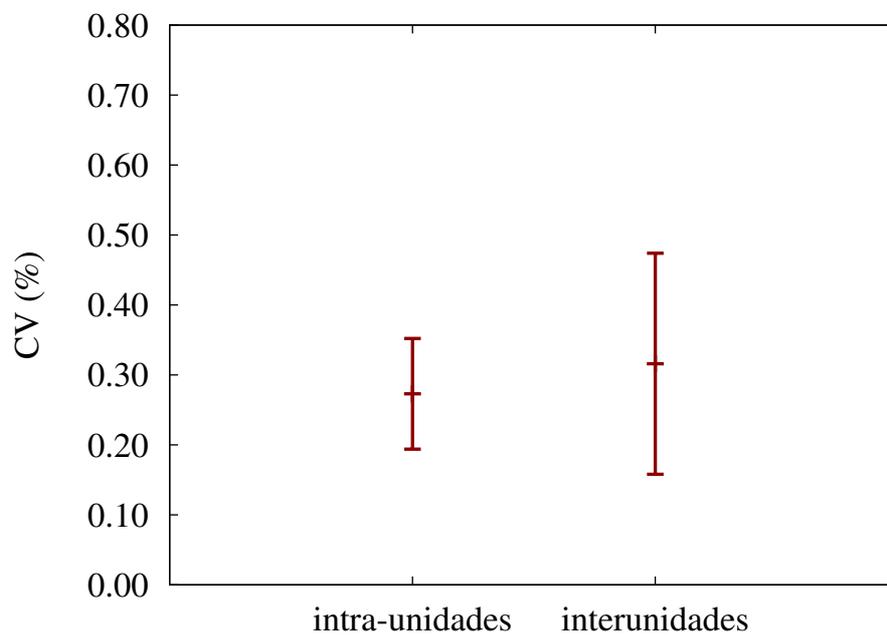


Figura 6.9: Teste de homogeneidade: Dodecanoato de metilo.

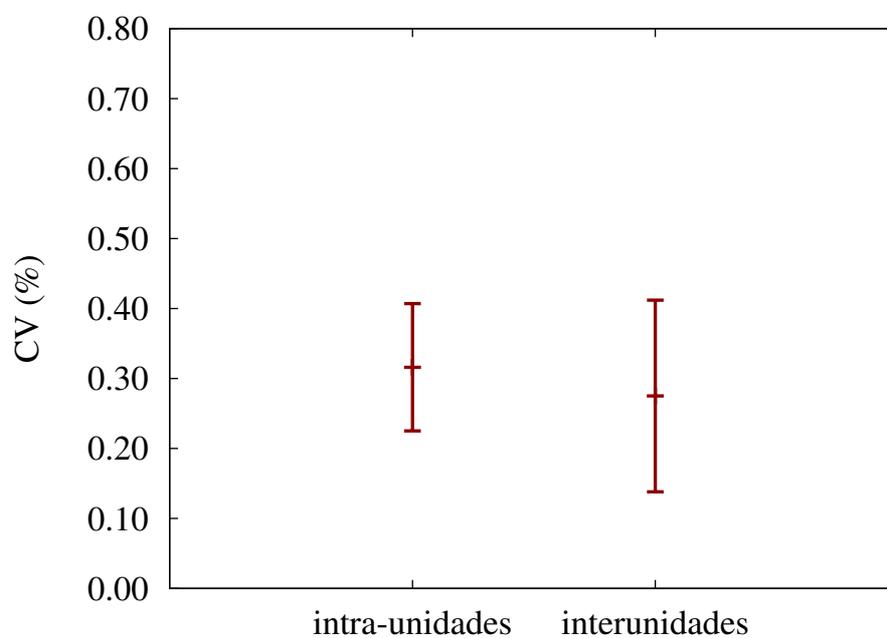


Figura 6.10: Teste de homogeneidade: 2-(Metilamino)benzoato de metilo.

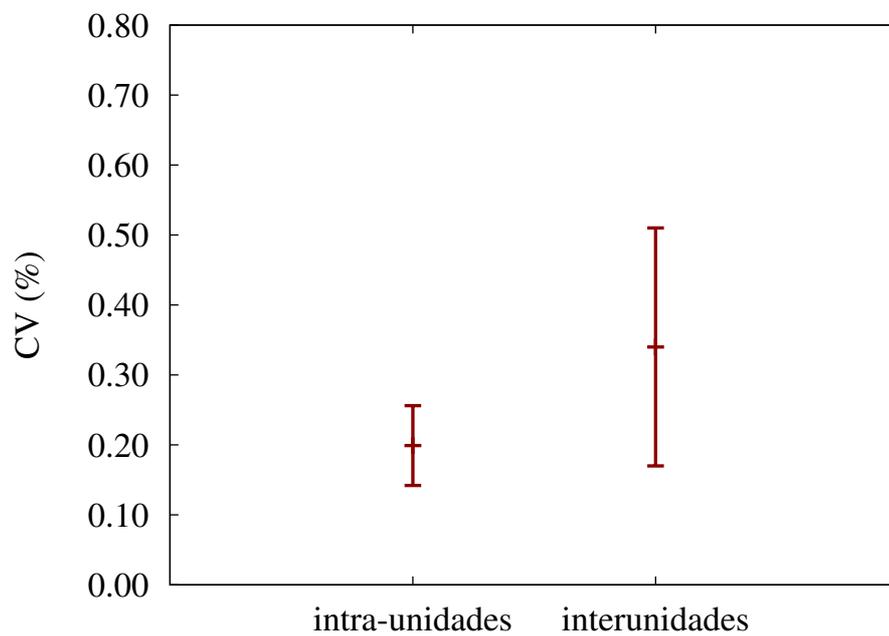


Figura 6.11: Teste de homogeneidade: Nonanal.

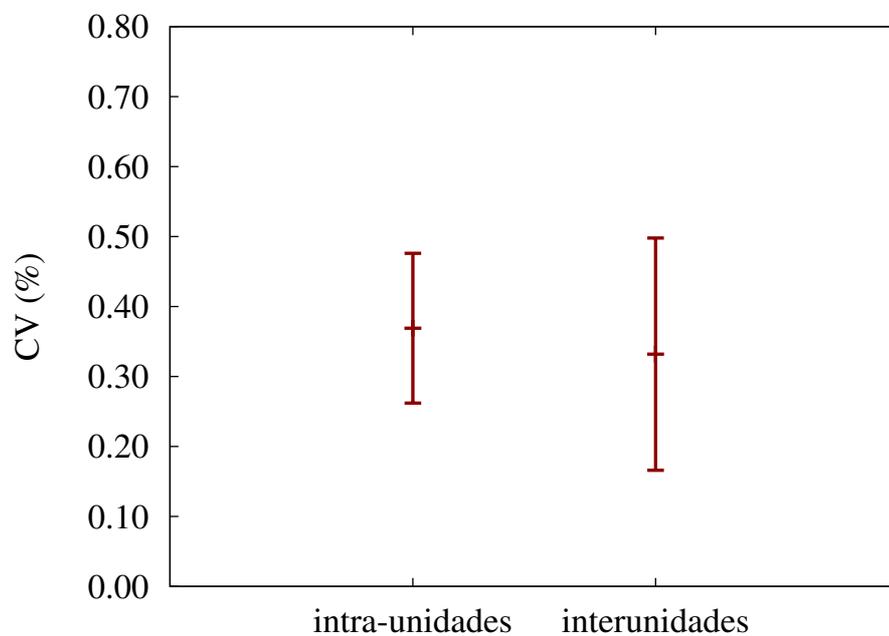


Figura 6.12: Teste de homogeneidade: Vanilina.

É importante frisar que os valores do CV e, conseqüentemente os de U , são apenas aproximações, dado que os valores de razões de isótopos são valores relativos e não absolutos, como pressupõe o cálculo do coeficiente de variação. No entanto, o objectivo destes cálculos foi o de ter uma ideia meramente aproximada do valor de CV, dado ser comum, nos testes de homogeneidade para a certificação de materiais de referência, apresentarem-se estes valores. No nosso caso estes valores têm apenas um significado relativo e não absoluto.

As estimativas das incertezas associadas aos CV, calculadas para os lotes intra-unidades, são menores que as estimativas da incerteza associadas aos CV calculadas para os lotes interunidades, como seria de esperar.

Os materiais candidatos a MRC não apresentam falta de homogeneidade.

6.4.3.2 Estabilidade

Os testes de estabilidade realizados nos candidatos a materiais de referência têm como objectivo garantir que os valores certificados são válidos num tempo razoável após término da análise de certificação e servir como base para a recomendação das condições de armazenamento e de transporte.^{5,6}

A amostra de Referência foi mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, que se supõe ser uma temperatura adequada à manutenção da integridade da amostra.

Estabilidade no curto prazo

O estudo de estabilidade no curto prazo pode dar informações acerca das condições de transporte e de armazenamento do MRC. Foram feitos os testes em condições drásticas de degradação: irradiação com luz UV e resistência a choques térmicos.

Estabilidade Acelerada

Irradiação com luz UV. É necessário dispor de informação sobre a possibilidade de reacções de fotólise do futuro MRC, por exposição à luz UV. Os resultados globais relativos a este teste encontram-se nas Tabelas C.1 a C.22 para 2 conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2, Apêndice C. Para melhor visualização das diferenças das razões isotópicas nas diferentes condições do ensaio, subtraiu-se o valor absoluto das razões isotópicas nas condições de referência dos valores absolutos das medidas às diferentes temperaturas do teste para cada amostra, e representou-se graficamente (Figura 6.13).

Observa-se que para qualquer um dos compostos estudados, as diferenças são muito pequenas e variam entre 0,00 e 0,19 ‰, em valor absoluto, pelo que se pode considerar que não há instabilidade nestas condições extremas.

Choques térmicos. Segundo as linhas de orientação do Guia BCR/01/97,⁶ as condições físicas a que estão sujeitos os MRC durante o seu transporte podem ser extremas, com

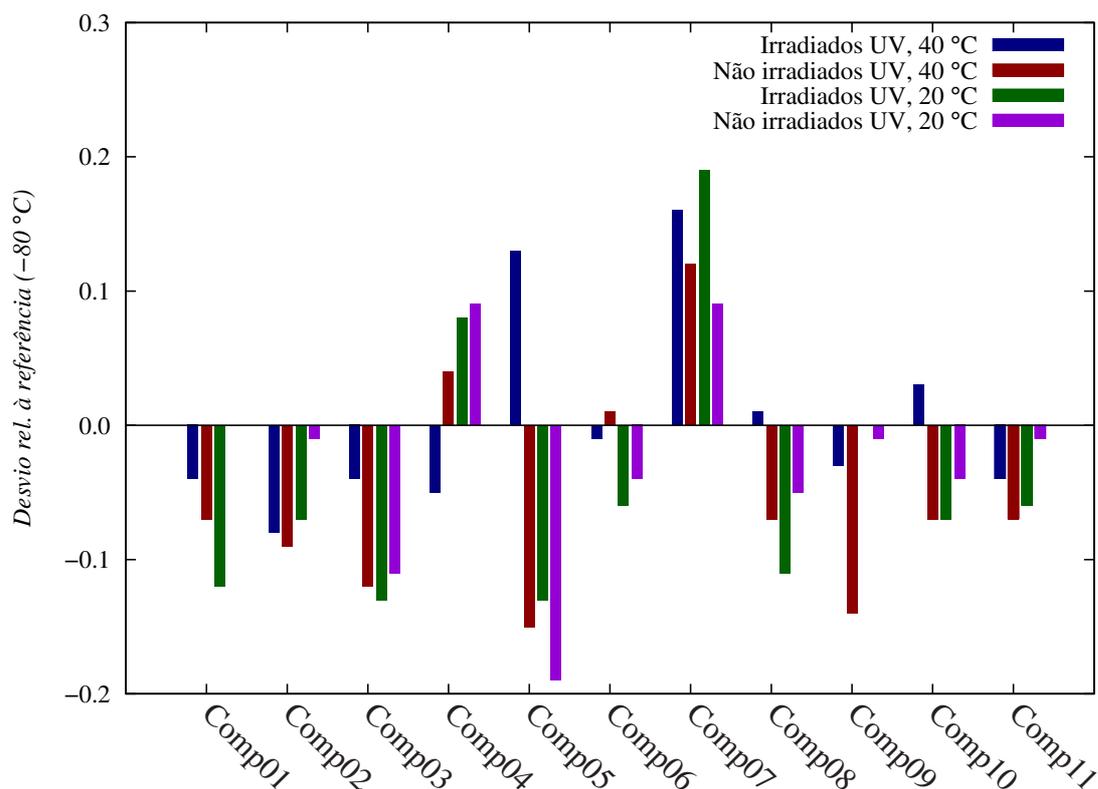


Figura 6.13: Teste de estabilidade no curto prazo por degradação acelerada: irradiação com luz UV.³²⁵ Comp01 - 1-Octanol; Comp02 - 2,6-Dimetilfenol; Comp03 - 2,6-Dimetilanilina; Comp04 - *N,N,3,5*-Tetrametilaniлина; Comp05 - 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo; Comp06 - Dodecano; Comp07 - Decanoato de metilo; Comp08 - Dodecanoato de metilo; Comp09 - 2-(Metilamino)benzoato de metilo; Comp10 - Nonanal; Comp11 - Vanilina.

a possibilidade dos seus contentores serem sujeitos a temperaturas que podem variar de -50 °C a +100 °C, pelo que é necessário conhecer a estabilidade dos compostos em condições mais drásticas, nomeadamente de temperatura.

Os resultados globais relativos a este teste para dois conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2, encontram-se nas Tabelas C.23 a C.44, no Apêndice C. Na Figura 6.14, podem ver-se as diferenças entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ para as amostras sujeitas aos choques térmicos, e o valor de $\delta^{13}\text{C}$ para a amostra de referência que são muito pequenas variando entre 0,01 e 0,42 ‰.

Os maiores desvios foram observados para o dodecanoato de metilo e para a vanilina, 0,42 ‰ e 0,38 ‰ respectivamente. Não foi detectada instabilidade para qualquer dos potenciais MRC pelo período de duas semanas, pelo que se pode concluir que o risco de instabilidade durante o transporte a temperaturas elevadas para, pelo menos duas semanas, é muito limitado.

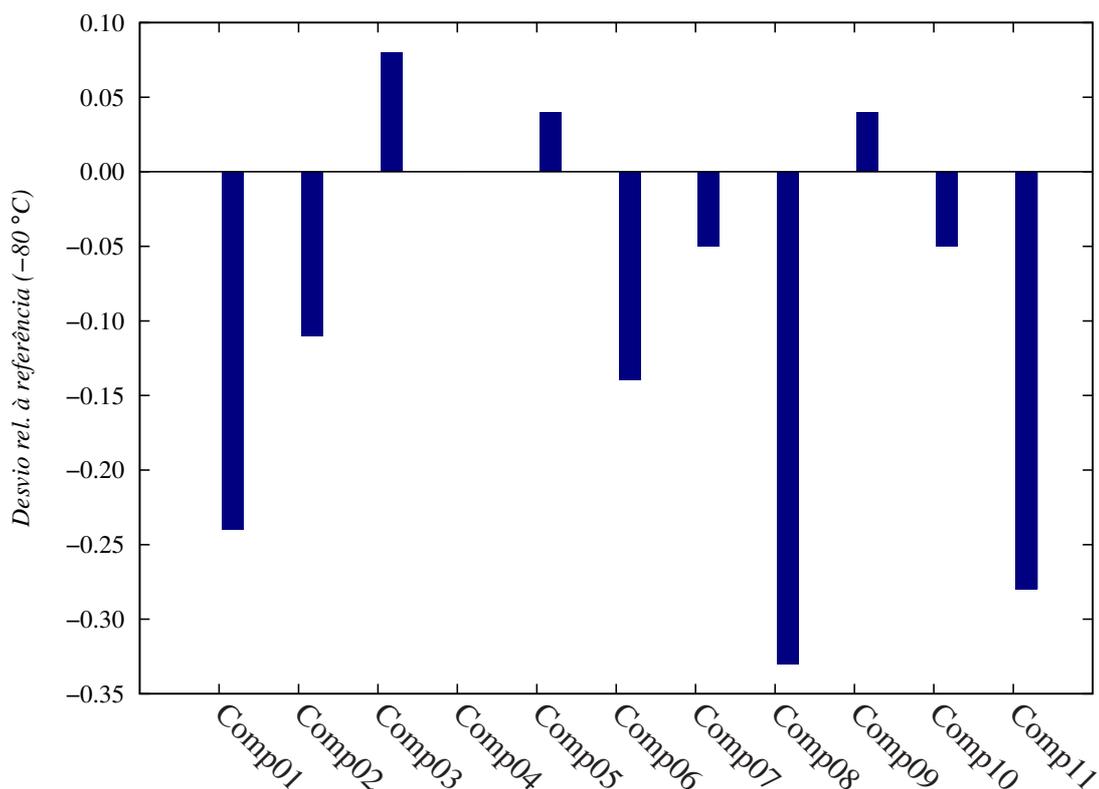


Figura 6.14: Teste de estabilidade no curto prazo, por degradação acelerada: choques térmicos³²⁵. Comp01 – 1-Octanol; Comp02 – 2,6-Dimetilfenol; Comp03 – 2,6-Dimetilanilina; Comp04 – *N,N*,3,5-Tetrametilaniлина; Comp05 – 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo; Comp06 – Dodecano; Comp07 – Decanoato de metilo; Comp08 – Dodecanoato de metilo; Comp09 – 2-(Metilamino)benzoato de metilo; Comp10 – Nonanal; Comp11 – Vanilina.

Estabilidade no longo prazo

O principal objectivo do ensaio de estabilidade no longo prazo é o de fornecer indicações sobre o manuseamento e as condições de armazenamento do MRC.^{5,6}

As Tabelas C.1 a C.22 mostram os resultados relativos ao teste de estabilidade no longo prazo, correspondente a $t = 3$ meses, para dois conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2. As Tabelas C.23 a C.44 mostram os resultados relativos ao teste de estabilidade no longo prazo, correspondente a $t = 6$ meses, para 2 conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2. As Tabelas C.45 a C.66 mostram os resultados relativos ao teste de estabilidade no longo prazo, correspondente a $t = 9$ meses, para 2 conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2. Todos estes resultados podem ser consultados no Apêndice C. As amostras para este ensaio foram mantidas às temperaturas constantes de -20 °C , $+4\text{ °C}$ e $+20\text{ °C}$ nos tempos de $t = 3$, 6 e 9 meses.

Os resultados obtidos para o ensaio de estabilidade no longo prazo, são exprimidos

como os desvios relativos observados, de acordo com a equação^{311,312}

$$R_{\theta} = \frac{X_{\theta}}{X_{-80\text{ }^{\circ}\text{C}}} \quad (6.3)$$

onde R_{θ} é a razão entre o valor médio obtido à temperatura θ (X_{θ}) e o valor médio obtido para a amostra de referência a -80°C ($X_{-80\text{ }^{\circ}\text{C}}$).

O valor da incerteza $U_{R_{\theta}}$, associada a R_{θ} foi calculada a partir da seguinte equação:

$$U_{R_{\theta}} = \frac{R_{\theta}}{100} \times \sqrt{CV_{\theta}^2 + CV_{-80\text{ }^{\circ}\text{C}}^2} \quad (6.4)$$

onde CV_{θ} e $CV_{-80\text{ }^{\circ}\text{C}}$ são os coeficientes de variação de X_{θ} e $X_{-80\text{ }^{\circ}\text{C}}$ respectivamente. Existe instabilidade se R_{θ} for significativamente diferente de 1 e se a gama $R_{\theta} \pm U_{R_{\theta}}$ não incluir o valor 1.³²⁷ Na prática, como seria de esperar, existem alguns desvios à unidade, devido aos erros da medição.

Na Tabela 6.13, estão compilados os valores de R_{θ} e a respectiva incerteza associada aproximada para os 11 compostos estudados.

Observa-se que os valores de R_{θ} são todos muito próximos da unidade como requerido, pelo que os compostos estudados se podem considerar estáveis no tempo estudado. Também as estimativas de $U_{R_{\theta}}$ são muito pequenas variando entre 0,0003‰ e 0,007‰.

O que foi dito em 6.4.3.1 relativamente ao cálculo do CV e de U também se aplica aqui. Trata-se de ter apenas valores aproximados para a estimativa da incerteza do cálculo de R_{θ} .

Para uma melhor visualização destes resultados traçaram-se os gráficos de R_{θ} , com a sua incerteza estimada associada, em função do tempo de ensaio, para cada composto e temperatura, Figuras 6.15 a 6.25.

Tabela 6.13: Teste de estabilidade no longo prazo. Razão das médias às temperaturas de -20°C , $+04^{\circ}\text{C}$ e $+20^{\circ}\text{C}$, relativas aos compostos com uma estimativa de incerteza associada.

Composto	Meses	$R_{-20} \pm U_{-20}$	$R_{+04} \pm U_{+04}$	$R_{+20} \pm U_{+20}$
1-Octanol	3	1,006 \pm 0,004	1,007 \pm 0,003	1,007 \pm 0,002
	6	1,007 \pm 0,006	1,004 \pm 0,004	1,002 \pm 0,004
	9	1,001 \pm 0,002	1,000 \pm 0,003	0,999 \pm 0,002
2,6-Dimetilfenol	3	0,998 \pm 0,003	1,000 \pm 0,002	0,999 \pm 0,001
	6	1,003 \pm 0,005	1,002 \pm 0,002	0,999 \pm 0,003
	9	0,997 \pm 0,003	0,9988 \pm 0,0009	1,000 \pm 0,003
2,6-Dimetilanilina	3	1,0083 \pm 0,0009	1,005 \pm 0,002	1,003 \pm 0,002
	6	0,999 \pm 0,002	0,999 \pm 0,001	1,000 \pm 0,004
	9	1,002 \pm 0,003	1,0012 \pm 0,0006	1,000 \pm 0,002
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilanilina	3	1,002 \pm 0,002	1,002 \pm 0,002	1,0025 \pm 0,0009
	6	1,001 \pm 0,003	1,002 \pm 0,001	1,001 \pm 0,002
	9	1,001 \pm 0,002	1,001 \pm 0,002	1,000 \pm 0,001
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	3	1,007 \pm 0,002	1,006 \pm 0,003	1,001 \pm 0,003
	6	1,001 \pm 0,002	1,001 \pm 0,002	1,001 \pm 0,002
	9	1,000 \pm 0,004	0,999 \pm 0,002	1,002 \pm 0,003
Dodecano	3	1,001 \pm 0,003	1,002 \pm 0,002	1,000 \pm 0,002
	6	1,005 \pm 0,003	1,002 \pm 0,004	0,999 \pm 0,002
	9	0,997 \pm 0,002	0,997 \pm 0,002	0,999 \pm 0,001
Decanoato de metilo	3	0,998 \pm 0,003	0,998 \pm 0,002	1,000 \pm 0,003
	6	1,001 \pm 0,005	1,000 \pm 0,004	1,001 \pm 0,003
	9	1,004 \pm 0,003	1,0035 \pm 0,0008	1,0021 \pm 0,0003
Dodecanoato de metilo	3	1,000 \pm 0,002	1,000 \pm 0,001	0,999 \pm 0,004
	6	1,008 \pm 0,003	1,008 \pm 0,002	1,001 \pm 0,004
	9	1,003 \pm 0,007	1,004 \pm 0,002	1,002 \pm 0,003
2-(Metilamino)benzoato de metilo	3	1,000 \pm 0,002	1,001 \pm 0,003	0,999 \pm 0,002
	6	0,999 \pm 0,002	0,999 \pm 0,001	0,9991 \pm 0,0006
	9	0,997 \pm 0,002	0,999 \pm 0,001	1,0001 \pm 0,0004
Nonanal	3	1,001 \pm 0,002	0,998 \pm 0,004	1,000 \pm 0,003
	6	1,002 \pm 0,004	0,998 \pm 0,002	0,999 \pm 0,002
	9	0,9994 \pm 0,0009	0,999 \pm 0,002	1,000 \pm 0,003
Vanilina	3	0,997 \pm 0,006	0,998 \pm 0,005	0,997 \pm 0,003
	6	1,003 \pm 0,005	1,004 \pm 0,004	1,004 \pm 0,003
	9	1,003 \pm 0,002	1,004 \pm 0,004	0,999 \pm 0,002

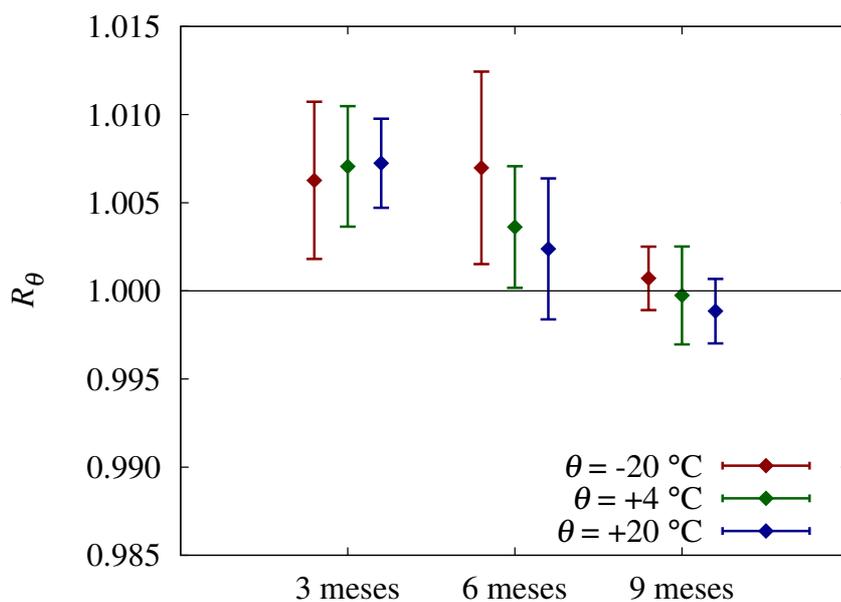


Figura 6.15: Teste de estabilidade no longo prazo: 1-Octanol.

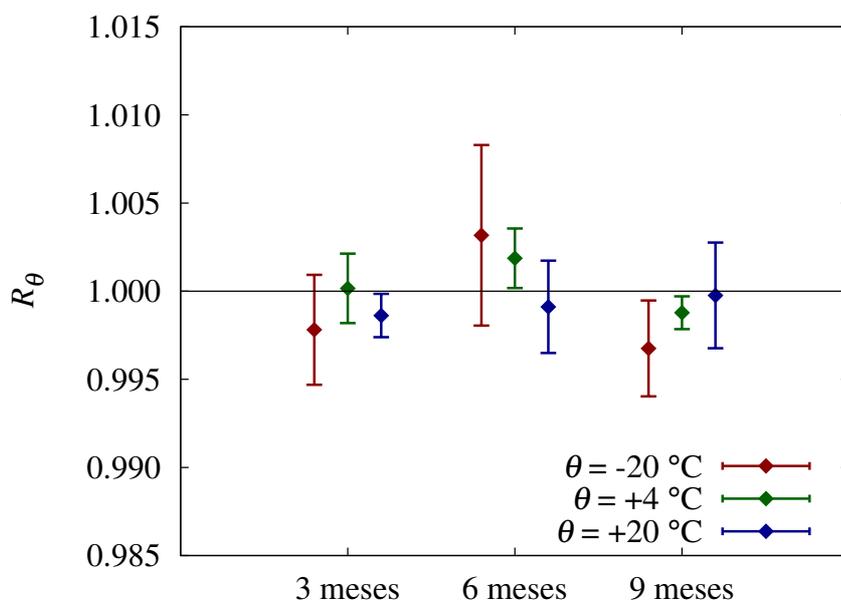


Figura 6.16: Teste de estabilidade no longo prazo: 2,6-Dimetilfenol.

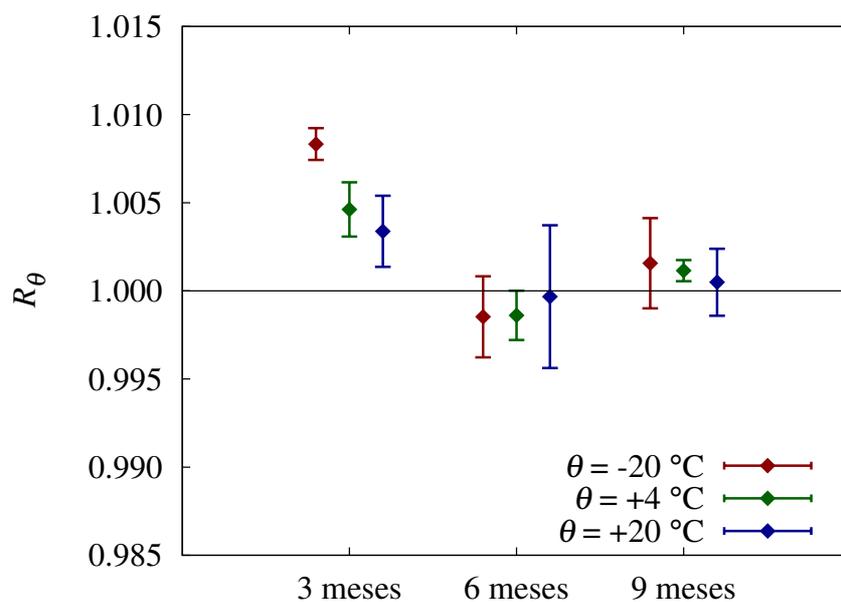


Figura 6.17: Teste de estabilidade no longo prazo: 2,6-Dimetilanilina.

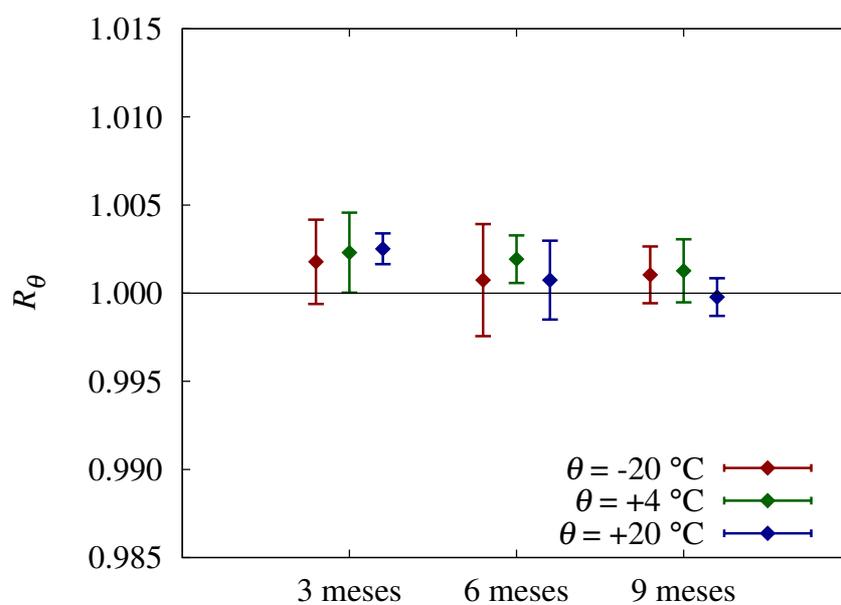


Figura 6.18: Teste de estabilidade no longo prazo: N,N,3,5-Tetrametilnilina.

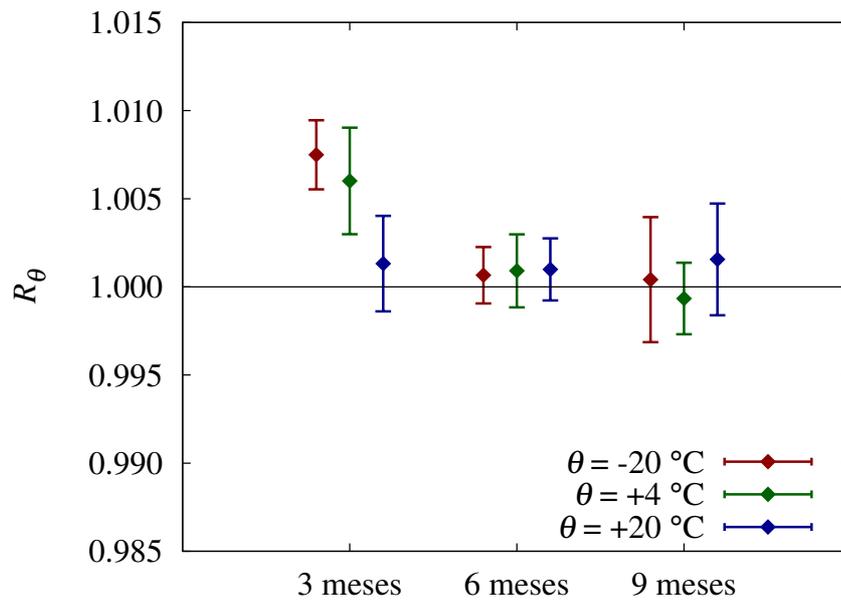


Figura 6.19: Teste de estabilidade no longo prazo: 4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo.

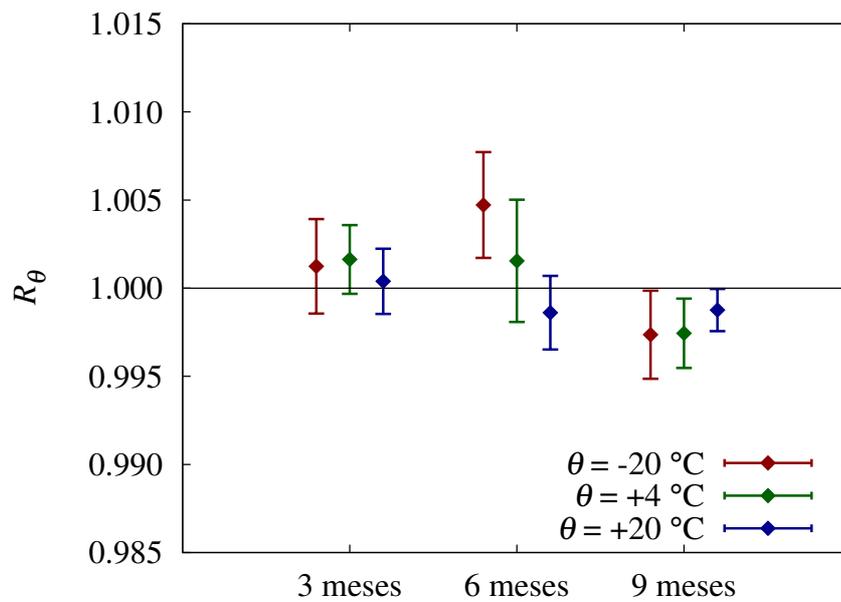


Figura 6.20: Teste de estabilidade no longo prazo: Dodecano.

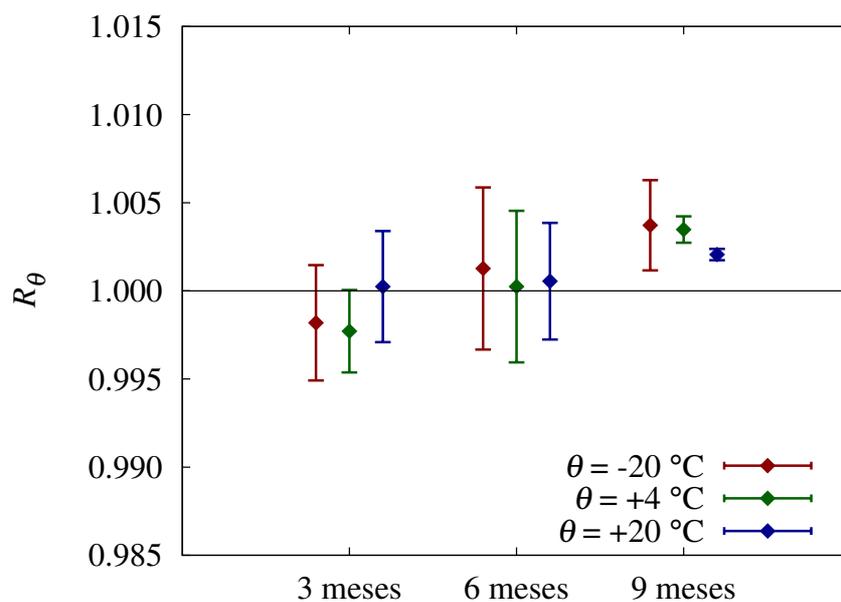


Figura 6.21: Teste de estabilidade no longo prazo: Decanoato de metilo.

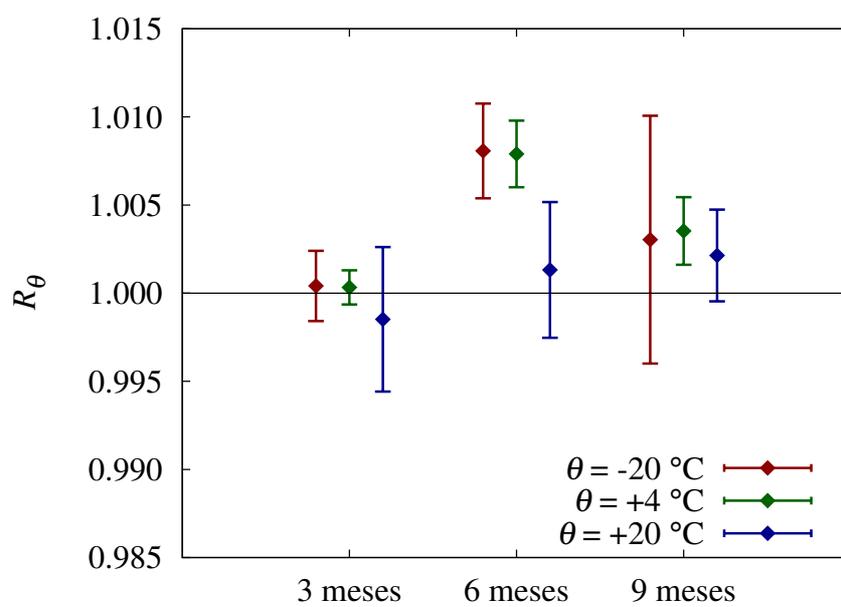


Figura 6.22: Teste de estabilidade no longo prazo: Dodecanoato de metilo.

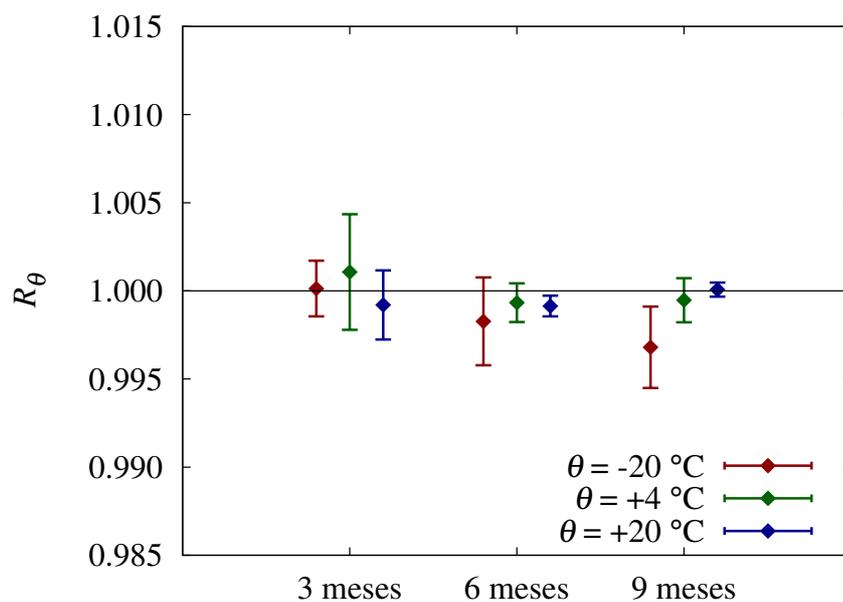


Figura 6.23: Teste de estabilidade no longo prazo: 2-(Metilamino)benzoato de metilo.

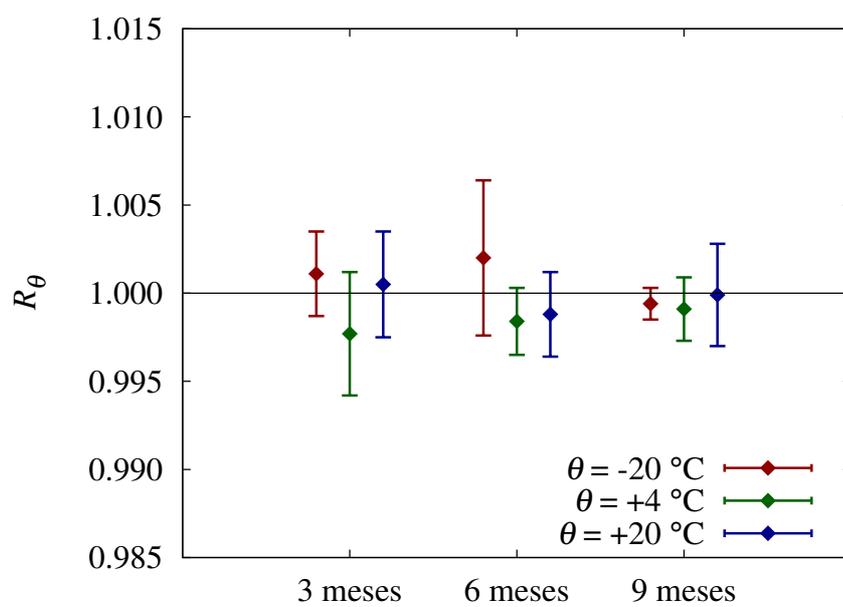


Figura 6.24: Teste de estabilidade no longo prazo: Nonanal.

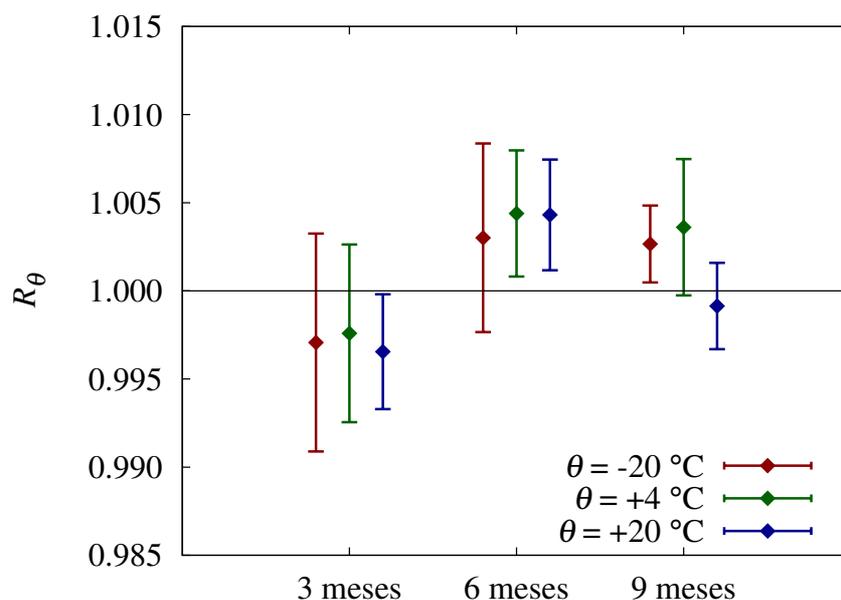


Figura 6.25: Teste de estabilidade no longo prazo: Vanilina.

Verifica-se que, para todos os compostos, excepto para o nonanal, existem situações de não sobreposição com a recta $y = 1$. No entanto, essas situações não deverão estar relacionadas com a instabilidade do composto em causa, caso contrário seria de esperar que a instabilidade se verificasse para as temperaturas mais altas, nomeadamente a $+20^\circ\text{C}$, pois essa seria a temperatura mais provável para fenómenos de degradação ou de evaporação. Além disso, apesar de não haver sobreposição, estes valores estão muito próximos da unidade. Parece mais provável que seja um problema inerente às unidades em questão.

Salienta-se ainda que, frequentemente, as amostras no tempo t não foram logo analisadas, dependendo de problemas instrumentais ou da disponibilidade dos equipamentos. Não será por acaso que as amostras correspondentes a $t = 3$ meses sejam as que apresentam maiores desvios pois estas amostras foram analisadas mais tarde.

É importante referir também, que o protocolo experimental da estabilidade no longo prazo usado neste trabalho, não foi o isócrono mas sim o clássico. Num estudo isócrono, o estudo da estabilidade no longo prazo é planeado por forma a que as amostras sejam todas analisadas ao mesmo tempo, ou seja, no final do teste.²⁸⁹

Segundo as orientações fornecidas nos BCR,^{5,6} as conclusões a retirar do teste de monitorização no longo prazo e a temperaturas diferentes são as seguintes:

- se ocorrerem pequenas variações nos materiais à temperatura de congelação, o material candidato a MR não deverá ser considerado,
- se ocorrerem pequenas variações nos materiais à temperatura de refrigeração (frigorífico) e significativas alterações à temperatura ambiente, o material necessitará de ser

armazenado em congelador e, provavelmente, transportado em condições de refrigeração,

- se não ocorrerem alterações dos materiais em qualquer das condições o material será considerado estável durante o seu tempo de armazenamento (“shelf life”).

Uma vez que nenhum dos compostos apresentava instabilidade nos tempos e temperaturas estudados, eles foram considerados estáveis não requerendo condições especiais de transporte ou armazenamento.

6.5 Exercício de Certificação Simulado (ECS)

Após optimização das condições cromatográficas e do estudo de interferentes foi seleccionada uma mistura final a ser analisada por GC/IRMS durante o Ensaio de Certificação Simulado, constituída por sete dos onze compostos estudados nomeadamente, 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, *N,N*,3,5-tetrametilnilina, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo e 2-(metilamino)benzoato de metilo e, ainda duas amostras de vanilina designadas por A e B, estas últimas apenas analisadas puras.

Neste exercício foram analisados os onze compostos por EA/IRMS, e a mistura de sete compostos e duas amostras de vanilina por GC/C/IRMS.

Inicialmente, o objectivo do ECS era obter um conjunto de resultados satisfatório e coerente entre os laboratórios, que pudessem originar valores de consenso para a futura certificação da mistura do tipo Grob para a técnica de GC/IRMS. Contudo, procurou-se ir um pouco mais longe e a obtenção de valores dos onze compostos puros, como futuros candidatos a MRC, para a técnica de EA/IRMS, passou a fazer parte dos objectivos do Exercício de Certificação Simulado. Este exercício foi planeado conforme o Protocolo Internacional de Harmonização.^{258,299}

Dos 64 laboratórios convidados apenas pouco mais de uma dezena (13, 14 ou 15, dependendo do composto) enviaram resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (Apêndice G). No Apêndice D, encontram-se algumas breves notas explicativas acerca dos testes estatísticos utilizados. O INETI é designado neste exercício pela sigla L₁₅. Por uma questão de simplificação utilizou-se por vezes a abreviatura Lab para designar laboratório.

6.5.1 Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por EA/IRMS. ECS

Neste ponto apresenta-se e discute-se os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ correspondentes ao ECS obtidos pela técnica de EA/IRMS, os quais estão compilados nas Tabelas G.2 a G.12 no Apêndice G. Para uma melhor visualização da dispersão dos resultados, representou-se graficamente, para cada composto, a média dos valores obtidos em cada laboratório, com o respectivo intervalo de confiança, IC, tendo como limites $\pm 2s$, Figuras 6.26 a 6.36.

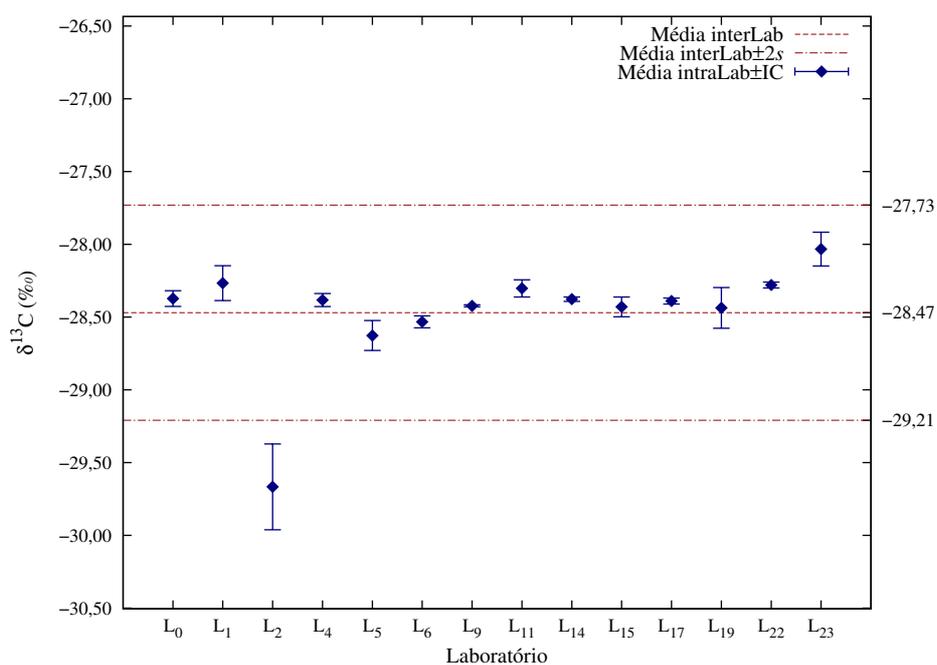


Figura 6.26: 1-Octanol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA/IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

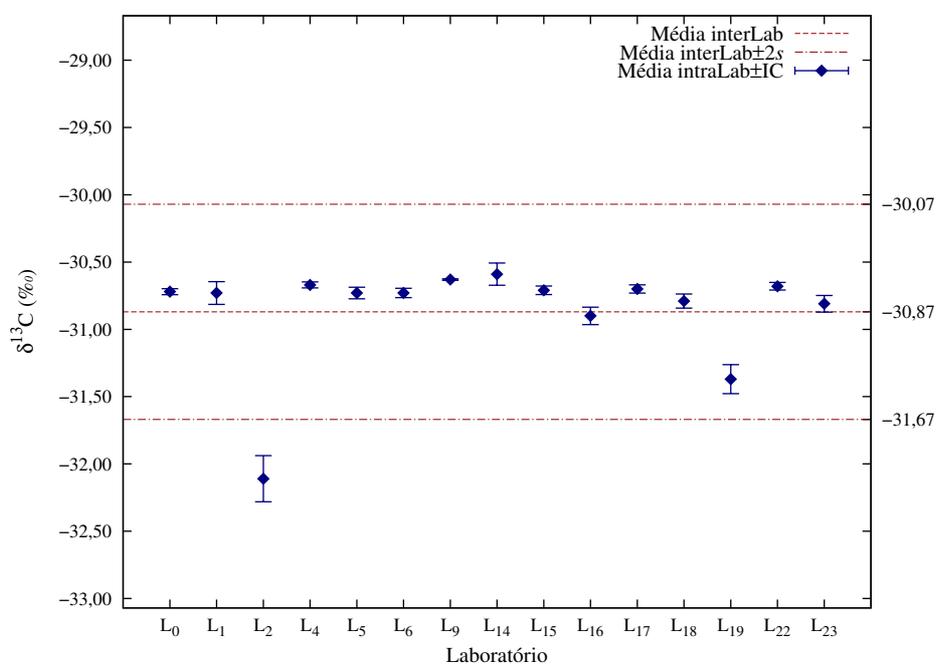


Figura 6.27: 2,6-Dimetilfenol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

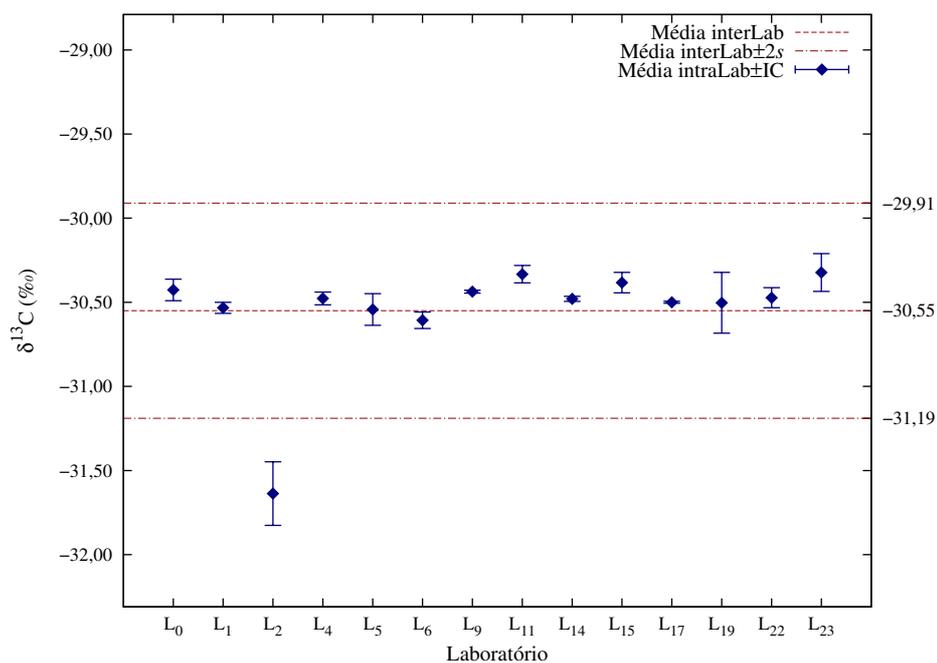


Figura 6.28: 2,6-Dimetilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

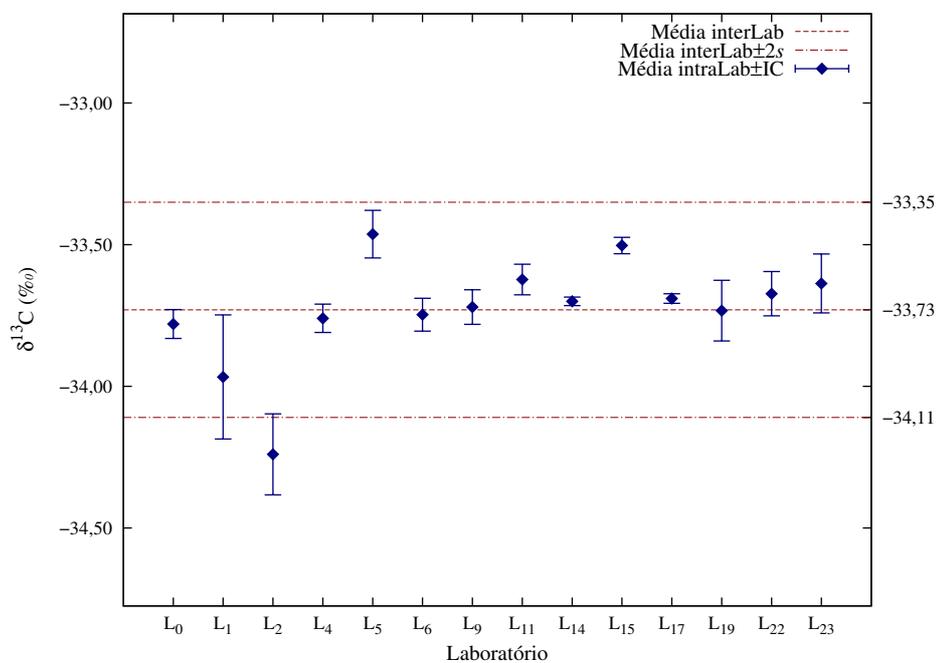


Figura 6.29: *N,N,3,5*-Tetrametilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

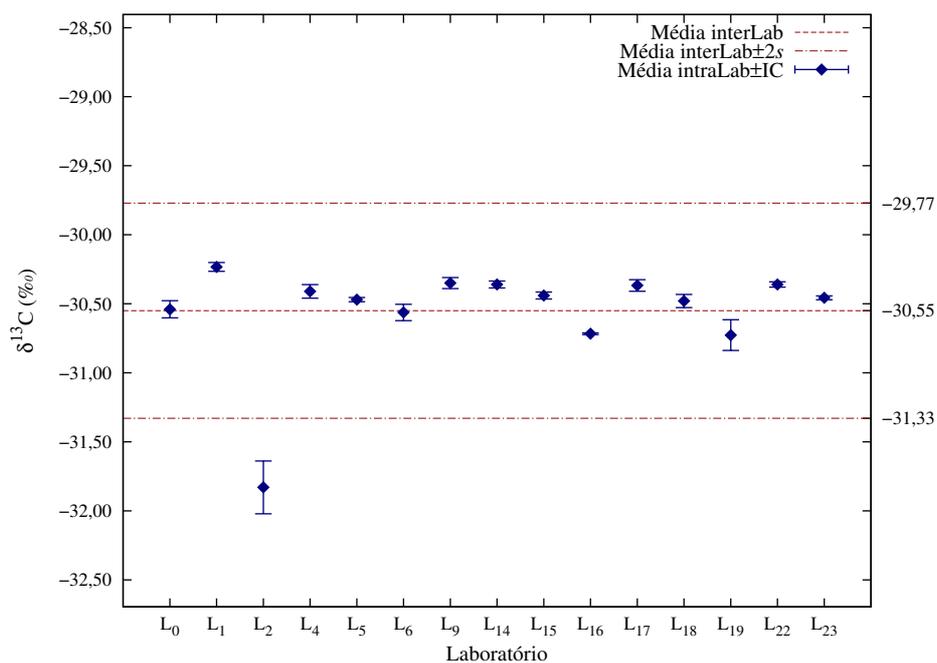


Figura 6.30: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

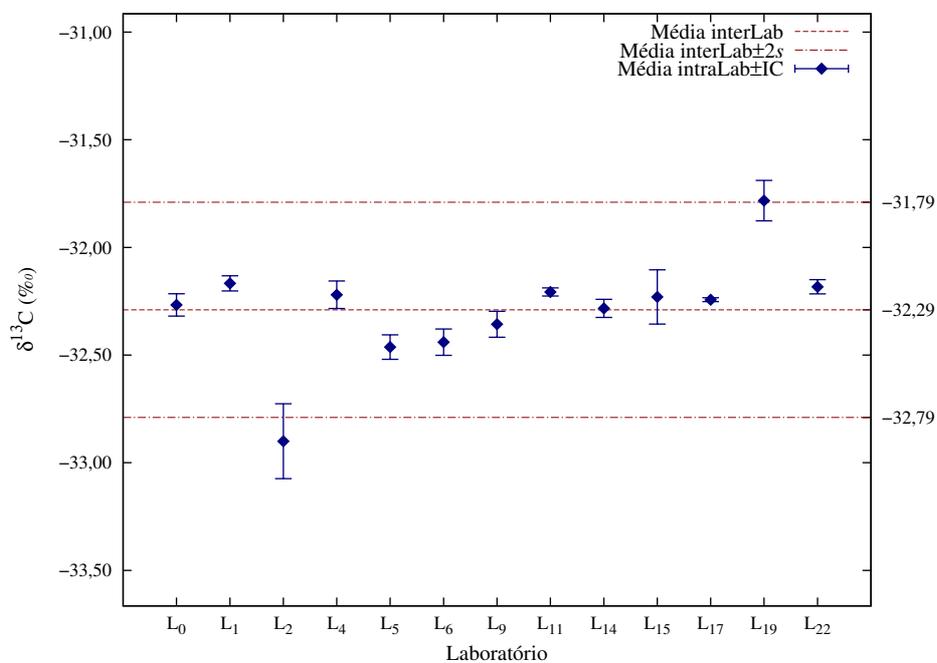


Figura 6.31: Dodecano. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

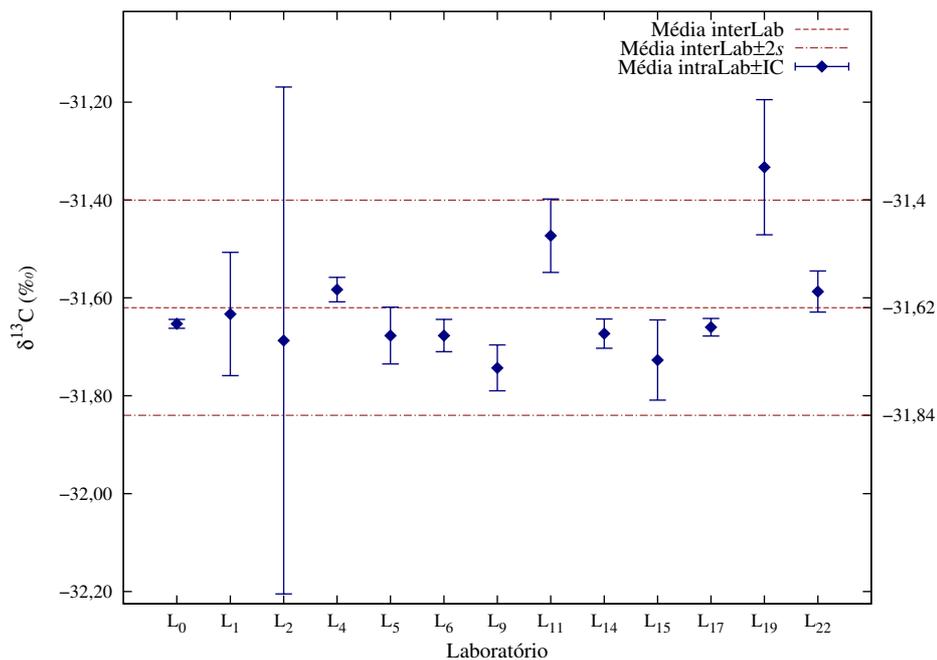


Figura 6.32: Decanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

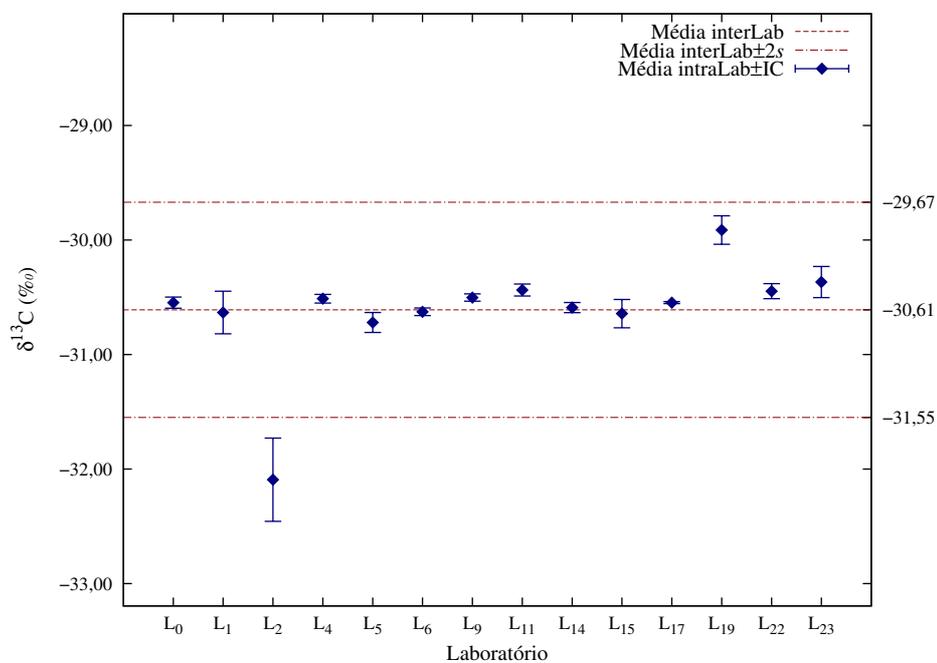


Figura 6.33: Dodecanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

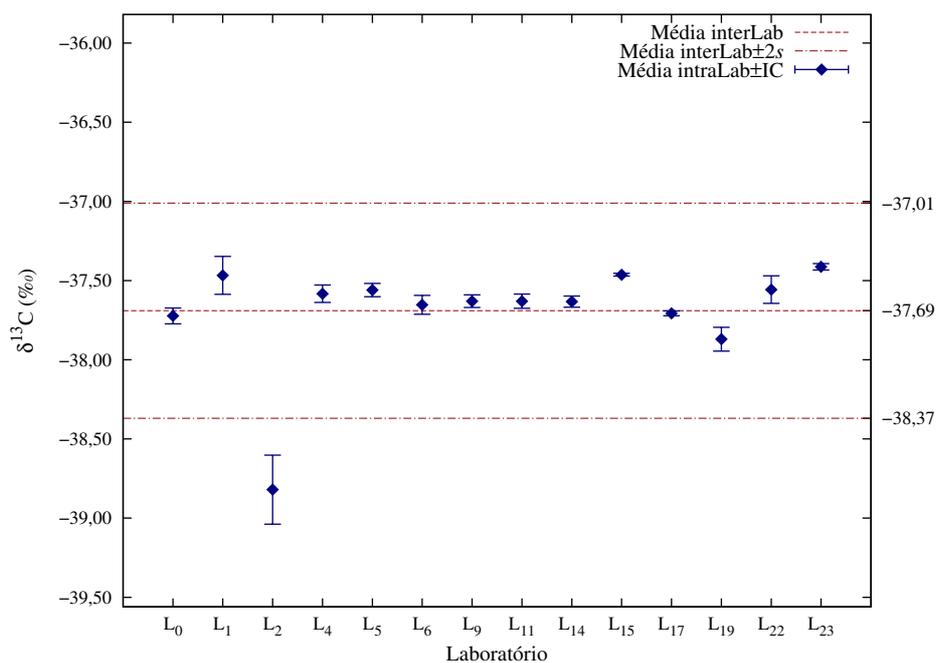


Figura 6.34: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

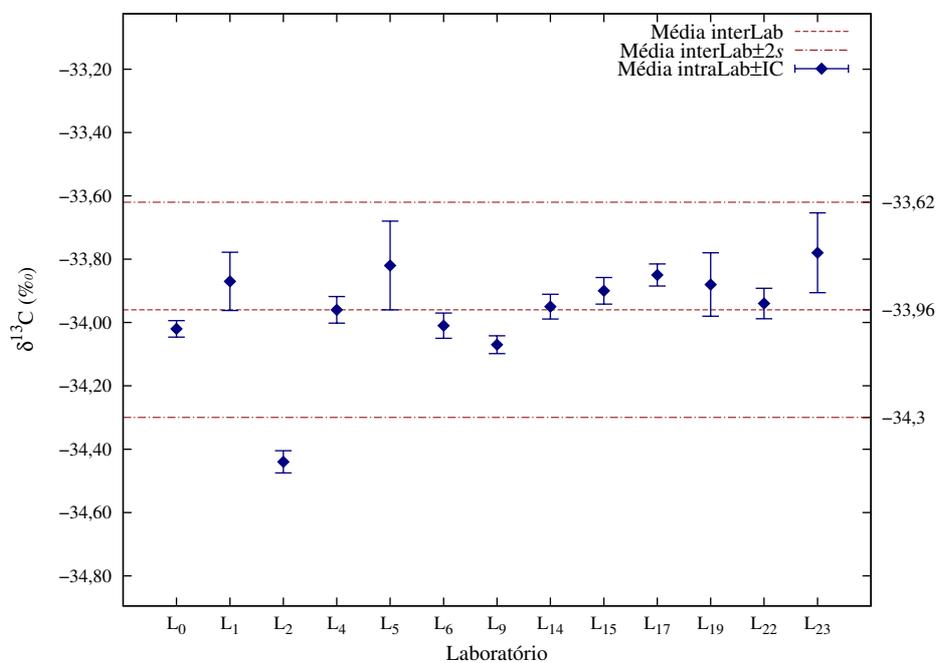


Figura 6.35: Nonanal. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

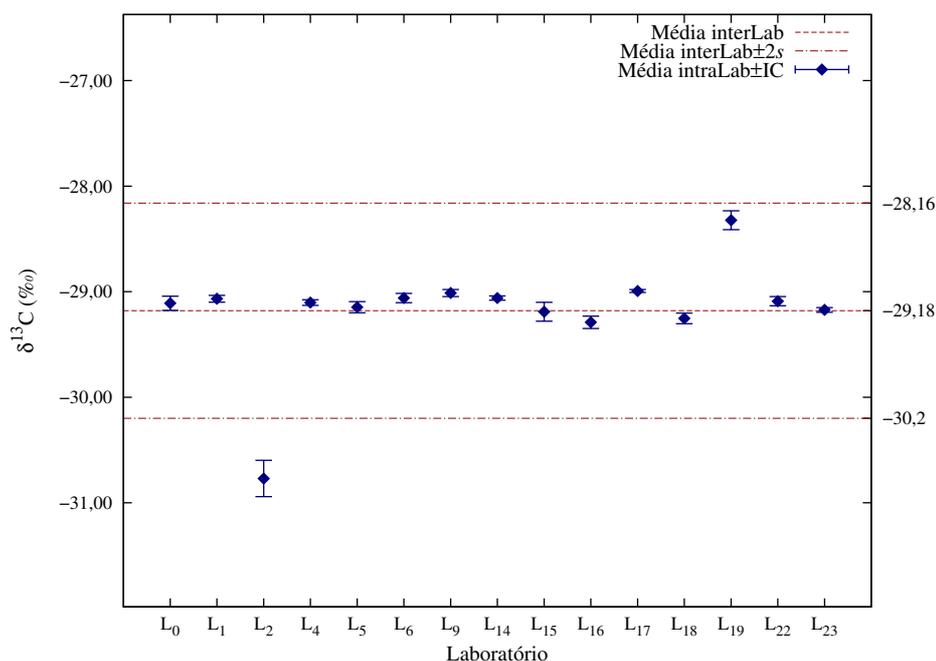


Figura 6.36: Vanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com IC associado relativo ao ECS (EA-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm 2s$.

Pela análise dos gráficos é visível o bom desempenho do INETI. A repetibilidade do laboratório L₂ é sempre maior que o desvio padrão da reprodutibilidade, 0,25 ‰,¹⁶⁶ pelo que aquele foi excluído antes de se ter procedido aos cálculos estatísticos para se obterem os resultados finais.

Na Tabela 6.14 estão compilados os resultados finais tratados estatisticamente para os onze compostos puros, após escrutínio e eliminação de laboratórios com valores médios aberrantes.

Para os compostos nonanal e *N,N*,3,5-tetrametilnilina é possível a combinação de dados, o que significa que os resultados pertencem à mesma população. Para os compostos dodecanoato de metilo, 2,6-dimetilfenol e vanilina, o laboratório L₁₉ é detectado como aberrante pelos testes de Dixon, Nalimov, Grubbs Simples e Grubbs Duplo, para 95 e 99 % de n.c.. No entanto, ao remover-se L₁₉ os desvios padrão para aqueles compostos ficariam reduzidos a 0,10 ‰, 0,08 ‰ e 0,09 ‰ respectivamente.

Tabela 6.14: Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) resultantes do ECS obtidos por EA/IRMS.

Composto	1-Octanol	2,6-Dimetilfenol	2,6-Dimetilantilina	N,N',3,5-Tetra-metilantilina	4-(N'-Dimetilamino)benzolato de etilo	Dodecano	Decanoato de metilo	Dodecanoato de metilo	2-(Metilamino)benzolato de metilo	Nonanal	Vanilina
Nº de Laboratórios aceites	13	14	13	13	14	12	12	13	13	12	14
Nº amostras analisadas	39	42	39	39	42	36	36	39	39	36	42
Teste múltiplo de Scheffe	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Testes para Detecção de Valores Aberrantes das Médias dos Laboratórios											
Teste de Dixon	95 % L5	L19	Não	Não	Não	L19	L19	L19	Não	Não	L19
	99 %	L19	Não	Não	Não	Não	L19	L19	Não	Não	L19
Teste Nalimov	95 % L23	L19	Não	L1	L19	L19	L19	L19	L19	Não	L19
	99 % L23	L19	Não	Não	Não	L19	L19	L19	Não	Não	L19
Teste Grubbs (Simples)	95 % L23(S) ^(a)	L19	Não	Não	Não	L19	L19	L19	Não	Não	L19
	99 %	L19	Não	Não	Não	L19	Não	L19	Não	Não	L19
Teste Grubbs (Duplo)	95 % L23	L19	Não	Não	Não	L19	L19	L19	Não	Não	L19
	99 %	L19	Não	Não	Não	L19	Não	L19	Não	Não	L19
Testes de Variâncias											
Teste de Cochran	95 % Não	Não	L19	L1	L19	Não	Não	Não	Não	Não	Não
(Detecção aberrantes)	99 %	Não	Não	L1	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Teste de Bartlett	95 % Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
(Homogeneidade de variâncias)	99 % Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ANOVA unifactorial	$s_{\text{inter}}^{(b)}$ 0,12	0,18	0,03	0,09	0,13	0,16	0,09	0,18	0,11	0,05	0,22
	$s_{\text{intra}}^{(c)}$ 0,13	0,10	0,13	0,15	0,08	0,10	0,11	0,16	0,10	0,12	0,09
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	95 % Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
	99 % Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

Continua página seguinte...

(a) – S – Suspeito.

(b) – s_{inter} – Desvio padrão interlaboratórios.

(c) – s_{intra} – Desvio padrão intralaboratórios.

(d) – NP – Não permitido. Os cálculos das diferenças intralaboratoriais pelo teste-F, não são válidos porque só há uma amostra (analisada em triplicado).

Tabela 6.14 – Continuação

Composto	1-Octanol	2,6-Dimetilfenol	2,6-Dimetilantilina	N,N,3,5-Tetrametilantilina	4-(N,N-Dimetilamino)benzato de etilo	Dodecano	Decanoato de metilo	Dodecanoato de metilo	2-(Metilamino)benzato de metilo	Nonanal	Vanilina
Teste F-Snedecor intralaboratórios	95 % NP ^(d)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
(ANOVA dupla hierárquica)	99 % NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Possibilidade para agrupar dados	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Normalidade da Distribuição das médias dos Laboratórios											
Teste Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors	95 % Normal	Não Norm.	Normal	Normal	Normal	Não Norm.	Normal	Normal	Normal	Normal	Não Norm.
Testes de Skewness e Kurtosis	99 % Normal	Não Norm.	Normal	Normal	Normal	Não Norm.	Normal	Normal	Normal	Normal	Não Norm.
Média dos Laboratórios (% _c)	-28,37	-30,77	-30,46	-33,69	-30,46	-32,24	-31,62	-30,50	-37,61	-33,92	-29,06
s Laboratórios	0,14	0,19	0,08	0,13	0,14	0,17	0,11	0,20	0,12	0,09	0,23
Semi-amplitude do IC a 95 %	0,09	0,11	0,05	0,08	0,08	0,11	0,07	0,12	0,07	0,05	0,13
Semi-amplitude do IT a 95 %	0,44	0,57	0,25	0,39	0,42	0,54	0,36	0,62	0,38	0,27	0,69

(a) – S – Suspeito.

(b) – s_{inter} – Desvio padrão interlaboratórios.(c) – s_{intra} – Desvio padrão intralaboratórios.

(d) – NP – Não permitido. Os cálculos das diferenças intralaboratoriais pelo teste-F, não são válidos porque só há uma amostra (analisada em triplicado).

Após reanálise dos resultados daquele laboratório, não foram encontradas quaisquer razões técnicas para a sua eliminação, pelo que não se removeu o laboratório L₁₉ dos cálculos estatísticos. A reforçar esta decisão está também o facto de que o desvio padrão viria mais baixo que 0,1 ‰, que é um valor muito baixo, e provavelmente, não reflectiria a gama verdadeira de valores que podem ser encontrados quando participam mais laboratórios em exercícios de certificação reais, onde são utilizados equipamentos de marcas diferentes (no caso do L₁₉ o espectrómetro de massa de razões isotópicas tinha mais de 10 anos sendo, portanto, mais propício para apresentar deriva.

A gama de valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados para os onze compostos varia entre -28,37 ‰ para o 1-octanol e -37,61 ‰ para o 2-(metilamino)benzoato de metilo. Esta gama de valores de $\delta^{13}\text{C}$ para materiais de referência poderá ser muito útil para a calibração de uma grande variedade de produtos na área da autenticidade alimentar, contrafacção de fármacos, etc...

Verificou-se ainda, que os valores dos desvios padrão são pequenos, variando entre 0,08 e 0,23 ‰, o que mais uma vez vem confirmar a robustez da técnica de EA/IRMS.

Apesar de haver compostos em que é possível agrupar os dados, optou-se por não o fazer, pois esta opção tem menos significado real, dado haver diferenças nos procedimentos/equipamentos usados pelos laboratórios, e a opção 'sem agrupamento' conduziria a maiores valores de incerteza. Salienta-se que esta estimativa dos testes F e de Bartlett são meramente indicativos, cabendo a decisão final de eliminação de laboratórios, ao produtor de MRC.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ resultantes do ECS são muito próximos dos anteriormente calculados no Ensaio Circular (Tabela 6.6). O valor para o nonanal no ECS (-33,92 ‰) é significativamente mais negativo que o valor obtido anteriormente (-30,84 ‰) pelo que só se pode inferir que, ou houve troca com outro composto, ou então, pertencia a um lote diferente do analisado no Ensaio Circular.

Os valores da semi-amplitude do IC de 95 % consideram-se como sendo a estimativa da incerteza para cada composto, de acordo com a literatura.^{5,259,276}

6.5.2 Determinação de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS. ECS

Este estudo teve como finalidade verificar a viabilidade da mistura dos sete compostos seleccionados, para calibração da técnica de GC/IRMS e, estabelecer valores de desempenho, nomeadamente de repetibilidade e de reprodutibilidade, comparativamente aos valores de 'Referência' obtidos por EA/IRMS no Exercício de Certificação Simulado.

A mistura analisada era constituída por 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, *N,N*,3,5-tetrametil-anilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo e 2-(metilamino)benzoato de metilo.

A vanilina foi também introduzida neste estudo pois, como já mencionado, havia muito

interesse no seu estudo como futuro MRC para a área da autenticidade alimentar.

Relativamente a estudos de estabilidade e de homogeneidade da mistura consideram-se os estudos anteriores feitos com os compostos puros. No entanto, só para se ter uma ideia da estabilidade da mistura, foi realizado um curto teste de estabilidade da mistura para ^2H , durante 3 semanas (estudo feito pelo laboratório E). Os resultados mostraram que a mistura não apresentou instabilidade nesse período.

Dos laboratórios convidados, apenas onze enviaram resultados de $\delta^{13}\text{C}$. Estes encontram-se compilados nas Tabelas G.13 a G.20 e podem ser consultados no Apêndice G. As Figuras 6.37 a 6.43 correspondem à representação gráfica dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para cada composto e para cada laboratório.

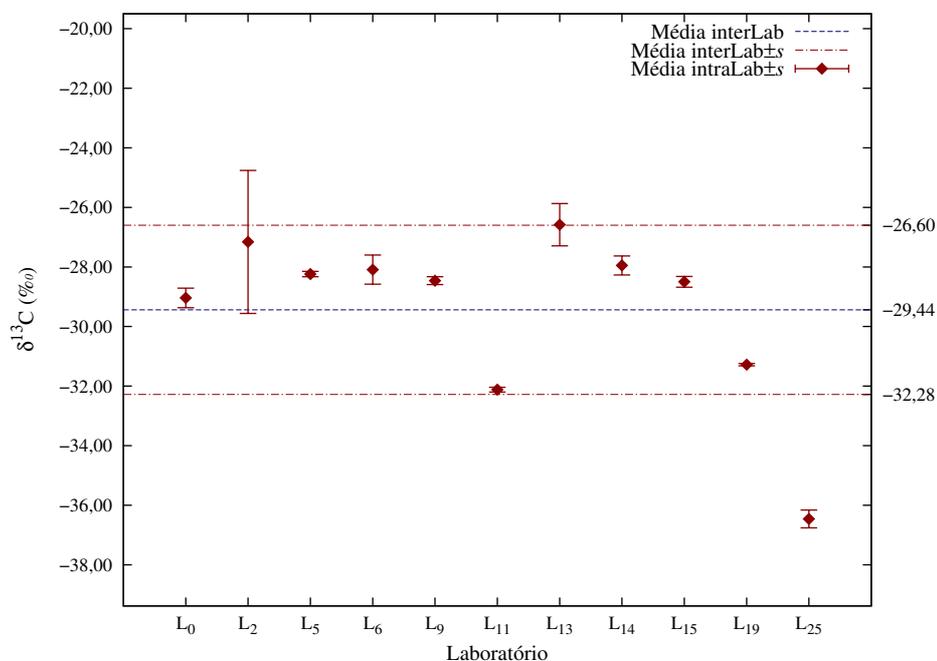


Figura 6.37: 1-Octanol. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

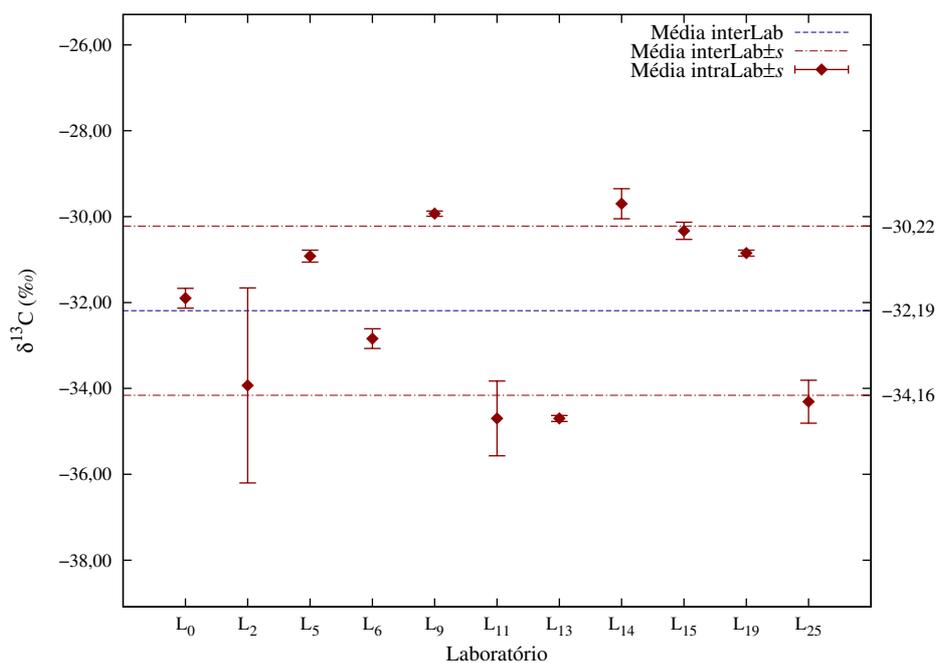


Figura 6.38: 2,6-Dimetilanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

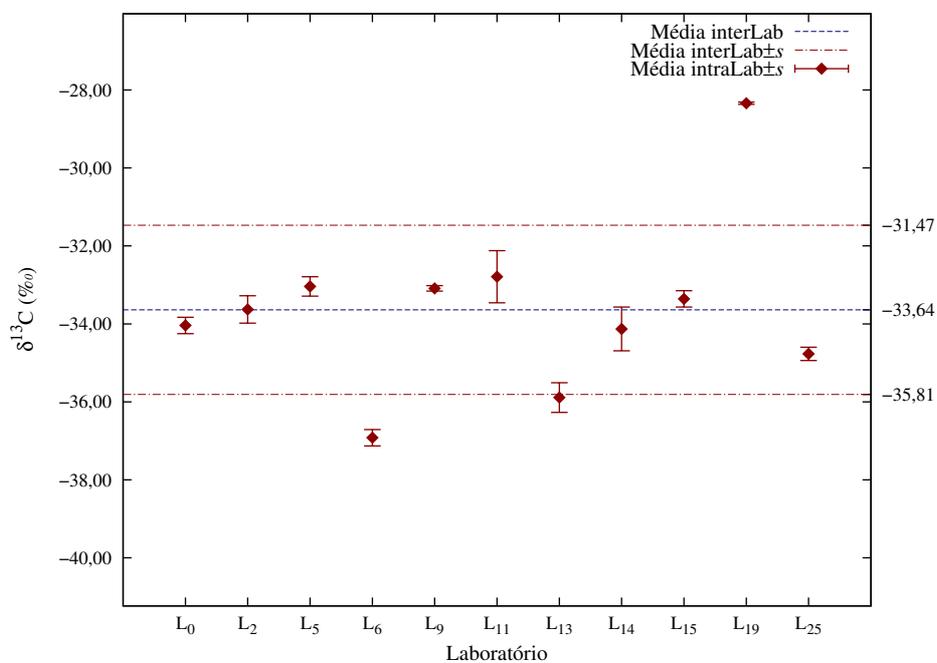


Figura 6.39: N,N,3,5-Tetrametilnilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

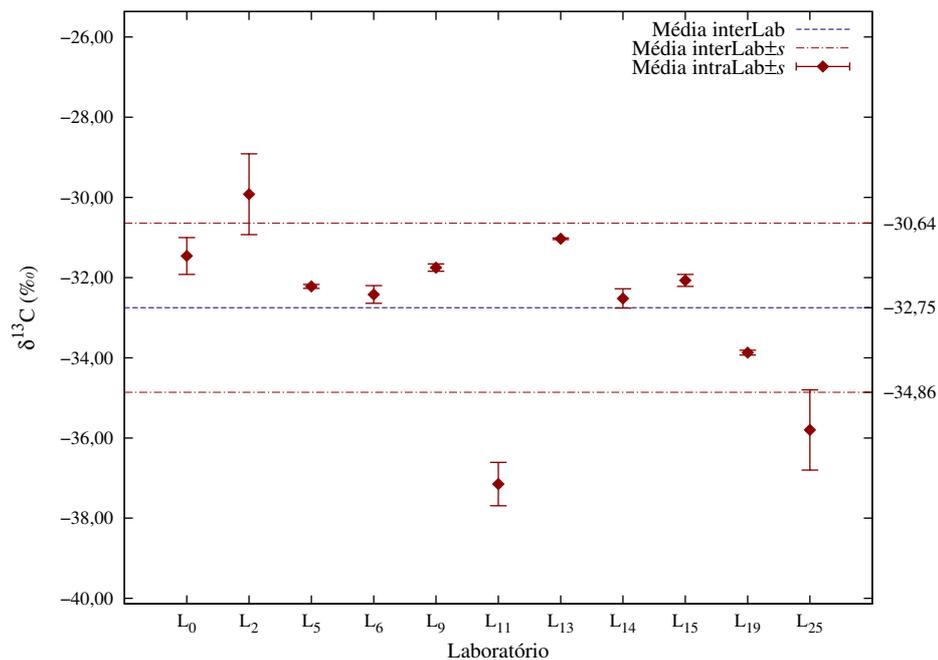


Figura 6.40: Dodecano. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

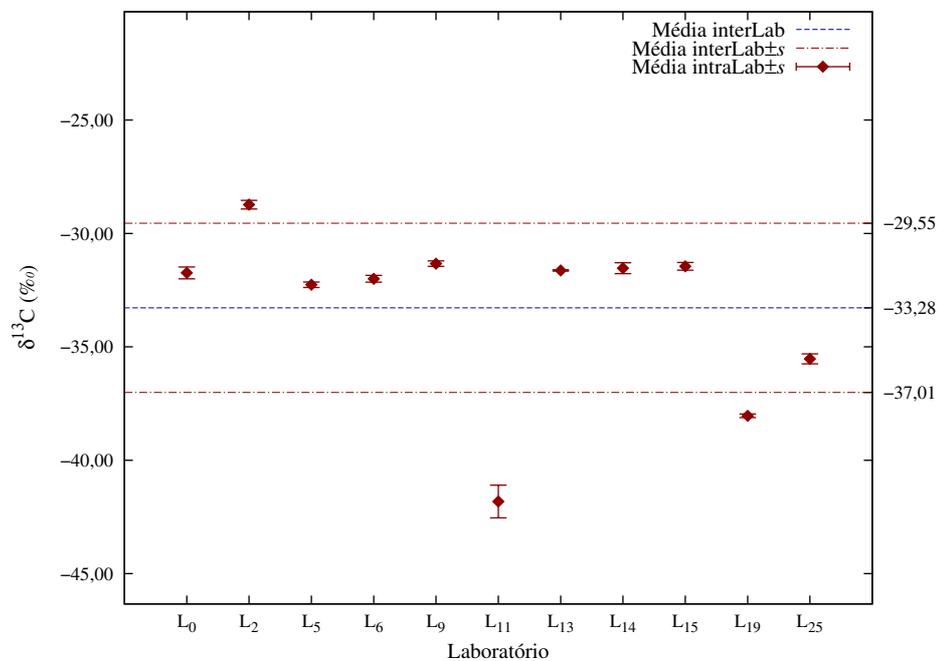


Figura 6.41: Decanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

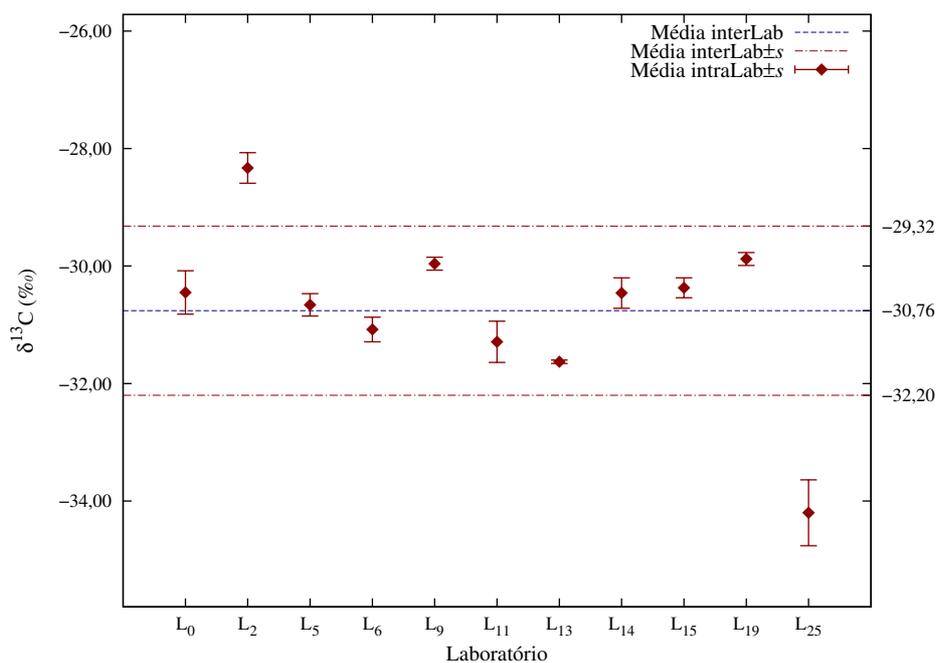


Figura 6.42: Dodecanoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

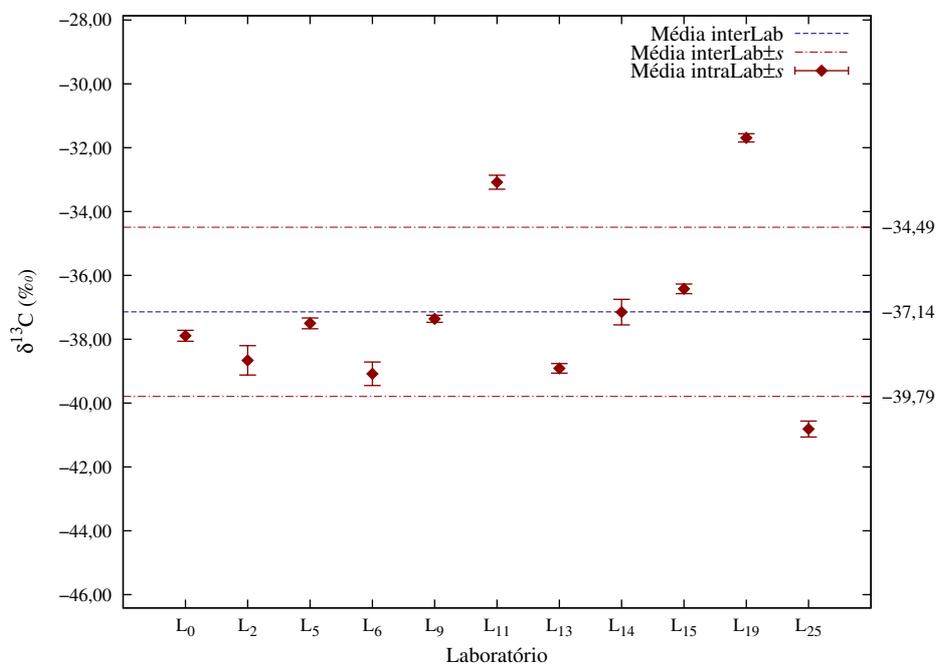


Figura 6.43: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

6.6 Tabelas z -score

Tal como foi dito, o principal propósito deste ensaio interlaboratorial foi obter valores de consenso para os compostos da mistura e comparar os resultados de GC/IRMS com os valores tomados como referência obtidos por EA/IRMS. Uma maneira prática de o fazer é através do cálculo de z -scores, um parâmetro que é usado nos ensaios de proficiência, e que permite ainda avaliar a dispersão global de todos os resultados. O uso de z -scores para avaliar um resultado é muito informativo e mostra de uma forma imediata, o resultado de um laboratório relativamente ao valor alvo. É uma maneira muito prática de avaliar a exactidão de um laboratório relativamente a determinações específicas. No Apêndice H encontram-se as Tabelas H.1 e H.2 com os valores calculados de z -score 1 e z -score 2, que resultaram do Exercício de Certificação Simulado.

A expressão para o cálculo de z -score é a seguinte:²⁵⁸

$$z = \frac{(x - \hat{X})}{\sigma} \quad (6.5)$$

onde x é o resultado do laboratório, \hat{X} é o valor alvo e representa a média das médias dos laboratórios (após escrutínio e remoção de valores aberrantes), e σ é o desvio padrão da média das médias de todos os laboratórios. Os valores de z -score podem ser considerados como um indicador da exactidão dos resultados resultantes das comparações interlaboratoriais.

Segundo a literatura,²⁵⁸ os critérios pré-estabelecidos para o z -score são, em módulo:

$z \leq 2$, Resultados satisfatórios.

$2 < z < 3$, Resultados questionáveis.

$z \geq 3$, Resultados insatisfatórios, o laboratório é eliminado.

6.6.1 z -score 1

Primeiro calculou-se o z -score 1, que compara o valor obtido por cada laboratório, para cada composto, com a média do conjunto de resultados dos laboratórios (só resultados de GC/IRMS) tendo em conta a sua dispersão global (desvio padrão das médias dos laboratórios). Estes valores de z -score 1 permitem avaliar o desempenho de cada Lab relativamente a todos os laboratórios (Figuras 6.44 e 6.45).

Observa-se que as médias de todos os laboratórios apresentam valores de z -score 1 menor que 3, pelo que não há resultados insatisfatórios. Os laboratórios L₁₁, L₁₉ e L₂₅ apresentam $2 < z < 3$ para alguns compostos e este último apresenta sempre valores de z -score negativos, o que poderá indicar a presença de um erro sistemático.

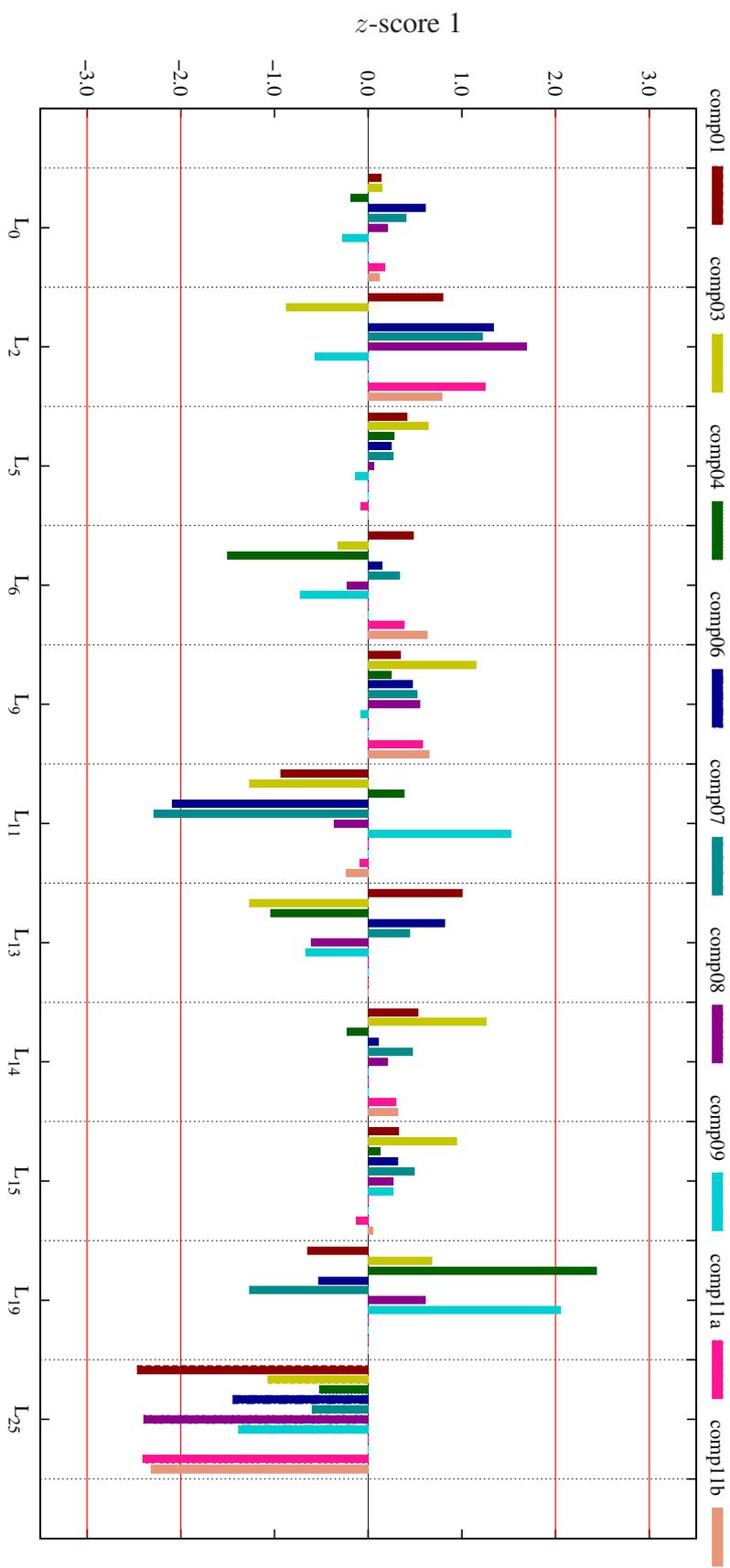


Figura 6.44: z-score 1 para todos os laboratórios (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS). Comp01 - 1-Octanol; Comp03 - 2,6-Dimetilanilina; Comp04 - N,N,3,5-Tetrametanilina; Comp06 - Dodecano; Comp07 - Decanoato de metilo; Comp08 - Dodecanoato de metilo; Comp09 - 2-(Metilamino)benzoato de metilo; Comp11 - Vanilina.

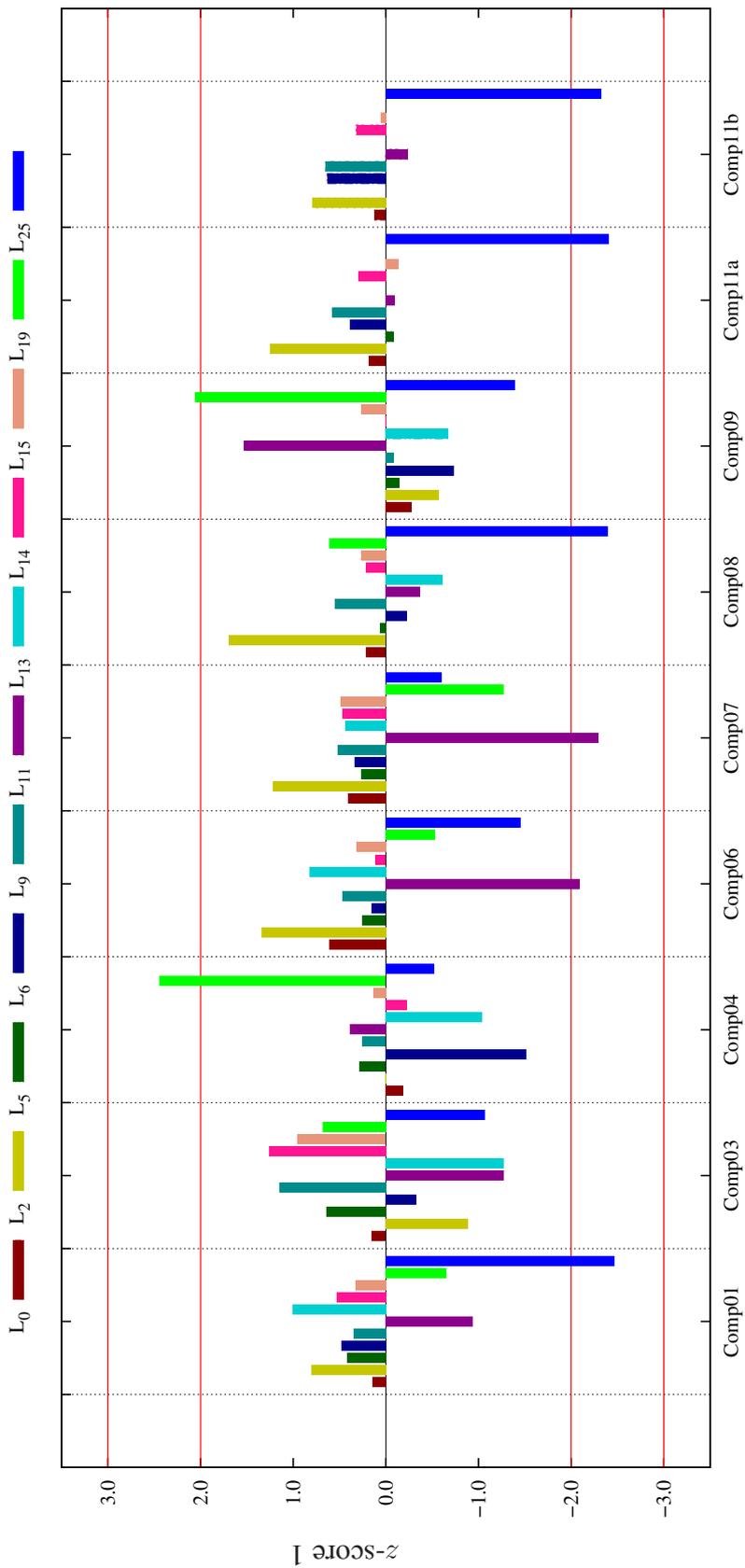


Figura 6.45: z-score 1 para todos os compostos (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS). Comp01 - 1-Octanol; Comp03 - 2,6-Dimetilanilina; Comp04 - N,N,3,5-Tetrametilaniilina; Comp06 - Dodecano; Comp07 - Decanoato de metilo; Comp08 - Dodecanoato de metilo; Comp09 - 2-(Metilamino)benzoato de metilo; Comp11 - Vanilina.

O INETI apresenta sempre valores de z -score entre 0 e 1, o que corresponde a um desempenho satisfatório.

6.6.2 z -score 2

Foi calculado um segundo z -score, z -score 2, que compara o resultado de cada laboratório com o respectivo valor de referência obtido por EA/IRMS. Este parâmetro permite a comparação entre as técnicas analíticas isotópicas de GC/IRMS e EA/IRMS. Os resultados calculados de z -score 2 apresentam-se no Apêndice H.

A representação gráfica dos valores de z -score 2, Figuras 6.46 e 6.47, permitem uma melhor visualização da exactidão de cada laboratório. Os laboratórios com menor dispersão são L₀, L₅, L₉, L₁₄ e L₁₅. As dispersões observadas para alguns compostos por alguns laboratórios deverão estar associadas ao seu desempenho e não ao composto ou à técnica de GC/IRMS pois existem laboratórios com valores de z -score 2 satisfatórios para todos os compostos, como é o caso do INETI. Vários laboratórios apresentam valores de z -score 2 negativos para o composto 03, 2,6-dimetilanilina, ou seja, o valor de $\delta^{13}\text{C}$ para este composto é quase sempre menor que o valor de $\delta^{13}\text{C}$ determinado por EA/IRMS.

Esta diferença de resultados poderá estar relacionada com a existência de fraccionamento isotópico introduzido pela técnica de GC/IRMS. Este tópico já foi apresentado no Capítulo 2 e está discutido com mais pormenor no ponto 6.6.5.1 onde são comparados as duas técnicas isotópicas usadas neste trabalho.

6.6.3 Valores dos Materiais a Certificar

Após escrutínio de valores aberrantes, procedeu-se aos cálculos estatísticos tal como em 6.5.1. Na Tabela 6.15 encontram-se compilados os valores de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ dos compostos presentes na mistura candidata a futuro MRC.

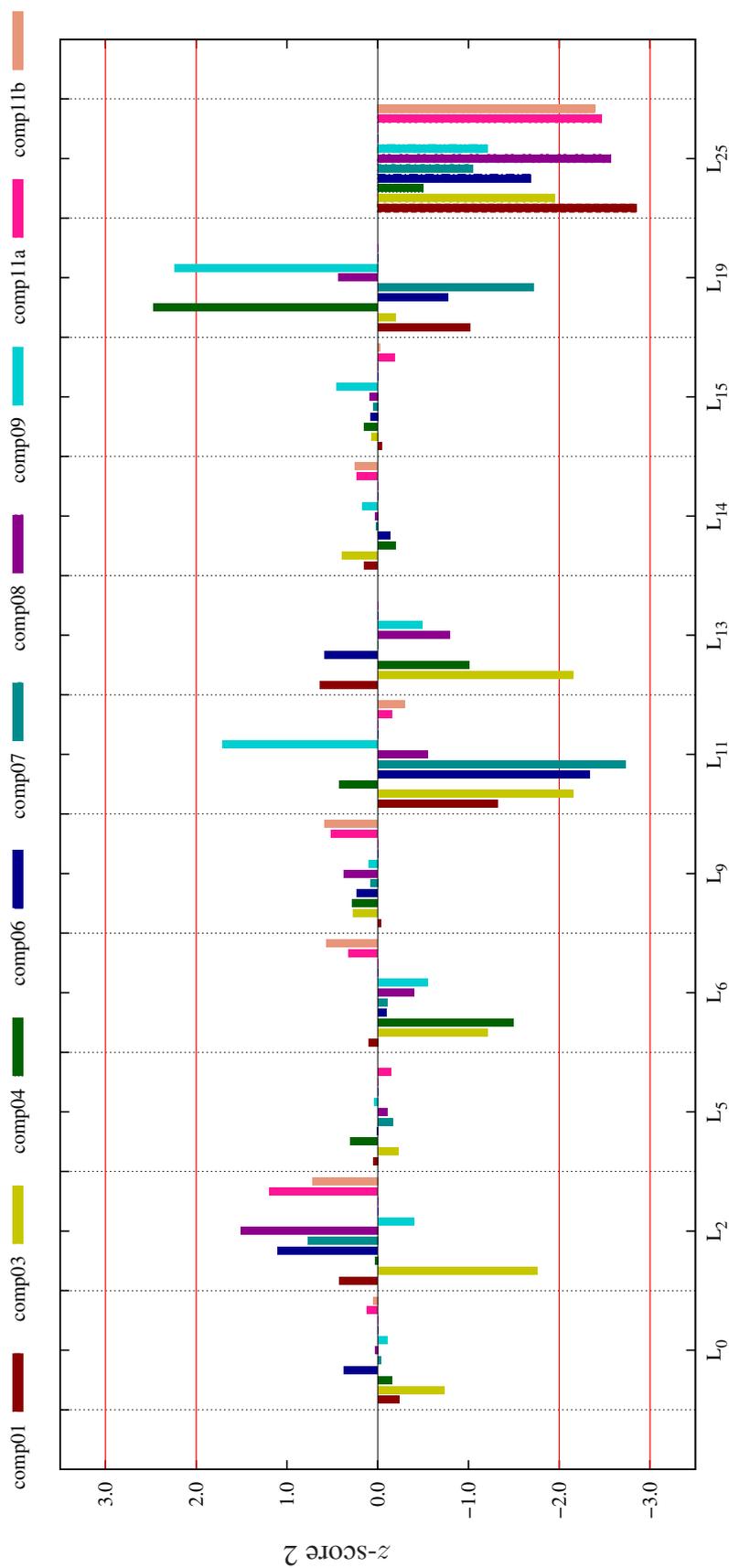


Figura 6.46: z-score 2 para todos os laboratórios (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS por comparação com os valores de referência obtidos por EA-IRMS). Comp01 - 1-Octanol; Comp03 - 2,6-Dimetilanilina; Comp04 - N,N,3,5-Tetrametilani-
lina; Comp06 - Dodecano; Comp07 - Decanoato de metilo; Comp08 - Dodecanoato de metilo; Comp09 - 2-(Metilamino)benzoato de metilo;
Comp11 - Vanilina.

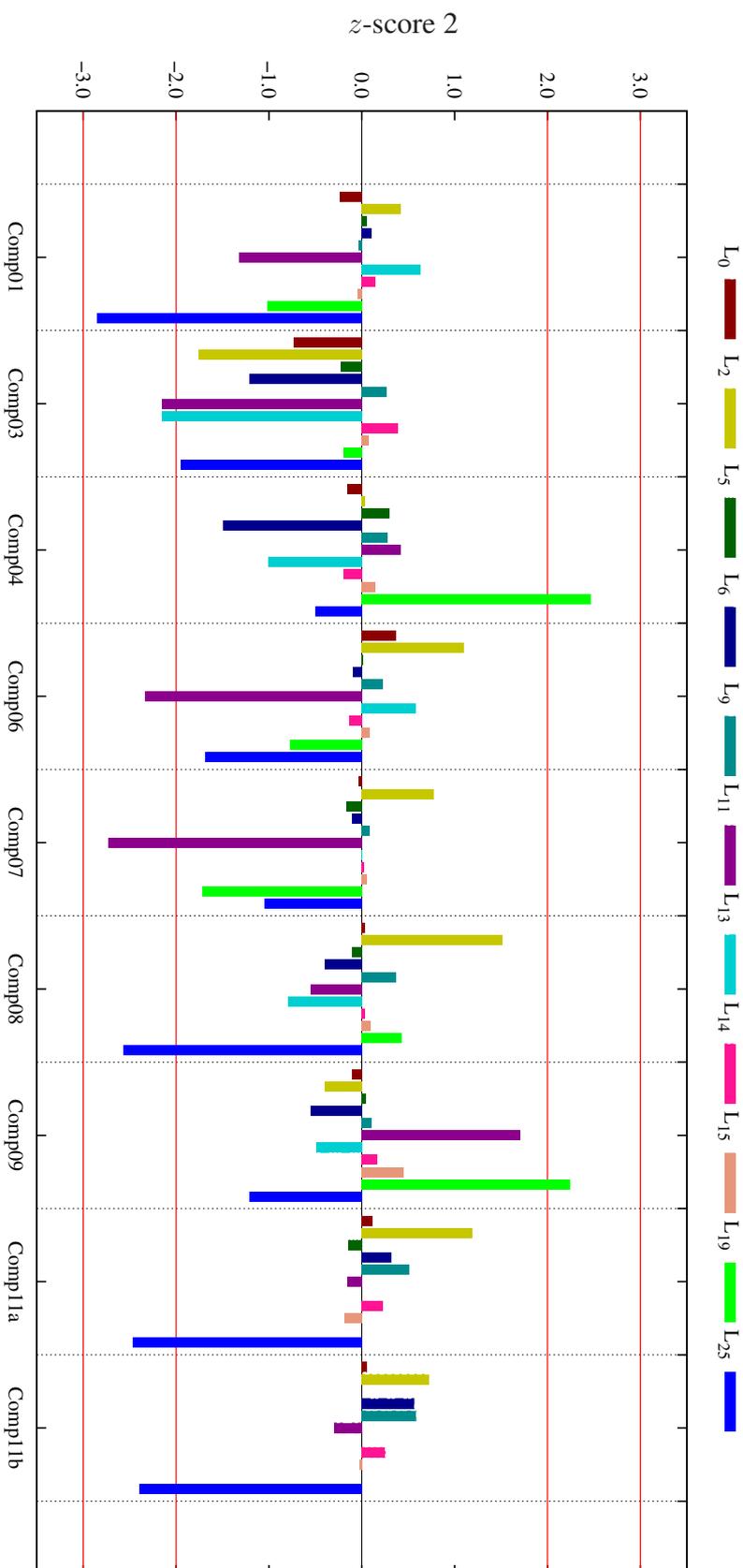


Figura 6.47: z-score 2 para todos os compostos (dispersão dos laboratórios calculada a partir dos resultados de GC-IRMS por comparação com os valores de referência obtidos por EA-IRMS). Comp01 - 1-Octanol; Comp03 - 2,6-Dimetilanilina; Comp04 - N,N,3,5-Tetrametilani-
lina; Comp06 - Dodecano; Comp07 - Decanoato de metilo; Comp08 - Dodecanoato de metilo; Comp09 - 2-(Metilamino)benzoato de metilo;
Comp11 - Vanilina.

Tabela 6.15: Resultados finais de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para a mistura do tipo Grob obtidos por GC/IRMS.

Composto	1-Octanol		2,6-Dimetilanti- lina		N,N,3,5-Tetra- metilaminina		Dodecano		Decanoato de metilo		Dodecanoato de metilo		2-Metilanti- no)benzoato de metilo	
	10	11	10	10	9	26	20	7	9	9	26	27	9	9
Nº de Laboratórios aceites	10	11	10	10	9	26	20	7	9	9	26	27	9	9
Nº amostras analisadas	29	32	30	30	26	26	20	20	26	26	26	27	26	27
Teste múltiplo de Scheffe	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Testes para Detecção de Valores Aberrantes das Médias dos Laboratórios														
Teste de Dixon	95 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	99 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Teste Nalimov	95 %	L11	Não	L6	L2,L19	Não	Não	Não	Não	Não	Não	L25	Não	Não
	99 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Teste Grubbs (Simples)	95 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	99 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Teste Grubbs (Duplo)	95 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	99 %	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Testes de Variâncias														
Teste de Cochran (Detecção aberrantes)	95 %	L2,L13	L2,L11	Não	L0,L2	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	99 %	L2	L2,L11	Não	L2	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Teste de Bartlett (Homogeneidade variâncias)	95 %	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	99 %	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
ANOVA unifactorial	$s_{inter}^{(a)}$	2,54	3,46	1,76	1,11	1,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,29	1,71	0,29	1,71
	$s_{intra}^{(b)}$	0,83	0,78	0,36	0,40	0,40	0,18	0,18	0,18	0,18	0,23	0,28	0,23	0,28

Continua página seguinte...

(a) – s_{inter} – Desvio padrão interlaboratórios.

(b) – s_{intra} – Desvio padrão intralaboratórios.

(c) – NP – Não permitido. Os cálculos das diferenças intralaboratoriais pelo teste-F, não são válidos porque só há uma amostra (analisada em triplicado).

Tabela 6.15 – Continuação

Composto	1-Octanol	2,6-Dimetilam- lina	N,N,3,5-Tetra- metilamina	Dodecano	Decanoato de metilo	Dodecanoato de metilo	2-(Metilami- no)benzoato de metilo
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	95 % Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	99 % Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	95 % NP ^(c)	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	99 % NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Possibilidade para agrupar dados	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Normalidade da Distribuição das médias dos Laboratórios							
Teste Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors	95 % Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	99 % Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Testes de Skewness e Kurtosis	95 % Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
	99 % Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Média dos Laboratórios (%)	-28,74	-32,19	-34,16	-31,92	-31,70	-30,64	-38,20
s Laboratórios	1,7	2,0	1,3	1,1	0,33	0,59	1,3
Semi-amplitude do IC a 95 %	1,2	1,3	0,50	0,84	0,30	0,45	1,0
Semi-amplitude do IT a 95 %	5,8	6,4	3,4	3,9	1,3	2,1	4,7

(a) – s_{inter} – Desvio padrão interlaboratórios.(b) – s_{intra} – Desvio padrão intralaboratórios.

(c) – NP – Não permitido. Os cálculos das diferenças intralaboratórias pelo teste-F, não são válidos porque só há uma amostra (analisada em triplicado).

Deve-se acentuar que os testes estatísticos aplicados não deverão ser usados como único critério para aceitação ou rejeição de resultados, mas sim para identificar resultados que requeiram uma investigação mais crítica e profunda durante a discussão técnica e, ainda, para demonstrar a concordância entre os vários conjuntos de dados aceites para a certificação.

Antes de se calcular os valores certificados e a respectiva estimativa da incerteza, deverá-se verificar se os dados fornecidos por todos os laboratórios podem ser considerados como amostras de uma única população e, portanto, se podem ser combinados, *i.e.*, serem tratados como um único conjunto de dados. Para isso, aplicam-se os testes F de Snedecor, que verifica se o valor de s entre laboratórios é muito diferente de zero, e o de Bartlett que verifica se as diferenças entre as variâncias são significativas. É possível agrupar os dados quando ambos os testes são negativos.

O teste F de Snedecor é efectuado para dois níveis de significância ($\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$) para se avaliar a significância das diferenças observadas (interlaboratórios e intralaboratórios).

O passo seguinte na análise dos dados foi o de verificar se os resultados seguem uma distribuição normal para posteriormente se calcular o valor de consenso (caso se trate de estudos de exequibilidade e não de certificação), e a estimativa da sua incerteza, o intervalo de confiança a 95 % (para isso calcula-se a média, o s , o intervalo de confiança, IC, da média a 95 % e o intervalo de tolerância, IT, das médias dos conjuntos de dados a 95 %, e usa-se o método de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors para avaliar se as médias dos laboratórios estão normalmente distribuídas).

A semi-amplitude do intervalo de confiança a 95 % pode ser considerada uma estimativa da incerteza do valor de consenso.^{5,259}

Neste trabalho os valores de consenso para certificação correspondem à média das médias dos laboratórios, e a sua incerteza é igual à semi-amplitude do intervalo de confiança a 95 %.

Assim, relativamente aos resultados finais apresentados na Tabela 6.15, pode-se resumir o seguinte:

1-Octanol (01) Os resultados apresentados pelo laboratório L₂₅ foram identificados como aberrantes, pelo que foi excluído dos cálculos estatísticos finais. Assim, o valor de consenso para o 1-octanol é de -28,74 ‰ com uma incerteza associada de 1,2 ‰.

2,6-Dimetilanilina (03) Não foram detectados valores médios aberrantes dos laboratórios que forneceram resultados. O valor de $\delta^{13}\text{C}$ de consenso para este composto é de -32,19 ‰ e a sua incerteza de 1,3 ‰.

N,N,3,5-Tetrametilanilina (04) Os testes de detecção de valores aberrantes detectaram a média do laboratório L₁₉ como aberrante. O L₁₉ é um laboratório que tem um equipamento mais antigo e já apresentava alguns problemas aquando do Ensaio Circular como anteriormente referido. O valor de $\delta^{13}\text{C}$ de consenso para este composto é de -34,16 ‰ com uma estimativa da incerteza de 0,50 ‰.

Dodecano (06) Não foram detectadas médias aberrantes pelos testes. No entanto dado que há uma grande dispersão dos resultados fornecidos para este composto, o desvio padrão da média é de 2,11 ‰ pelo que se excluíram os laboratórios L₁₁ e L₂₅ do cálculo final da média do valor de consenso. O valor médio de consenso para este composto é -31,92 ‰ e a estimativa da sua incerteza de 0,84 ‰.

Decanoato de metilo (07) Foram removidos dos cálculos finais os laboratórios L₂, L₁₁, L₁₉ e L₂₅. Verificou-se uma elevada dispersão entre as médias dos laboratórios participantes. O valor de consenso para o decanoato de metilo é -31,70 ‰ e a estimativa da sua incerteza de 0,30 ‰.

Dodecanoato de metilo (08) Os testes de detecção de valores de médias aberrantes identificaram os laboratórios L₂₅ e L₂ como aberrantes pelo que foram removidos do cálculo do valor médio do dodecanoato de metilo. O valor de $\delta^{13}\text{C}$ de consenso é -30,64 ‰ com uma estimativa da incerteza de 0,45 ‰.

2-(Metilamino)benzoato de metilo (09) Os testes para detecção de valores aberrantes não identificaram laboratórios com médias aberrantes. Contudo, foram excluídos do cálculo do valor médio os laboratórios L₁₁ e L₁₉ dado que o desvio padrão da média, 2,65 ‰, seria muito elevado para um MRC. Assim, o valor de consenso para este composto é de -38,20 ‰ com uma estimativa da incerteza de 1,0 ‰.

Apesar de alguns laboratórios terem sido detectados como aberrantes pelo teste de Cochran de variâncias (L₀, L₂, L₆ e L₁₃), e pelo teste de Nalimov para detecção de médias (L₂, L₆, L₁₁, L₁₉ e L₂₅), não foram excluídos dos cálculos estatísticos para que os resultados finais reflectissem melhor a realidade dos laboratórios tais como, diferentes equipamentos, diferentes condições cromatográficas etc., o que conduz a dispersões maiores ou menores quando se participa em estudos colaborativos.

Refere-se que o laboratório L₂₅ apenas forneceu resultados pela técnica de GC/IRMS pelo que se pode inferir que não possui a técnica de EA/IRMS sendo, portanto, mais difícil a calibração de GC/IRMS, e daí o seu desempenho insatisfatório no Exercício de Certificação Simulado.

O número máximo de laboratórios que podem ser excluídos em estudos colaborativos é na razão de 2/9, ou seja, aproximadamente 22,2% dos laboratórios participantes.⁵

No caso do decanoato de metilo foram removidos 4 laboratórios. Seria necessário conhecer com detalhe os controlos da qualidade, as condições cromatográficas etc., para garantir que não estão a ser excluídos resultados correctos. Num Exercício de Certificação cujo objectivo é a certificação de materiais, há que se saber muito bem o que se está a rejeitar.

É importante focar que é preciso ter em atenção que a rejeição de dados é uma tarefa complexa e determinante, para se encontrar um valor final o mais verdadeiro possível. As avaliações técnicas e estatísticas devem ser muito criteriosas e examinadas cuidadosamente,

para não se correr o risco de se excluírem resultados correctos ou manter resultados incorrectos ou questionáveis.

Deve ficar claro que a responsabilidade final da avaliação dos resultados e os cálculos do valor certificado e da estimativa da incerteza, são do produtor de MRC.

6.6.4 Vanilina (11)

Os resultados globais obtidos para as duas amostras de vanilina designadas por A e B encontram-se no Apêndice G, Tabela G.20.

A Figura 6.48 corresponde à representação gráfica dos resultados de $\delta^{13}\text{C}$ para cada laboratório. Aplicou-se a análise estatística já utilizada anteriormente e os resultados finais encontram-se na Tabela 6.16.

Os testes para detecção de valores aberrantes às médias, detectaram as médias dadas pelos laboratórios L_2 e L_{25} como aberrantes, pelo que estes dois laboratórios foram excluídos dos cálculos estatísticos. Assim, o valor de consenso para a vanilina é de $-28,92\text{‰}$ e a estimativa da sua incerteza é de $0,32\text{‰}$.

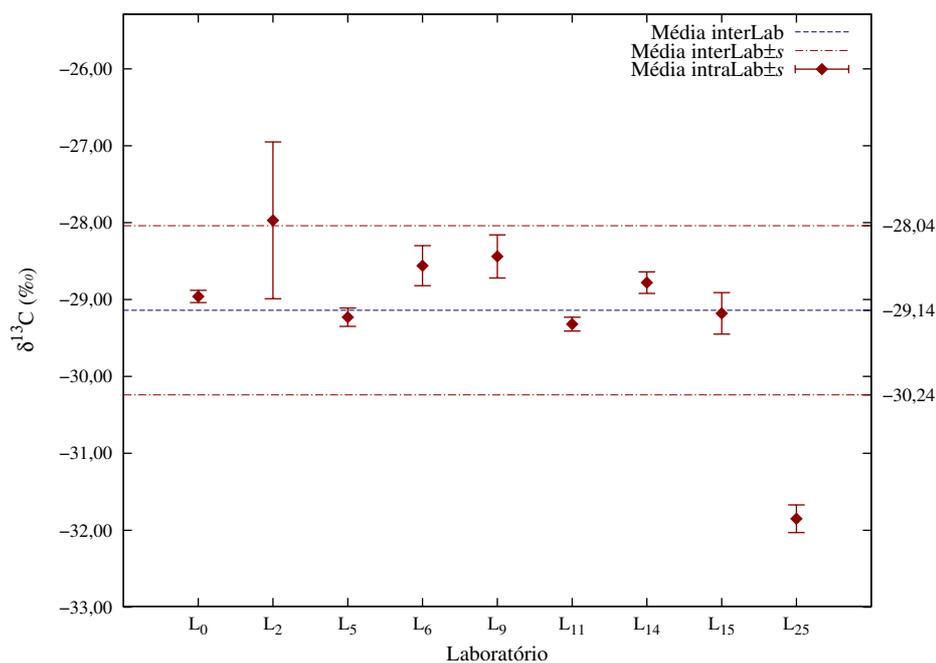


Figura 6.48: Vanilina. Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ intralaboratórios com s associado, relativo ao ECS (GC-IRMS), e o valor médio interlaboratorial $\pm s$.

Tabela 6.16: Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) para a vanilina obtidos por GC/IRMS.

Composto		1ª Avaliação	Sem L2 e L25
Nº de Laboratórios aceites		9	7
Nº amostras analisadas		17	13
Teste múltiplo de Scheffe		Não	Sim
Testes para Detecção de Valores Aberrantes das Médias dos Laboratórios			
Teste de Dixon	95 %	Sim (L2;L25)	Não
	99 %	Sim (L2;L25)	Não
Teste Nalimov	95 %	Sim (L2;L25)	Não
	99 %	Sim (L2;L25)	Não
Teste Grubbs (Simples)	95 %	Sim (L2;L25)	Não
	99 %	Sim (L2;L25)	Não
Teste Grubbs (Duplo)	95 %	Sim (L2;L25)	Não
	99 %	Sim (L2;L25)	Não
Testes de Variâncias			
Teste de Cochran	95 %	Não	Não
(Detecção aberrantes)	99 %	Não	Não
Teste de Bartlett	95 %	Sim	Sim
(Homogeneidade variâncias)	99 %	Sim	Sim
ANOVA unifactorial	$s_{\text{inter}}^{(a)}$	1,09	0,36
	$s_{\text{intra}}^{(b)}$	0,40	0,20
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	interlaboratórios	95 %	Não
		99 %	Não
Teste F-Snedecor (ANOVA dupla hierárquica)	intralaboratórios	95 %	NP ^(c)
		99 %	NP
Possibilidade para agrupar dados		Sim	Sim
Normalidade da Distribuição das médias dos Laboratórios			
Teste Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors	95 %	Normal	Normal
	99 %	Normal	Normal
Testes de Skewness e Kurtosis	95 %	Normal	Normal
	99 %	Normal	Normal
Média dos Laboratórios (‰)		-29,14	-28,92
s Laboratórios		1,10	0,34
Semi-amplitude do IC a 95 %		0,85	0,32
Semi-amplitude do IT a 95 %		3,89	1,37

(a) – s_{inter} – Desvio padrão interlaboratórios.(b) – s_{intra} – Desvio padrão intralaboratórios.(c) – NP – Não permitido. Os cálculos das diferenças intralaboratoriais pelo teste- F , não são válidos porque só há uma amostra (analisada em triplicado).

6.6.5 Comparação de GC/IRMS com EA/IRMS. ECS

6.6.5.1 Valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$

A Tabela 6.17 apresenta, de forma sumária, os valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ para os onze compostos puros analisados por EA/IRMS (a que correspondem os valores de referência e que servem como termo de comparação) e os valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ da mistura dos sete compostos e da vanilina, pela técnica de GC/IRMS. Podem também ver-se os valores do desvio padrão da repetibilidade, s_r , o desvio padrão da reprodutibilidade, s_R , o limite de repetibilidade, r e o limite de reprodutibilidade R obtidos para as duas técnicas isotópicas e ainda, a diferença entre elas. Estes cálculos foram efectuados de acordo com os Guias ISO 5725^{320,330,331} e encontram-se no Apêndice E.

Verifica-se que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por GC/IRMS são mais negativos que por EA/IRMS, excepto para a vanilina e para o dodecano. As diferenças entre os valores médios $\delta^{13}\text{C}$ obtidos por EA/IRMS e os valores médios obtidos por GC/IRMS não são muito elevadas, excepto no caso da 2,6-dimetilanilina, em que esta diferença tem o valor de 1,73 ‰. No entanto, estas diferenças são sempre menores que a precisão do método GC/IRMS para o composto em questão (valores de S_R).

Esta diferença de valores entre as duas técnicas isotópicas poderá estar relacionada com o fraccionamento isotópico introduzido pelo sistema cromatográfico.

Este assunto foi abordado em profundidade por Meier-Augenstein,³³²⁻³³⁷ e explica que o efeito isotópico cromatográfico resulta das diferentes interacções entre o soluto e a fase estacionária, dominadas pelas forças de dispersão de Van der Waals, conduzindo à eluição em primeiro lugar do isótopo mais pesado (efeito isotópico inverso).³³⁴⁻³³⁶ Na separação de compostos por cromatografia em fase gasosa o efeito isotópico termodinâmico é essencialmente o responsável pelo fraccionamento isotópico.

Tabela 6.17: Comparação das técnicas EA/IRMS e GC/IRMS. Parâmetros de desempenho.

Composto	$\delta^{13}\text{C}\%$												
	EA/IRMS			GC/IRMS			EA/IRMS			GC/IRMS			
	s_r	r	s_R	R	s_r	r	s_R	R	s_r	r	s_R	R	GC-EA
1-Octanol	1	-28,37	0,13	0,36	0,18	0,50	-28,74	0,83	2,3	1,8	5,0	-0,37	
2,6-Dimetilfenol	2	-30,77	0,10	0,28	0,20	0,56	—	—	—	—	—	—	
2,6-Dimetilanilina	3	-30,46	0,13	0,36	0,13	0,36	-32,19	0,78	2,2	2,0	5,5	-1,7	
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilamnilina	4	-33,69	0,15	0,42	0,18	0,50	-34,16	0,36	1,0	1,4	3,9	-0,47	
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	5	-30,46	0,08	0,22	0,16	0,45	—	—	—	—	—	—	
Dodecano	6	-32,24	0,10	0,28	0,19	0,53	-31,92	0,40	1,1	1,1	3,1	0,32	
Decanoato de metilo	7	-31,62	0,11	0,31	0,15	0,42	-31,70	0,18	0,50	0,36	1,0	-0,08	
Dodecanoato de metilo	8	-30,50	0,16	0,45	0,24	0,67	-30,64	0,23	0,64	0,58	1,6	-0,14	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	9	-37,61	0,10	0,28	0,15	0,42	-38,20	0,27	0,76	1,3	3,7	-0,59	
Nonanal	10	-33,92	0,12	0,34	0,13	0,36	—	—	—	—	—	—	
Vanilina	11	-29,06	0,09	0,25	0,24	0,67	-28,92	0,20	0,56	0,50	1,4	0,14	

Devido ao efeito isotópico cromatográfico, o sinal m/z 45 ($^{13}\text{CO}_2$) pode preceder o sinal m/z 44 ($^{12}\text{CO}_2$) em cerca de 150 ms.^{333,338} Este desvio de tempo depende da natureza do composto e das condições cromatográficas, tais como a polaridade da fase estacionária, a temperatura da coluna e o fluxo do gás de arrastamento, maus parâmetros de integração dos picos etc..

Ao estudar por GC/C/IRMS ésteres metílicos de ácidos gordos saturados, Meier-Augenstein confirmou este efeito³³⁴ quando, ao usar o mesmo gradiente de temperatura, variou a pressão de gás à cabeça da coluna. Observou que, à medida que a pressão era mais elevada, os isotopólogos (já definido no Capítulo 3) mais pesados eluíam mais cedo e vinham com valores de razão isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ mais negativos. Variando o gradiente da temperatura e mantendo a pressão do gás à cabeça da coluna, obteve um efeito marcante nos tempos de retenção e na separação dos picos, não tendo sido a forma destes significativamente afectada.

Não foi possível, no entanto, determinar a diferença entre os t_R dos diferentes isotopólogos. A diferença de tempo entre as razões m/z 44 e m/z 45 foram da ordem de 100 ms (pico a pico), mas as variações dos gradientes de uma temperatura para outra foram muito pequenas, para serem determinadas com precisão.

Dado que os compostos que eluem da coluna sofrem combustão, transformando-se em CO_2 e H_2O , será de esperar que a molécula de massa molecular mais baixa (mais susceptível ao fraccionamento isotópico) que é subseqüentemente transferida para o espectrómetro de massa, passando por várias ligações e variações no diâmetro dos capilares, sofra na interface de combustão uma intensificação do efeito isotópico.

Este autor refere ainda que, no sistema hifenado GC/C/IRMS, existem sete potenciais fontes de discriminação da massa e, portanto, para fraccionamento isotópico:

- 1) fraccionamento isotópico durante a injeção da amostra, que poderá ser superado pela utilização de injeção em “splitless” ou “on column”,
- 2) efeito isotópico cromatográfico,
- 3) distorção do pico cromatográfico (“tailing”),
- 4) o processo de combustão,
- 5) distorção do pico N_2/CO_2 durante a passagem pela interface de combustão (quando está presente composto(s) contendo azoto),
- 6) variações das condições de fluxo na abertura da fenda anterior ao espectrómetro de IRMS e finalmente,
- 7) o próprio IRMS (este efeito pode ser compensado pelo gás de verificação externo).

É fundamental que haja uma boa separação dos picos cromatográficos e a utilização de colunas capilares cromatográficas de elevada resolução para um bom desempenho da técnica GC/IRMS.

Também Bruno Glaser *et al.*,³³⁹ observaram no sistema de GC/IRMS um efeito de frac-

cionamento isotópico dependente da quantidade, ao tentarem localizar as causas responsáveis pela deriva. Estudaram fenóis derivados da lenhina e apesar da optimização do parâmetro crucial, o injector split/splitless, o fraccionamento nunca foi totalmente eliminado.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de compostos puros mostraram uma dependência directa da quantidade injectada. As equações matemáticas que melhor ajustaram a relação entre a quantidade injectada e o valor de $\delta^{13}\text{C}$ foram, a regressão linear e a logarítmica, permitindo uma redução de cerca 4 para 2 ‰ na gama de 4 a 80 ng dos fenóis injectados.

Parece inevitável o efeito de fraccionamento isotópico nesta técnica, no entanto, este pode ser minimizado. O INETI utilizou injeção “splitless” mas nem todos os laboratórios participantes no ECS usaram este modo de injeção.

6.6.5.2 Parâmetros de desempenho de GC/IRMS e de EA/IRMS

A variabilidade dos métodos analíticos EA/IRMS e GC/IRMS, nomeadamente o desvio padrão da repetibilidade, s_r , o desvio padrão da reprodutibilidade, s_R , o limite de repetibilidade, r e o limite de reprodutibilidade R , foram calculados de acordo com as normas internacionais ISO 5725:1-6^{320,330,331,340-342} (Apêndice E).

As definições destes parâmetros e de outros relacionados, encontram-se descritas no guia ISO 30,²⁸² que por sua vez se baseia no GUM²⁵⁹ e no VIM.¹

O objectivo do Exercício de Certificação Simulado foi verificar se era possível encontrar acordo satisfatório entre os resultados dos diferentes laboratórios e não o de comparar as duas técnicas, pelo que não foi planeado por forma a permitir uma comparação estatística completa e exaustiva. Contudo, os dados apresentados na Tabela 6.17, permitem uma avaliação comparativa rápida das duas técnicas em termos de exactidão e de precisão.

Do ponto de vista da precisão, e no contexto deste exercício, a repetibilidade e a reprodutibilidade entre os laboratórios são mais elevadas para GC/IRMS que para EA/IRMS. Relativamente à exactidão, considerando que os valores de EA/IRMS são os valores de referência e tendo em conta a precisão de GC/IRMS, as medidas não são significativamente diferentes. De facto, as diferenças entre as médias das medições por EA/IRMS e GC/IRMS são sempre menores que a reprodutibilidade.

Os valores da repetibilidade e da reprodutibilidade são bastante mais elevados na técnica de GC/IRMS, como seria de esperar, uma vez que esta técnica apresentou maiores dispersões em todos os ensaios realizados ao longo deste trabalho.

A repetibilidade e a reprodutibilidade dos métodos analíticos EA/IRMS e GC/IRMS podem ver-se na Tabela 6.18.

Quanto à precisão dos métodos de GC/IRMS e EA/IRMS, considerou-se que ela corresponde ao desvio padrão ponderado da média para cada composto, no ensaio do ECS. Obtiveram-se os seguintes valores para a precisão:

Tabela 6.18: Valores de s_r , r , s_R e R (%) para as técnicas de EA/IRMS e GC/IRMS.

Método	s_r	r	s_R	R
EA/IRMS	0,12	0,34	0,18	0,50
GC/IRMS	0,43	1,2	1,2	3,4

EA/IRMS: 0,15 %.

GC/IRMS: 1,2 %.

6.6.5.3 Estimativa da incerteza

Na literatura podem encontrar-se diversas abordagens para o cálculo das estimativas das incertezas associadas a um resultado ou a um método analítico.²⁵⁹⁻²⁷⁴

Dado que foi feito um Exercício de Certificação Simulado, onde participaram vários laboratórios, optou-se por aplicar a abordagem de utilização de dados interlaboratoriais no cálculo da estimativa da incerteza do método de GC/IRMS. Como valores alvo tomaram-se os valores médios obtidos no ECS por EA/IRMS, Tabela 6.14.

Esta abordagem para o cálculo da estimativa da incerteza tem a vantagem de contemplar as condições de máxima variabilidade, *i.e.*, diferentes matrizes, laboratórios, equipamentos, operadores de entre outros.

A Tabela 6.19 resume os valores das estimativas das incertezas calculadas para os métodos EA/IRMS e GC/IRMS.

Tabela 6.19: Incertezas estimadas para EA/IRMS e GC/IRMS

Método	Incerteza Expandida (U) (%)
EA	0,43
GC	2,5

Como seria de prever, a técnica de GC/IRMS apresenta uma incerteza mais elevada que EA/IRMS. Esta estimativa da incerteza não deve ser tomada como uma incerteza absoluta da técnica, mas como uma primeira aproximação de um critério que tem em linha de conta a precisão e a exactidão da técnica de GC/IRMS. Este valor poderá facilitar a comparação e a interpretação de medições por GC/IRMS, num futuro MRC.

Capítulo 7

Conclusões Finais e Perspectivas Futuras

7.1 Conclusões

O principal objectivo deste trabalho foi identificar uma mistura do tipo Grob e avaliar a sua exequibilidade como futuro MRC, de acordo com as linhas orientadoras publicadas no Guia BCR,^{5,6} adequada ao controlo da técnica de GC/IRMS e para melhorar a rastreabilidade das suas medições.

No trabalho aqui apresentado, foi possível:

- Obter valores de consenso para a certificação de $\delta^{13}\text{C}$ para os compostos puros 1-octanol, 2,6-dimetilfenol, 2,6-dimetilanilina, *N,N*,3,5-tetrametanilina, 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, 2-(metilamino)benzoato de metilo, nonanal, e vanilina para a técnica de EA/IRMS. Estes compostos preencheram os requisitos necessários de estabilidade e de homogeneidade.
- Obter uma mistura constituída por 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, *N,N*,3,5-tetrametanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo e 2-(metilamino)benzoato de metilo, com valores das razões isotópicas $\delta^{13}\text{C}$ conhecidos, cujos resultados foram coerentes para um grupo de laboratórios. Para estes a diferença de valores de $\delta^{13}\text{C}$ relativamente a EA/IRMS são menores que a precisão da medição. Esta mistura não será uma mistura pronta a usar (só foi feito estudo de estabilidade para 3 semanas) mas os compostos individuais serão misturados antes de serem utilizados pelo operador. A diferença acentuada entre os resultados obtidos em alguns laboratórios e os valores tomados como referência sublinha mais uma vez a importância e a utilidade de haver MRC disponíveis para as determinações por GC/IRMS.
- Obter um valor de consenso de $\delta^{13}\text{C}$ da vanilina para a técnica de GC/IRMS.
- Avaliar o desempenho de GC/IRMS e comparar com EA/IRMS.

- Fornecer orientações para a utilização destes compostos como futuros MRC: possibilidades, uso e limitações.

A adequabilidade de cada composto como MRC para EA/IRMS e da mistura do tipo Grob para GC/IRMS encontra-se resumida em ‘Folhas de Dados Técnicos individuais’, “Technical Data Sheets”, contendo informação sobre tamanho/quantidade recomendada, tipo de embalagem, condições de armazenamento e o valor de consenso para certificação com a estimativa da sua incerteza (ver Apêndice I). Esta informação constitui o principal produto final deste trabalho.

É também de referir que os valores de $\delta^{13}\text{C}$ para a *N,N,3,5*-tetrametilnilina, 2,6-dimetilanilina, 2-(metilamino)benzoato de metilo, dodecano e 1-octanol, constantes das Folhas de Dados Técnicos, são ligeiramente diferentes dos calculados ao longo desta tese o que poderá estar relacionado com diferentes critérios de aceitação/rejeição de valores médios dos laboratórios participantes e/ou fórmulas de cálculo.

O IRMM, em Geel, foi contactado com vista a uma eventual produção destes materiais de referência.

Como consideração final, verifica-se que apesar do enorme avanço tecnológico da técnica de GC/IRMS, parece haver ainda grandes desafios, para os fabricantes de equipamentos, no sentido de melhorar o desempenho desta técnica hifenada, nomeadamente em termos de precisão e exactidão.

7.2 Perspectivas Futuras

A disponibilidade de um Material de Referência (Certificado), neste caso de um conjunto de compostos para formar uma mistura com valores $\delta^{13}\text{C}$ conhecidos, que permita calibrar os sistemas de GC/IRMS, rastrear as medições dos isótopos estáveis por GC/IRMS e permitir correlacionar os resultados de diferentes laboratórios (muitos deles são laboratórios oficiais cuja missão é precisamente a detecção de fraudes económicas de géneros alimentícios) é uma mais valia de que serão primeiros beneficiários os laboratórios, mas cujo impacto acabará por se repercutir na defesa dos interesses dos consumidores.

Dado tratar-se de uma técnica muito versátil com enormes potencialidades, outra consequência muito importante é que irá permitir o desenvolvimento de novos métodos alargando a técnica para um número muito maior de aplicações na área da autenticidade alimentar de entre outras.

Muitos laboratórios, especialmente os acima referidos, anseiam por este tipo de MRC e têm mostrado muito interesse através de contactos directos com os participantes neste trabalho de investigação, sobre a data da disponibilidade da mistura.

No entanto esta é uma tarefa para o IRMM que, a esta altura, estará provavelmente a fazer o estudo de certificação.

A multiplicidade de desafios emergentes na área da autenticidade e segurança alimentares irá, com certeza, colocar uma pressão cada vez mais elevada nos laboratórios e, consequentemente na utilização de técnicas como a GC/IRMS, pelo que o estudo agora efectuado é apenas o primeiro de uma série, que se adivinha, e que conduzirá à disponibilização de novos MRC cada vez mais adaptados à diversidade de analitos e matrizes sujeitas a análise/controllo.

Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Português da Qualidade (IPQ), *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)*, IPQ, 3^a ed. (2005).
- [2] Guillou, C., Remaud, G., Lees, M., The certification of BCR-656 (96 % vol.), BCR-657, BCR-658 (7 % vol.), BCR-659 (12 % vol.) and BCR-660 (12 % vol.). For application of analytical procedures described in EEC/2676/90, EEC/822/97 and CEN/TC N 108, 109, 110, European Commission (EUR 20064 EN) (2001).
- [3] Horwitz, W., Nomenclature of interlaboratory analytical studies, *Pure Appl. Chem.* **66**, 1903 (1994).
- [4] <http://www.iso-analytical.co.uk/terminology.html> (consultado em 24/02/2008).
- [5] European Commission, Guidelines for the production and certification of BCR reference materials, Doc BCR/48/93, Brussels (1994).
- [6] European Commission, Guidelines for the production and certification of BCR reference materials, Doc BCR/01/97, Brussels (1997).
- [7] Thomson, J.J., Rays of positive electricity, *Proc. Roy. Soc. A* **89**, 1 (1913).
- [8] Aston, F.W., The constitution of the elements, *Nature* **104**, 393 (1919).
- [9] Soddy, F., Intra-atomic charge, *Nature* **92**, 399 (1913).
- [10] Aston, F.W., *Isotopes*, Edward Arnold & Co., London (1922).
- [11] Nier, A.O., A redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon and potassium, *Physiol. Rev.* **77**, 789 (1950).
- [12] Mook, W.G., Introduction: Theory, Methods, Review, in W.G. Mook (ed.), *Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle. Principles and Applications*, volume I, UNESCO/IAEA (2000).
- [13] De Laeter, J.R., Bohlke, J.K., De Bièvre, P., Hidaka, H., Peiser, H.S., Rosman, K.J.R., Taylor, P.D.P., Atomic weights of the elements: review 2000 (IUPAC) Technical Report, *Pure Appl. Chem.* **75**, 683 (2003).

- [14] Urey, H.C., Teal, G.K., The hydrogen isotope of atomic weight two, *Rev. Mod. Phys.* **7**, 34 (1935).
- [15] Urey, H.C., The thermodynamic properties of isotopic substances, *J. Chem. Soc.* 562 (1947).
- [16] Craig, H., Isotopic variations in meteoric waters, *Science* **133**, 1702 (1961).
- [17] Hayes, J.M., Practice and principles of isotopic measurements in organic geochemistry (2002), (disponível em <http://www.nosams.who.edu/docs/IsoNotesAug02.pdf> ; consultado em 21 setembro 2006).
- [18] Kendall, C., Tracing nitrogen sources and cycling in catchments, in C. Kendall, J.J. Mc Donnell (eds.), *Isotopes Tracers in Catchment Hydrology*, cap. 16, pp 519–576, Elsevier Science B. V., Amsterdam (1998).
- [19] Craig, H., Gordon, L.I., Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere, *Marine Geochemistry* **3**, 277 (1965).
- [20] Kendall, C., Caldwell, E.A., Fundamentals of isotope geochemistry, in C. Kendall, J.J. Mc Donnell (eds.), *Isotopes Tracers in Catchment Hydrology*, cap. 2, pp 51–86, Elsevier Science B. V., Amsterdam (1998).
- [21] O’Leary, M.H., Carbon isotope fractionation in plants, *Phytochemistry* **20**, 553 (1981).
- [22] Craig, H., The geochemistry of the stable carbon isotopes, *Geochim. Cosmochim. Acta* **3**, 53 (1953).
- [23] Hatch, M.D., Slack, C.R., Photosynthetic CO₂-fixation pathways, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 141 (1970).
- [24] Smith, B.N., Epstein, S., Two categories of ¹³C/¹²C ratios in higher plants., *Plant Physiol.* **74**, 104 (1971).
- [25] Park, R., Epstein, S., Carbon isotope fractionation during photosynthesis, *Geochim. Cosmochim. Acta* **21**, 110 (1960).
- [26] Brugnoli, E., Farquhar, G.D., Photosynthetic fractionation of carbon isotopes, in R.C. Leegood, T.D. Sharkey, von Caemmerer S. (eds.), *Advances in Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, volume 9, cap. 17, pp 399–434, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1999).
- [27] Deleens, É., La discrimination du ¹³C et les trois types de métabolisme des plantes, *Physiol. Vég.* **14**, 641 (1976).
- [28] Teixeira, A.R., Ricardo, C.P.P., *Fotossíntese*, Didáctica Editora, Lisboa, 1ª ed. (1983).

- [29] Hatch, M.D., Slack, C.R., Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurrence in other plant species, *Biochem. J.* **102**, 417 (1967).
- [30] Ehleringer, J.R., Cerling, T.E., Helliker, B.R., C₄ photosynthesis, atmospheric CO₂, and climate, *Oecologia* **112**, 285 (1997).
- [31] Winter, K., M., H.J.A., How closely do the $\delta^{13}\text{C}$ values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of CO₂ fixed during day and night?, *Plant Physiol.* **129**, 1843 (2002).
- [32] Lajtha, K., Michener, R.H., *Stable Isotopes In Ecology and Environmental Science*, Blackwell Scientific Publications, London (1994).
- [33] Coplen, T.B., Bohlke, J.K., Bièvre, P.D., Ting, D., Holden, N.E., Hpple, J.A., Krouse, H.R., Lamberty, A., Peiser, H.S., Révész, K., Rieder, S.E., Rosman, K.J.R., Roth, E., Taylor, P.D.P., Vocke, R.D.J., Xiao, Y.K., Isotope-abundance variations of selected elements, *Pure Appl. Chem.* **74**, 1987 (2002).
- [34] Craig, H., Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters, *Science* **133**, 1833 (1961).
- [35] Clark, I.D., Fritz, P., *Environmental Isotopes in Hydrogeology*, Lewis Publishers, New York (1997).
- [36] Gat, J.R., Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle, *Annu. Rev. Earth. Planet. Sci.* **24**, 225 (1996).
- [37] Martin, G.J., Martin, M.L., Climatic significance of isotope ratios, *Phytochemistry Rev.* **2**, 179 (2003).
- [38] Schmidt, H.L., Werner, R.A., Rossmann, A., ¹⁸O Pattern and biosynthesis of natural plant products. Review., *Phytochemistry* **58**, 9 (2001).
- [39] Calderone, G., *Application des Techniques Isotopiques Modernes pour la Caractérisation de Produits Alimentaires et des Boissons*, Tese de Doutorado, Université de Nantes, Nantes (2005).
- [40] Hogberg, P., ¹⁵N Natural abundance in soil-plant systems. Tansley Review N° 95, *New Phytol.* **137**, 179 (1997).
- [41] Sponheimer, M., Robinson, T., Ayliffe, L., Roeder, B., Hammer, J., Passey, B., West, A., Cerling, E., Dearing, D., Ehleringer, R., Nitrogen isotopes in mammalian herbivores: hair $\delta^{15}\text{N}$ values from a controlled feeding study, *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**, 80 (2003).
- [42] Sponheimer, M., Robinson, T.F., Roeder, B.L., Passey, B.H., Ayliffe, L.K., Cerling, T.E., Dearing, M.D., Ehleringer, J.R., An experimental study of nitrogen flux in llamas: is $\delta^{14}\text{N}$ preferentially excreted?, *J. Archaeol. Sci.* **30**, 1649 (2003).

- [43] De Laeter, J.R., De Bièvre, P., Peiser, H.S., Isotope mass spectrometry in metrology, *Mass Spectrom. Rev.* **11**, 193 (1992).
- [44] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 178/2002 do Parlamento Europeu do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 31 p 1 (01.02.2002).
- [45] Mcnaught, A.D., Wilkinson, A., *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Blackwell Science, Cambridge, 2nd ed. (1997).
- [46] Sharp, Z., *Principles of Stable Isotope Geochemistry*, Pearson Prentice Hall, New Jersey, 1st ed. (2007).
- [47] Craig, H., Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochim. Cosmochim. Acta* **12**, 133 (1957).
- [48] McLafferty, F.W., Turecek, F., *Interpretation of Mass Spectra*, Univeristy Science Books, Mill Valley, CA, 4th ed. (1993).
- [49] Preston, T., The measurement of stable isotope natural abundance variations, *Plant, Cell and Environment* **15**, 1091 (1992).
- [50] Brenna, J.T., Corso, T.N., Tobias, H.J., Calmi, R.J., High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry., *Mass Spectrometry Reviews* **16**, 227 (1997).
- [51] Brand, W.A., Mass spectrometer hardware for analyzing stable isotope ratios, in P.A. de Groot (ed.), *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*, volume I, cap. 38, pp 835–858, Elsevier Science B. V., Amsterdam (2004).
- [52] Preston, T., Barrie, A., Recent progress in continuous flow isotope ratio mass spectrometry, *International Laboratory* 31 (1991).
- [53] Merren, T., Application of an electrostatic filter for the measurement of hydrogen isotopes in continuous flow mode irms, Technical Brief TB4, Micromass (2000).
- [54] Unterzaucher, J., Die mikroanalytische bestimmung des sauerstoffes, *Chemische Berichte* **73**, 391 (1940).
- [55] Werner, R.A., The online $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ analysis: development and application, *Isotopes Environ. Health Stud.* **39**, 85 (2003).
- [56] Guillou, C., Lipp, M., Radovic, B., Reniero, F., Schmidt, M., Anklam, E., Use of pyrolysis-mass spectrometry in food analysis: applications in the food analysis laboratory of the European Commissions Joint Research Center, *J. Anal. Appl. Pyrol.* **49**, 329 (1999).

- [57] Sessions, A.L., Isotope-ratio detection for gas chromatography, *J. Sep. Sci.* **29**, 1946 (2006).
- [58] Brand, W.A., High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **31**, 225 (1996).
- [59] Schmidt, H.L., Butzenlechner, M., Rossmann, A., Schwarz, S., Kexel, H., Kempe, K., Inter- and intramolecular isotope correlations in organic compounds as a criterion for authenticity identification and origin assignment, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **196**, 105 (1993).
- [60] Hener, U., Brand, W.A., Hilker, A.W., Juchelka, D., Mosandl, A., Podebrad, F., Simultaneous on-line pyrolysis of $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of organic compounds using GC-pyrolysis-IRMS, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **206**, 230 (1998).
- [61] Hor, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., Flavour authenticity studies by $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio determination using on-line gas-chromatography pyrolysis isotope ratio mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 21 (2001).
- [62] Breas, O., Fourel, F., Martin, G., $\delta^{13}\text{C}$ Analysis of aromas and perfumes by a coupled GC-IRMS technique. The case of vanillin and leaf alcohol extracts, *Analisis* **22**, 268 (1994).
- [63] Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A., GC/IRMS analysis of Mandarin essential oils. 1. $\delta^{13}\text{C}_{PDB}$ and $\delta^{15}\text{N}_{AIR}$ values of methyl *N*-methylantranilate, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2579 (1997).
- [64] Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A., GC/IRMS analysis of Mandarin essential oils. 2. $\delta^{13}\text{C}_{(PDB)}$ values of characteristic flavor components, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4719 (1997).
- [65] Krueger, D.A., Krueger, H.W., Carbon isotopes in vanillin and the detection of falsified "natural" vanillin, *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1265 (1983).
- [66] Krueger, D.A., Krueger, H.W., Detection of fraudulent vanillin labeled with $\delta^{13}\text{C}$ in the carbonyl carbon., *J. Agric. Food Chem.* **33**, 323 (1985).
- [67] Bricout, J., Fontes, J.C., Merlivat, L., Detection of synthetic vanillin in vanilla extracts by isotopic analysis, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**, 713 (1974).
- [68] Guarino, P.A., Isolation of vanillin from vanilla extract for stable isotope ratio analysis: interlaboratory study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**, 835 (1982).
- [69] Riley, K.A., Kleyn, D.H., Fundamental principles of vanilla/vanilla extract processing and methods of detecting adulteration in vanilla extracts, *Food Technol.* **43**, 64 (1989).
- [70] Hoffman, P.G., Salb, M., Isolation and stable isotope ratio analysis of vanillin, *J. Agric. Food Chem.* **27**, 352 (1979).

- [71] Dennis, M.J., Wilson, P., Kelly, S., Parker, I., The use of pyrolytic techniques to estimate site specific isotope data of vanillin, *J. Anal. Appl. Pyrol.* **47**, 95 (1998).
- [72] McRae, C., Love, G.D., Murray, I.P., Snape, C.E., Fallick, A.E., Potential of gas chromatography isotope ratio mass spectrometry to source Polycyclic Aromatic Hydrocarbon emissions, *Analytical Communications* **33**, 331 (1996).
- [73] Philp, R.P., The emergence of stable isotopes in environmental and forensic geochemistry studies: a review, *Environ. Chem. Lett.* **5**, 57 (2007).
- [74] Mason, P.M., Hall, S.E., Gilmour, I., Houghton, E., Pillinger, C., Seymour, M.A., The use of stable carbon isotope analysis to detect the abuse of testosterone in cattle, *Analyst* **123**, 2405 (1998).
- [75] Balizs, G., Jainz, A., Horvatovich, P., Investigation of the feeding effect on the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio of the hormones in bovine urine using gas chromatography/combustion isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **1067**, 323 (2005).
- [76] Ferchaud, V., Bizec, B.L., Monteau, F., Andre, F., Characterization of exogenous testosterone in livestock by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry: influence of feeding and age, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 652 (2000).
- [77] Buisson, C., Hebestreit, M., Weigert, A.P., Heinrich, K., Fry, H., Flenker, U., Banneke, S., Prevost, S., Andre, F., Schaenzer, W., Houghton, E., Le Bizec, B., Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17β -estradiol administration to cattle, *J. Chromatogr. A* **1093**, 69 (2005).
- [78] Aguilera, R., Becchi, M., Mateus, L., Popot, M.A., Bonnaire, Y., Casabianca, H., Hatton, C.K., Detection of exogenous hydrocortisone in horse urine by gas chromatography combustion carbon isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* **702**, 85 (1997).
- [79] Rieley, G., Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: identification of isotope fractionation processes, *Analyst* **119**, 915 (1994).
- [80] Hofmann, D., Gehre, M., Jung, K., Sample preparation techniques for the determination of natural $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ variation in amino acids by gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS), *Isotopes Environ. Health Stud.* **39**, 233 (2003).
- [81] Glaser, B., Amelung, W., Determination of ^{13}C natural abundance of amino acid enantiomers in soil: methodological considerations and first results, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 891 (2002).
- [82] Glaser, B., Compound-specific stable-isotope ($\delta^{13}\text{C}$) analysis in soil science, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **168**, 633 (2005).

- [83] Docherty, G., Jones, V., Evershed, R.P., Practical theoretical considerations in the gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry $\delta^{13}\text{C}$ analysis of small polyfunctional compounds, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 730 (2001).
- [84] Preston, C., Richling, E., Elss, S., Appel, M., Heckel, F., Hartlieb, A., Schreier, P., On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of pineapple (*Ananas comosus L. Merr.*) volatiles, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 8027 (2003).
- [85] Spangenberg, J.E., Macko, S.A., Hunziker, J., Characterization of olive oil by carbon isotope analysis of individual fatty acids: implications for authentication, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4179 (1998).
- [86] Angerosa, F., Bréas, O., Contento, S., Guillou, C., Reniero, F., Sada, E., Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1013 (1999).
- [87] Bauer-Christoph, C., Christoph, N., Aguilar-Cisneros, B., López, M.G., Richling, E., Rossmann, A., Schreier, P., Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses, *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 438 (2003).
- [88] Aguilar-Cisneros, B., Lopez, M., Richling, E., Heckel, F., Schreier, P., Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7520 (2002).
- [89] Jung, J., Jaufmann, T., Hener, U., Munch, A., Kreck, M., Dietrich, H., Mosandl, A., Progress in wine authentication: GC-C/P-IRMS measurements of glycerol and GC analysis of 2,3-butanediol stereoisomers, *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 811 (2006).
- [90] Calderone, G., Naulet, N., Guillou, C., Reniero, F., Cortes, A.I.B., Analysis of the ^{13}C natural abundance of CO_2 gas from sparkling drinks by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 701 (2005).
- [91] Calderone, G., Guillou, C., Reniero, F., Naulet, N., Helping to authenticate sparkling drinks with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *Food Res. Int.* **40**, 324 (2007).
- [92] Parker, I.G., Kelly, S.D., Sharman, M., Dennis, M.J., Howie, D., Investigation into the use of carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of Scotch whisky congeners to establish brand authenticity using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry, *Food Chem.* **63**, 423 (1998).
- [93] Kelly, S., Parker, I., Sharman, M., Dennis, J., Goodall, I., Assessing the authenticity of single seed vegetable oils using fatty acid stable carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), *Food Chem.* **59**, 181 (1997).

- [94] Woodbury, S.E., Evershed, R.P., Rossell, J.B., $\delta^{13}\text{C}$ analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis, *J. Chromatogr. A* **805**, 249 (1998).
- [95] Cohn, M., Urey, H.C., Oxygen exchange reactions of organic compounds and water, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 679 (1938).
- [96] Epstein, S., Mayeda, T., Variation of ^{18}O content of water from natural sources, *Geochim. Cosmochim. Acta* **4**, 213 (1953).
- [97] O'Neil, J.R., Adami, L.H., Epstein, S., Revised value for the ^{18}O fractionation between H_2O and CO_2 at 25 °C, *J. Res. U.S. Geol. Surv.* **3**, 623 (1975).
- [98] Gonfiantini, R., The δ -notation and the mass spectrometric techniques, in J.R. Gat, R. Gonfiantini (eds.), *Stable Isotope Hydrology. Deuterium and Oxygen-18 in the Water Cycle*, cap. 4, pp 35–84, IAEA, Vienna (1981).
- [99] Santrock, J., Studley, S.A., Hayes, J.M., Isotopic analyses based on the mass spectrum of carbon dioxide, *Anal. Chem.* **57**, 1444 (1985).
- [100] McKinney, C.R., McRea, J.M., Epstein, S., Allen, H.A., Urey, H.C., Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios, *Rev. Sci. Instrum.* **21**, 724 (1950).
- [101] Verkouteren, R.M., Lee, J.N., Web-based interactive data processing: application to stable isotope metrology, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **370**, 803 (2001).
- [102] Tsivou, M., Kioukia-Fougia, N., Lyris, E., Aggelis, Y., Fragkaki, A., Kiouisi, X., Simitsek, P., Dimopoulou, H., Leontiou, I.P., Stamou, M., Spyridaki, M.H., Georgakopoulos, C., An overview of the doping control analysis during the Olympic Games of 2004 in Athens, Greece, *Anal. Chim. Acta* **555**, 1 (2006).
- [103] Ehleringer, J.R., Casale, J.F., Lott, M.J., Ford, V.L., Tracing the geographical origin of cocaine, *Nature* **408**, 311 (2000).
- [104] Ehleringer, J.R., Cooper, D.A., Lott, M.J., Cook, C.S., Geo-location of heroin and cocaine by stable isotope ratios, *Forensic Sci. Int.* **106**, 27 (1999).
- [105] Palhol, F., Lamoureux, C., Chabrilat, M., Naulet, N., $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopic ratio and statistical analysis: an efficient way of linking seized Ecstasy tablets, *Anal. Chim. Acta* **510**, 1 (2004).
- [106] Billault, I., Courant, F., Pasquereau, L., Derrien, S., Robins, R.J., Naulet, N., Correlation between the synthetic origin of methamphetamine samples and their $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ stable isotope ratios, *Anal. Chim. Acta* **593**, 20 (2007).

- [107] Lichtfouse, E., Compound-specific isotope analysis. Application to archaeology, biomedical sciences, biosynthesis, environment, extraterrestrial chemistry, food science, humic substances, microbiology, organic geochemistry, soil science and sport., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1337 (2000).
- [108] Martin, M.L., Martin, G.J., Guillou, C., A site-specific and multi-element isotopic approach to origin inference of sugars in foods and beverages, *Mikrochim. Acta* **II**, 81 (1991).
- [109] Dennis, M.J., Recent developments in food authentication, *Analyst* **123**, 151R (1998).
- [110] Kohn, M.J., Law, J.M., Stable isotope chemistry of fossil bone as a new paleoclimate indicator, *Geochim. Cosmochim. Acta* **70**, 931 (2006).
- [111] Fouillac, A.M., Cocherie, A., Girard, J.P., Guerrot, C., Innocent, C., Millot, R., Motelica, M., Sanjuan, B., Widory, D., Traceurs isotopiques : sources et processus, *Oil Gas Sci. Technol.* **60**, 923 (2005).
- [112] Bowen, G.J., Wilkinson, B., Spatial distribution of $\delta^{18}\text{O}$ in meteoric precipitation, *Geology* **30**, 315 (2002).
- [113] Manga, M., Using springs to study groundwater flow and active geologic processes, *Annu. Rev. Earth. Planet. Sci.* **29**, 201 (2001).
- [114] Benson, S., Lennard, C., Maynard, P., Roux, C., Forensic applications of isotope ratio mass spectrometry - A review, *Forensic Sci. Int.* **157**, 1 (2006).
- [115] Mottram, H.R., Dudd, S.N., Lawrence, G.J., Stott, A.W., Evershed, R.P., New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery, *J. Chromatogr. A* **833**, 209 (1999).
- [116] Sharp, Z.D., Atudorei, V., Panarello, H.O., Fernández, J., Douthitt, C., Hydrogen isotope systematics of hair: archeological and forensic applications, *J. Archaeol. Sci.* **30**, 1709 (2003).
- [117] Vitòria, L., Otero, N., Soler, A., Canals, A., Fertilizer characterization: isotope data (N, S, O, C and Sr), *Environ. Sci. Technol.* **38**, 3254 (2004).
- [118] Zimnoch, M., Florkowski, T., Necki, J.M., Neubert, R.E.M., Diurnal variability of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of atmospheric CO_2 in the urban atmosphere of Kraków, Poland, *Isotopes Environ. Health Stud.* **40**, 129 (2004).
- [119] Fairweather-Tait, S.J., Dainty, J., Use of stable isotopes to assess the bioavailability of trace elements: a review, *Food Addit. Contam.* **19**, 939 (2002).
- [120] Peterson, B.J., Fry, B., Stable isotopes in ecosystem studies, *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 293 (1987).

- [121] Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P., Stable isotopes in plant ecology, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**, 507 (2002).
- [122] Howland, M.R., Corr, L.T., Young, S.M.M., Jones, V., Jim, S., Van der Merwe, N.J., Mitchell, A.D., Evershed, R.P., Expression of the dietary isotope signal in the compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ values of pig bone lipids and amino acids, *Int. J. Osteoarchaeol.* **13**, 54 (2003).
- [123] Jasper, J.P., Nasr, M., Buhse, L., Westenberger, B., Spencer, J., Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients, *Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry. Newsletter - The network developing forensic applications of stable isotope mass spectrometry* **1**, 4 (2003).
- [124] Thompson, D.R., Bury, S.J., Hobson, K.A., Wassenaar, L.I., Shannon, J.P., Stable isotopes in ecological studies, *Oecologia* **144**, 517 (2005).
- [125] Yoneyama, T., Ito, O., Engelaar, W.M.H.G., Uptake, metabolism and distribution of nitrogen in crop plants traced by enriched and natural ^{15}N : Progress over the last 30 years, *Phytochemistry Rev.* **2**, 121 (2003).
- [126] Gleixner, G., Danier, H.J., Werner, R.A., Schmidt, H.L., Correlations between the C-13 content of primary and secondary plant-products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes, *Plant Physiol.* **102**, 1287 (1993).
- [127] Renou, J.P., Deponge, C., Gachon, P., Bonnefoy, J.C., Coulon, B., Garel, J.P., Vérité, R., Ritz, P., Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk, *Food Chem.* **85**, 63 (2004).
- [128] Ayliffe, L.K., Cerling, T.E., Robinson, T., West, A.G., Sponheimer, M., Passey, B.H., Hammer, J., Roeder, B., Dearing, D., Ehleringer, J.R., Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath CO_2 of horses fed an isotopically varied diet, *Oecologia* **139**, 11 (2004).
- [129] Focken, U., Feeding fish with diets of different ratios of C3- and C4-plant-derived ingredients: a laboratory analysis with implications for the back-calculation of diet from stable isotope, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2087 (2004).
- [130] DeNiro, M.J., Epstein, S., Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals, *Geochim. Cosmochim. Acta* **42**, 495 (1978).
- [131] Manca, G., Franco, M. A. Versini, G., Camin, F., Rossmann, A., Tola, A., Correlation between multielement isotope ratio and geographical origin of Peretta cow's milk cheese, *J. Dairy Sci.* **89**, 831 (2006).
- [132] Crittenden, R.G., Andrew, A.S., LeFournour, M., Young, M.D., Middleton, H., Stockmann, R., Determining the geographic origin of milk in Australasia using multi-element stable isotope ratio analysis, *Int. Dairy J.* **17**, 421 (2007).

- [133] Kornexl, B.E., Werner, T., Rossmann, A., Schmidt, H.L., Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients - a possible tool for origin assignment and quality control, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**, 19 (1997).
- [134] Rossmann, A., Heberhauer, G., Hoelz, S., Horn, P., Pichlmayer, F., Voerkelius, S., The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter, *Eur. Food Res. Technol.* **211**, 32 (2000).
- [135] Rossmann, A., Versini, G., Pichlmayer, F., Lamprecht, G., Origin of assignment of milk from alpine regions by multielement stable isotope ratio analysis (SIRA), *La Rivista di Scienza dell' Alimentazione* **anno27**, 9 (1998).
- [136] Manca, G., Camin, F., Coloru, G.C., Del Caro, A., Depentori, D., Franco, M.A., Characterization of the geographical origin of Pecorino sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) and $^{15}\text{C}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid ratios, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1404 (2001).
- [137] Ulberth, F., Analytical approaches for food authentication, *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.* **95**, 561 (2004).
- [138] Comissão Europeia, Regulamento (CEE) N° 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro de 1990 que determina os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 272 p 1 (03.10.1990).
- [139] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 440/2003 da Comissão de 10 de Março de 2003 que altera o Regulamento (CE) N° 2676/90 que determina os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho, Anexo II - Determinação por espectrometria de massa isotópica da razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ do etanol do vinho ou do etanol obtido por fermentação de mostos de uvas, de mostos de uvas concentrados ou de mostos de uvas concentrados e rectificadas, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 66 p 15 (11.03.2003).
- [140] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 822/97 da Comissão de 06 de Maio de 1997 que altera o Regulamento (CE) N° 2676/90 que determina os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho - Anexo 43. Determinação da razão isotópica $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ da água dos vinhos, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 117 p 10 (07.05.97).
- [141] Guillou, C., Reniero, F., Serrini, G., A review of the European Wine Data Bank (1995), documento não publicado.
- [142] Bréas, O., Reniero, F., Serrini, G., Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8**, 967 (1994).
- [143] Rossmann, A., Schmidt, H.L., Reniero, F., Versini, G., Moussa, I., Merle, M.H., Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **203**, 293 (1996).

- [144] Ogrinc, N., Kosir, J.E., Spangenberg, J.E., Kidric, J., The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review, *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 424 (2003).
- [145] Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-San José, M.L., Boger, Z., Comparative study of artificial neural network and multivariate methods to classify Spanish DO rose wines, *Talanta* **62**, 983 (2004).
- [146] Rossmann, A., Christoph, N., Voerkelius, S., Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope and meteorological data, data banks and statistical tests. Part 1: Wines from Franconia and Lake Constance 1992 to 2001, *Mitt. Klosterneuburg* **53**, 23 (2003).
- [147] Martin, G.J., Guillou, C., Martin, M.L., Cabanis, M.T., Tep, Y., Aerny, J., Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines, *J. Agric. Food Chem.* **36**, 316 (1988).
- [148] Kosir, I.J., Kocjancic, M., Ogric, N., Kidric, J., Use of SNIF-NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalisation and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines), *Anal. Chim. Acta* **429**, 195 (2001).
- [149] Weber, D., Rossmann, A., Schwarz, S., Schmidt, H.L., Correlations of carbon isotope ratios of wine ingredients for the improved detection of adulterations .1. organic acids and ethanol, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **205**, 158 (1997).
- [150] Latorre, M.J., Garciajares, C., Medina, B., Herrero, C., Pattern-recognition analysis applied to classification of wines from Galicia (Northwestern Spain) with certified brand of origin, *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1451 (1994).
- [151] Dunbar, J., Use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wines, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **311**, 578 (1982).
- [152] Day, M.P., Zhang, B., Martin, G.J., Determination of the geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotope composition. II- Diferentiation of the principal product zones in France for the 1990 vintage, *J. Sci. Food Agric.* **67**, 113 (1995).
- [153] Calderone, G., Guillou, C., Analysis of isotopic ratios for the detection of illegal watering of beverages, *Food Chem.* **106**, 1399 (2008).
- [154] Martin, G.J., The chemistry of chaptalization, *Endeavour* **14**, 137 (1990).
- [155] Versini, G., Camin, F., Ramponi, M., Dellacassa, E., Stable isotope analysis grape product: $\delta^{13}\text{C}$ - based internal standardisation methods to improve the detection of some types of adulterations, *Anal. Chim. Acta* **563**, 325 (2006).

- [156] Rossmann, A., Reniero, F., Moussa, I., Schmidt, H.L., Versini, G., Merle, M.H., Stable oxygen isotope content of water of EU data-bank wines from Italy, France and Germany, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **208**, 400 (1999).
- [157] Calderone, G., Naulet, N., Guillou, C., Reniero, F., Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5902 (2004).
- [158] Weber, D., Kexel, H., Schmidt, H.L., ¹³C-Pattern of natural glycerol: origin and practical importance, *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2042 (1997).
- [159] Fronza, G., Fuganti, C., Grasselli, P., Reniero, F., Guillou, C., Breas, O., Sada, E., Rossmann, A., Hermann, A., Determination of the $\delta^{13}\text{C}$ content of glycerol samples of different origin, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 477 (1998).
- [160] Ishida-Fuji, K., Goto, S., Uemura, R., Yamada, K., Sato, M., Yoshida, N., Botanical and geographical origin identification of industrial ethanol by stable isotope analyses of C, H, and O, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 2193 (2005).
- [161] Krueger, D.A., Krueger, H.W., Isotopic composition of carbon in vinegars, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 449 (1985).
- [162] Remaud, G., Guillou, C., Vallet, C., Martin, G.J., A coupled NMR and MS isotopic method for the authentication of natural vinegars, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **342**, 457 (1992).
- [163] Martin, G., Remaud, G., Isotopic methods for control of natural flavours authenticity, *Flavour Fragr. J.* **8**, 97 (1993).
- [164] Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Rossmann, A., Adam, L., Assignment of raw material and authentication of spirits by gas chromatography, hydrogen- and carbon-isotope ratio measurements .1. Analytical methods and results of a study of commercial products, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **204**, 445 (1997).
- [165] Brooks, J.R., Buchmann, N., Phillips, S., Ehleringer, B., Evans, R.D., Lott, M., Martinelli, L.A., Pockman, W.T., Sandquist, D., Sparks, J.P., Sperry, L., Williams, D., Ehleringer, J.R., Heavy and light beer: a carbon approach to detect C₄ carbon in beers of different origins, styles, and prices, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6413 (2002).
- [166] Koziat, J., Rossmann, A., Martin, G.J., Ashurst, P.R., Determination of C-13 content of sugars of fruit and vegetable juices - A European inter-laboratory comparison, *Anal. Chim. Acta* **271**, 31 (1993).
- [167] Jamin, E., Guerin, R., Retif, M., Lees, M., Martin, G.J., Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5202 (2003).

- [168] Yunianta, B.L.Z., Lees, M., Martin, G.J., Stable-isotope fractionation in fruit juice concentrates - application to the authentication of grape and orange products, *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2411 (1995).
- [169] Kelly, S., Rhodes, C., Lofthouse, D.A., Burwood, C.E., Dennis, J., Detection of sugar syrups in apple juice by $\delta^2\text{H} \text{‰}$ $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ analysis of hexamethylenetetramine prepared from fructose, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1801 (2003).
- [170] Padovan, G.J., De Jong, D., Rodrigues, L.P., Marchini, J.S., Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio, *Food Chem.* **82**, 633 (2003).
- [171] Anklam, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, *Food Chem.* **63**, 549 (1998).
- [172] Radovic, B.S., Goddacre, R., Anklam, E., Contribution of pyrolysis-mass spectrometry (Py-MS) to authenticity testing of honey, *J. Anal. Appl. Pyrol.* **60**, 79 (2001).
- [173] Weinert, B., Ulrich, M., Mosandl, A., GC-IRMS analysis of black Ceylon, Assam and Darjeeling teas, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* **208**, 277 (1999).
- [174] Serra, F., Guillou, C., Reniero, F., Ballarin, L., Cantagallo, M.I., Wieser, M., Iyer, S.S., Heberger, K., Vanhaecke, F., Determination of the geographical origin of green coffee by principal component analysis of carbon, nitrogen and boron stable isotope ratios, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2111 (2005).
- [175] Kelly, S., Baxter, M., Chapman, S., Rhodes, C., Dennis, J., Brereton, P., The application of isotopic and elemental analysis to determine the geographical origin of premium long grain rice, *Eur. Food Res. Technol.* **214**, 72 (2002).
- [176] Suzuki, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Ohkouchi, N., Korenaga, T., Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses, *Food Chem.* **109**, 470 (2008).
- [177] Serra, F., Reniero, F., Guillou, C.G., Moreno, J.M., Marinas, J.M., Vanhaecke, F., $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ isotopic analysis to determine the origin of *L*-tartaric acid, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1227 (2005).
- [178] Ritz, P., Gachon, P., Garel, J.P., Bonnefoy, J.C., Coulon, J.B., Renou, J.P., Milk characterization: effect of the breed, *Food Chem.* **91**, 521 (2005).
- [179] Brescia, M.A., Monfreda, M., Buccolieri, A., Carrino, C., Characterization of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations, *Food Chem.* **89**, 139 (2005).
- [180] Camin, F., Wietzerbin, K., Cortes, A.I.B., Haberhauer, G., Lee, M., Versini, G., Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, Italian, and Spanish cheeses, *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6592 (2004).

- [181] Boner, M., Forstel, H., Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 301 (2004).
- [182] Bahar, B., Monahan, F.J., Moloney, A.P., O'Kiely, P., Scrimgeour, C.M., Schmidt, O., Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 1937 (2005).
- [183] Schmidt, O., Quilter, J.M., Bahar, B., Moloney, A.P., Scrimgeour, C.M., Begley, I.S., Monahan, F.J., Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis, *Food Chem.* **91**, 545 (2005).
- [184] Renou, J.P., Bielicki, G., Deponge, C., Gachon, P., Micol, D., Ritz, P., Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II: Beef meat, *Food Chem.* **86**, 251 (2004).
- [185] Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., Versini, G., Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat, *Meat Sci.* **64**, 239 (2003).
- [186] Nakashita, R., Suzuki, Y., Akamatsu, F., Iizumi, Y., Korenaga, T., Chikaraishi, Y., Stable carbon, nitrogen, and oxygen isotope analysis as a potential tool for verifying geographical origin of beef, *Anal. Chim. Acta* **617**, 148 (2008).
- [187] Heaton, K., Kelly, S.D., Hoogewerff, J., Woolfe, M., Verifying the geographical origin of beef: the application of multi-element isotope and trace element analysis, *Food Chem.* **107**, 506 (2008).
- [188] Coutinho, R., Carreira, P.M., Almeida, C., Soares, A.M.M., Vieira, M.C.R., Carvalho, M.R., Cruz, J.V., Estudo isotópico dos sistemas aquíferos do Maciço das Sete Cidades, S. Miguel - resultados preliminares, *Recursos Hídricos* **17**, 25 (1996).
- [189] Bahar, B., Schmidt, O., Moloney, A.P., Scrimgeour, C.M., Begley, I.S., Monahan, F.J., Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef, *Food Chem.* **106**, 1299 (2008).
- [190] Trueman, C.N., McGill, R.A.R., Guyard, P.H., The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with atlantic salmon (*Salmo salar*), *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3239 (2005).
- [191] Gaye-Siessegger, J., Focken, U., Muetzel, S., Abel, H., Becker, K., Feeding level and individual metabolic rate affect $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values in carp: implications for food web studies, *Oecologia* **138**, 175 (2004).
- [192] Rossmann, A., Determination of stable isotope ratios in food analysis, *Food Rev. Int.* **17**, 347 (2001).

- [193] Ghidini, S., Ianieri, A., Zanardi, E., Conter, M., Boschetti, T., P., I., Bracchi, P.G., Stable isotope determination in food authentication: a review, *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* **XXVI**, 193 (2006).
- [194] Karoui, R., De Baerdemaeker, J., A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products, *Food Chem.* **102**, 621 (2007).
- [195] Kelly, S., Heaton, K., Hoogewerff, J., Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis, *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 555 (2005).
- [196] Cordella, C., Moussa, I., Martel, A.C., Sbirrazzuoli, N., Lizzani-Cuvelier, L., Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1751 (2002).
- [197] Rozansky, K., Froehlich, K., Mook, W.G., Surface water, in W.G. Mook (ed.), *Environmental Isotopes in the Hydrological Cycle. Principles and Applications*, volume III, UNESCO/IAEA (2001).
- [198] Ghosh, P., Brand, W.A., Stable isotope ratio mass spectrometry in global climate change research. Review, *Int. J. Mass Spectrom.* **228**, 1 (2003).
- [199] Aires-Barros, L., Marques, J.M., Graça, R.C., Matias, M.J., Van Der Weijden, C.H., Kreulen, R., Eggenkamp, H.G.M., Hot and cold CO₂-rich mineral waters in Chaves geothermal area (Northern Portugal), *Geothermics* **27**, 89 (1998).
- [200] Chamberlain, C.P., Blum, J.D., Holmes, R.T., Feng, X.H., Sherry, T.W., Graves, G.R., The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds, *Oecologia* **109**, 132 (1997).
- [201] Hobson, K.A., Bowen, G.J., Wassenaar, L.I., Ferrand, Y., Lormee, H., Using stable hydrogen and oxygen isotope measurements of feathers to infer geographical origins of migrating European birds, *Oecologia* **141**, 477 (2004).
- [202] Yohannes, E., Hobson, K.A., Pearson, D.J., Wassenaar, L.I., Stable isotope analyses of feathers help identify autumn stopover sites of three long-distance migrants in Northeastern Africa, *J. Avian Biol.* **36**, 235 (2005).
- [203] Hobson, K.A., Using stable isotopes to trace long-distance dispersal in birds and other taxa, *Diversity and Distributions* **11**, 157 (2005).
- [204] Hobson, K.A., Reconstructing avian diets using stable-carbon and nitrogen isotope analysis of egg components: patterns of isotopic fractionation and turnover, *The Condor* **97**, 752 (1995).
- [205] O'Brien, D.M., Wooller, M.J., Tracking human travel using stable oxygen and hydrogen isotope analysis of hair and urine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2422 (2007).

- [206] Schwertl, M., Auerswald, K., Schnyder, H., Reconstruction of the isotopic history of animal diets by hair segmental analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 1312 (2003).
- [207] Kohn, M.J., Schoeninger, M.J., Valley, J.W., Herbivore tooth oxygen isotope compositions: effects of diet and physiology, *Geochim. Cosmochim. Acta* **60**, 3889 (1996).
- [208] Bol, R., Pflieger, C., Stable isotope (^{13}C , ^{15}N and ^{34}S) analysis of the hair of modern humans and their domestic animals, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 2195 (2002).
- [209] Schwertl, M., Auerswald, K., Schaufele, R., Schnyder, H., Carbon and nitrogen stable isotope composition of cattle hair: ecological fingerprints of production systems?, *Agric. Ecosyst. Environ.* **109**, 153 (2005).
- [210] Cerling, T.E., Wittemeyer, G., Rasmussen, H.B., Vollrath, F., Cerling, C.E., Robinson, T.J., Douglas-Hamilton, I., Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 371 (2006).
- [211] Nardoto, G.B., Silva, S., Kendall, C., Ehleringer, J.R., Chesson, L.A., Ferraz, E.S.B., Moreira, M.Z., Ometto, J.P.H.B., Martinelli, L.A., Geographical patterns of human diet derived from stable-isotope analysis of fingernails, *Am. J. Phys. Anthropol.* **131**, 137 (2006).
- [212] McCarthy, I.D., Waldron, S., Identifying migratory *Salmo trutta* using carbon and nitrogen stable isotope ratios, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1325 (2000).
- [213] Schmidt, T.C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., Meckenstock, R.U., Haderlein, S.B., Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges, *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 283 (2004).
- [214] Kim, M., Kennicutt II, M.C., Qian, Y., Source characterization using compound composition and stable isotope ratio of PAHs in sediments from lakes, harbor, and shipping waterway, *Sci. Total Environ.* **389**, 367 (2008).
- [215] Kim, M., Kennicutt II, M.C., Qian, Y., Molecular and stable carbon isotopic characterization of PAH contaminants at McMurdo Station, Antarctica, *Mar. Pollut. Bull.* **52**, 1585 (2006).
- [216] Vetter, W., Gaul, S., Armbruster, W., Stable carbon isotope ratios of POPs - a tracer that can lead to the origins of pollution, *Environ. Int.* **34**, 357 (2008).
- [217] Parente, F., Porro, G.B., The ^{13}C -urea breath test for non-invasive diagnosis of helicobacter pylory infection: which procedure and which measurement equipment?, *Eur. J. Gastroen. Hepat.* **13**, 803 (2001).
- [218] Cook, E., Kairiukstis, L., *Methods of Dendrochronology*, Kluwer Academic, Dordrecht (1990).

- [219] Ehleringer, J., Forensic applications of stable isotope analysis, *Forensic Isotope Ratio Mass Spectrometry. Newsletter - The network developing forensic applications of stable isotope mass spectrometry* **2**, 4 (2005).
- [220] Stanimirova, I., Daszykowski, M., Van Gyseghem, E., Bensaid, F.F., Lees, M., Smeyers-Verbeke, J., Massart, D.L., Vander Heyden, Y., Chemometrical exploration of an isotope ratio data set of acetylsalicylic acid, *Anal. Chim. Acta* **552**, 1 (2005).
- [221] Jasper, J.P., Weaner, L.E., Duffy, B.J., A preliminary multi-stable-isotopic evaluation of three synthetic pathways of topiramate, *J. Pharmaceut. Biomed.* **39**, 66 (2005).
- [222] Prese, B., Barlet, N., Loiseau, G., Montet, D., Review of the current methods of analytical traceability allowing determination of the origin of foodstuffs, *Food Control* **18**, 228 (2007).
- [223] Arvanitoyannis, I.S., Katsota, M.N., Psarra, E.P., Soufleros, E.H., Kallithraka, S., Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of a multivariate analysis (chemometrics). Review, *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 321 (1999).
- [224] Krueger, H.W., Reesman, R.H., Carbon isotope analyses in food technology, *Mass Spectrom. Rev.* **1**, 205 (1982).
- [225] Reid, L.M., O'Donnell, C.P., Downey, G., Recent technological advances for the determination of food authenticity. Review, *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 344 (2006).
- [226] Luykx, D.M.A., van Ruth, S.M., An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products, *Food Chem.* **107**, 897 (2008).
- [227] Huang, H., Yu, H., Xu, H., Ying, Y., Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review, *J. Food Eng.* **87**, 303 (2008).
- [228] Pontes, M.J.C., Santos, S.R.B., Araujo, M.C.U., Almeida, L.F., Lima, R.A.C., Gaião, E.N., Souto, U.T.C.P., Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectrometry, *Food Res. Int.* **39**, 182 (2006).
- [229] Gil, L.A., PCR-based methods for fish and fishery products authentication, *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 558 (2007).
- [230] Esler, M.B., Griffith, D.W., Wilson, S.R., Steele, L.P., Precision trace gas analysis by FT-IR spectroscopy. 2. The isotope $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of CO_2 , *Anal. Chem.* **72**, 216 (2000).
- [231] Esler, M.B., Griffith, D.W.T., Turatti, F., Wilson, S.R., Rahn, T., Zhang, H., NO_2 Concentration and flux measurements and complete isotopic analysis by FTIR spectroscopy, *Chemosphere* **2**, 445 (2000).
- [232] Haisch, M., Hering, P., Schadewaldt, P., Braden, H., Koletzko, S., Steffen, C., Bio-medical application of an isotope selective Nondispersive Infrared Spectrometer for $^{13}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$ concentrations measurements in breath samples, *Isotope Environ. Health Stud.* **30**, 253 (1994).

- [233] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 2081/92 do Conselho de 14 de Julho de 1992 relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 208 p 1 (24.07.92).
- [234] <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/66479E/66479E16.htm> (consultado em 26/05/2006).
- [235] http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp (consultado em 13/07/2006).
- [236] <http://www.fao.org/docrep/007/y5419e/y5419e00.htm> (consultado em 14/03/2008).
- [237] Comissão Europeia, Directiva 2001/54/CE da Comissão de 11 de Julho de 2001 que revoga a Directiva 79/1066/CEE que determina os métodos de análise comunitários para o controlo dos extractos de café e dos extractos de chicória, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 191 p 42 (13.7.2001).
- [238] Comissão Europeia, Regulamento (CEE) N° 2348/91 que estabelece um banco de dados dos resultados da análise de produtos do vinho por ressonância magnética nuclear do deutério, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 214 p 39 (02.08.1991).
- [239] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 1410/2003 da Comissão, de 7 de Agosto de 2003 que altera o Regulamento (CE) N° 1622/2000 que estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) N° 1493/1999 do Conselho que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, e constitui um código comunitário das práticas e tratamentos enológicos, *Jornal Oficial da União Europeia*, L 201 p 9 (08.08.2003).
- [240] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 1622/2000 da Comissão de 24 de Julho de 2000 que estabelece determinadas normas de execução do Regulamento (CE) N° 1493/1999, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, e constitui um código comunitário das práticas e tratamentos enológicos, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 194 p 1 (31.7.2000).
- [241] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 1493/1999 do Conselho de 17 de Maio de 1999 que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 179 p 1 (14.7.1999).
- [242] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 2152/200 da Comissão de 31 de Outubro que altera o Regulamento (CE) N° 2185/98 relativo às normas comerciais para o azeite, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 288 p 36 (01.11.2001).
- [243] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 455/2001 da Comissão de 6 de Março de 2001 que altera o Regulamento (CEE) N° 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como os métodos de análise relacionados., *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 65 p 9 (07.03.2001).

- [244] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 213/2001 da Comissão de 9 de Janeiro de 2001 que estabelece as normas de execução do Regulamento (CE) N° 1255/1999, no que respeita aos métodos a utilizar para a análise e a avaliação da qualidade do leite e dos produtos lácteos e, altera os Regulamentos (CE) N° 2771/1999 e (CE) N° 2799/1999., *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 37 p 1 (07.02.2001).
- [245] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 2491/2001 da Comissão de 19 de Dezembro de 2001 que altera o Regulamento (CEE) N° 2092/91 do Conselho relativo ao modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos agrícolas e nos géneros alimentícios, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 337 p 9 (20.12.2001).
- [246] Comissão Europeia, Regulamento (CE) N° 2601/2001 da Comissão de 28 de Dezembro de 2001 que completa o anexo do Regulamento (CE) N° 2400/96 relativo à inscrição de determinadas denominações no «Registo das denominações de origem protegidas e das indicações geográficas protegidas» previsto no Regulamento (CEE) N° 2081/92 do Conselho relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios., *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 345 p 47 (29.12.2001).
- [247] Comissão Europeia, Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Março de 2000 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 109 p 29 (06.05.2000).
- [248] http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/com/1999/com1999_0719pt01.pdf (consultado em 15/02/2008).
- [249] Commission Européenne, CEN/TC 174 (ENV 12140) N° 108. Determination of the stable carbon isotope ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of sugars from fruit juices- method using isotope ratio mass spectrometry, Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996).
- [250] Commission Européenne, CEN/TC 174 (ENV 12141) N° 109. Determination of the stable oxygen isotope ratio $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ of water from fruit juices -method using isotope ratio mass spectrometry., Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996).
- [251] AOAC INTERNACIONAL, Official method 995.17. Determination of beet sugar in fruit juices, SNIF-NMR, in *Official Methods of Analysis*, cap. 37, 25, AOAC INTERNACIONAL, Gaithersburg, 16th ed. (2000).
- [252] Calderone, G., Guillou, C., Naulet, N., Utilisation réglementaire des analyses isotopiques des aliments - dix ans d' expérience européenne, *L' Actualité Chimique* **8-9**, 20 (2003).
- [253] AOAC INTERNACIONAL, Official method 2004.01. Detection of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of ethanol derived from fruit juices and maple syrup by IRMS: continue study Official First Action, in *Official Methods of Analysis*, cap. 51, AOAC INTERNACIONAL, 18th ed. (2006).

- [254] AOAC INTERNATIONAL, Official method 991.41. C₄ plant sugars in honey, in *Official Methods of Analysis*, cap. 44, 29, AOAC INTERNACIONAL, Gaithersburg, 16th ed. (2000).
- [255] PORTUGAL, Presidência do Conselho de Ministros, Decreto-lei n.º 180/2000, *Diário da República, N.º 184, SÉRIE I-A* (10 de Agosto de 2000).
- [256] PORTUGAL, Ministério da Economia e da Inovação, Decreto-lei n.º 237/2005, *Diário da República, N.º 250, SÉRIE I-A* (30 de Dezembro de 2005).
- [257] Associação Portuguesa de Laboratórios Acreditados, *Guia Relacre 3 - Validação de resultados em laboratórios químicos*, Rel. téc., RELACRE, Lisboa (1996).
- [258] Thompson, M., Wood, R., The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories, *Pure Appl. Chem.* **65**, 2123 (1993).
- [259] International Organization for Standardization, *Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)*, ISO, Geneva (1995).
- [260] Instituto Português de Acreditação, *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos*, IPAC (2007).
- [261] Magnusson, B., Näykky, T., Hovind, H., Krysell, M., *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories - TR 537*, Rel. téc., NORD-TEST, Espoo (2004).
- [262] van der Veen, A.M.H., Linsinger, T.P.J., Schimmel, H., Lamberty, A., Pauwels, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials - 4. Characterisation and certification, *Accred. Qual. Assur.* **6**, 290 (2001).
- [263] EURACHEM/CITAC, *QUAM: 2000. Pt. Quantifying uncertainty in analytical measurement*, Rel. téc., EURACHEM/CITAC (2000).
- [264] Associação Portuguesa de Laboratórios Acreditados, *Guia EURACHEM/RELACRE 1. Exemplos de cálculos de incertezas*, Rel. téc., RELACRE, Lisboa (2002).
- [265] National Institute of Standards Technology, *Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurements (Technical Note 1297)*, NIST (1994).
- [266] The European co-operation for Accreditation, *Expression of the uncertainty of measurement in calibration. EA-04/02*, EA (1999).
- [267] van der Veen, A.M.H., Linsinger, T.P.J., Pauwels, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study, *Accred. Qual. Assur.* **6**, 26 (2001).
- [268] Pauwels, J., Lamberty, A., Schimmel, H., The determination of the uncertainty of reference materials certified by laboratory intercomparison, *Accred. Qual. Assur.* **3**, 180 (1998).

- [269] van der Veen, A.M.H., Implementing the GUM in the certification of reference materials: the revision of ISO Guide 35, *Accred. Qual. Assur.* **7**, 2 (2002).
- [270] van der Veen, A.M.H., Linsinger, T.P.J., Lamberty, A., Pauwels, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 3. Stability study, *Accred. Qual. Assur.* **6**, 257 (2001).
- [271] van der Veen, A.M.H., Pauwels, J., Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 1. Principles of analysis of variance, *Accred. Qual. Assur.* **5**, 464 (2000).
- [272] Pauwels, J., van der Veen, A.M.H., Lamberty, A., Schimmel, H., Evaluation of uncertainty of reference materials, *Accred. Qual. Assur.* **5**, 95 (2000).
- [273] Linsinger, T.P.J., Pauwels, J., van der Veen, A.M.H., Schimmel, H., Lamberty, A., Homogeneity and stability of reference materials, *Accred. Qual. Assur.* **6**, 20 (2001).
- [274] Silva, R.J.N.B., Santos, J.R., Camões, M.F.G.F.C., A new terminology for the approaches to the quantification of the measurement uncertainty, *Accred. Qual. Assur.* **10**, 664 (2006).
- [275] Quevauviller, P., Bennink, D., Bowadt, S., Critical outlook and trends for environmental reference materials at the Measurements & Testing Generic Activity (European Commission), *Fresenius' J. Anal. Chem.* **370**, 11 (2001).
- [276] Quevauviller, P., Reference materials: a gap in the quality system?, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **368**, 737 (2000).
- [277] King, B., Metrology in chemistry: Part I. Current activities in Europe, *Accred. Qual. Assur.* **5**, 173 (2000).
- [278] King, B., Metrology in chemistry: Part II. Future requirements in Europe, *Accred. Qual. Assur.* **5**, 266 (2000).
- [279] Zschunke, A., The role of reference materials in analytical chemistry, *Accred. Qual. Assur.* **8**, 247 (2003).
- [280] Stoepler, M., Wolf, W.R., Jenks, P.J., *Reference materials for chemical analysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim - República Federal da Alemanha (2001).
- [281] Parkany, M., Klich, H., Rasberry, S., REMCO, the ISO Council Committee on Reference Materials - its first 25 years, *Accred. Qual. Assur.* **6**, 226 (2001).
- [282] International Organization for Standardization, *ISO Guide 30: Terms and definitions used in connection with reference materials*, ISO, Geneva, 1st ed. (1992).
- [283] Dabrio, M., Sejerøe-Olsen, B., Musser, S., Emteborg, H., Ulberth, F., Emons, H., Production of certified reference material for the acrylamide content in toasted bread, *Food Chem.* **110**, 504 (2008).

- [284] Steger, H.F., Twenty-five years of international collaboration in reference materials via ISO/REMCO, *Accred. Qual. Assur.* **7**, 134 (2002).
- [285] International Organization for Standardization, *ISO Guide 31: Reference materials - Contents of certificates and labels*, ISO, Geneva, 2nd ed. (2000).
- [286] International Organization for Standardization, *ISO Guide 32: Calibration in Analytical Chemistry and Use of Certified Reference Materials*, ISO, Geneva, 1st ed. (1997).
- [287] International Organization for Standardization, *ISO Guide 33: Uses of certified reference materials*, ISO, Geneva, 2nd ed. (2000).
- [288] International Organization for Standardization, *ISO Guide 34: Quality system guidelines for the production of reference materials*, ISO, Geneva, 1st ed. (1996).
- [289] International Organization for Standardization, *ISO Guide 35: Reference materials - General and statistical principles for certification*, ISO, Geneva, 3rd ed. (2006).
- [290] International Organization for Standardization, *ISO Guide 34/Cor.1: General requirements for the competence of reference materials producers*, ISO, Geneva (2003).
- [291] Inczédy, J., Lengyel, T., Ure, A.M., *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature*, Blackwell Science, 3rd ed. (1998).
- [292] World Health Organization, *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004)*, Technical Report Series 932, WHO (2006).
- [293] The European co-operation for Accreditation, *Selection and Use of Reference Materials. EA-04/14*, EA (2003).
- [294] International Laboratory Accreditation Cooperation, *Guidelines for the requirements for the competence of Reference Material Producers, ILAC-G12:2000*, ILAC (2000).
- [295] Gröning, M., Fröhlich, K., Regge, P.D., Danesi, P.R., The use of matrix reference materials in environmental analytical processes Part II: Examples on reference materials certified for stable isotope composition, IAEA (Isotope Hydrology Unit) (1999), (disponível em http://www.iaea.org/programmes/aqcs/pdf/reference_2; consultado em 01/04/2007).
- [296] Comissão Europeia, Directiva 84/449/CEE da Comissão de 25 de Abril de 1984 que pela sexta vez adapta ao progresso técnico a Directiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N^o L 251 p 1 (19.09.1984).

- [297] Comissão Europeia, Directiva 92/69/CEE de 31 de Julho de 1992 que adapta ao progresso técnico, pela décima sétima vez, a Directiva 67/548/CEE do Conselho relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N° L 383 p 1 (29.12.92).
- [298] King, B., Traceability of chemical analysis, *Analyst* **122**, 197 (1997).
- [299] Horwitz, W., Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies, *Pure Appl. Chem.* **60**, 855 (1988).
- [300] Arunachalam, J., Bleise, A., Mahwar, R.S., Ramadevi, P., Iyengar, G.V., The natural matrix reference material database of the International Atomic Energy Agency: Reference materials in support of dietary investigations, *J. Food Composition Anal.* **19**, 241 (2006).
- [301] Pauwels, J., Lambert, A., CRMs for the 21st century: new demands and challenges, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **370**, 111 (2001).
- [302] Wallin, H.C., Why do food analysts need quality assurance?, *Accred. Quali. Assur.* **1**, 163 (1996).
- [303] King, B., The selection and use of reference materials - A basic guide for laboratories and accreditation bodies, *Accred. Qual. Assur.* **8**, 429 (2003).
- [304] Lauwaars, M., Anklam, E., Method validation and reference materials, *Accred. Qual. Assur.* **9**, 253 (2004).
- [305] Pan, X.R., Hierarchy of reference materials certified for chemical composition, *Metrologia* **34**, 35 (1997).
- [306] Gonfiantini, R., Stichler, W., Rozansky, K., Standards and intercomparison materials distributed by the International Atomic Energy Agency for stable isotopes measurements, in *Reference and intercomparison materials for stable isotopes of light elements*, volume IAEA-TEODC-825, pp 13–29, IAEA, Proceedings of a consultants meeting held in Vienna (1993).
- [307] Hoefs, J., *Stable isotope Geochemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1st ed. (1973).
- [308] Gonfiantini, R., Consultants Meeting on stable isotope standards and intercalibration in hydrology and in geochemistry, IAEA Vienna (1976), documento não publicado.
- [309] International of Energy Atomic Agency, *Development and use of reference materials and quality control materials*, Rel. Téc. IAEA/TECDOC/1350, IAEA, Vienna (2003).
- [310] Qi, H., Coplen, T.B., Geilmann, H., Brand, W.A., Böhlke, J.K., Two new organic reference materials for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements and a new value for the of NBS 22 oil, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2483 (2003).

- [311] Ruban, V., López-Sánchez, J.F., Pardo, P., Rauret, G., Muntau, H., Quevauviller, P., Development of a harmonised phosphorus extraction procedure and certification of a sediment reference material, *J. Environ. Monit.* **3**, 121 (2001).
- [312] Pueyo, M., Rauret, G., Bacon, J.R., Gomez, A., Muntau, H., Quevauviller, P., López-Sánchez, J.F., A new organic-rich reference material certified for its EDTA- and acetic acid- extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn, following collaboratively tested and harmonised procedures, *J. Environ. Monit.* **3**, 238 (2001).
- [313] <http://www.irmm.jrc.be> (consultado em 24/07/2007).
- [314] <http://www.nist.gov> (consultado em 12/07/2007).
- [315] <http://www.iaea.org/> (consultado em 23/07/2007).
- [316] Coplen, T.B., Brand, W.A., Gehre, M., Groning, M., Meijer, H.A., Toman, B., Verkouteren, R.M., After two decades a second anchor for the VPDB $\delta^{13}\text{C}$ scale, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3165 (2006).
- [317] Emons, H., Held, A., Ulberth, F., Reference materials as crucial tools for quality assurance and control in food analysis, *Pure Appl. Chem.* **78**, 135 (2006).
- [318] American Society for Quality, Fishbone diagram, (disponível em <http://www.asq.org/learn-about-quality/cause-analysis-tools/overview/fishbone.html>; consultado em 13/01/2008).
- [319] Bonas, G., Zervou, M., Papaeoannou, T., Lees, M., “SoftCRM”: a new software for the Certification of Reference Materials, *Accred. Qual. Assur.* **8**, 101 (2003).
- [320] International Organization for Standardization, *ISO 5725-2. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*, ISO, Geneva (1994).
- [321] Grob, K., Grob, G., Grob Jr., K., Testing capillary gas chromatographic columns, *J. Chromatogr.* **219**, 13 (1981).
- [322] Guillou, C., Koziat, J., Rossmann, A., Martin, G.J., Determination of the C-13 contents of organic acids and sugars in fruit juices: an inter-comparison study, *Anal. Chim. Acta* **388**, 137 (1999).
- [323] Guillou, C., Remaud, G., Lees, M., Certified reference materials for isotopic analysis of food products, in *1st International Symposium on Isotopomers (ISI 2001)*, Yokohama (2001).
- [324] Smith, Kerry, M., Wells, D.E., Preparation and evaluation of candidate certified reference materials (CRMs) for nutrients in seawater, *J. Environ. Monit.* **9**, 708 (2007).

- [325] Serra, F., Janeiro, A., Calderone, G., Moreno Rojas, J.M., Rhodes, C., Gonthier, L.A., Martin, F., Lees, M., Mosandl, A., Sewenig, S., Hener, U., Henriques, B., Ramalho, L., Reniero, F., Teixeira, A.J., Guillou, C., Inter-laboratory comparison of elemental analysis and gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). Part I: $\delta^{13}\text{C}$ measurements of selected compounds for the development of an isotopic Grob-test, *J. Mass Spectrom.* **42**, 361 (2007).
- [326] Pauwels, J., Lamberty, A., Schimmel, H., Homogeneity testing of reference materials, *Accred. Qual. Assur.* **3**, 51 (1998).
- [327] Kramer, K.J.M., Kramer, G.N., Muntau, H., *Practical Manual for the Production of Laboratory Reference Materials*, European Commission DG Research (2001).
- [328] Quevauviller, P., Benoliel, M.J., Carneiro, R.N., Cortez, L., Certification of reference materials for the quality control of major element determinations in groundwater, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **363**, 23 (1999).
- [329] Benoliel, M.J., Quevauviller, P., Rodrigues, E., Andrade, M.E., Cavaco, M.A., Cortez, L., Certification of reference materials for the quality control of major element determinations in groundwater, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **358**, 574 (1997).
- [330] International Organization for Standardization, *ISO 5725-1. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions*, ISO, Geneva (1994).
- [331] International Organization for Standardization, *ISO 5725-4. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method*, ISO, Geneva (1994).
- [332] Meier-Augenstein, W., Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **842**, 351 (1999).
- [333] Meier-Augenstein, W., Stable isotope analysis of fatty acids by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **465**, 63 (2002).
- [334] Meier-Augenstein, W., Watt, P.W., Langhans, C.D., Influence of gas chromatographic parameters on measurement of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratios by gas-liquid chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **752**, 233 (1996).
- [335] Meier-Augenstein, W., The chromatographic side of isotope ratio mass spectrometry: pitfalls and answers, *LC-GC International* 17 (1997).
- [336] Meier-Augenstein, W., GC and IRMS technology for ^{13}C and ^{15}N analysis on organic compounds and related gases, in P.A. de Groot (ed.), *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques*, volume I, cap. 8, pp 153–181, Elsevier Science B. V., Amsterdam (2004).

- [337] Meier-Augenstein, W., A reference gas inlet module for internal isotopic calibration in high precision gas chromatography combustion-isotope ratio mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1775 (1997).
- [338] Werner, R.A., Brand, W.A., Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 501 (2001).
- [339] Schmitt, J., Glaser, B., Zech, W., Amount-dependent isotopic fractionation during compound-specific isotope analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 970 (2003).
- [340] International Organization for Standardization, *ISO 5725-6. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 6: Use in practice of accuracy values*, ISO, Geneva (1994).
- [341] International Organization for Standardization, *ISO 5725-3. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method*, ISO, Geneva (1994).
- [342] International Organization for Standardization, *ISO 5725-5. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 5: Alternative methods for the determination of the precision of a standard measurement method*, ISO, Geneva (1998).
- [343] International Organization for Standardization, *ISO 3534-1. Statistics-vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms*, ISO, Geneva (1993).
- [344] International Organization for Standardization, *ISO 3534-3. Statistics-vocabulary and symbols. Part 3: design of experiments*, ISO, Geneva (1995).
- [345] Farrant, T.J., *Practical Statistics for the Analytical Scientist*, Royal Society of Chemistry, Teddington, 1st ed. (1997).

Apêndice A

Teste de Homogeneidade

As Tabelas A.1 a A.11 mostram os resultados globais relativos ao teste de homogeneidade intra-unidades e interunidades.

Tabela A.1: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1514	-28,09	-28,09	-28,13	-28,35	-28,30	-28,14
0145-1523	-28,17	-28,31	-28,42	-28,28	-28,21	-28,40
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1527	-28,56	-28,40	-28,48			
0145-1533	-28,47	-28,30	-28,39			
0145-1535	-28,20	-28,52	-28,36			
0145-1541	-28,13	-28,49	-28,31			
0145-1545	-28,54	-28,46	-28,50			
0145-1551	-28,39	-28,17	-28,28			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,013917					
var inter	0,007904					
F_{calc}	0,57					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.2: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1883	-30,52	-30,56	-30,78	-30,82	-30,59	-30,65
0145-1892	-30,58	-30,61	-30,78	-30,61	-30,68	-30,80
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1895	-30,76	-30,80	-30,78			
0145-1902	-30,80	-30,61	-30,71			
0145-1903	-30,68	-30,84	-30,76			
0145-1911	-30,64	-30,68	-30,66			
0145-1914	-30,67	-30,78	-30,73			
0145-1922	-30,79	-30,71	-30,75			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,010918					
var inter	0,001870					
F_{calc}	0,17					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.3: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-0902	-30,47	-30,51	-30,46	-30,52	-30,56	-30,49
0145-0904	-30,51	-30,49	-30,52	-30,48	-30,56	-30,42
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-0912	-30,44	-30,42	-30,43			
0145-0914	-30,60	-30,58	-30,59			
0145-0921	-30,50	-30,56	-30,53			
0145-0925	-30,50	-30,59	-30,55			
0145-0933	-30,64	-30,64	-30,64			
0145-0934	-30,54	-30,49	-30,52			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,001608					
var inter	0,005067					
F_{calc}	3,15					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.4: *N,N,3,5-Tetrametilaniлина*. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-0739	-33,80	-33,80	-33,64	-33,65	-33,65	-33,67
0145-0744	-33,64	-33,84	-33,78	-33,64	-33,79	-33,76
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-0748	-33,69	-33,66	-33,68			
0145-0754	-33,93	-33,87	-33,90			
0145-0755	-33,92	-34,00	-33,96			
0145-0762	-33,96	-33,88	-33,92			
0145-0768	-33,91	-33,97	-33,94			
0145-0770	-34,02	-34,01	-34,02			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,006252					
var inter	0,013887					
F_{calc}	2,22					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.5: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1230	-30,19	-30,24	-30,24	-30,34	-30,29	-30,28
0145-1235	-30,29	-30,32	-30,40	-30,23	-30,35	-30,38
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1237	-30,14	-30,28	-30,21			
0145-1246	-30,50	-30,45	-30,48			
0145-1248	-30,44	-30,43	-30,44			
0145-1254	-30,52	-30,41	-30,47			
0145-1260	-30,52	-30,47	-30,50			
0145-1266	-30,57	-30,49	-30,53			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,004136					
var inter	0,013150					
F_{calc}	3,18					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.6: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1392	-31,92	-32,15	-32,28	-31,93	-32,14	-32,17
0145-1399	-32,10	-32,11	-32,15	-32,32	-32,15	-32,16
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1403	-31,92	-32,28	-32,10			
0145-1409	-32,03	-32,20	-32,12			
0145-1413	-32,24	-32,18	-32,21			
0145-1417	-32,24	-31,92	-32,08			
0145-1421	-31,93	-32,07	-32,00			
0145-1426	-32,12	-32,14	-32,13			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,013433					
var inter	0,004684					
F_{calc}	0,35					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.7: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1641	-31,55	-31,53	-31,52	-31,56	-31,54	-31,53
0145-1644	-31,29	-31,70	-31,55	-31,50	-31,58	-31,62
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1648	-31,34	-31,55	-31,45			
0145-1653	-31,73	-31,48	-31,61			
0145-1661	-31,53	-31,54	-31,54			
0145-1665	-31,36	-31,85	-31,61			
0145-1670	-31,72	-31,42	-31,57			
0145-1672	-31,40	-31,53	-31,47			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,008990					
var inter	0,004798					
F_{calc}	0,53					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.8: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1761	-30,32	-30,27	-30,32	-30,38	-30,41	-30,44
0145-1765	-30,47	-30,50	-30,57	-30,39	-30,40	-30,38
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1770	-30,18	-30,41	-30,30			
0145-1777	-30,39	-30,35	-30,37			
0145-1784	-30,39	-30,35	-30,37			
0145-1786	-30,24	-30,29	-30,27			
0145-1794	-30,28	-30,28	-30,28			
0145-1799	-30,51	-30,47	-30,49			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,006899					
var inter	0,007080					
F_{calc}	1,03					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.9: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-1064	-37,10	-37,35	-37,29	-37,34	-37,37	-37,46
0145-1070	-37,34	-37,23	-37,29	-37,40	-37,39	-37,58
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-1074	-37,25	-37,51	-37,38			
0145-1078	-37,55	-37,51	-37,53			
0145-1083	-37,53	-37,49	-37,51			
0145-1089	-37,59	-37,50	-37,55			
0145-1096	-37,65	-37,59	-37,62			
0145-1102	-37,42	-37,59	-37,51			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,013955					
var inter	0,006100					
F_{calc}	0,44					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.10: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-0616	-30,64	-30,70	-30,80	-30,84	-30,78	-30,80
0145-0618	-30,85	-30,73	-30,82	-30,82	-30,79	-30,79
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-0623	-30,49	-30,80	-30,65			
0145-0627	-30,82	-30,66	-30,74			
0145-0635	-30,84	-30,79	-30,82			
0145-0640	-30,71	-30,79	-30,75			
0145-0646	-30,89	-30,81	-30,85			
0145-0649	-30,80	-30,79	-30,80			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,003745					
var inter	0,005174					
F_{calc}	1,38					
F_{crit}	3,20					

Tabela A.11: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para o teste de homogeneidade interunidades e intra-unidades para os compostos puros.

HOMOGENEIDADE INTRA-UNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	3	4	5	6
0145-2008	-28,80	-28,98	-29,18	-29,15	-29,04	-29,20
0145-2013	-29,09	-29,00	-29,01	-29,08	-29,00	-29,07
HOMOGENEIDADE INTERUNIDADES						
Amostra	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	1	2	Média			
0145-2020	-29,03	-29,12	-29,08			
0145-2022	-29,35	-29,36	-29,36			
0145-2029	-29,25	-29,19	-29,22			
0145-2032	-29,19	-29,30	-29,25			
0145-2037	-29,31	-29,21	-29,26			
0145-2043	-29,16	-29,20	-29,18			
Comparação de Variâncias						
var intra	0,011491					
var inter	0,008607					
F_{calc}	0,75					
F_{crit}	3,20					

Apêndice B

Valores de $\delta^{13}\text{C}$ por EA-IRMS. Ensaio Circular

Na Tabela B.1 apresentam-se os resultados globais de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para os compostos puros relativo ao Ensaio Circular.

Tabela B.1: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por EA-IRMS para os compostos puros. Ensaio Circular.

Composto	Fórmula	Lab	1	2	3	média lab	s	média	s_{exp}
1-Octanol	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	A	-28,46	-28,46	-28,05	-28,32	0,24	-28,34	0,062
		B	-28,21	-28,17	-28,15	-28,18	0,03		
		C	-28,42	-28,35	-28,45	-28,41	0,05		
		D	-28,44	-28,46	-28,48	-28,46	0,02		
2,6-Dimetilfenol	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}$	A	-30,70	-30,69	-30,64	-30,68	0,03	-30,56	0,093
		B	-30,51	-30,44	-30,56	-30,50	0,06		
		C	-30,20	-30,26	-30,51	-30,32	0,16		
		D	-30,74	-30,69	-30,77	-30,73	0,04		
2,6-Dimetilanilina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$	A	-30,47	-30,53	-30,35	-30,45	0,09	-30,44	0,051
		B	-30,20	-30,36	-30,41	-30,32	0,11		
		C	-30,45	-30,35	-30,45	-30,42	0,06		
		D	-30,50	-30,60	-30,61	-30,57	0,06		
<i>N,N</i> ,3,5-Tetrametilanilina	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}$	A	-33,75	-33,81	-33,91	-33,82	0,08	-33,74	0,046
		B	-33,70	-33,64	-33,58	-33,64	0,06		
		C	-33,71	-33,65	-33,70	-33,69	0,03		
		D	-33,81	-33,80	-33,83	-33,81	0,02		
4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)benzoato de etilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2$	A	-30,10	-30,24	-30,34	-30,23	0,12	-30,34	0,039
		B	-30,39	-30,41	-30,44	-30,41	0,03		
		C	-30,52	-30,28	-30,25	-30,35	0,15		
		D	-30,27	-30,41	-30,39	-30,36	0,08		
Dodecano	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}$	A	-32,10	-32,07	-31,98	-32,05	0,06	-32,19	0,076
		B	-32,14	-32,07	-32,08	-32,10	0,04		
		C	-32,06	-32,34	-32,23	-32,21	0,14		
		D	-32,43	-32,40	-32,35	-32,39	0,04		
Decanoato de metilo	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$	A	-31,41	-31,71	-31,76	-31,63	0,19	-31,51	0,043
		B	-31,47	-31,57	-31,52	-31,52	0,05		
		C	-31,41	-31,52	-31,53	-31,49	0,07		
		D	-31,41	-31,47	-31,38	-31,42	0,05		
Dodecanoato de metilo	$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_2$	A	-30,62	-30,61	-30,64	-30,62	0,02	-30,48	0,063
		B	-30,46	-30,38	-30,15	-30,33	0,16		
		C	-30,51	-30,40	-30,41	-30,44	0,06		
		D	-30,51	-30,56	-30,52	-30,53	0,03		
2-(Metilamino)benzoato de metilo	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	A	-37,51	-37,12	-37,37	-37,33	0,20	-37,51	0,089
		B	-37,80	-37,50	-37,97	-37,76	0,24		
		C	-37,50	-37,40	-37,62	-37,51	0,11		
		D	-37,36	-37,44	-37,58	-37,46	0,11		
Nonanal	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}$	A	-30,93	-30,93	-31,05	-30,97	0,07	-30,84	0,097
		B	-30,32	-30,71	-30,67	-30,57	0,21		
		C	-30,94	-31,04	-30,97	-30,98	0,05		
		D	-30,99	-30,80	-30,78	-30,86	0,12		
Vanilina	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	A	-28,86	-28,86	-28,90	-28,87	0,02	-28,93	0,097
		B	-28,89	-29,11	-29,12	-29,04	0,13		
		C	-28,64	-28,60	-28,80	-28,68	0,11		
		D	-29,21	-29,01	-29,13	-29,12	0,10		

Apêndice C

Teste de Estabilidade

As Tabelas C.1 a C.22 mostram os resultados globais relativos aos testes de degradação acelerada (irradiação com luz UV), e de estabilidade no longo prazo correspondente a $t = 3$ meses para dois conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2.

C.1 Amostra 1, para $t=3$ meses

Tabela C.1: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1481	-28,58	-28,50	-28,54	0,06
Não Irradiados com UV a +40 °	0145-1494	-28,50	-28,58	-28,54	0,06
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1487	-28,58	-28,53	-28,56	0,04
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1518	-28,50	-28,50	-28,50	0,00
Mantido a -20 °C	0145-1567	-28,57	-28,37	-28,47	0,14
Mantido a +04 °C	0145-1582	-28,51	-28,59	-28,55	0,06
Mantido a +20 °C	0145-1553	-28,59	-28,42	-28,51	0,12
Referência mantida a -80 °C	0145-1516	-28,25	-28,38	-28,32	0,09

Tabela C.2: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1961	-30,88	-30,81	-30,85	0,05
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1853	-30,79	-30,78	-30,79	0,01
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1868	-30,84	-30,78	-30,81	0,04
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1920	-30,80	-30,78	-30,79	0,01
Mantido a -20 °C	0145-1879	-30,67	-30,59	-30,63	0,06
Mantido a +04 °C	0145-1906	-30,83	-30,80	-30,82	0,02
Mantido a +20 °C	0145-1891	-30,73	-30,77	-30,75	0,03
Referência mantida a -80 °C	0145-1878	-30,79	-30,74	-30,77	0,04

Tabela C.3: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0907	-30,49	-30,37	-30,43	0,08
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0999	-30,46	-30,48	-30,47	0,01
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0984	-30,48	-30,45	-30,47	0,02
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0860	-30,51	-30,38	-30,45	0,09
Mantido a -20 °C	0145-0950	-30,54	-30,55	-30,55	0,01
Mantido a +04 °C	0145-0891	-30,50	-30,49	-30,50	0,01
Mantido a +20 °C	0145-0920	-30,42	-30,34	-30,38	0,06
Referência mantida a -80 °C	0145-1016	-30,31	-30,32	-30,32	0,01

Tabela C.4: *N,N,3,5-Tetrametilaniлина*. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0841	-33,74	-33,72	-33,73	0,01
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0813	-33,64	-33,60	-33,62	0,03
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0829	-33,57	-33,71	-33,64	0,10
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0796	-33,65	-33,66	-33,66	0,01
Mantido a -20 °C	0145-0715	-33,68	-33,70	-33,69	0,01
Mantido a +04 °C	0145-0731	-33,81	-33,78	-33,80	0,02
Mantido a +20 °C	0145-0724	-33,76	-33,80	-33,78	0,03
Referência mantida a -80 °C	0145-0835	-33,69	-33,66	-33,68	0,02

Tabela C.5: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1241	-30,40	-30,41	-30,41	0,01
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1250	-30,57	-30,46	-30,52	0,08
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1236	-30,48	-30,50	-30,49	0,01
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1253	-30,50	-30,52	-30,51	0,01
Mantido a -20 °C	0145-1208	-30,61	-30,67	-30,64	0,04
Mantido a +04 °C	0145-1255	-30,64	-30,51	-30,58	0,09
Mantido a +20 °C	0145-1228	-30,51	-30,47	-30,49	0,03
Referência mantida a -80 °C	0145-1249	-30,39	-30,37	-30,38	0,01

Tabela C.6: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1354	-32,33	-32,21	-32,27	0,08
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1408	-32,36	-32,11	-32,24	0,18
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1401	-32,36	-32,32	-32,34	0,03
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1372	-32,28	-32,32	-32,30	0,03
Mantido a -20 °C	0145-1452	-32,28	-32,24	-32,26	0,03
Mantido a +04 °C	0145-1414	-32,32	-32,30	-32,31	0,01
Mantido a +20 °C	0145-1453	-32,22	-32,20	-32,21	0,01
Referência mantida a -80 °C	0145-1385	-32,19	-32,25	-32,22	0,04

Tabela C.7: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1646	-31,51	-31,75	-31,63	0,17
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1603	-31,54	-31,61	-31,58	0,05
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1676	-31,59	-31,50	-31,55	0,06
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1639	-31,64	-31,63	-31,64	0,01
Mantido a -20 °C	0145-1689	-31,70	-31,61	-31,66	0,06
Mantido a +04 °C	0145-1640	-31,58	-31,57	-31,58	0,01
Mantido a +20 °C	0145-1678	-31,74	-31,58	-31,66	0,11
Referência mantida a -80 °C	0145-1707	-31,76	-31,65	-31,71	0,08

Tabela C.8: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1748	-30,41	-30,46	-30,44	0,04
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1724	-30,55	-30,47	-30,51	0,06
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1776	-30,45	-30,60	-30,53	0,11
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1755	-30,43	-30,46	-30,45	0,02
Mantido a -20 °C	0145-1763	-30,52	-30,56	-30,54	0,03
Mantido a +04 °C	0145-1835	-30,49	-30,50	-30,50	0,01
Mantido a +20 °C	0145-1834	-30,36	-30,63	-30,50	0,19
Referência mantida a -80 °C	0145-1743	-30,48	-30,50	-30,49	0,01

Tabela C.9: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1178	-37,40	-37,35	-37,38	0,04
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1065	-37,46	-37,61	-37,54	0,11
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1118	-37,57	-37,56	-37,57	0,01
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1168	-37,43	-37,38	-37,41	0,04
Mantido a -20 °C	0145-1120	-37,44	-37,48	-37,46	0,03
Mantido a +04 °C	0145-1061	-37,36	-37,58	-37,47	0,16
Mantido a +20 °C	0145-1159	-37,31	-37,46	-37,39	0,11
Referência mantida a -80 °C	0145-1075	-37,43	-37,43	-37,43	0,00

Tabela C.10: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0655	-30,72	-30,85	-30,79	0,09
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0576	-31,05	-31,00	-31,03	0,04
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0673	-31,07	-31,06	-31,07	0,01
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0601	-30,97	-30,99	-30,98	0,01
Mantido a -20 °C	0145-0636	-31,02	-30,90	-30,96	0,08
Mantido a +04 °C	0145-0651	-30,71	-30,94	-30,83	0,16
Mantido a +20 °C	0145-0607	-31,06	-30,99	-31,03	0,05
Referência mantida a -80 °C	0145-0583	-30,95	-30,92	-30,94	0,02

Tabela C.11: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-2050	-28,92	-29,01	-28,97	0,06
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-2084	-28,99	-29,13	-29,06	0,10
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1977	-28,95	-28,97	-28,96	0,01
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-2083	-29,00	-29,11	-29,06	0,08
Mantido a -20 °C	0145-2059	-28,92	-28,92	-28,92	0,00
Mantido a +04 °C	0145-2075	-28,85	-28,88	-28,87	0,02
Mantido a +20 °C	0145-2045	-29,00	-28,82	-28,91	0,13
Referência mantida a -80 °C	0145-2071	-28,90	-29,15	-29,03	0,18

C.2 Amostra 2, para $t=3$ meses

Tabela C.12: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1548	-28,43	-28,37	-28,40	0,04
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1594	-28,42	-28,50	-28,46	0,06
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1499	-28,57	-28,53	-28,55	0,03
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1562	-28,40	-28,33	-28,37	0,05
Mantido a -20 °C	0145-1592	-28,52	-28,51	-28,52	0,01
Mantido a +04 °C	0145-1504	-28,58	-28,38	-28,48	0,14
Mantido a +20 °C	0145-1511	-28,54	-28,53	-28,54	0,01

Tabela C.13: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1852	-30,79	-30,79	-30,79	0,00
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1907	-30,87	-30,84	-30,86	0,02
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1950	-30,74	-30,82	-30,78	0,06
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1940	-30,68	-30,69	-30,69	0,01
Mantido a -20 °C	0145-1921	-30,80	-30,73	-30,77	0,05
Mantido a +04 °C	0145-1964	-30,76	-30,69	-30,73	0,05
Mantido a +20 °C	0145-1957	-30,71	-30,68	-30,70	0,02

Tabela C.14: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0972	-30,48	-30,38	-30,43	0,07
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0981	-30,56	-30,54	-30,55	0,01
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0867	-30,59	-30,54	-30,57	0,04
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0913	-30,52	-30,59	-30,56	0,05
Mantido a -20 °C	0145-0883	-30,59	-30,59	-30,59	0,00
Mantido a +04 °C	0145-0917	-30,41	-30,42	-30,42	0,01
Mantido a +20 °C	0145-0983	-30,49	-30,42	-30,46	0,05

Tabela C.15: *N,N,3,5*-Tetrametilaniilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0700	-33,79	-33,80	-33,80	0,01
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0855	-33,72	-33,70	-33,71	0,01
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0741	-33,61	-33,61	-33,61	0,00
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0810	-33,69	-33,49	-33,59	0,14
Mantido a -20 °C	0145-0747	-33,71	-33,85	-33,78	0,10
Mantido a +04 °C	0145-0807	-33,78	-33,64	-33,71	0,10
Mantido a +20 °C	0145-0766	-33,73	-33,75	-33,74	0,01

Tabela C.16: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1313	-30,40	-30,50	-30,45	0,07
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1303	-30,49	-30,54	-30,52	0,04
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1330	-30,53	-30,48	-30,51	0,04
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1297	-30,60	-30,62	-30,61	0,01
Mantido a -20 °C	0145-1217	-30,53	-30,62	-30,58	0,06
Mantido a +04 °C	0145-1214	-30,46	-30,64	-30,55	0,13
Mantido a +20 °C	0145-1319	-30,35	-30,35	-30,35	0,00

Tabela C.17: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1378	-32,31	-32,16	-32,24	0,11
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1422	-32,24	-32,22	-32,23	0,01
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1439	-32,27	-32,23	-32,25	0,03
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1419	-32,34	-32,17	-32,26	0,12
Mantido a -20 °C	0145-1435	-32,35	-32,17	-32,26	0,13
Mantido a +04 °C	0145-1441	-32,29	-32,18	-32,24	0,08
Mantido a +20 °C	0145-1412	-32,32	-32,19	-32,26	0,09

Tabela C.18: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1610	-31,47	-31,57	-31,52	0,07
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1666	-31,60	-31,74	-31,67	0,10
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1651	-31,56	-31,54	-31,55	0,01
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1657	-31,70	-31,63	-31,67	0,05
Mantido a -20 °C	0145-1621	-31,57	-31,71	-31,64	0,10
Mantido a +04 °C	0145-1712	-31,73	-31,65	-31,69	0,06
Mantido a +20 °C	0145-1632	-31,71	-31,82	-31,77	0,08

Tabela C.19: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1734	-30,47	-30,39	-30,43	0,06
Not Irradiados com UV a +40 °C	0145-1813	-30,57	-30,46	-30,52	0,08
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1793	-30,64	-30,51	-30,58	0,09
Not Irradiados com UV a +20 °C	0145-1822	-30,60	-30,46	-30,53	0,10
Mantido a -20 °C	0145-1741	-30,51	-30,42	-30,47	0,06
Mantido a +04 °C	0145-1730	-30,47	-30,54	-30,51	0,05
Mantido a +20 °C	0145-1810	-30,38	-30,41	-30,40	0,02

Tabela C.20: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-1055	-37,48	-37,55	-37,52	0,05
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-1158	-37,56	-37,59	-37,58	0,02
Irradiados com UV a +20 °C	0145-1126	-37,25	-37,33	-37,29	0,06
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1049	-37,35	-37,55	-37,45	0,14
Mantido a -20 °C	0145-1072	-37,35	-37,47	-37,41	0,08
Mantido a +04 °C	0145-1124	-37,42	-37,32	-37,37	0,07
Mantido a +20 °C	0145-1034	-37,46	-37,37	-37,42	0,06

Tabela C.21: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-0689	-30,82	-31,11	-30,97	0,21
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-0634	-30,96	-30,91	-30,94	0,04
Irradiados com UV a +20 °C	0145-0643	-30,81	-30,97	-30,89	0,11
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-0674	-30,90	-30,93	-30,92	0,02
Mantido a -20 °C	0145-0657	-31,04	-30,91	-30,98	0,09
Mantido a +04 °C	0145-0621	-30,86	-30,94	-30,90	0,06
Mantido a +20 °C	0145-0685	-30,88	-30,87	-30,88	0,01

Tabela C.22: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (irradiação com UV) e de estabilidade no longo prazo para $t = 3$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Irradiados com UV a +40 °C	0145-2017	-29,09	-29,06	-29,08	0,02
Não Irradiados com UV a +40 °C	0145-2080	-29,01	-29,06	-29,04	0,04
Irradiados com UV a +20 °C	0145-2007	-29,05	-29,19	-29,12	0,10
Não Irradiados com UV a +20 °C	0145-1994	-29,05	-28,81	-28,93	0,17
Mantido a -20 °C	0145-1998	-28,99	-28,93	-28,96	0,04
Mantido a +04 °C	0145-1966	-28,92	-29,17	-29,05	0,18
Mantido a +20 °C	0145-2077	-28,87	-29,01	-28,94	0,10

As Tabelas C.23 a C.44 mostram os resultados globais relativos aos testes de estabilidade aos choques térmicos e no longo prazo correspondente a $t = 6$ meses para 2 conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2.

C.3 Amostra 1, para $t=6$ meses

Tabela C.23: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1540	-28,51	-28,61	-28,56	0,07
Mantido a -20 °C	0145-1493	-28,28	-28,63	-28,46	0,25
Mantido a +04 °C	0145-1488	-28,54	-28,32	-28,43	0,16
Mantido a +20 °C	0145-1490	-28,43	-28,50	-28,47	0,05
Referência mantida a -80 °C	0145-1485	-28,32	-28,29	-28,31	0,02

Tabela C.24: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1862	-30,92	-30,90	-30,91	0,01
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1842	-30,95	-30,95	-30,95	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1885	-30,79	-30,79	-30,79	0,00
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1872	-30,73	-30,66	-30,70	0,05
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1857	-30,83	-30,68	-30,76	0,11

Tabela C.25: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-0944	-30,49	-30,40	-30,45	0,06
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0946	-30,55	-30,50	-30,53	0,04
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0918	-30,52	-30,46	-30,49	0,04
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0952	-30,47	-30,71	-30,59	0,17
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0990	-30,51	-30,59	-30,55	0,06

Tabela C.26: *N,N*,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-0736	-33,59	-33,54	-33,57	0,04
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0706	-33,49	-33,71	-33,60	0,16
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0745	-33,67	-33,62	-33,65	0,04
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0771	-33,70	-33,71	-33,71	0,01
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0790	-33,59	-33,64	-33,62	0,04

Tabela C.27: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1339	-30,37	-30,26	-30,32	0,08
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1304	-30,31	-30,31	-30,31	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1232	-30,40	-30,28	-30,34	0,08
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1259	-30,32	-30,41	-30,37	0,06
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1281	-30,34	-30,41	-30,38	0,05

Tabela C.28: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1353	-32,40	-32,36	-32,38	0,03
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1352	-32,55	-32,50	-32,53	0,04
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1373	-32,50	-32,40	-32,45	0,07
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1370	-32,37	-32,26	-32,32	0,08
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1363	-32,27	-32,37	-32,32	0,07

Tabela C.29: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1619	-31,80	-31,60	-31,70	0,14
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1597	-31,69	-31,62	-31,66	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1609	-31,51	-31,79	-31,65	0,20
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1647	-31,53	-31,71	-31,62	0,13
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1637	-31,51	-31,65	-31,58	0,10

Tabela C.30: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1783	-30,88	-30,69	-30,79	0,13
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1780	-30,64	-30,59	-30,62	0,04
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1725	-30,61	-30,61	-30,61	0,00
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1742	-30,34	-30,28	-30,31	0,04
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1728	-30,40	-30,33	-30,37	0,05

Tabela C.31: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1024	-37,50	-37,52	-37,51	0,01
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1036	-37,43	-37,62	-37,53	0,13
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1053	-37,59	-37,59	-37,59	0,00
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1058	-37,57	-37,56	-37,57	0,01
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1082	-37,55	-37,61	-37,58	0,04

Tabela C.32: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-0571	-30,71	-30,81	-30,76	0,07
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0584	-30,96	-30,72	-30,84	0,17
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0595	-30,76	-30,72	-30,74	0,03
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0594	-30,62	-30,73	-30,68	0,08
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0647	-30,69	-30,81	-30,75	0,08

Tabela C.33: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-2068	-29,49	-29,33	-29,41	0,11
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1990	-29,00	-29,01	-29,01	0,01
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2073	-29,02	-29,14	-29,08	0,08
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1980	-29,15	-29,24	-29,20	0,06
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2051	-29,09	-28,97	-29,03	0,08

C.4 Amostra 2, para $t=6$ meses

Tabela C.34: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1522	-28,49	-28,58	-28,54	0,06
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1571	-28,55	-28,55	-28,55	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1549	-28,35	-28,42	-28,39	0,05
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1544	-28,25	-28,31	-28,28	0,04

Tabela C.35: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1931	-30,74	-30,91	-30,83	0,12
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1893	-30,79	-30,72	-30,76	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1955	-30,78	-30,89	-30,84	0,08
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1924	-30,68	-30,84	-30,76	0,11

Tabela C.36: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-0973	-30,45	-30,54	-30,50	0,06
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0956	-30,52	-30,45	-30,49	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1002	-30,49	-30,56	-30,53	0,05
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0977	-30,55	-30,43	-30,49	0,08

Tabela C.37: *N,N*,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-0798	-33,71	-33,63	-33,67	0,06
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0757	-33,68	-33,68	-33,68	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0776	-33,71	-33,72	-33,72	0,01
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0801	-33,57	-33,58	-33,58	0,01

Tabela C.38: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-1213	-30,35	-30,36	-30,36	0,01
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1263	-30,40	-30,33	-30,37	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1205	-30,41	-30,32	-30,37	0,06
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1216	-30,39	-30,30	-30,35	0,06

Tabela C.39: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1374	-32,62	-32,47	-32,55	0,11
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1428	-32,44	-32,40	-32,42	0,03
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1423	-32,35	-32,23	-32,29	0,08
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1450	-32,26	-32,21	-32,24	0,04

Tabela C.40: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1673	-31,50	-31,61	-31,56	0,08
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1669	-31,70	-31,47	-31,59	0,16
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1684	-31,61	-31,64	-31,63	0,02
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1656	-31,66	-31,49	-31,58	0,12

Tabela C.41: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Choque térmico	0145-1756	-30,50	-30,72	-30,61	0,16
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1792	-30,68	-30,53	-30,61	0,11
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1796	-30,67	-30,53	-30,60	0,10
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1782	-30,54	-30,46	-30,50	0,06

Tabela C.42: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-1184	-37,57	-37,57	-37,57	0,00
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1110	-37,47	-37,54	-37,51	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1100	-37,51	-37,53	-37,52	0,01
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1076	-37,52	-37,54	-37,53	0,01

Tabela C.43: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-0637	-30,85	-30,82	-30,84	0,02
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0602	-30,78	-30,78	-30,78	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0654	-30,62	-30,70	-30,66	0,06
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0629	-30,70	-30,80	-30,75	0,07

Tabela C.44: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos aos testes de estabilidade de degradação acelerada (choques térmicos) e estabilidade no longo prazo para $t = 6$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	s
Choque térmico	0145-2063	-29,21	-29,21	-29,21	0,00
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2033	-29,23	-29,23	-29,23	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1999	-29,21	-29,26	-29,24	0,04
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2042	-29,03	-29,20	-29,12	0,12

As Tabelas C.45 a C.66 mostram os resultados globais relativos ao teste de estabilidade no longo prazo correspondente a $t = 9$ meses para 2 conjuntos de amostras, Amostra 1 e Amostra 2.

C.5 Amostra 1, para $t=9$ meses

Tabela C.45: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1475	-28,43	-28,31	-28,37	0,08
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1483	-28,30	-28,32	-28,31	0,01
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1477	-28,29	-28,29	-28,29	0,00
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1563	-28,36	-28,36	-28,36	0,00

Tabela C.46: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1851	-30,56	-30,60	-30,58	0,03
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1843	-30,69	-30,69	-30,69	0,00
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1847	-30,74	-30,69	-30,72	0,04
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1850	-30,77	-30,68	-30,73	0,06

Tabela C.47: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0864	-30,36	-30,38	-30,37	0,01
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0880	-30,37	-30,40	-30,39	0,02
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0859	-30,31	-30,41	-30,36	0,07
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0928	-30,38	-30,31	-30,35	0,05

Tabela C.48: *N,N*,3,5-Tetrametilaniina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0721	-33,62	-33,61	-33,62	0,01
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0702	-33,55	-33,61	-33,58	0,04
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0717	-33,53	-33,60	-33,57	0,05
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0830	-33,58	-33,59	-33,59	0,01

Tabela C.49: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1245	-30,50	-30,31	-30,41	0,13
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1215	-30,42	-30,45	-30,44	0,02
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1221	-30,46	-30,35	-30,41	0,08
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1257	-30,39	-30,47	-30,43	0,06

Tabela C.50: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1366	-32,07	-32,18	-32,13	0,08
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1350	-32,06	-32,10	-32,08	0,03
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1357	-32,15	-32,13	-32,14	0,01
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1356	-32,25	-32,16	-32,21	0,06

Tabela C.51: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1605	-31,76	-31,69	-31,73	0,05
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1607	-31,67	-31,71	-31,69	0,03
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1601	-31,66	-31,65	-31,66	0,01
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1659	-31,55	-31,71	-31,63	0,11

Tabela C.52: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1727	-30,57	-30,61	-30,59	0,03
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1719	-30,47	-30,51	-30,49	0,03
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1723	-30,43	-30,43	-30,43	0,00
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1762	-30,57	-30,29	-30,43	0,20

Tabela C.53: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1032	-37,27	-37,43	-37,35	0,11
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1037	-37,55	-37,46	-37,51	0,06
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1073	-37,52	-37,49	-37,51	0,02
Referência mantida a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1040	-37,47	-37,53	-37,50	0,04

Tabela C.54: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-0591	-30,82	-30,88	-30,85	0,04
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-0573	-30,80	-30,90	-30,85	0,07
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-0572	-30,94	-30,91	-30,93	0,02
Referência mantida a -80 °C	0145-0579	-30,86	-30,87	-30,87	0,01

Tabela C.55: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 1.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-2052	-29,10	-29,22	-29,16	0,08
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-1973	-29,11	-29,34	-29,23	0,16
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-1971	-29,03	-29,18	-29,11	0,11
Referência mantida a -80 °C	0145-2001	-29,12	-29,10	-29,11	0,01

C.6 Amostra 2, para $t=9$ meses

Tabela C.56: 1-Octanol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-1550	-28,38	-28,40	-28,39	0,01
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-1539	-28,32	-28,47	-28,40	0,11
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-1521	-28,33	-28,40	-28,37	0,05

Tabela C.57: 2,6-Dimetilfenol. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1916	-30,67	-30,67	-30,67	0,00
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1915	-30,65	-30,72	-30,69	0,05
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1912	-30,61	-30,83	-30,72	0,16

Tabela C.58: 2,6-Dimetilanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0905	-30,48	-30,35	-30,42	0,09
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0899	-30,39	-30,36	-30,38	0,02
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0894	-30,31	-30,41	-30,36	0,07

Tabela C.59: *N,N*,3,5-Tetrametilnilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0740	-33,69	-33,56	-33,63	0,09
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0752	-33,68	-33,67	-33,68	0,01
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0746	-33,57	-33,61	-33,59	0,03

Tabela C.60: 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-1302	-30,51	-30,45	-30,48	0,04
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-1247	-30,45	-30,32	-30,39	0,09
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-1287	-30,53	-30,57	-30,55	0,03

Tabela C.61: Dodecano. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-1440	-32,14	-32,09	-32,12	0,04
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-1462	-32,21	-32,12	-32,17	0,06
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-1433	-32,16	-32,22	-32,19	0,04

Tabela C.62: Decanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a -20 °C	0145-1663	-31,61	-31,73	-31,67	0,08
Mantido a $+04\text{ °C}$	0145-1675	-31,72	-31,68	-31,70	0,03
Mantido a $+20\text{ °C}$	0145-1668	-31,64	-31,61	-31,63	0,02

Tabela C.63: Dodecanoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1806	-30,46	-30,45	-30,46	0,01
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1802	-30,57	-30,60	-30,59	0,02
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1804	-30,53	-30,59	-30,56	0,04

Tabela C.64: 2-(Metilamino)benzoato de metilo. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1097	-37,39	-37,43	-37,41	0,03
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1122	-37,45	-37,46	-37,46	0,01
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1104	-37,49	-37,51	-37,50	0,01

Tabela C.65: Nonanal. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0631	-30,85	-30,83	-30,84	0,01
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0638	-30,87	-30,78	-30,83	0,06
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-0625	-30,74	-30,86	-30,80	0,08

Tabela C.66: Vanilina. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) relativos ao teste de estabilidade no longo prazo para $t = 9$ meses. Amostra 2.

Condições	Referência	2 Medições/amostra			
		1	2	Média	<i>s</i>
Mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-1988	-29,19	-29,24	-29,22	0,04
Mantido a $+04\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2031	-29,13	-29,28	-29,21	0,11
Mantido a $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$	0145-2049	-29,03	-29,10	-29,07	0,05

Apêndice D

Breves Notas Explicativas Sobre Estatística

As definições abaixo descritas estão conforme o VIM,¹ o Guia ISO 30,²⁸² a Norma ISO 5725-1,³³⁰ as Normas ISO 3534-1 e 3534-3,^{343,344} ou foram retiradas de literatura específica.^{319,345}

- Agrupar dados, do inglês “to pool data”: A possibilidade para agrupar dados impõe que sejam satisfeitas duas condições: as variâncias dos laboratórios devem ser homogêneas (o teste de Bartlett não pode detectar valores aberrantes), e as diferenças entre as médias dos laboratórios não podem ser estatisticamente significativas (estimado pelo teste *F*-Snedecor).
- Amostragem hierarquizada ou aninhada (“nested”): Amostragem em que a amostra é seleccionada por estágios, as unidades amostradas em cada estágio são amostradas das maiores unidade escolhidas do estágio anterior.
- ANalysis Of VAriance, ANOVA: Análise de variâncias, definida como a técnica que consiste na separação da variação total de uma variável de resposta em componentes significativos, associados a fontes específicas de variação. ANOVA unifactorial (ANOVA “one-way”) calcula só a variância interlaboratórios e avalia a sua significância. A ANOVA dupla hierárquica (“two-fold nested” ANOVA) calcula a variância interlaboratórios e a variância intralaboratórios.
- Assimetria, do inglês “Skewness”: Grau de assimetria relativamente à distribuição Normal.
- Curtose, do inglês “Kurtosis”: Grau de achatamento relativamente à distribuição Normal. O conjunto de dados são considerados normais quando a assimetria e a curtose correspondem a uma distribuição normal pra um dadoo nível de significância.
- Deriva (“drift”): Variação lenta de uma característica metrológica de um instrumento de medição.

- Desvio padrão experimental: Parâmetro s que caracteriza a dispersão dos resultados obtidos numa série de n medições da mesma mensuranda, dado pela fórmula

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (\text{D.1})$$

- Desvio padrão experimental da média: É uma estimativa do desvio padrão experimental da média e representa-se pela expressão

$$s = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{D.2})$$

O desvio padrão experimental da média é por vezes incorrectamente usado como “erro padrão da média”.

- Desvio padrão da repetibilidade, s_r : O desvio padrão de resultados obtidos em condições de repetibilidade. É uma medida da dispersão dos resultados obtidos em condições de repetibilidade. Similarmente, a variância da repetibilidade s_r^2 pode ser definida e usada como uma medida da dispersão dos resultados obtidos em condições de repetibilidade.
- Desvio padrão da reprodutibilidade, s_R : O desvio padrão de resultados obtidos em condições de reprodutibilidade. É uma medida da dispersão dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade. Similarmente, a variância da reprodutibilidade s_R^2 pode ser definida e usada como uma medida da dispersão dos resultados obtidos em condições de reprodutibilidade.
- Ensaio de proficiência: Método para verificar o desempenho de um laboratório através de testes interlaboratoriais.²⁵⁸
- Exactidão da medição: Aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da mensuranda.
- Incerteza de medição: Parâmetro associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. Pode ser por exemplo o desvio padrão (ou um dado múltiplo dele), ou a metade de um intervalo para um dado nível de confiança.
- Limite de repetibilidade: O valor menor ou igual esperado com uma probabilidade de 95 %, entre a diferença absoluta de dois resultados obtidos em condições de repetibilidade. O símbolo usado é r .
- Limite de reprodutibilidade: O valor menor ou igual esperado com uma probabilidade de 95 %, entre a diferença absoluta de dois resultados obtidos em condições de reprodutibilidade. O símbolo usado é R .
- Nível de confiança, n.c.: O valor $1-\alpha$ da probabilidade (P) associada com um intervalo de confiança (IC) ou intervalo de tolerância (IT).

- **Precisão:** Aproximação entre os resultados de medições independentes obtidos em condições de precisão. A medida da precisão é normalmente expressa em termos de imprecisão e considerada como o desvio padrão. Menor precisão é reflectida por um desvio padrão maior. Resultados independentes significa resultados obtidos de modo a não se influenciarem. As condições de repetibilidade e de reprodutibilidade são condições particulares extremas.
- **Repetibilidade dos resultados:** Precisão sob condições de repetibilidade. Aproximação entre os resultados de medições sucessivas da mesma mensuranda efectuadas nas mesmas condições de medição. As condições de repetibilidade incluem: mesmo método; mesmo operador; mesmo instrumento de medição, usado nas mesmas condições; mesmo laboratório; repetição num curto intervalo de tempo.¹
- **Reprodutibilidade dos resultados:** Precisão sob condições de reprodutibilidade. Aproximação entre os resultados das medições da mesma mensuranda efectuada com alteração das condições de medição. As condições de reprodutibilidade podem incluir: mesmo método de medição; diferentes operadores; diferentes instrumentos de medição e diferentes laboratórios.
- **Semi-amplitude do intervalo de confiança a 95 %** (“the half-width of the 95 % Confidence Interval”): Corresponde à gama onde se pode encontrar o valor médio com um n.c. de 95 %).
- **Semi-amplitude do intervalo de tolerância a 95 %/95 %** (“the half-width of the 95 %/95 % Tolerance Interval”): Corresponde ao intervalo onde se podem encontrar 95 % das médias (dos laboratórios) com 95 % de probabilidade.
- **Teste de Bartlett:** Teste usado para detecção de variâncias aberrantes. Compara o valor estatístico de χ^2 com o valor crítico da distribuição χ^2 .
- **Teste de Cochran:** Teste usado para detecção de variâncias aberrantes. Compara o valor de *C* estatístico com o valor crítico de *C* tabelado (tabela de Cochran).
- **Teste de Dixon:** Teste usado para detecção de valores aberrantes. Compara o valor estatístico de Dixon com o valor crítico das tabelas de Dixon.
- **Teste *F* de Snedecor:** Teste usado para análise de variâncias aberrantes. Compara o valor de *F* estatístico com o valor crítico de *F* tabelado (tabela teste *F*).
- **Teste de Grubbs:** Teste usado para detecção de valores aberrantes. Pode ser Simple ou Duplo, este último é utilizado quando o teste simple não detecta valores aberrantes.
- **Teste de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors:** Teste usado para verificação da normalidade de um conjunto de dados. Compara o valor estatístico de χ^2 com o valor crítico da distribuição χ^2 .
- **Teste múltiplo de Scheffe:** Verifica se as médias dos laboratórios são significativamente diferentes por comparação das médias duas a duas.

- Teste- t de Nalimov: O valor de t estatístico de Nalimov é comparado com o valor crítico da distribuição t -Student.
- Teste- t de Student: Teste de significância para comparar médias.
- valor- p : Probabilidade de uma amostra pertencer a uma dada população assumindo que a hipótese nula é verdadeira, $H_0 : \mu_1 = \mu_2$.

Os testes utilizados acima mencionados são vulgarmente utilizados no tratamento estatístico de resultados e podem encontrar-se facilmente descritos em bibliografia específica da área, pelo que uma descrição detalhada destes testes sai do âmbito deste trabalho.

Apêndice E

Cálculos Estatísticos

Uma das maneiras de calcular os parâmetros estatísticos s_{inter} , s_{intra} , s_r , s_R , r e R é pela análise de variâncias, ANOVA. As Tabelas E.1 e E.2 representam Tabela ANOVA tipo para ANOVA unifactorial e bifactorial, respectivamente. O número de grupos está representado por p e o número de réplicas por n .

E.1 ANOVA unifactorial

No cálculo do s interlaboratórios e do s intralaboratórios, utilizou-se a análise de variância ANOVA unifactorial.

Tabela E.1: Tabela ANOVA unifactorial

Fonte de Variação	Soma de Quadrados, SQ	Nº g.l.	Média de Quadrados, MQ	F_{calc}	F_{crit}
Entre grupos (E)	SQ_E	$p - 1$	$MQ_E = \frac{SQ_E}{g.l.E}$	$\frac{MQ_E}{MQ_D}$	$F_{(\alpha; g.l.E; g.l.D)}$
Dentro dos grupos (D)	SQ_D	$p(n - 1)$	$MQ_D = \frac{SQ_D}{g.l.D}$		
Total (T)	SQ_T	$np - 1$			

Por comparação com a Tabela E.1, sabendo que $MQ_D = s_{intra}^2$, a sua raiz quadrada será s_{intra} .

Para o cálculo de s_{inter} usa-se a expressão

$$s_{inter}^2 = \sqrt{((MQ_E - MQ_D)/n)}$$

logo a sua raiz quadrada será o valor para s_{inter} .

O mesmo para o cálculo dos parâmetros s_r , s_R , r e R , sabendo que:

$$s_r^2 = MQ_D \quad (\text{E.1})$$

onde MQ_D é a Média de Quadrados Dentro dos Grupos, “Mean Squares Within Groups”,

a variância da reprodutibilidade, s_R^2 se calcula pela equação,

$$s_R^2 = s_r^2 + s_L^2 \quad (\text{E.2})$$

onde s_r^2 é a variância da repetibilidade e s_L^2 corresponde à variância interlaboratórios, e

$$s_L^2 = \frac{MQ_E - MQ_D}{n} \quad (\text{E.3})$$

onde MQ_E corresponde à Média de Quadrados Entre Grupos “Mean Squares Between Groups”.

Seguidamente pode calcular-se o limite de repetibilidade, pela seguinte expressão:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (\text{E.4})$$

e o limite de reprodutibilidade

$$R = 2,8 \times s_R \quad (\text{E.5})$$

Para calcular s_r e s_R , dos métodos EA/IRMS e GC/IRMS, utilizaram-se os dados interlaboratoriais relativos ao ECS, e que resultaram da média ponderada dos desvios padrão dos diferentes compostos, *i.e.*,

$$s_R = \frac{(s_{R1} \times n_{L1}) + (s_{R2} \times n_{L2}) + \dots + (s_{Rn} \times n_{Ln})}{L_1 + L_2 + \dots + L_n} \quad (\text{E.6})$$

em que s_{R1} a s_{Rn} correspondem à reprodutibilidade dos compostos 1 a n , e n_{L1} a n_{Ln} corresponde ao número de laboratórios que forneceram resultados para os compostos 1 a n . Fez-se o mesmo para o cálculo de s_r .

E.2 ANOVA bifactorial

No estudo da influência do laboratório, das duas colunas cromatográficas e do composto puro e em mistura (compostos analisados por GC/IRMS no Ensaio Circular), aplicou-se a análise de variâncias ANOVA bifactorial.

A Tabela E.2 representa Tabela ANOVA tipo para ANOVA bifatorial.

Tabela E.2: Tabela ANOVA bifatorial

Fonte de Variação	Soma de Quadrados, SQ	Nºg.l.	Média de Quadrados, MQ	F_{calc}	F_{crit}
Entre grupos (E)	SQ_E	$p - 1$	$MQ_E = \frac{SQ_E}{g.l._E}$	$\frac{MQ_E}{MQ_r}$	$F_{(\alpha; g.l._E; g.l._r)}$
Dentro dos grupos (D)	SQ_D	$p(n - 1)$	$MQ_D = \frac{SQ_D}{g.l._D}$	$\frac{MQ_D}{MQ_r}$	$F_{(\alpha; g.l._D; g.l._r)}$
Variação residual (ou Erro) (r)	SQ_r	$(p - 1)(n - 1)$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{g.l._r}$		
Total	SQ_T	$np - 1$			

Aqui a análise é feita por comparação dos valores de F_{calc} com os valores de F_{crit} . O efeito de E é significativo ao nível de significância α se $F_{\text{calc}}^E > F_{\text{crit}}$. O efeito de D é significativo ao nível de significância α se $F_{\text{calc}}^D > F_{\text{crit}}$.

Apêndice F

Resultados de $\delta^{13}\text{C}$ por GC/IRMS. Ensaio Circular

Na Tabela F.1 estão compilados os resultados correspondentes à análise dos 11 compostos por GC/IRMS nas diferentes condições (colunas cromatográficas polar e apolar e composto puro e em mistura).

Tabela F.1: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) obtidos por GC-IRMS.

Composto	Referência	Lab.	Coluna	Puro/ Mistura	1	2	3	Média	s	s ²	Valor de referência
1-Octanol	-	A	col.B (wax)	m	-27,63	-27,48	-27,55	-27,55	0,075	0,006	
1-Octanol	-	A	col.A (HP5)	m	-28,37	-28,66	-28,82	-28,62	0,228	0,052	
1-Octanol	-	A	col.B (wax)	p	-28,31	-28,20	-28,00	-28,17	0,157	0,025	
1-Octanol	-	A	col.A (HP5)	p	-28,29	-28,54	-28,38	-28,40	0,127	0,016	
1-Octanol	0137-0990	B	col.A (HP5)	m	-30,40	-30,23	-30,27	-30,30	0,089	0,008	
1-Octanol	0137-0990	B	col.B (wax)	m	-29,38	-29,33	-29,02	-29,24	0,195	0,038	
1-Octanol	0137-0990	B	col.A (HP5)	p	-28,03	-27,81	-27,74	-27,86	0,151	0,023	
1-Octanol	0137-0990	B	col.B (wax)	p	-31,18	-30,72	-30,30	-30,73	0,440	0,194	
1-Octanol	0137-0990	C	col.A (HP5)	m	-28,23	-28,14	-28,43	-28,27	0,148	0,022	
1-Octanol	0137-0990	C	col.B (wax)	m	-28,28	-28,24	-28,05	-28,19	0,123	0,015	
1-Octanol	0137-0990	C	col.A (HP5)	p	-28,61	-28,64	-28,40	-28,55	0,131	0,017	
1-Octanol	0137-0990	C	col.B (wax)	p	-29,00	-28,98	-28,81	-28,93	0,104	0,011	
1-Octanol	0137-0990	D	col.A (HP5)	p	-28,95	-29,15	-29,26	-29,12	0,155	0,024	
1-Octanol	0137-0990	D	col.B (wax)	p	-27,61	-27,68	-27,27	-27,52	0,219	0,048	
2,6-Dimetilfenol	-	A	col.B (wax)	p	-32,09	-32,01	-31,98	-32,03	0,057	0,003	
2,6-Dimetilfenol	-	A	col.A (HP5)	p	-31,76	-31,16	-32,10	-31,67	0,476	0,227	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	B	col.A (HP5)	p	-32,39	-32,26	-32,16	-32,27	0,115	0,013	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	B	col.B (wax)	p	-32,02	-31,90	-31,72	-31,88	0,151	0,023	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	C	col.A (HP5)	p	-30,48	-30,40	-30,27	-30,38	0,106	0,011	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	C	col.B (wax)	p	-30,74	-30,53	-30,71	-30,66	0,114	0,013	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	D	col.A (HP5)	p	-35,31	-35,32	-35,52	-35,38	0,119	0,014	
2,6-Dimetilfenol	0137-0993	D	col.B (wax)	p	-	-	-	-	-	-	
2,6-Dimetilanilina	-	A	col.B (wax)	m	-36,12	-36,28	-36,47	-36,29	0,175	0,031	
2,6-Dimetilanilina	-	A	col.A (HP5)	m	-38,56	-37,92	-38,05	-38,18	0,338	0,114	
2,6-Dimetilanilina	-	A	col.B (wax)	p	-39,04	-39,02	-38,52	-38,86	0,295	0,087	
2,6-Dimetilanilina	-	A	col.A (HP5)	p	-38,09	-37,83	-38,03	-37,98	0,136	0,019	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	B	col.A (HP5)	m	-31,54	-31,78	-31,57	-31,63	0,131	0,017	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	B	col.B (wax)	m	-31,00	-30,88	-30,34	-30,74	0,352	0,124	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	B	col.A (HP5)	p	-29,83	-30,12	-30,55	-30,17	0,362	0,131	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	B	col.B (wax)	p	-29,85	-30,15	-30,44	-30,15	0,295	0,087	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	C	col.A (HP5)	m	-30,05	-30,11	-30,20	-30,12	0,075	0,006	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	C	col.B (wax)	m	-30,65	-30,19	-30,20	-30,35	0,263	0,069	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	C	col.A (HP5)	p	-30,25	-30,08	-30,34	-30,22	0,132	0,017	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	C	col.B (wax)	p	-30,35	-30,33	-30,44	-30,37	0,059	0,003	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	D	col.A (HP5)	p	-32,07	-32,75	-33,44	-32,75	0,685	0,469	
2,6-Dimetilanilina	0137-0986	D	col.B (wax)	p	-19,86	-21,31	-22,00	-21,06	1,091	1,191	
N,N,3,5-Tetrametilaniilina	-	A	col.B (wax)	m	-32,67	-32,66	-32,89	-32,74	0,130	0,017	
N,N,3,5-Tetrametilaniilina	-	A	col.A (HP5)	m	-34,83	-33,59	-33,24	-33,89	0,835	0,698	
N,N,3,5-Tetrametilaniilina	-	A	col.B (wax)	p	-35,14	-35,19	-35,14	-35,14	0,029	0,001	

Continua página seguinte...

Tabela F.1 – Continuação

Composto	Referência	Lab.	Coluna	Puro/ Mistura	1	2	3	Média	s	s ²	Valor de referência
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	–	A	col.A (HP5)	p	-34,66	-34,82	-34,79	-34,76	0,085	0,007	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	B	col.A (HP5)	m	-34,70	-34,69	-34,48	-34,62	0,124	0,015	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	B	col.B (wax)	m	-34,22	-34,16	-34,00	-34,13	0,114	0,013	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	B	col.A (HP5)	p	-32,99	-33,29	-33,14	-33,14	0,150	0,022	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	B	col.B (wax)	p	-33,14	-33,46	-34,08	-33,56	0,478	0,228	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	C	col.A (HP5)	m	-32,92	-32,94	-32,94	-32,93	0,012	0,000	-33,74
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	C	col.B (wax)	m	-33,77	-33,45	-33,46	-33,56	0,182	0,033	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	C	col.A (HP5)	p	-33,24	-33,39	-33,36	-33,33	0,079	0,006	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	C	col.B (wax)	p	-33,51	-33,76	-33,71	-33,66	0,132	0,018	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	D	col.A (HP5)	p	-33,62	-34,64	-35,27	-34,51	0,833	0,694	
N,N,3,5-Tetrametilaniлина	0137-0985	D	col.B (wax)	p	-27,29	-27,87	-29,56	-28,24	1,178	1,387	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	–	A	col.B (wax)	p	-30,38	-30,16	-30,68	-30,41	0,261	0,068	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	–	A	col.A (HP5)	p	-30,11	-30,27	-29,91	-30,10	0,180	0,033	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	B	col.A (HP5)	p	-31,54	-31,57	-31,28	-31,46	0,159	0,025	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	B	col.B (wax)	p	-30,33	-30,52	-30,25	-30,37	0,139	0,019	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	C	col.A (HP5)	p	-30,14	-30,11	-29,87	-30,04	0,148	0,022	-30,34
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	C	col.B (wax)	p	-29,84	-30,33	-29,98	-30,05	0,252	0,064	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	D	col.A (HP5)	p	-30,29	-30,18	-30,30	-30,25	0,068	0,005	
4-(N,N-Dimetilamino)benzoato de etilo	0137-0988	D	col.B (wax)	p	-30,65	-30,08	-29,93	-30,22	0,376	0,142	
Dodecano	–	A	col.B (wax)	m	-30,15	-30,04	-30,29	-30,16	0,125	0,016	
Dodecano	–	A	col.A (HP5)	m	-29,22	-30,26	-29,91	-29,80	0,529	0,280	
Dodecano	–	A	col.B (wax)	p	-32,72	-32,52	-32,33	-32,52	0,195	0,038	
Dodecano	–	A	col.A (HP5)	p	-30,38	-30,57	-30,74	-30,56	0,180	0,032	
Dodecano	0137-0989	B	col.A (HP5)	m	-33,09	-33,19	-33,22	-33,17	0,068	0,005	
Dodecano	0137-0989	B	col.B (wax)	m	-32,88	-32,92	-33,02	-32,94	0,072	0,005	
Dodecano	0137-0989	B	col.A (HP5)	p	-32,04	-31,64	-32,15	-31,94	0,268	0,072	
Dodecano	0137-0989	B	col.B (wax)	p	-32,86	-32,69	-32,27	-32,61	0,304	0,092	-32,19
Dodecano	0137-0989	C	col.A (HP5)	m	-31,68	-31,60	-31,72	-31,67	0,061	0,004	
Dodecano	0137-0989	C	col.B (wax)	m	-31,75	-31,86	-31,67	-31,76	0,095	0,009	
Dodecano	0137-0989	C	col.A (HP5)	p	-31,84	-31,61	-31,55	-31,67	0,153	0,023	
Dodecano	0137-0989	C	col.B (wax)	p	-32,24	-32,21	-32,50	-32,32	0,159	0,025	
Dodecano	0137-0989	D	col.A (HP5)	p	-32,76	-32,58	-32,71	-32,68	0,095	0,009	
Dodecano	0137-0989	D	col.B (wax)	p	-31,94	–	–	–	–	–	
Decanoato de metilo	–	A	col.B (wax)	m	-30,91	-30,92	-31,16	-31,00	0,142	0,020	
Decanoato de metilo	–	A	col.A (HP5)	m	-29,29	-29,11	-29,52	-29,31	0,206	0,042	
Decanoato de metilo	–	A	col.B (wax)	p	-31,55	-31,96	-31,63	-31,71	0,217	0,047	
Decanoato de metilo	–	A	col.A (HP5)	p	-29,89	-29,97	-30,06	-29,97	0,085	0,007	-31,51
Decanoato de metilo	0137-0991	B	col.A (HP5)	m	-32,87	-32,87	-32,88	-32,87	0,006	0,000	
Decanoato de metilo	0137-0991	B	col.B (wax)	m	-32,54	-32,99	-33,30	-32,94	0,382	0,146	
Decanoato de metilo	0137-0991	B	col.A (HP5)	p	-31,41	-31,36	-31,28	-31,35	0,066	0,004	

Continúa página seguinte...

Tabela F.1 – Continuação

Composto	Referência	Lab.	Coluna	Puro/ Mistura	1	2	3	Média	s	s ²	Valor de referência
Decanoato de metilo	0137-0991	B	col.B (wax)	p	-32,09	-31,64	-31,85	-31,86	0,225	0,051	
Decanoato de metilo	0137-0991	C	col.A (HP5)	m	-31,25	-31,12	-31,24	-31,20	0,072	0,005	
Decanoato de metilo	0137-0991	C	col.B (wax)	m	-31,44	-31,19	-31,13	-31,25	0,164	0,027	
Decanoato de metilo	0137-0991	C	col.A (HP5)	p	-31,95	-31,67	-31,91	-31,84	0,151	0,023	-31,51
Decanoato de metilo	0137-0991	C	col.B (wax)	p	-31,65	-31,45	-31,74	-31,61	0,148	0,022	
Decanoato de metilo	0137-0991	D	col.A (HP5)	p	-31,57	-31,50	-32,14	-31,74	0,350	0,122	
Decanoato de metilo	0137-0991	D	col.B (wax)	p	-29,92	-29,32	-29,18	-29,47	0,394	0,155	
Dodecanoato de metilo	-	A	col.B (wax)	m	-29,89	-29,79	-29,90	-29,86	0,061	0,004	
Dodecanoato de metilo	-	A	col.A (HP5)	m	-28,37	-28,03	-28,36	-28,25	0,193	0,037	
Dodecanoato de metilo	-	A	col.B (wax)	p	-30,28	-30,44	-31,02	-30,58	0,389	0,152	
Dodecanoato de metilo	-	A	col.A (HP5)	p	-28,72	-28,83	-28,69	-28,75	0,074	0,005	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	B	col.A (HP5)	m	-31,43	-31,41	-31,34	-31,39	0,047	0,002	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	B	col.B (wax)	m	-30,97	-31,24	-30,87	-31,03	0,191	0,037	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	B	col.A (HP5)	p	-30,12	-30,35	-30,16	-30,21	0,123	0,015	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	B	col.B (wax)	p	-30,80	-30,42	-30,85	-30,69	0,235	0,055	-30,48
Dodecanoato de metilo	0137-0992	C	col.A (HP5)	m	-30,08	-30,00	-30,09	-30,06	0,049	0,002	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	C	col.B (wax)	m	-30,59	-30,15	-30,11	-30,28	0,266	0,071	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	C	col.A (HP5)	p	-30,27	-30,31	-30,41	-30,33	0,072	0,005	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	C	col.B (wax)	p	-30,60	-30,38	-30,65	-30,54	0,144	0,021	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	D	col.A (HP5)	p	-30,45	-30,76	-30,72	-30,64	0,168	0,028	
Dodecanoato de metilo	0137-0992	D	col.B (wax)	p	-	-	-	-	-	-	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	-	A	col.B (wax)	m	-29,89	-29,92	-30,10	-29,97	0,114	0,013	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	-	A	col.A (HP5)	m	-38,30	-37,65	-37,00	-37,65	0,650	0,422	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	-	A	col.B (wax)	p	-29,24	-29,16	-29,46	-29,29	0,155	0,024	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	-	A	col.A (HP5)	p	-37,34	-37,43	-37,42	-37,40	0,049	0,002	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	B	col.A (HP5)	m	-39,28	-39,11	-39,33	-39,24	0,115	0,013	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	B	col.B (wax)	m	-38,31	-38,19	-38,13	-38,21	0,092	0,008	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	B	col.A (HP5)	p	-37,33	-37,55	-37,47	-37,45	0,111	0,012	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	B	col.B (wax)	p	-38,44	-38,12	-38,55	-38,37	0,223	0,050	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0,137-0987	C	col.A (HP5)	m	-36,00	-36,20	-36,35	-36,18	0,176	0,031	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0,137-0987	C	col.B (wax)	m	-37,54	-37,13	-37,00	-37,22	0,282	0,079	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	C	col.A (HP5)	p	-36,72	-36,60	-36,80	-36,71	0,101	0,010	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	C	col.B (wax)	p	-37,27	-37,16	-37,21	-37,21	0,055	0,003	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	D	col.A (HP5)	p	-38,51	-39,17	-38,67	-38,78	0,345	0,119	
2-(Metilamino)benzoato de metilo	0137-0987	D	col.B (wax)	p	-38,49	-39,47	-38,35	-38,77	0,609	0,370	
Nonanal	-	A	col.B (wax)	p	-30,64	-30,60	-30,80	-30,68	0,106	0,011	
Nonanal	-	A	col.A (HP5)	p	-31,01	-30,44	-30,52	-30,66	0,309	0,095	
Nonanal	0137-0984	B	col.A (HP5)	p	-33,66	-33,59	-33,73	-33,66	0,070	0,005	-30,84
Nonanal	0137-0984	B	col.B (wax)	p	-31,67	-31,68	-32,16	-31,84	0,280	0,078	
Nonanal	0137-0984	C	col.A (HP5)	p	-30,22	-30,48	-30,40	-30,37	0,133	0,018	

Continua página seguinte...

Tabela F.1 – Continuação

Composto	Referência	Lab.	Coluna	Puro/ Mistura	1	2	3	Média	s	s ²	Valor de referência
Nonanal	0137-0984	C	col.B (wax)	P	-30,62	-30,55	-30,31	-30,49	0,163	0,026	
Nonanal	0137-0984	D	col.A (HP5)	P	-31,76	-32,19	-32,33	-32,09	0,295	0,087	-30,84
Nonanal	0137-0984	D	col.B (wax)	P	-30,99	-31,28	-31,11	-31,13	0,149	0,022	
Vanilina	-	A	col.B (wax)	P	-28,53	-28,84	-28,59	-28,65	0,164	0,027	
Vanilina	-	A	col.A (HP5)	P	-29,01	-28,35	-28,17	-28,51	0,442	0,196	
Vanilina	0137-0994	B	col.A (HP5)	P	-28,62	-28,59	-28,53	-28,58	0,046	0,002	
Vanilina	0137-0994	B	col.B (wax)	P	-29,92	-29,73	-29,70	-29,78	0,119	0,014	
Vanilina	0137-0994	C	col.A (HP5)	P	-28,75	-28,88	-28,99	-28,87	0,120	0,014	-28,93
Vanilina	0137-0994	C	col.B (wax)	P	-29,00	-28,72	-29,11	-28,94	0,201	0,040	
Vanilina	0137-0994	D	col.A (HP5)	P	-28,49	-28,60	-28,74	-28,61	0,127	0,016	
Vanilina	0137-0994	D	col.B (wax)	P	-	-	-	-	-	-	

Apêndice G

Exercício de Certificação Simulado (ECS)

A Tabela G.1 lista os laboratórios que participaram no ECS.

Tabela G.1: Laboratórios que participaram no ECS.

Organização	Local/País
Eurofins Scientific Analytics	Nantes, França
ARC Seibersdorf Research GmbH	Seibersdorf, Áustria
LSSD, Canada Customs & Revenue Agency	Otava, Canadá
Canadian Food Inspection Agency	Otava, Canadá
CNRS Service Central D'Analyses	Vernaison, França
Laboratoires des Douanes	Paris, França
BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung	Berlim, Alemanha
J. W. G.- Universität Frankfurt am Main	Frankfurt, Alemanha
Instituto agrario di S. Michele all'Adige	S. Michele all'Adige, Itália
JRC- ISPRA (IHCP)	Ispra, Itália
Instituto de Geologia, UNAM	Cidade do México, México
INETI (DTIQ/LAQAS)	Lisboa, Portugal
Instituto Tecnológico e Nuclear	Sacavém, Portugal
Jozef Stephan Institute	Ljubljana, Eslovénia

Continua página seguinte...

TabelaG.1 – Continuação

Organização	Local/País
AINIA	Valencia, Espanha
CSL Food Science Laboratory	York, Reino Unido
University of East Anglia	Norwich, Reino Unido
Laboratorio Agrario de Madrid	Madrid, Espanha
Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit	Oldenburg, Alemanha
INRA Saint-Gilles	Saint-Gilles, França

G.1 Resultados do ECS. EA/IRMS

As Tabelas G.2 a G.12 apresentam os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ correspondentes ao ECS obtidos pela técnica de EA/IRMS.

Tabela G.2: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 1-Octanol obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-28,40	-28,27	-28,45	-28,37	0,093	0,054
L1	-28,50	-28,10	-28,20	-28,27	0,208	0,12
L2	-30,02	-29,08	-29,90	-29,67	0,512	0,30
L4	-28,47	-28,36	-28,32	-28,38	0,078	0,045
L5	-28,43	-28,78	-28,67	-28,63	0,179	0,10
L6	-28,61	-28,52	-28,47	-28,53	0,071	0,041
L9	-28,43	-28,41	-28,43	-28,42	0,012	0,007
L11	-28,42	-28,23	-28,26	-28,30	0,102	0,059
L14	-28,35	-28,38	-28,40	-28,38	0,025	0,015
L15	-28,30	-28,46	-28,53	-28,43	0,118	0,068
L17	-28,40	-28,35	-28,42	-28,39	0,036	0,021
L19	-28,54	-28,61	-28,16	-28,44	0,242	0,14
L22	-28,30	-28,24	-28,30	-28,28	0,035	0,020
L23	-27,82	-28,22	-28,06	-28,03	0,201	0,12
			Média	-28,47		
			<i>s</i>	0,37		

Tabela G.3: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2,6-Dimetilfenol obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-30,76	-30,72	-30,68	-30,72	0,040	0,022
L1	-30,60	-30,70	-30,90	-30,73	0,153	0,085
L2	-32,05	-31,84	-32,45	-32,11	0,310	0,17
L4	-30,71	-30,67	-30,63	-30,67	0,040	0,022
L5	-30,82	-30,67	-30,71	-30,73	0,078	0,043
L6	-30,75	-30,78	-30,66	-30,73	0,062	0,035
L9	-30,62	-30,63	-30,64	-30,63	0,010	0,006
L14	-30,53	-30,76	-30,48	-30,59	0,149	0,83
L15	-30,77	-30,66	-30,69	-30,71	0,057	0,031
L16	-31,00	-30,92	-30,77	-30,90	0,117	0,065
L17	-30,65	-30,70	-30,76	-30,70	0,055	0,030
L18	-30,80	-30,69	-30,88	-30,79	0,095	0,053
L19	-31,42	-31,15	-31,53	-31,37	0,196	0,11
L22	-30,69	-30,62	-30,72	-30,68	0,051	0,028
L23	-30,73	-30,77	-30,94	-30,81	0,112	0,062
			Média	-30,87		
			<i>s</i>	0,40		

Tabela G.4: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2,6-Dimetilanilina obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-30,30	-30,48	-30,50	-30,43	0,110	0,064
L1	-30,60	-30,50	-30,50	-30,53	0,058	0,033
L2	-31,85	-31,26	-31,80	-31,64	0,327	0,19
L4	-30,51	-30,52	-30,40	-30,48	0,067	0,038
L5	-30,67	-30,36	-30,60	-30,54	0,163	0,094
L6	-30,64	-30,51	-30,67	-30,61	0,085	0,049
L9	-30,45	-30,42	-30,44	-30,44	0,015	0,009
L11	-30,25	-30,43	-30,32	-30,33	0,091	0,052
L14	-30,47	-30,46	-30,51	-30,48	0,026	0,015
L15	-30,40	-30,27	-30,48	-30,38	0,106	0,061
L17	-30,49	-30,51	-30,50	-30,50	0,010	0,006
L19	-30,75	-30,61	-30,15	-30,50	0,314	0,18
L22	-30,44	-30,59	-30,39	-30,47	0,104	0,060
L23	-30,11	-30,49	-30,37	-30,32	0,194	0,11
			Média	-30,55		
			<i>s</i>	0,32		

Tabela G.5: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do *N,N,3,5*-Tetrametilnilina obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-33,71	-33,75	-33,88	-33,78	0,089	0,051
L1	-34,40	-33,70	-33,80	-33,97	0,379	0,22
L2	-34,15	-34,05	-34,52	-34,24	0,248	0,14
L4	-33,86	-33,71	-33,71	-33,76	0,087	0,050
L5	-33,63	-33,39	-33,37	-33,46	0,145	0,084
L6	-33,84	-33,64	-33,76	-33,75	0,101	0,058
L9	-33,84	-33,68	-33,64	-33,72	0,106	0,061
L11	-33,65	-33,70	-33,52	-33,62	0,093	0,054
L14	-33,68	-33,69	-33,73	-33,70	0,026	0,015
L15	-33,45	-33,51	-33,55	-33,50	0,050	0,029
L17	-33,69	-33,72	-33,66	-33,69	0,030	0,017
L19	-33,93	-33,71	-33,56	-33,73	0,186	0,11
L22	-33,83	-33,60	-33,59	-33,67	0,136	0,078
L23	-33,57	-33,84	-33,50	-33,64	0,180	0,11
			Média	-33,73		
			<i>s</i>	0,19		

Tabela G.6: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 4-(*N,N*-Dimetilamino)benzoato de etilo obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-30,44	-30,52	-30,66	-30,54	0,111	0,062
L1	-30,20	-30,30	-30,20	-30,23	0,058	0,032
L2	-32,18	-31,49	-31,82	-31,83	0,345	0,19
L4	-30,51	-30,38	-30,34	-30,41	0,089	0,049
L5	-30,46	-30,45	-30,50	-30,47	0,026	0,015
L6	-30,62	-30,44	-30,63	-30,56	0,107	0,059
L9	-30,43	-30,29	-30,33	-30,35	0,072	0,040
L14	-30,37	-30,31	-30,40	-30,36	0,046	0,025
L15	-30,49	-30,43	-30,40	-30,44	0,046	0,025
L16	-30,71	-30,71	-30,73	-30,72	0,012	0,006
L17	-30,29	-30,44	-30,37	-30,37	0,075	0,042
L18	-30,38	-30,52	-30,54	-30,48	0,087	0,048
L19	-30,95	-30,67	-30,56	-30,73	0,201	0,11
L22	-30,40	-30,34	-30,34	-30,36	0,035	0,019
L23	-30,46	-30,43	-30,48	-30,46	0,025	0,014
	Média			-30,55		
	<i>s</i>			0,39		

Tabela G.7: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Dodecano obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-32,25	-32,19	-32,36	-32,27	0,086	0,052
L1	-32,10	-32,20	-32,2	-32,17	0,058	0,035
L2	-33,10	-32,57	-33,03	-32,90	0,288	0,17
L4	-32,33	-32,21	-32,12	-32,22	0,105	0,064
L5	-32,37	-32,56	-32,46	-32,46	0,095	0,057
L6	-32,33	-32,46	-32,53	-32,44	0,101	0,061
L9	-32,31	-32,29	-32,47	-32,36	0,099	0,060
L11	-32,17	-32,23	-32,22	-32,21	0,032	0,019
L14	-32,21	-32,29	-32,35	-32,28	0,070	0,042
L15	-32,13	-32,09	-32,47	-32,23	0,209	0,13
L17	-32,23	-32,26	-32,24	-32,24	0,015	0,009
L19	-31,94	-31,63	-31,78	-31,78	0,155	0,094
L22	-32,18	-32,13	-32,24	-32,18	0,055	0,033
			Média	-32,29		
			<i>s</i>	0,25		

Tabela G.8: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Decanoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-31,67	-31,65	-31,64	-31,65	0,015	0,009
L1	-31,80	-31,40	-31,70	-31,63	0,208	0,13
L2	-30,70	-32,11	-32,25	-31,69	0,857	0,52
L4	-31,63	-31,55	-31,57	-31,58	0,042	0,025
L5	-31,59	-31,78	-31,66	-31,68	0,096	0,058
L6	-31,64	-31,74	-31,65	-31,68	0,055	0,033
L9	-31,83	-31,72	-31,68	-31,74	0,078	0,047
L11	-31,55	-31,54	-31,33	-31,47	0,124	0,075
L14	-31,62	-31,68	-31,72	-31,67	0,050	0,030
L15	-31,57	-31,81	-31,80	-31,73	0,136	0,082
L17	-31,69	-31,63	-31,66	-31,66	0,030	0,018
L19	-31,29	-31,13	-31,58	-31,33	0,228	0,14
L22	-31,66	-31,52	-31,58	-31,59	0,070	0,042
			Média	-31,62		
			<i>s</i>	0,11		

Tabela G.9: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Dodecanoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-30,58	-30,61	-30,45	-30,55	0,085	0,079
L1	-30,40	-30,50	-31,00	-30,63	0,321	0,19
L2	-32,72	-32,10	-31,46	-32,09	0,630	0,36
L4	-30,59	-30,48	-30,47	-30,51	0,067	0,038
L5	-30,57	-30,87	-30,72	-30,72	0,150	0,087
L6	-30,61	-30,69	-30,58	-30,63	0,057	0,033
L9	-30,44	-30,53	-30,54	-30,50	0,055	0,032
L11	-30,37	-30,40	-30,54	-30,44	0,091	0,052
L14	-30,52	-30,67	-30,58	-30,59	0,075	0,044
L15	-30,43	-30,86	-30,64	-30,64	0,215	0,12
L17	-30,53	-30,56	-30,55	-30,55	0,015	0,009
L19	-30,08	-29,99	-29,67	-29,91	0,215	0,12
L22	-30,54	-30,32	-30,48	-30,45	0,114	0,066
L23	-30,12	-30,59	-30,39	-30,37	0,236	0,14
			Média	-30,61		
			<i>s</i>	0,47		

Tabela G.10: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do 2-(Metilamino)benzoato de metilo obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-37,65	-37,82	-37,70	-37,72	0,087	0,050
L1	-37,40	-37,70	-37,30	-37,47	0,208	0,12
L2	-38,97	-38,39	-39,10	-38,82	0,378	0,22
L4	-37,69	-37,51	-37,55	-37,58	0,095	0,055
L5	-37,48	-37,58	-37,62	-37,56	0,072	0,042
L6	-37,57	-37,62	-37,77	-37,65	0,104	0,060
L9	-37,66	-37,55	-37,68	-37,63	0,070	0,040
L11	-37,67	-37,54	-37,68	-37,63	0,078	0,045
L14	-37,62	-37,70	-37,58	-37,63	0,061	0,035
L15	-37,45	-37,48	-37,46	-37,46	0,015	0,009
L17	-37,68	-37,73	-37,71	-37,71	0,025	0,015
L19	-37,95	-37,94	-37,72	-37,87	0,130	0,075
L22	-37,57	-37,70	-37,40	-37,56	0,150	0,087
L23	-37,41	-37,38	-37,45	-37,41	0,035	0,020
			Média	-37,69		
			<i>s</i>	0,34		

Tabela G.11: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Nonanal obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais			Média	<i>s</i>	IC (95%)
L0	-34,07	-34,00	-33,99	-34,02	0,044	0,026
L1	-33,70	-34,00	-33,90	-33,87	0,153	0,092
L2	-34,51	-34,40	-34,42	-34,44	0,059	0,035
L4	-34,03	-33,96	-33,89	-33,96	0,070	0,042
L5	-33,60	-33,79	-34,06	-33,82	0,231	0,14
L6	-34,04	-33,93	-34,05	-34,01	0,067	0,040
L9	-34,08	-34,02	-34,11	-34,07	0,046	0,028
L14	-33,95	-34,01	-33,88	-33,95	0,065	0,039
L15	-33,91	-33,83	-33,97	-33,9	0,070	0,042
L17	-33,81	-33,83	-33,92	-33,85	0,059	0,035
L19	-34,03	-33,90	-33,70	-33,88	0,166	0,10
L22	-34,02	-33,93	-33,86	-33,94	0,080	0,048
L23	-33,54	-33,92	-33,88	-33,78	0,209	0,13
			Média	-33,96		
			<i>s</i>	0,17		

Tabela G.12: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ do Vanilina obtidos por EA/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Medidas individuais		Média	<i>s</i>	IC (95%)	
L0	-29,24	-29,00	-29,09	-29,11	0,121	0,67
L1	-29,10	-29,10	-29,00	-29,07	0,058	0,032
L2	-30,70	-31,11	-30,50	-30,77	0,311	0,17
L4	-29,14	-29,12	-29,05	-29,10	0,047	0,026
L5	-29,25	-29,06	-29,13	-29,15	0,096	0,053
L6	-29,09	-28,97	-29,12	-29,06	0,079	0,044
L9	-29,07	-29,02	-28,95	-29,01	0,060	0,033
L14	-29,10	-29,05	-29,03	-29,06	0,036	0,020
L15	-29,34	-29,21	-29,02	-29,19	0,161	0,089
L16	-29,19	-29,40	-29,28	-29,29	0,105	0,058
L17	-28,99	-29,02	-28,97	-28,99	0,025	0,014
L18	-29,17	-29,24	-29,35	-29,25	0,091	0,050
L19	-28,47	-28,15	-28,35	-28,32	0,162	0,090
L22	-29,05	-29,04	-29,18	-29,09	0,078	0,043
L23	-29,21	-29,13	-29,18	-29,17	0,040	0,022
			Média	-29,18		
			<i>s</i>	0,51		

G.2 Resultados do ECS. GC/IRMS

Nas Tabelas G.13 a G.20 estão compilados os resultados de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos com a técnica de GC/IRMS.

Tabela G.13: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 1-Octanol obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
	Medidas individuais			Média	s
L0	-28,97	-29,40	-28,76	-29,04	0,33
L2	-25,32	-26,29	-29,88	-27,16	2,40
L5	-28,31	-28,26	-28,14	-28,24	0,09
L6	-27,65	-27,99	-28,62	-28,09	0,49
L9	-28,60	-28,36	-28,41	-28,46	0,13
L11	-32,10	-32,21	-32,05	-32,12	0,08
L13	-26,08	-27,08	(a)	-26,58	0,71
L14	-27,59	-28,05	-28,20	-27,95	0,32
L15	-28,65	-28,54	-28,30	-28,50	0,18
L19	-31,32	-31,24	-31,29	-31,28	0,04
L25	-36,78	-36,43	-36,18	-36,46	0,30
			Média	-29,44	
			s	2,48	

^(a) Não existe.**Tabela G.14:** Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 2,6-Dimetilanilina obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
	Medidas individuais			Média	s
L0	-31,86	-31,69	-32,14	-31,90	0,23
L2	-33,61	-36,35	-31,84	-33,93	2,27
L5	-31,01	-30,76	-30,99	-30,92	0,14
L6	-33,10	-32,72	-32,69	-32,84	0,23
L9	-29,99	-29,92	-29,87	-29,93	0,06
L11	-35,58	-34,68	-33,84	-34,70	0,87
L13	-34,75	-34,65	(a)	-34,70	0,07
L14	-29,95	-29,30	-29,85	-29,70	0,35
L15	-30,37	-30,50	-30,11	-30,33	0,20
L19	-30,93	-30,79	-30,83	-30,85	0,07
L25	-34,76	-34,39	-33,77	-34,31	0,50
			Média	-32,19	
			s	1,97	

^(a) Não existe.

Tabela G.15: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *N,N,3,5-Tetrametilnilina* obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				<i>s</i>
	Medidas individuais			Média	
L0	-34,23	-33,81	-34,08	-34,04	0,21
L2	-33,79	-33,22	-33,87	-33,63	0,35
L5	-33,33	-32,87	-32,91	-33,04	0,25
L6	-36,84	-36,76	-37,15	-36,92	0,21
L9	-33,17	-33,03	-33,06	-33,09	0,07
L11	-32,90	-33,40	-32,07	-32,79	0,67
L13	-36,24	-35,94	-35,49	-35,89	0,38
L14	-33,53	-34,23	-34,63	-34,13	0,56
L15	-33,33	-33,58	-33,16	-33,36	0,21
L19	-28,34	-28,37	-28,32	-28,34	0,03
L25	-34,88	-34,86	-34,58	-34,77	0,17
			Média	-33,64	
			<i>s</i>	2,17	

Tabela G.16: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de *Dodecano* obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				<i>s</i>
	Medidas individuais			Média	
L0	-31,87	-31,54	-30,96	-31,46	0,46
L2	-28,75	-30,45	-30,55	-29,92	1,01
L5	-32,16	-32,25	-32,25	-32,22	0,05
L6	-32,24	-32,35	-32,67	-32,42	0,22
L9	-31,85	-31,68	-31,71	-31,75	0,09
L11	-37,54	-37,38	-36,53	-37,15	0,54
L13	-31,01	-31,04	(<i>a</i>)	-31,03	0,02
L14	-32,75	-32,53	-32,27	-32,52	0,24
L15	-32,19	-32,12	-31,90	-32,07	0,15
L19	-33,91	-33,91	-33,80	-33,87	0,06
L25	-36,67	-36,02	-34,71	-35,80	1,00
			Média	-32,75	
			<i>s</i>	2,11	

(*a*) Não existe.

Tabela G.17: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Decanoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				s
	Medidas individuais			Média	
L0	-31,82	-31,45	-31,95	-31,74	0,26
L2	-28,87	-28,80	-28,52	-28,73	0,19
L5	-32,26	-32,38	-32,15	-32,26	0,12
L6	-32,15	-32,00	-31,85	-32,00	0,15
L9	-31,46	-31,30	-31,22	-31,33	0,12
L11	-41,80	-42,55	-41,12	-41,82	0,72
L13	-31,61	-31,65	(a)	-31,63	0,03
L14	-31,26	-31,74	-31,58	-31,53	0,24
L15	-31,51	-31,58	-31,26	-31,45	0,17
L19	-37,97	-38,13	-38,01	-38,04	0,08
L25	-35,76	-35,51	-35,33	-35,53	0,22
			Média	-33,28	
			s	3,73	

(a) Não existe.

Tabela G.18: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Dodecanoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				s
	Medidas individuais			Média	
L0	-30,36	-30,14	-30,86	-30,45	0,37
L2	-28,43	-28,52	-28,03	-28,33	0,26
L5	-30,78	-30,45	-30,76	-30,66	0,19
L6	-31,28	-30,86	-31,10	-31,08	0,21
L9	-30,09	-29,91	-29,89	-29,96	0,11
L11	-31,46	-31,52	-30,89	-31,29	0,35
L13	-31,61	-31,65	(a)	-31,63	0,03
L14	-30,73	-30,42	-30,22	-30,46	0,26
L15	-30,32	-30,55	-30,23	-30,37	0,17
L19	-29,91	-29,76	-29,97	-29,88	0,11
L25	-34,13	-34,79	-33,67	-34,20	0,56
			Média	-30,76	
			s	1,44	

(a) Não existe.

Tabela G.19: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de 2-(Metilamino)benzoato de metilo obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
	Medidas individuais			Média	s
L0	-38,05	-37,89	-37,72	-37,89	0,17
L2	-38,66	-38,20	-39,11	-38,66	0,46
L5	-37,49	-37,33	-37,67	-37,50	0,17
L6	-38,68	-39,14	-39,42	-39,08	0,37
L9	-37,48	-37,29	-37,30	-37,36	0,11
L11	-33,30	-33,06	-32,87	-33,08	0,22
L13	-39,08	-38,79	-38,85	-38,91	0,15
L14	-36,72	-37,22	-37,50	-37,15	0,40
L15	-36,32	-36,59	-36,34	-36,42	0,15
L19	-31,79	-31,73	-31,54	-31,69	0,13
L25	-41,06	-40,82	-40,56	-40,81	0,25
			Média	-37,14	
			s	2,65	

^(a) Não existe.

Tabela G.20: Valores de $\delta^{13}\text{C}$ de Vanilina obtidos por GC/IRMS no ECS.

Lab	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)							Média	s
	Medidas individuais								
	Vanilina A			Vanilina B					
L0	-28,93	-28,86	-28,98	-29,11	-28,94	-28,95	-28,96	0,08	
L2	-27,16	-28,49	-27,36	-26,82	-29,49	-28,47	-27,97	1,02	
L5	-29,09	-29,27	-29,32	^(a)	^(a)	^(a)	-29,23	0,12	
L6	-28,63	-28,70	-28,73	-28,15	-28,34	-28,82	-28,56	0,26	
L9	-28,42	-28,50	-28,46	-27,92	-28,76	-28,57	-28,44	0,28	
L11	-29,26	-29,21	-29,26	-29,38	-29,39	-29,43	-29,32	0,09	
L14	-28,78	-28,98	-28,61	-28,90	-28,67	-28,76	-28,78	0,14	
L15	-29,62	-29,06	-29,18	-29,36	-28,88	-29,00	-29,18	0,27	
L25	-32,12	-31,81	-31,95	-31,63	-31,89	-31,67	-31,85	0,18	
						Média	-29,14		
						s	1,10		

^(a) Não existe.

Apêndice H

Tabelas z-score

Seguidamente apresentam-se as Tabelas com os valores de z -score relativos ao ECS usando a técnica de GC/IRMS.

Tabela H.1: Tabela z -score-1 relativo a GC/IRMS.

Lab	Composto								
	1-Octanol	2,6-Dimetilamili- lina	<i>N,N</i> ,3,5-Tetra- metilanilina	Dodecano	Decanoato de metilo	Dodecanoato de metilo	2-(Metilami- no)benzoato de metilo	Vanilina(a)	Vanilina(b)
L0	0,14	0,15	-0,19	0,61	0,41	0,21	-0,28	0,18	0,12
L2	0,80	-0,88	0,00	1,34	1,22	1,69	-0,57	1,25	0,79
L5	0,42	0,64	0,28	0,25	0,27	0,06	-0,14	-0,08	n.d.
L6	0,48	-0,33	-1,51	0,15	0,34	-0,23	-0,73	0,39	0,63
L9	0,35	1,15	0,25	0,47	0,52	0,55	-0,08	0,58	0,65
L11	-0,94	-1,27	0,39	-2,09	-2,29	-0,37	1,53	-0,09	-0,24
L13	1,01	-1,27	-1,04	0,82	0,44	-0,61	-0,67	n.d.	n.d.
L14	0,53	1,26	-0,23	0,11	0,47	0,21	0,00	0,30	0,32
L15	0,33	0,95	0,13	0,32	0,49	0,27	0,27	-0,13	0,05
L19	-0,65	0,68	2,44	-0,53	-1,27	0,61	2,06	n.d.	n.d.
L25	-2,47	-1,07	-0,52	-1,45	-0,60	-2,40	-1,39	-2,41	-2,32

Tabela H.2: Tabela z-score-2 relativo a EA/IRMS.

Lab	Composto								
	1-Octanol	2,6-Dimetilani- lina	N,N,3,5-Tetra- metilanilina	Dodecano	Decanoato de metilo	Dodecanoato de metilo	2-(Metilami- no)benzoato de metilo	Vanilina(a)	Vanilina(b)
L0	-0,24	-0,73	-0,16	0,37	-0,03	0,03	-0,10	0,12	0,05
L2	0,42	-1,76	0,03	1,10	0,77	1,51	-0,40	1,19	0,72
L5	0,05	-0,23	0,30	0,01	-0,17	-0,11	0,04	-0,14	n.d.
L6	0,10	-1,21	-1,49	-0,09	-0,10	-0,40	-0,55	0,32	0,56
L9	-0,03	0,27	0,28	0,23	0,08	0,37	0,10	0,51	0,58
L11	-1,32	-2,15	0,42	-2,33	-2,73	-0,55	1,71	-0,16	-0,30
L13	0,63	-2,15	-1,01	0,58	0,00	-0,79	-0,49	n.d.	n.d.
L14	0,15	0,39	-0,20	-0,13	0,02	0,03	0,17	0,23	0,25
L15	-0,04	0,07	0,15	0,08	0,05	0,09	0,45	-0,19	-0,02
L19	-1,02	-0,20	2,47	-0,77	-1,72	0,43	2,24	n.d.	n.d.
L25	-2,85	-1,95	-0,50	-1,69	-1,05	-2,57	-1,21	-2,47	-2,39

Apêndice I

Folhas dos Dados Técnicos para os Compostos Puros e para a Mistura do Tipo Grob

Technical Data Sheet: Compound 01Name of compound : **1-octanol**Chemical formula : **C₈H₁₈O**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : None

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

If certified for $\delta^{13}\text{C}$ ‰ only - storage and transport at room temperatureIf certified for $\delta^2\text{H}$ ‰ - storage at +4 °C (the long term stability should be checked)

Method requirements :

Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	13	4
Outlying data sets ?	Yes	Yes
Number of analysed samples	39	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-28.37	-73.8
SD of means	0.14	6.3
Sb	0.12	6.3
Sw	0.13	1.7
H.W. 95% C. I. mean of means	0.09	10.1

CAS No : **111-87-5**

Structure :

**Figura I.1:** Folha de dados técnicos do 1-octanol.

Technical Data Sheet: Compound 02Name of compound : **2,6-dimethylphenol**Chemical formula : **C₈H₁₀O**

Product description : Solid

Toxicity (manufacturer's description) : Toxic ; dangerous for environment

Minimum sample size (as future CRM) : 0.5 g

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage and transport at room temperature

Method requirements :

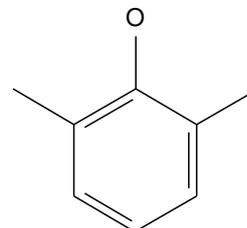
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	14	4
Outlying data sets ?	Yes	Yes
Number of analysed samples	42	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-30.77	-109.8
SD of means	0.19	2.5
Sb	0.18	2.3
Sw	0.10	1.9
H.W. 95% C. I. mean of means	0.11	4.0

CAS No : **576-26-1**

Structure :

**Figura I.2:** Folha de dados técnicos do 2,6-dimetilfenol.

Technical Data Sheet: Compound 03Name of compound : **2,6-dimethylaniline**Chemical formula : **C₈H₁₁N**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : Toxic

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage at room temperature. If certified for $\delta^2\text{H}$ ‰, then transport at +4 °C.

Method requirements :

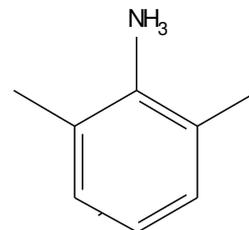
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰, $\delta^2\text{H}$ ‰ and $\delta^{15}\text{N}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna) and Air.

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰	$\delta^{15}\text{N}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	13	4	9
Outlying data sets ?	Yes	No	No
Number of analysed samples	39	12	27
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW	‰, Air
Mean of Lab means	-30.46	-151.3	0.18
SD of means	0.08	6.7	0.17
Sb	0.03	6.6	0.15
Sw	0.13	2.3	0.15
H.W. 95% C. I. mean of means	0.05	10.7	0.13

CAS No : **10287-53-3**

Structure :

**Figura I.3:** Folha de dados técnicos da 2,6-dimetilanilina.

Technical Data Sheet: Compound 04Name of compound : *N,N*,3,5-tetramethylanilineChemical formula : $C_{10}H_{15}N$

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : Harmful

Minimum sample size (as future CRM) : 0.1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)
- Vial Inserts 02-NV - e.g. Chromacol (pack size 1000)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage at room temperature. If certified for δ^2H ‰, then transport at +4 °C.

Method requirements :

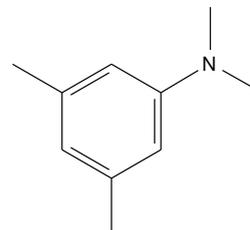
Determination of $\delta^{13}C$ ‰, δ^2H ‰ and $\delta^{15}N$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna) and Air.

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}C$ ‰	δ^2H ‰	$\delta^{15}N$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	13	4	9
Outlying data sets ?	Yes	No	No
Number of analysed samples	39	12	27
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW	‰, Air
Mean of Lab means	-33.69	-160.1	0.12
SD of means	0.13	2.8	0.30
Sb	0.09	2.7	0.29
Sw	0.15	1.6	0.15
H.W. 95% C. I. mean of means	0.08	4.5	0.23

CAS No : 4913-13-7

Structure :

**Figura I.4:** Folha de dados técnicos da *N,N*,3,5-tetrametilaniolina.

Technical Data Sheet: Compound 05Name of compound : ethyl 4-(*N,N*-dimethylamino)benzoateChemical formula : $C_{11}H_{15}NO_2$

Product description : Solid

Toxicity (manufacturer's description) : Irritant

Minimum sample size (as future CRM) : 0.5 g

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

If certified for $\delta^{13}C$ ‰ only - storage and transport at room temperatureIf certified for δ^2H ‰ - storage at +4 °C (possible problems of long term stability).

Method requirements :

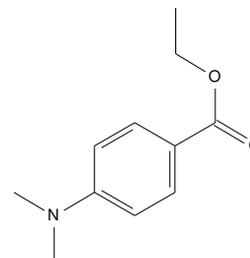
Determination of $\delta^{13}C$ ‰, δ^2H ‰ and $\delta^{15}N$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna) and Air.

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

	$\delta^{13}C$ ‰	δ^2H ‰	$\delta^{15}N$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	14	4	9
Outlying data sets ?	Yes	Yes	No
Number of analysed samples	42	12	27
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW	‰, Air
Mean of Lab means	-30.46	-74.3	-4.80
SD of means	0.14	7.7	0.26
Sb	0.13	7.6	0.24
Sw	0.08	1.9	0.16
H.W. 95% C. I. mean of means	0.08	12.2	0.20

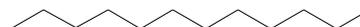
CAS No : 10287-53-3

Structure :

**Figura I.5:** Folha de dados técnicos do 4-(*N,N*-dimetilamino)benzoato de etilo.

Technical Data Sheet: Compound 06CAS No : **112-40-3**Name of compound : **Dodecane**

Structure :

Chemical formula : **C₁₂H₂₆**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : None

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage and transport at room temperature .

Method requirements :

Determination of $\delta^{13}\text{C} \text{‰}$ and $\delta^2\text{H} \text{‰}$ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C} \text{‰}$	$\delta^2\text{H} \text{‰}$
Number of accepted data sets (Labs)	12	4
Outlying data sets ?	Yes	No
Number of analysed samples	36	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-32.24	-131.4
SD of means	0.17	4.3
Sb	0.16	4.0
Sw	0.10	2.4
H.W. 95% C. I. mean of means	0.11	6.8

Figura I.6: Folha de dados técnicos do dodecano.

Technical Data Sheet: Compound 07Name of compound : **Methyl decanoate**Chemical formula : **C₁₁H₂₂O₂**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : None

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage and transport at room temperature .

Method requirements :

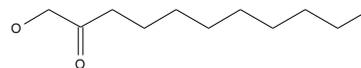
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	12	4
Outlying data sets ?	Yes	No
Number of analysed samples	36	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-31.62	-245.7
SD of means	0.11	3.3
Sb	0.09	2.8
Sw	0.11	3.0
H.W. 95% C. I. mean of means	0.07	5.2

Figura I.7: Folha de dados técnicos do decanoato de metilo.CAS No : **110-42-9**

Structure :



Technical Data Sheet: Compound 08Name of compound : **Methyl dodecanoate**Chemical formula : **C₁₃H₂₆O₂**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : None

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage and transport at room temperature .

Method requirements :

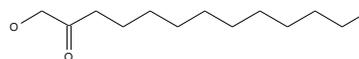
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	13	4
Outlying data sets ?	Yes	No
Number of analysed samples	39	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-30.50	-252.5
SD of means	0.20	4.3
Sb	0.18	4.0
Sw	0.16	2.5
H.W. 95% C. I. mean of means	0.12	6.8

Figura I.8: Folha de dados técnicos do dodecanoato de metilo.CAS No : **111-82-0**

Structure :



Technical Data Sheet: Compound 09Name of compound : **Methyl 2-(methylamino)benzoate**Chemical formula : **C₉H₁₁NO₂**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : None

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Storage and transport at room temperature .

Method requirements :

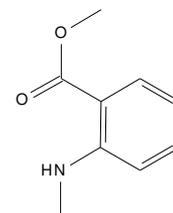
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰, $\delta^2\text{H}$ ‰ and $\delta^{15}\text{N}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna) and Air.

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰	$\delta^{15}\text{N}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	13	4	10
Outlying data sets ?	Yes	No	Yes
Number of analysed samples	39	12	30
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW	‰, Air
Mean of Lab means	-37.61	-128.4	-2.54
SD of means	0.12	8.3	0.22
Sb	0.11	8.2	0.21
Sw	0.10	1.7	0.12
H.W. 95% C. I. mean of means	0.07	13.2	0.16

CAS No : **85-91-6**

Structure :

**Figura I.9:** Folha de dados técnicos do 2-(metilamino)benzoato de metilo.

Technical Data Sheet: Compound 10Name of compound : **Nonanal**Chemical formula : **C₉H₁₈O**

Product description : Liquid

Toxicity (manufacturer's description) : Irritant

Minimum sample size (as future CRM) : 1 mL

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

Manufacturer's recommendations : storage and transport at +4 °C. Store in dark. .

Method requirements :

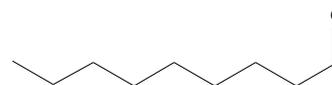
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA/IRMS (Elemental Analyser / Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Mean Standard Ocean Water, IAEA, Vienna).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	12	4
Outlying data sets ?	No	No
Number of analysed samples	36	12
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SNOW
Mean of Lab means	-33.92	-130.9
SD of means	0.09	7.2
Sb	0.05	7.1
Sw	0.12	1.7
H.W. 95% C. I. mean of means	0.05	11.5

CAS No : **124-19-6**

Structure :

**Figura I.10:** Folha de dados técnicos do nonanal.

Technical Data Sheet: Compound 11Name of compound : **Vanillin**Chemical formula : **C₈H₈O₃**

Product description : Solid

Toxicity (manufacturer's description) : Harmful

Minimum sample size (as future CRM) : 0.5 g

Total number of units (estimate) : 1500 - 2000

Suitable packaging (tested for resistance to shocks, leakage, refrigeration) :

- 2 mL screw top vial. 12 x 32 mm (ambered) - e.g. Chromacol part number 2-SV(A) (pack size 500)
- 8 mm black solid cap. 8 x 9 mm, no central hole - e.g. Chromacol part number 8-SCS (pack size 500)
- 8 mm blue silicone/PTFE seal. 1.4 mm thickness - e.g. Chromacol part number 8-ST14 (pack size 500)

Storage and transport requirements based on stability tests :

If certified for $\delta^{13}\text{C}$ ‰ only - storage and transport at room temperature. The long term stability for $\delta^2\text{H}$ ‰ needs to be re-checked. Store in dark.

Method requirements :

Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ and $\delta^2\text{H}$ ‰ by EA-IRMS (Elemental Analyser - Isotope Ratio Mass Spectrometry). The results are expressed in parts per thousand and traceable respectively to the international references : V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite, IAEA, Vienna), V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water, IAEA, Vienna).

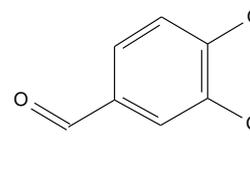
Determination of $\delta^{13}\text{C}$ ‰ by GC/C/IRMS (Gas Chromatography/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry).

Results of simulated certification exercise and subsequent statistical calculations - isotope abundance and associated uncertainty (95% C.I.) :

Parameter	EA		GC
	$\delta^{13}\text{C}$ ‰	$\delta^2\text{H}$ ‰	$\delta^{13}\text{C}$ ‰
Number of accepted data sets (Labs)	14	4	7
Outlying data sets ?	Yes	Yes	Yes
Number of analysed samples	42	12	39
Unit	‰, V-PDB	‰, V-SMOW	‰, V-PDB
Mean of Lab means	-29.06	77.2	-28.92
SD of means	0.23	2.0	0.34
Sb	0.22	1.5	0.36
Sw	0.09	2.4	0.20
H.W. 95% C. I. mean of means	0.13	3.2	0.32

CAS No : **121-33-5**

Structure :

**Figura I.11:** Folha de dados técnicos da vanilina.

Technical Data Sheet : Mix for GC-IRMS

Name of compounds : *N,N,3,5-tetramethylaniline* (B), *2,6-dimethylaniline* (C), *methyl 2-(metilamino)benzoate* (D), *dodecane* (F), *1-octanol* (G), *methyl decanoate* (H), *methyl dodecanoate* (I).

Product description and toxicity (manufacturer's description) : See individual data sheets

Instructions for mixing : The seven compounds can be used in solution in MTBE (methyl tert-butyl ether, purity 99.8%). One set of vials should be used for the dilution assays. When the optimal dilution conditions are found, the mixture in MTBE can be kept one week at 4°C.

Recommended concentrations are as follows :

		$\delta^2\text{H}$ measurements	$\delta^{13}\text{C}$ measurements	$\delta^{15}\text{N}$ measurements
4	<i>N,N,3,5-tetramethylaniline</i>	–	–	–
3	<i>2,6 dimethylaniline</i>	–	–	–
9	<i>methyl 2-(metilamino)benzoate</i>	0.04%	0.02%	–
6	<i>dodecane</i>	0.03%	0.02%	–
1	<i>1-octanol</i>	0.03%	0.02%	–
7	<i>methyl decanoate</i>	0.03%	0.02%	–
8	<i>methyl dodecanoate</i>	0.03%	0.02%	–

Method requirements :

The following analytical conditions were established and tested during the project and tested by each of the project partners. Two columns - a polar and a non polar - have been tested.

Column A (non polar):

30 m x 0.25 mm ID HP-5MS (Crosslinked 5% PH ME Siloxane), film thickness 0.5 μm

Analytical conditions for D/H measurements

Thermo Finnigan Delta plus XL online coupled to a HP via pyrolysis interface

- Injector : split/splitless injector (temperature 250°C)
- Carrier gas : helium, flow 1mL/min
- Temperature program: **40°C/5min/5°C/min/250°C/10min**
- Injection: 0.4 μL splitless (temperature 280°C)
- Pyrolysis interface temperature: 1450°C(for D/H measurements)
- Hot ion source

Retention times for D/H measurements (flow : 1 mL/min)

substance	retention time [min]
1-octanol	20.4
2,6-dimethylaniline	24.0
dodecane	25.0
<i>N,N,3,5-tetramethylaniline</i>	27.9
methyl decanoate	29.0
<i>methyl 2-(metilamino)benzoate</i>	31.9
methyl dodecanoate	34.8

Figura I.12: Mistura: 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, *N,N,3,5-tetrametilanilina* e 2-(metilamino)benzoato de metilo.

Analytical conditions for $\delta^{13}\text{C}$ measurements

Thermo Finnigan Delta plus online coupled to a HP via combustion interface

- Injector : split/splitless injector (temperature 250°C)
- Carrier gas : helium, flow 1.8 mL/min
- Temperature program: 40°C/5min/5°C/min/250°C/10min
- Injection: 0.5 -1 μL split 1/20 (temperature 280°C)
- Combustion interface temperature : 940°C(for 13C measurements)
- Hot ion source

Retention times for $\delta^{13}\text{C}$ measurements (flow : 1.8 ml/min)

substance	retention time [min]
1-octanol	17.8
2,6-dimethylaniline	21.3
dodecane	22.4
<i>N,N</i> ,3,5-tetramethylaniline	25.0
methyl decanoate	26.3
methyl 2-(metilamino)benzoate	28.9
methyl dodecanoate	32.0

Column B (polar)

30 m x 0.25 mm ID HP-INNOWax (Crosslinked Polyethylene Glycol), film thickness 0.5 μm

Analytical conditions for D/H measurements :

Thermo Finnigan Delta plus XL online coupled to a HP via pyrolysis interface

- Injector : split/splitless injector (temperature 250°C)
- Carrier gas : helium, flow 0.8 mL/min
- Temperature program : 40°C/15min/3°C/min/130°C/0min/5°C/min/250°C/15min
- Injection: 0.4 μL splitless (temperature 280°C)
- Pyrolysis interface temperature: 1450°C(for D/H measurements)
- Hot ion source

The effluent from the GC passes through a ceramic tube (Al_2O_3 , 0.5 mm i.d.; l=320 mm). The interface is coupled via an open split to the mass spectrometer.

Retention times for D/H measurements (flow : 1 mL/min)

substance	retention time [min]
dodecane	24.6
1-octanol	44.5
methyl decanoate	46.1
<i>N,N</i> ,3,5-tetramethylaniline	51.5
methyl dodecanoate	53.0
2,6-dimethylaniline	54.6
methyl 2-(metilamino)benzoate	60.4

Figura I.13: Mistura (continuação): 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, *N,N*,3,5-tetrametilanolina e 2-(metilamino)benzoato de metilo.

Analytical conditions for $\delta^{13}\text{C}$ measurements

Thermo Finnigan Delta plus online coupled to a HP via combustion interface

- Injector : split/splitless injector (temperature 250°C)
- Carrier gas : helium, flow 1.8 mL/min
- Temperature program : 40°C/15min/3°C/min/130°C/0min/5°C/min/250°C/15min
- Injection: 0.5 - 1 μL split 1/20 (temperature 280°C)
- Combustion interface temperature: 940°C
- Hot ion source

Retention Times for $\delta^{13}\text{C}$ measurements (flow : 1.8 mL/min)

substance	retention time [min]
dodecane	19.8
1-octanol	41.1
methyl decanoate	42.6
<i>N,N,3,5</i> -tetramethylaniline	47.9
methyl dodecanoate	50.2
2,6-dimethylaniline	51.7
methyl 2-(metilamino)benzoate	57.4

Established performance parameters for GC-IRMS of the mixture compared to the EA-IRMS reference values :

COMPOUNDS		mean EA- IRMS	S_R EA- IRMS	diff.	mean GC- IRMS	S_r	S_R GC- IRMS
<i>N,N,3,5</i> -tetramethylaniline	4	-33.7	0.1	0.1	-33.6	0.4	0.7
2,6-dimethylaniline	3	-30.5	0.1	-1.1	-31.6	0.3	1.80
methyl 2-(metilamino)benzoate	9	-37.6	0.1	-0.3	-37.9	0.3	1.0
dodecane	6	-32.2	0.2	0.2	-32.1	0.2	1.0
1-octanol	1	-28.4	0.1	-0.4	-28.8	0.3	1.9
methyl decanoate	7	-31.7	0.1	-0.1	-31.7	0.2	0.4
methyl dodecanoate	8	-30.5	0.2	-0.1	-30.6	0.2	0.6

Figura I.14: Mistura (continuação): 1-octanol, 2,6-dimetilanilina, dodecano, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, *N,N,3,5*-tetrametilanolina e 2-(metilamino)benzoato de metilo.

