



Determinação de TCA em rolhas por GC/MS com amostragem por HS-Trap

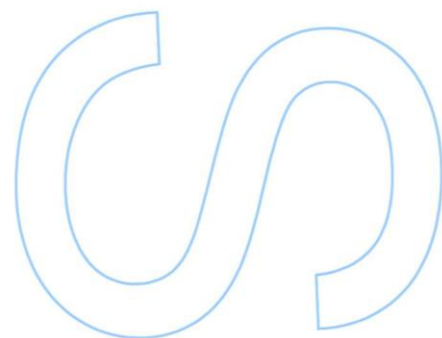
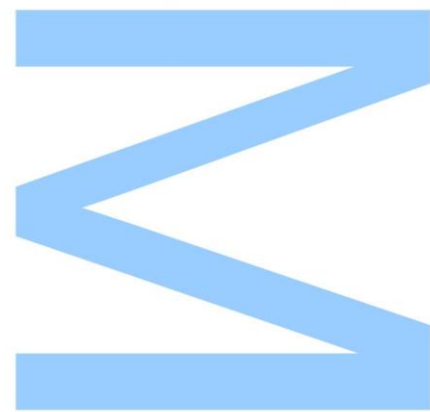
Ana Sofia Rodrigues da Silva

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise
Química

Departamento de Química e Bioquímica
2021

Orientador

Cosme Moura, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

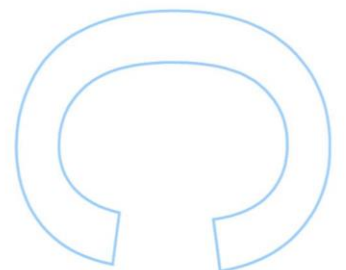
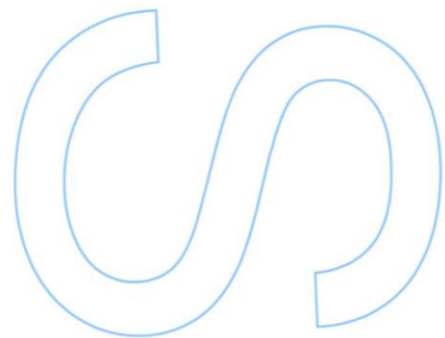
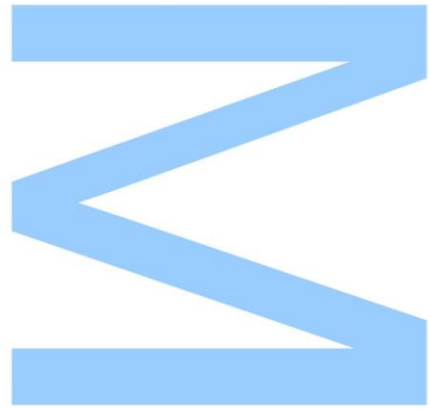




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____



Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não posso deixar de prestar o meu reconhecimento.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao orientador de tese Professor Doutor Cosme Moura pelo apoio, disponibilidade e paciência para me auxiliar não só no trabalho laboratorial mas também na redacção deste documento.

Em segundo lugar gostaria de agradecer a coloboração das empresas CorkSupply Portugal SA, por disponibilizar o padrão interno, soluções padrão e amostras que foram ensaiadas no decorrer do trabalho, e ILC, Instrumentos de Laboratório Cientifico, LDA, por disponibilizar o equipamento necessário (*HS-Trap*) para a execução do trabalho, bem como a assistencia técnica para o mesmo.

Resumo

O trabalho realizado foi desenvolvido no âmbito de uma dissertação efetuada no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto com a colaboração das empresas Cork Supply Portugal SA, com sede em Santa Maria da Feira, e ILC, Instrumentos de Laboratórios Científicos, LDA, com sede em Lisboa.

O objetivo proposto para a dissertação foi a adequação e conseqüente validação do método GC/MS com amostragem por HS-Trap para determinação de 2,4,6-tricloroanisol (TCA), sugerido, em literatura, por empresas ligadas ao setor de produção de cromatógrafos associados a um detetor de massa.

Este objetivo está inserido um projeto mais abrangente com o intuito de fornecer á indústria corticeira um método de determinação de TCA alternativo ao método normalizado (ISO 20752).

O estudo focou sobre parâmetros essenciais da validação, tais como, a homogeneidade, a linearidade e a repetibilidade.

Os resultados obtidos demonstraram uma homogeneidade fraca, no entanto, na fase de trabalho decorrente (fase de adequação), aceitou-se a falta homogeneidade em prol de tentar obter uma linearidade de método (R^2) aceitável. Em termos de linearidade, a maioria dos ensaios não apresenta uma linearidade de método aceitável, embora as representações gráficas mostrem retas mais ou menos adequadas. A precisão do método, foi avaliada apenas a repetibilidade e os resultados obtidos, embora satisfatórios, representam uma repetibilidade pontual e que não é representativa do sistema.

Durante a trabalho experimental, a linha de base não é suficientemente estável para garantir a robustez do método, que por sua vez afeta os parâmetros de validação.

Palavras-chave: TCA; Rolhas de Cortiça; GC/MS; HS-Trap; Validação de Métodos Analíticos.

Abstract

The work carried out was developed within the scope of a dissertation carried out in the Department of Chemistry and Biochemistry of the Faculty of Sciences of the University of Porto with the collaboration of the companies Cork Supply Portugal SA, based in Santa Maria da Feira, and ILC, Scientific Laboratories Instruments, LDA, headquartered in Lisbon.

The proposed objective for the dissertation was the adequacy and consequent validation of the GC/MS method with sampling by HS-*Trap* for the determination of 2,4,6-trichloroanisole (TCA), suggested in the literature, by companies related to the production of chromatographs associated with a mass detector.

This objective is part of a more comprehensive project with the aim of providing the cork industry with an alternative method for determining TCA to the standardized method (ISO 20752).

The study focused on essential validation parameters, such as homogeneity, linearity and repeatability.

The results obtained showed a weak homogeneity, however, in the resulting work phase (adaptation phase), the lack of homogeneity was accepted in order to try to obtain an acceptable method linearity (R^2). In terms of linearity, most tests do not present an acceptable method linearity, although the graphical representations show linear regressions more or less adequate. The precision of the method was evaluated only by the repeatability and the results obtained, although satisfactory, represent a punctual repeatability that is not representative of the system.

During experimental work, the baseline is not stable enough to guarantee the robustness of the method, which in turn affects the validation parameters.

Keywords: TCA; Cork stoppers; GC/MS; HS-*Trap*; Validation of Analytical Methods.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XIII
1. Introdução	1
1.1 Enquadramento	1
1.2 Objetivos.....	1
1.3 Estrutura da Dissertação.....	1
2. Estado da Arte.....	2
2.1 Caracterização da Cortiça.....	2
2.1.1 Estrutura	2
2.1.2 Constituição Química	3
2.1.3 Propriedades da Cortiça.....	3
2.2 Rolhas de Cortiça	4
2.3 Contaminações associadas às rolhas de cortiça.....	4
2.3.1. 2,4,6-tricloroanisol nas rolhas de cortiça	5
2.3.2 Métodos de extração de 2,4,6-tricloroanisol	6
2.3.2.1 Métodos de eliminação/lavagem.....	6
I) Novos Sistemas de Cozedura	6
II) Destilação sob vapor controlado.....	6

III) Volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas.....	7
IV) Extração supercrítica com CO ₂ (EFS).....	8
2.3.2.2 Métodos de extração para análise química	9
I) Preparação de Amostra segundo a Norma ISO 20752	9
II) Microextração em fase sólida (SPME)	9
III) Headspace.....	10
a) Teoria Básica da Análise por Headspace	10
1) Constante de Partição	10
b) Lei de Henry.....	12
c) Sensibilidade do Headspace	12
1) Influência da temperatura na pressão de vapor e no constante de partição ...	12
2) Influência do volume da amostra na sensibilidade do headspace para compostos com constantes de partição diferentes.....	13
3) Mudar matriz da amostra ao variar o coeficiente de atividade	13
d) Extração múltiplas por headspace (MHE)	13
1) Princípios de MHE	14
2) Base teórica do MHE.....	14
3) Cálculo simplificado de MHE	14
e) Amostras sólidas.....	14
f) Preparação de soluções padrão a partir de líquidos e de sólidos.....	15
g) Técnica de vaporização total (TVT).....	15
h) Técnica de vaporização com teor de analito na matriz desprezável (FET).....	15

i) Headspace Dinâmico	16
1) Sem Trap.....	16
2) Com Trap	16
2.3.3 Métodos de deteção e determinação de 2,4,6-tricloroanisol.....	17
a) Análise sensorial (ISO 22308)	17
b) Análise pela ISO 20752	17
1) Cromatografia gasosa (GC)	17
2) Detetores indicados pela ISO 20752.....	18
I) MS.....	18
II)ECD.....	19
2.4 Procedimento genérico da técnica de amostragem por headspace	19
2.5 Validação de Métodos	21
2.5.1 Identificação.....	22
2.5.2 Seletividade e Especificidade.....	22
2.5.3 Sensibilidade.....	22
2.5.4 Linearidade e Gama analítica.....	23
a) Gama analítica	23
b) Linearidade.....	23
I) Correlação Linear.....	23
II) Método de Mandel (norma ISO 8466-1)	23
III) Teste da Áreas Normalizadas	24
IV) Teste de Rikilt.....	25
2.5.5 Limiares analíticos	25

a) Limite do Branco (LoB)	26
b) Limite de deteção (LoD)	26
c) Limite de Quantificação (LoQ)	26
2.5.6 Precisão	27
a) Repetibilidade	27
b) Reprodutibilidade	27
c) Precisão Intermédia	28
2.5.7 Exatidão	28
2.5.8 Robustez	29
3. Procedimento Experimental	30
3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos	30
3.1.1 Materiais e Equipamentos	30
3.1.2 Reagentes	30
3.2 Preparação de Soluções	31
3.2.1 Solução Stock de TCA (1000 ppm)	31
3.2.2 Diluições	31
3.2.2.1 Primeira Diluição (400 ppb)	31
3.2.2.2 Segunda Diluição (320 ppt)	31
3.2.3 Soluções Padrão ensaiadas	31
3.3 Condições Operacionais	32
3.3.1 Condições do HS-Trap	32
3.3.2 Condições do GC/MS	33
4. Resultados e Discussão	34

4.1 Cromatogramas Típicos.....	34
4.2 Teste da homogeneidade da variância.....	36
4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	37
4.4 Linearidade.....	38
4.2.2 Testes de Mandel.....	44
4.2.3 Testes das Áreas Normalizadas.....	45
4.2.4 Testes de Rikilt.....	49
4.3 Precisão – Repetibilidade	53
4.4 Exatidão.....	54
4.4.1 Soluções Amostras	54
4.5 Evolução do Branco.....	56
4.6 Intervalos de Áreas e Razões de Áreas para cada Concentração	58
5. Conclusão	63
Bibliografia	64

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da estrutura de cortiça natural.	2
Figura 2 – Fórmula química do 2,4,6-Tricloroanisol.....	5
Figura 3 – Representação de mecanismo de formação do 2,4,6-TCA.....	5
Figura 4 - Esquema do processo de destilação sob vapor controlado.....	7
Figura 5 - Esquema do processo de Volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas.....	8
Figura 6 - Esquema representativo de SPME.....	9
Figura 7 – Esquema de um vial de headspace contendo uma amostra.....	10
Figura 8 - Representação gráfica da equação 4 para K's iguais a 0,026, 0,5 e 10.	11
Figura 9 - Representação esquemática dos componentes principais da cromatografia gasosa.	18
Figura 10 – Representação esquemática do GC/MS.....	19
Figura 11 - Exemplo dos Cromatogramas obtidos (Solução padrão de 20 ppt com padrão interno).....	35
Figura 12 - Representações Gráficas de todos os Conjuntos de Resultados	43
Figura 13 - Representações Gráficas de todas as tentativas de avaliação de linearidade	Erro! Marcador não definido.
Figura 14 - Concentrações Calculadas vs Concentrações da Empresa (4 pontos).....	56
Figura 17 - Proporção de 210 m/z em relação a 195 m/z	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores de volumes necessários no preparo das Soluções Padrão.....	32
Tabela 2 - Temperaturas dos componentes de Headspace	32
Tabela 3 – Tempos dos procedimentos do Headspace	32
Tabela 4 - Pressões dos componentes do Headspace.....	33
Tabela 5 – Tempo de adsorção.....	33
Tabela 6 - Programa de Temperaturas.....	33
Tabela 7 - Conjunto de Resultados para avaliação de homogeneidade e repetibilidade	36
Tabela 8 - Teste de Homogeneidade de Variância.....	37
Tabela 9 - Valores de Razão sinal-ruído e limites de deteção e quantificação	38
Tabela 10 - Conjunto de Resultados 1	39
Tabela 11 - Conjunto de Resultados 2	39
Tabela 12 - Conjunto de Resultados 3	40
Tabela 13 - Conjunto de Resultados 4	40
Tabela 14 - Conjunto de Resultados 5	40
Tabela 15 - Conjunto de Resultados 6	41
Tabela 16 - Conjunto de Resultados 7	41
Tabela 17 - Conjunto de Resultados 8	41
Tabela 18 - Conjunto de Resultados 9	42
Tabela 19 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 1	44
Tabela 20 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 2	44
Tabela 21 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 4	44
Tabela 22 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 8	45

Tabela 23 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 9	45
Tabela 24 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)	46
Tabela 25 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)	46
Tabela 26 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)	46
Tabela 27 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)	47
Tabela 28 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)	47
Tabela 29 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)	47
Tabela 30 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)	48
Tabela 31 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)	48
Tabela 32 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)	49
Tabela 33 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)	49
Tabela 34 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)	50
Tabela 35 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)	50
Tabela 36 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)	50
Tabela 37 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)	51
Tabela 38 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)	51
Tabela 39 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)	51
Tabela 40 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)	52
Tabela 41 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)	52
Tabela 42 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)	52
Tabela 43 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)	53
Tabela 44 – Valores do desvio Padrão Combinado	53
Tabela 45 – Valores do desvio Padrão Relativo Combinado	54

Tabela 46 - Razões das Áreas para 195 e 210 m/z para as Amostras	54
Tabela 47 – Valores das concentrações Calculadas e da Empresa	55
Tabela 48 – Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)	58
Tabela 49 – Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)	59
Tabela 50 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)	59
Tabela 51 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)	59
Tabela 52 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)	60
Tabela 53 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)	60
Tabela 54 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)	60
Tabela 55 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)	61
Tabela 56 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)	61
Tabela 57 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)	61

Lista de Abreviaturas

TCA – 2,4,6-tricloroanisol

SPME – Microextração em fase sólida

CG – Cromatografia gasosa

MS – Espetrometria de massa

FM – Fase móvel

HS – Headspace

HS-*Trap* – Headspace com *Trap*

MR - Materiais de referência

MRC - Materiais de referência certificados

EIL - Ensaio interlaboratoriais

EFS - Extração com Fluido Supercrítico

MHE – Extração múltiplas por Headspace

TVT – Técnica de vaporização total

FET – Técnica de vaporização completa

FID – Detetor de ionização de chama

ECD – Detetor de captura de eletrões

SPME – Microextração de gota única

IMS – Espectrometria de mobilidade iónica

LPME – Extração de fase líquida

VT – Valor Teste

LoB – Limite do Branco

LoD/LD – Limite de Deteção

LoQ/LQ – Limite de Quantificação

S/N – Sinal/ruído

S400 – Solução padrão de TCA de 400 ppb

S320 – Solução padrão de TCA de 320 ppt

SPI – Solução de Padrão Interno

A195 – Área correspondente ao pico do TCA do fragmento de massa 195 m/z

A210 - Área correspondente ao pico do TCA do fragmento de massa 210 m/z

A215 – Área correspondente ao pico do D5-TCA do fragmento de massa 215 m/z

1. Introdução

1.1 Enquadramento

No âmbito do Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química (M:MA3Q), da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP), a presente dissertação foi desenvolvida no tema “Determinação de TCA em rolhas por GC/MS com amostragem por HS-Trap” com o intuito de adequar um método de determinação de TCA proposto por algumas marcas de construção/fabrico de cromatógrafos para se obter uma metodologia alternativa ao método oficial/normalizado (ISO 20752).

1.2 Objetivos

O objetivo desta dissertação é a adequação e consequente validação de um método de determinação de 2,4,6-tricloroanisol por headspace com *trap* com separação por cromatografia gasosa e deteção por espectrometria de massa para soluções com um intervalo de concentrações de 0,5 a 20 ppt. Para alcançar este objetivo, o trabalho foi planeado de modo a ser executado em duas etapas, onde na primeira etapa os ensaios seriam em solução, seguindo o tratamento de amostras descrito no método normalizado (ISO 20752), e posteriormente, numa segunda fase os ensaios seriam feitos diretamente na rolha (sem maceração) usando as vantagens do amostrador de headspace. No entanto, apenas a primeira etapa foi executada.

1.3 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos:

- Introdução – Apresentação do enquadramento, objetivos e estrutura da dissertação;
- Estado de Arte – Introdução á cortiça (rolhas, contaminações (TCA) e determinação de TCA) e á validação de métodos;
- Procedimento Experimental – Descrição do procedimento usado no decorrer do trabalho experimental;
- Resultados e Discussão – Apresentação dos resultados obtidos e a sua interpretação;
- Conclusão – Capítulo onde se apresentam as principais conclusões da dissertação.

2. Estado da Arte

2.1 Caracterização da Cortiça

A cortiça é um tecido vegetal que constitui o revestimento do tronco e ramos do sobreiro (*Quercus suber L.*). É removida periodicamente sob forma de pranchas com espessura adequada para o processamento industrial. A cortiça é amplamente explorada devido às suas propriedades únicas, referidas mais á frente, e atualmente a sua aplicação industrial vai muito além da produção de rolhas e de pavimentos, por exemplo isolamento térmico e acústico e artigos de decoração. Num contexto de desenvolvimento sustentável, a cortiça pode desempenhar um papel relevante, porque é um recurso natural, renovável, reciclável e não tóxico.

2.1.1 Estrutura

A cortiça é um tecido constituído por membranas celulares, cujo conteúdo desapareceu durante o crescimento, e têm um posterior processo de suberificação das membranas celulares.[1]

As células podem ser descritas como prismas retangulares, que estão dispostos em colunas paralelas à direção radial da árvore (Figura 1). Cortes axiais e tangenciais mostram uma estrutura que se assemelha a uma parede de tijolos (Figura 1). [2]

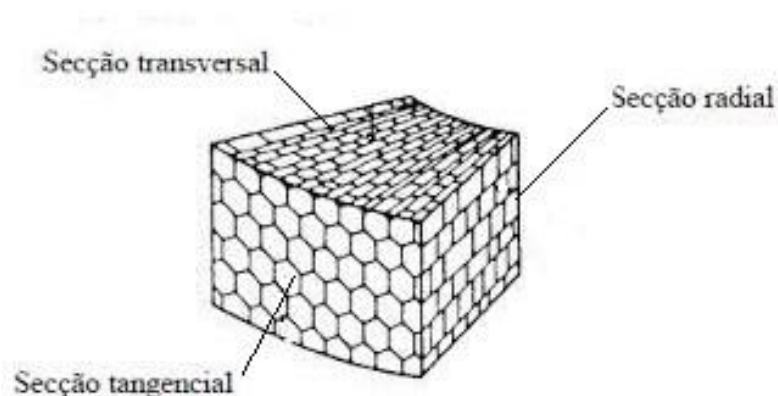


Figura 1 – Esquema da estrutura de cortiça natural.

2.1.2 Constituição Química

Os componentes estruturais são macromoléculas, de natureza polimérica, insolúveis, que estão presentes nas paredes celulares da cortiça e que lhe conferem a sua forma e grande parte das suas propriedades físicas e químicas. [2]

A constituição química da cortiça engloba vários tipos de compostos e cujos valores típicos são aproximadamente os seguintes: suberina (45%); lenhina (27%); polissacáridos (12%); ceróides (6%); taninos (6%) e cinzas (4%). [3] A suberina é o principal constituinte e é responsável pela compressibilidade e elasticidade, a lenhina e os polissacáridos fazem parte da estrutura das paredes, os ceróides têm como função repelir a água e, por isso, contribuem para a impermeabilidade, e os taninos contribuem para a proteção do material, contra ações externas ambientais.

2.1.3 Propriedades da Cortiça

A cortiça possui qualidades únicas, tais como: [4]

- *Leveza* – pesa apenas 0,16 gramas por centímetro cúbico e é capaz de flutuar;
- *Baixo grau de permeabilidade a líquidos e a gases* – graças à suberina e aos ceróides presentes nas paredes das células a cortiça é praticamente impermeável a líquidos e a gases;
- *Elasticidade e compressibilidade* – pode ser comprimida até cerca de metade da sua largura sem perder qualquer flexibilidade e recupera a sua forma e volume assim que deixa de ser pressionada;
- *Um excelente isolante térmico e acústico* – a cortiça tem uma baixa condutividade térmica, som e vibração. Isto acontece porque os elementos gasosos que contém estão fechados em pequenos compartimentos impermeáveis e isolados uns dos outros por um material resistente à humidade;
- *Combustão lenta* - a cortiça é também um retardador de fogo natural: não faz chama nem expele gases tóxicos (em concentrações letais) durante a combustão;
- *Resistência ao atrito* - a cortiça é resistente ao desgaste e tem um coeficiente de atrito elevado, ao ponto de ser usada como pavimento.

2.2 Rolhas de Cortiça

A indústria da cortiça possui uma gama completa de rolhas, disponíveis em inúmeros calibres e formatos, por forma a adaptarem-se à enorme diversidade de garrafas e a todo o tipo de vinho. As rolhas de cortiça podem agrupar-se nas seguintes categorias: [5]

- Rolha natural – peça única, extraída por brocagem de um traço de cortiça;
- Rolha natural colmatada - rolhas naturais cujos poros estão preenchidos com pó de cortiça;
- Rolha natural multipeça – fabricadas a partir de duas ou mais metades de cortiça natural coladas entre si através de uma cola certificada para estar em contacto com alimentos;
- Rolha técnica – constituídas por um corpo de cortiça aglomerada muito densa e com discos de cortiça natural colados nos dois topos;
- Rolha aglomerada – rolhas técnicas inteiramente fabricadas a partir de granulados de cortiça proveniente de subprodutos resultantes da produção de rolhas naturais;
- Rolha micro granulada – rolhas de nova geração com um corpo de cortiça aglomerada de granulometria específica;
- Rolha de champanhe – fazem parte das rolhas técnicas, com um corpo aglomerado e com um, dois ou três discos num dos topos, mas com um diâmetro maior que as rolhas normais.
- Rolha capsulada – rolha de cortiça natural em cujo topo é colada uma cápsula de madeira, PVC, metal, vidro, etc.

2.3 Contaminações associadas às rolhas de cortiça

Os principais compostos responsáveis pela contaminação, proveniente das rolhas de cortiça, no vinho são haloanisóis e halofenóis. Estes compostos são facilmente detetados através do olfato e do paladar.

Os principais haloanisóis responsáveis por desvios sensoriais nos vinhos são os cloroanisóis e os bromoanisóis, entre eles: o 2,4,6-tricloroanisol, o 2,3,4,6-tetracloroanisol, o pentacloroanisol e o 2,4,6-tribromoanisol. [6]

2.3.1. 2,4,6-tricloroanisol nas rolhas de cortiça

O 2,4,6-tricloroanisol (Figura 2), também conhecido como TCA, é um cloroanisol, que nas concentrações em que normalmente se encontra (da ordem de $\mu\text{g/L}$), não é tóxico nem perigoso para o ser humano, mas deprecia bastante a bebida. [7]

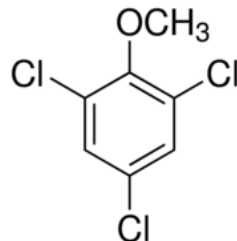


Figura 2 – Fórmula química do 2,4,6-Tricloroanisol

O limite de percepção de TCA é variável de acordo com o consumidor, com o tipo de vinho, com a ocasião em que é consumido, entre outros fatores. É muito frequente o consumidor utilizar o termo “gosto a rolha” para descrever os desvios sensoriais relacionados com o descritor/gosto a mofo. [8]

Os clorofenóis podem ser formados a partir de uma reação direta entre os produtos resultantes da degradação da lenhina e de açúcares com fontes de cloro presentes no meio ambiente, e/ou a partir de compostos organo-clorados, que fazem parte da composição química de diferentes produtos. [2] Na Figura 3 estão representados três mecanismos de formação de cloroanisóis.

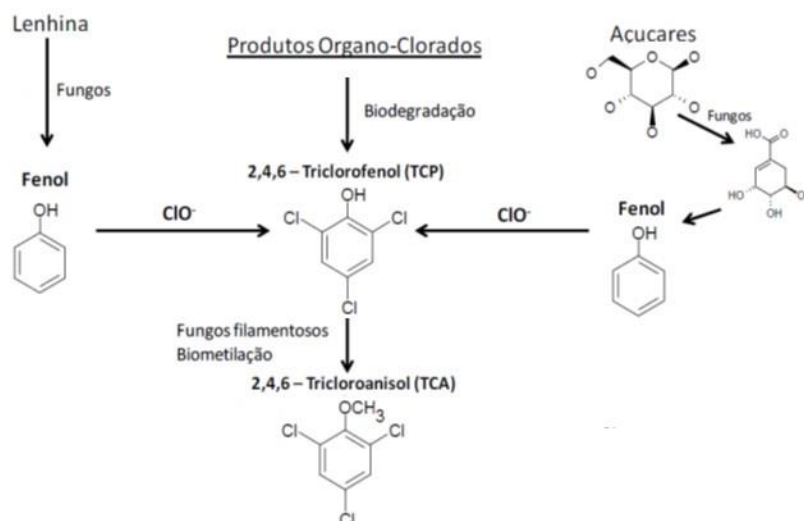


Figura 3 – Representação de mecanismo de formação do 2,4,6-TCA

2.3.2 Métodos de extração de 2,4,6-tricloroanisol

2.3.2.1 Métodos de eliminação/lavagem

I) Novos Sistemas de Cozedura

O sistema tradicional de cozedura consiste na imersão das pranchas de cortiça em água em ebulição, durante um intervalo de tempo que normalmente varia entre 60 e 90 minutos numa tina aberta em cobre, aço ou latão. Neste sistema, a eficiência do processo de cozedura vai-se reduzindo à medida que a água vai ficando mais contaminada, pois a mesma água que descontamina uma prancha pode contaminar as adjacentes. [9]

Os novos sistemas de cozedura são sistemas dinâmicos onde a água está constantemente a circular e ao mesmo tempo a ser descontaminada antes de entrar novamente no ciclo de cozedura. [8] O processo de tratamento da água de cozedura em contínuo consiste numa torre de extração de voláteis onde se promove a destilação e a filtração da água de cozedura. [9]

Os sistemas permitem a cozedura uniforme de todas as pranchas a temperaturas relativamente altas, a melhor extração dos compostos solúveis e também a extração de compostos orgânicos voláteis como TCA evitando, em simultâneo, a possibilidade de contaminação cruzada. [8]

II) Destilação sob vapor controlado

A destilação por arrastamento de vapor de água aplicada á cortiça, particularmente ao granulado que é usado em rolhas de Champanhe e técnicas, é um processo altamente eficaz para a extração de TCA. A volatilidade de TCA permite o seu arrastamento numa corrente de vapor.[8] A Figura 4 mostra esquematicamente do processo de eliminação de TCA.

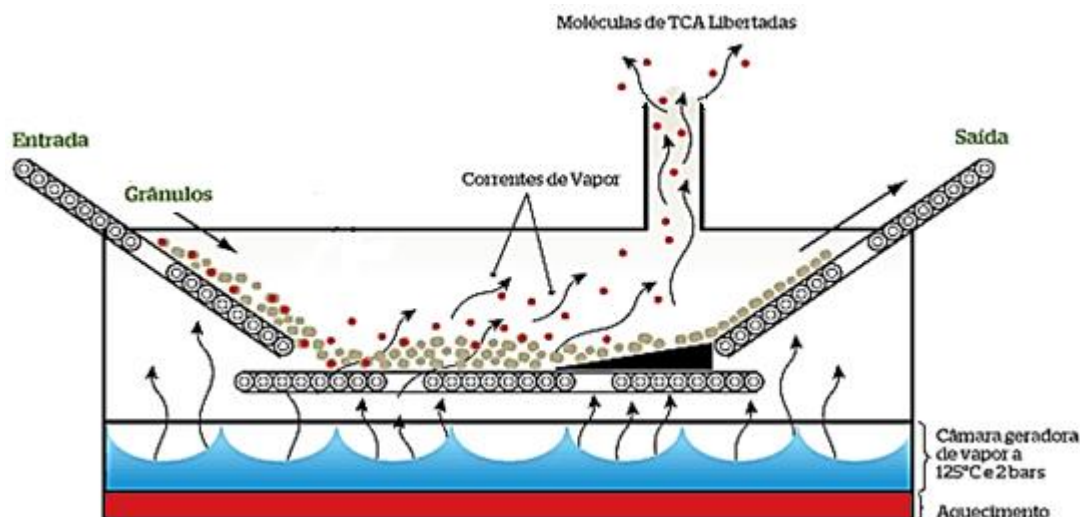


Figura 4 - Esquema do processo de destilação sob vapor controlado

Semelhante ao processo de destilação sob vapor controlado, existe a volatilização por arrastamento em temperatura e humidade controlada, onde o processo num ambiente permanentemente renovado de humidade relativa elevada e temperatura acima dos 60 °C. O processo consegue uma extração significativa de TCA. E é especialmente usado em rolhas naturais visto que, para além da elevada eficácia, não provoca deformação nas rolhas. [8]

III) Volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas

O processo permite o tratamento eficaz de rolhas de cortiça natural, preservando todas as suas propriedades físico-mecânicas pela combinação otimizada de temperaturas – próximas de 60°C – concentração de etanol na fase de vapor e introdução contínua de ar quente. O processo simula a cedência de TCA, existente na cortiça, para o vinho engarrafado, pelo efeito dissolvente do etanol. O fluxo de ar conduz a mistura de vapor de água e etanol envolvendo as rolhas de cortiça e proporciona as condições ideais para a promoção de uma fácil rutura de ligações entre o TCA e a matriz da cortiça. A junção da extração com o fluxo de ar previne a reabsorção do TCA pela matriz da cortiça, dado que o fluxo de ar se move em apenas uma direção. [8] Na Figura 5 está representado de forma esquemática o procedimento de volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas.

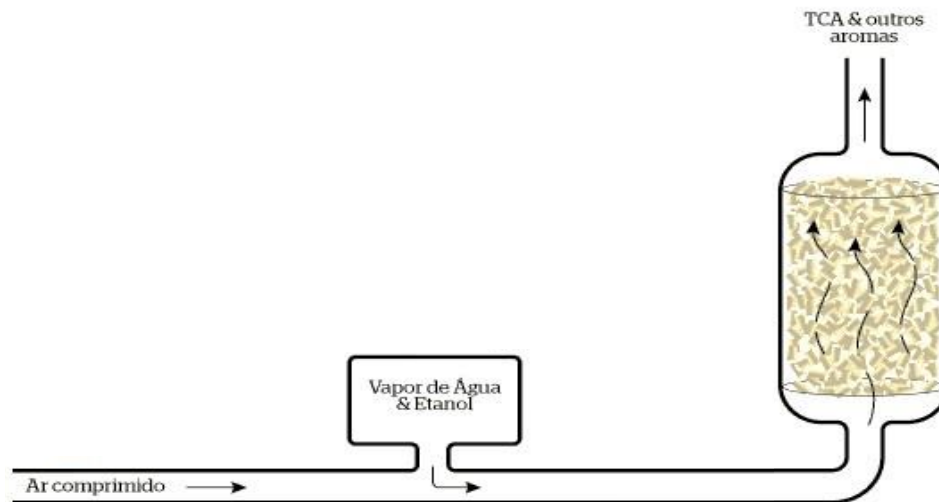


Figura 5 - Esquema do processo de Volatilização por arrastamento em fase gasosa de polaridade ajustada, sob temperatura e humidade controladas

IV) Extração supercrítica com CO₂ (EFS)

O fluido supercrítico é o estado da matéria acima da temperatura crítica e da pressão crítica onde o vapor e o líquido têm a mesma densidade e o fluido não pode ser liquefeito pelo simples aumento da pressão. [10] O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono, cujas condições de extração estão acima da temperatura crítica (31°C) e da pressão crítica (74 bar). [11] O dióxido de carbono supercrítico, assim como a maioria dos fluidos supercríticos, tem a densidade próxima à de um líquido, baixa viscosidade e difunde-se como um gás. [12]

O processo de extração submete granulado de cortiça a uma corrente de CO₂ em estado supercrítico que leva à remoção/arrastamento do TCA e, eventualmente, outros compostos voláteis, de produtos de cortiça. [8]

A EFS apresenta diversas vantagens, quando comparada aos métodos tradicionais de extração e separação, por exemplo, o elevado potencial de solubilidade que os fluidos apresentam quando estão nas condições supercríticas e os solventes usados, geralmente, são gasosos à temperatura e pressão ambiente, assim após a extração são facilmente eliminados. [12]

2.3.2.2 Métodos de extração para análise química

I) Preparação de Amostra segundo a Norma ISO 20752

A extração prevista pela norma baseia-se na técnica de maceração à temperatura ambiente. E consiste em emergir rolhas/granulados/discos, durante 24 horas \pm 2 horas, utilizando o volume de simulador vinho (mistura etanol/água) suficiente para manter as rolhas inteiramente imersas e, em seguida, analisar o macerado. [13]

II) Microextração em fase sólida (SPME)

SPME é uma microtécnica onde ocorrem os processos de extração e pré-concentração de analitos. O dispositivo básico de SPME consiste num suporte de fibra ótica, de sílica fundida, com 1 cm de uma extremidade revestido com um filme fino de um polímero ou de um sólido adsorvente. [14] A fibra encontra-se alojada num dispositivo semelhante a uma seringa onde se encontra retraída até ao momento da extração.

O processo de microextração em fase sólida está representada na Figura 6. A amostra é colocada em um frasco com tampa, adaptado com um septo que permite a perfuração. Com a fibra retraída no interior da agulha do dispositivo SPME, o septo do frasco é perfurado, e com o movimento do êmbolo do dispositivo SPME, a fibra SPME é exposta diretamente na amostra ou no headspace do frasco. Após o término da extração, ou seja, após atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases, a fibra é novamente retraída para o interior da agulha do dispositivo SPME, para posterior ensaio. [15]

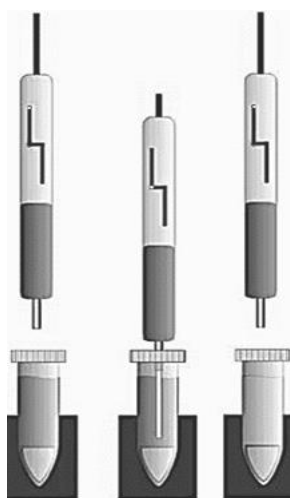


Figura 6 - Esquema representativo de SPME

III) Headspace

a) Teoria Básica da Análise por Headspace

A técnica de amostragem por headspace é baseada num procedimento que consiste na extração térmica de analitos gasosos, voláteis ou semi-voláteis, de meios líquidos e sólidos, que permite uma matriz mais simples quando comparada com a matriz original, com sua subsequente determinação. [16]

A amostra, líquida ou sólida, é colocada em um vial numa porção que ocupe, preferencialmente, até 50% do volume total, e o vial é fechado. [17] Este vial, representado na figura 9, é aquecido por um determinado período de tempo, a uma temperatura definida, num forno de temperatura controlada apropriado para vials de headspace, figura 7, e os compostos voláteis são distribuídos entre a fase de amostra e a fase gasosa até que o equilíbrio seja alcançado. [18] A quantidade de substância que é extraída para o headspace é controlada pela constante de partição, pela razão de fases e coeficiente de atividade.

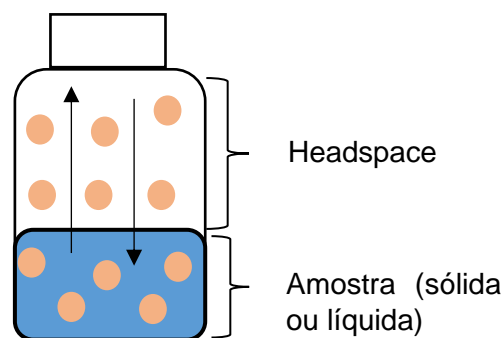


Figura 7 – Esquema de um vial de headspace contendo uma amostra

1) Constante de Partição

O constante de partição é um parâmetro fundamental que expressa a distribuição da quantidade de substância no sistema bifásico. [17] O constante de partição (K) é a razão entre a concentração do analito na amostra (C_s), e a concentração do analito no headspace (C_G), quando o sistema está em equilíbrio térmico, apresentado na equação 1. [19]

$$K = \left(\frac{C_s}{C_G} \right)_{Equilíbrio} \quad eq. 1$$

$$K = \frac{W_s/V_s}{W_G/V_G} = \frac{W_s}{W_G} * \beta \quad eq. 2$$

É de observar que os compostos com um valor alto de K favorecem a fase da amostra (analito pouco volátil), enquanto os compostos com um K baixo favorecem a fase de headspace (analito muito volátil). Como se pretende usar para ensaio a fase de headspace, deve-se garantir que os valores de K para os analitos sejam muito mais baixos do que os dos componentes indesejados na matriz da amostra. [20]

Um aumento na temperatura diminui o valor do constante de partição. No entanto, a influência real dessa mudança na sensibilidade do headspace depende do valor relativo de K versus a razão de fase β , representado na equação 3. [17]

$$C_0 V_S = C_G V_G + C_S V_S = C_G V_G + K C_G V_S = C_G (K V_S + V_G) \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow C_0 = C_G \left(\frac{K V_S}{V_S} + \frac{V_G}{V_S} \right) = C_G (K + \beta) \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow C_G = \frac{C_0}{K + \beta} \quad \text{eq. 3}$$

$$\frac{C_G}{C_0} = \frac{1}{K + \beta} \Leftrightarrow \frac{W_G/V_G}{W_0/V_S} = \frac{1}{K + \beta} \Leftrightarrow \frac{W_G V_S}{W_0 V_G} = \frac{1}{K + \beta} \Leftrightarrow \frac{W_G}{W_0} * \frac{1}{\beta} = \frac{1}{K + \beta} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow \frac{W_G}{W_0} = \frac{\beta}{K + \beta} \quad \text{eq. 4}$$

A representação gráfica da equação 4, em percentagem, para diferentes K's (K=0,026; K=0,5; K=10) encontram-se na Figura 8. Como se pode observar quanto menor for o K, em relação a β , a razão entre as quantidades é obtida maioritariamente pela razão de β 's que é igual a 100%, isto significa que toda a quantidade de analito na amostra foi transferida para o headspace.

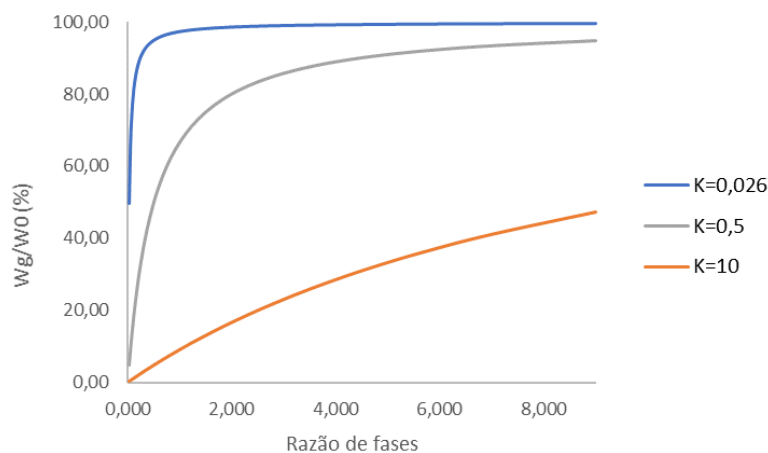


Figura 8 - Representação gráfica da equação 4 para K's iguais a 0,026, 0,5 e 10.

b) Lei de Henry

A Lei de Henry afirma que, a uma temperatura constante, a quantidade de um gás dissolvido em um líquido é diretamente proporcional à pressão parcial desse gás em equilíbrio com aquele líquido, constante de Henry (H). [20] Na equação 5 está representado o resultado da junção da Lei de Henry e da Lei de Raoult.

$$p_i = H * x_{s(i)} \quad eq. 5$$

A constante de partição é idêntica ao coeficiente de solubilidade de polímeros sólidos como a fase condensada. [21] No caso da distribuição de fase entre o ar e a água, a constante da lei de Henry expressa em atm.m³/mol é frequentemente preferida, no entanto, a constante H da lei de Henry adimensional também pode ser definida como o recíproco do coeficiente de partição. [22, 23]

c) Sensibilidade do Headspace

1) Influência da temperatura na pressão de vapor e no constante de partição

O constante de partição de um composto na amostra está relacionado com inverso de sua pressão de vapor quando puro. [20] Na equação 6 está representado a relação entre o constante de partição, as pressões de vapor e o coeficiente de atividade.

$$K = \frac{p_{total}}{p_i^0 * \gamma_i} \quad eq. 6$$

$$K = \frac{constante}{p_i^0} \quad eq. 7$$

$$\log K = \log constante - \log p_i^0 \quad eq. 8$$

A pressão de vapor (p_i^0) de um composto puro é influenciada por sua temperatura e a relação é exponencial. [17] Na equação 9 está apresentada a forma como a temperatura influencia a pressão de vapor, onde B e C são constantes relacionadas com a substância, enquanto na equação 10 encontra-se a relação entre a temperatura e a constante de partição.

$$\log p_i^0 = -\frac{B}{T} + C \quad eq. 9$$

$$\log K = -\frac{B'}{T} + C' \quad eq. 10$$

2) Influência do volume da amostra na sensibilidade do headspace para compostos com constantes de partição diferentes

A equação 11 mostra que a concentração de um composto na fase de vapor do headspace é proporcional à sua concentração original na amostra e o recíproco do constante de partição K adicionado à razão de fase β . [20]

$$C_G = \frac{C_0}{K + \beta} \quad eq. 11$$

Se K for baixo, o valor de β afeta significativamente a concentração na fase de headspace, logo o volume da amostra deve ser ajustado. Diminuir β aumenta a concentração de todos os compostos na fase de headspace. [20]

3) Mudar matriz da amostra ao variar o coeficiente de atividade

O coeficiente de atividade (γ) descreve a interação intermolecular entre soluto e solvente. Ao alterar a matriz da amostra, pode-se modificar o coeficiente de atividade e, por fim, o constante de partição e a sensibilidade do headspace. [17]

De acordo com a equação 12, o valor do constante de partição também pode ser diminuído aumentando o valor do coeficiente de atividade. Um constante de partição menor indica solubilidade reduzida do analito na matriz e, portanto, uma concentração aumentada no headspace. [17]

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 * \gamma_i} \quad eq. 12$$

d) Extração múltiplas por headspace (MHE)

Muitos equipamentos para extrações múltiplas são disponíveis comercialmente. Alguns deles fazem o processo de extração automaticamente, mas a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual, enquanto outros, além de extração automatizada, são também capazes de transferir a amostra ao sistema cromatográfico.[10]

1) Princípios de MHE

Em MHE, a amostra é pesada em um frasco de amostra que é selado e termicamente equilibrado da mesma forma que para uma análise de headspace de equilíbrio regular. O tempo de equilíbrio deve ser suficiente para permitir que os componentes liberados da amostra atinjam uma concentração estável na fase de vapor.[20]

2) Base teórica do MHE

O MHE funciona reanalisando a mesma amostra várias vezes. Entre cada análise, o headspace é ventilado para que o equilíbrio do vapor possa ser restabelecido. Para cada análise, há menos analito no frasco e, portanto, os picos cromatográficos ficam progressivamente menores. Se se continuar a reanalisar a mesma amostra, chegará um ponto em que todo o analito foi efetivamente retirado do frasco. Se se somar os resultados de todas essas análises de repetição, irá se ter uma medida da quantidade total de analito no frasco (W_0) e, portanto, na amostra, representado na equação 13. [20]

$$W_0 \propto A_{total} = \sum A_i \quad eq. 13$$

3) Cálculo simplificado de MHE

Se o cálculo da regressão linear mostrar uma correlação muito boa ou se, por outro lado, não for necessária uma precisão muito alta, a determinação pode ser realizada apenas a partir das duas primeiras medições consecutivas, representado na equação 14. [17]

$$\sum A_i = \frac{A_1^2}{A_1 - A_2} \quad eq. 14$$

e) Amostras sólidas

Amostras sólidas para análise de headspace são tipicamente polímeros, material de embalagem impresso, produtos farmacêuticos e solo. Em geral, as amostras de polímero sólido são muito grandes para permitir o equilíbrio em qualquer tempo razoável. Se não for possível dissolver o analito numa solução ou se o processo for demasiado demorado, a única opção é triturar o material mecanicamente por moagem. Para evitar a geração excessiva de calor e a perda compostos voláteis, a trituração por congelamento é necessária e a amostra deve ser resfriada. [17]

f) Preparação de soluções padrão a partir de líquidos e de sólidos

Na preparação de uma solução stock, os principais problemas são a pureza do solvente e sua interferência com a determinação. O procedimento geral para preparar uma solução stock de uma substância líquida ou sólida envolve a colocação de um volume específico do composto puro em um pequeno balão volumétrico e o volume é perfeito com o solvente. Esta solução padrão de stock deve ser transferida para uma garrafa com tampa de rosca e armazenada com o mínimo de headspace em um refrigerador protegido da luz. [17]

g) Técnica de vaporização total (TVT)

Uma pequena quantidade de amostra é adicionada ao vial que é então aquecida a uma temperatura suficiente para vaporizar toda a amostra dentro do frasco. [20] Quando toda a amostra, incluindo os componentes da matriz, evapora, não existe mais um headspace e uma amostra, apenas uma fase está presente no vial, um gás (vapor), e o vial apenas serve como um recipiente. [17]

$$C_G = \frac{W_0}{V_{total}} \quad eq. 15$$

O TVT é particularmente adequado para a preparação de padrões de vapor a serem usados para calibração. [17]

h) Técnica de vaporização com teor de analito na matriz desprezável (FET)

O FET é muito semelhante à técnica TVT, exceto que é usado em casos onde a vaporização completa da amostra não pode ser alcançada. Nesta técnica, um baixo volume de amostra é injetado, evaporado e termicamente equilibrado em um frasco selado. [20]

A matriz não influencia mais a distribuição de fase se o analito for completamente transferido da amostra para a fase gasosa. Na prática, isso é feito ajustando a relação de fase β o mais alto possível. [17]

$$C_G = \frac{W_0}{V_{total} - V_S} \quad eq. 16$$

Uma vez que o volume do frasco é limitado, o volume da amostra deve ser diminuído, assim, uma pequena amostra é extraída por um volume de gás relativamente grande e, em condições favoráveis, uma extração exaustiva pode ser alcançada. [17]

i) Headspace Dinâmico

O headspace dinâmico, tal como o headspace estático, envolve mover o analito da matriz da amostra para a fase de headspace, no entanto, em vez de se deixar que os voláteis entrem em equilíbrio entre a amostra e o headspace, a atmosfera á volta da amostra é constantemente renovada por um fluxo continuo de gás inerte, removendo os analitos voláteis. [24] A corrente de gás inerte, que contém o analito, pode ser conduzida diretamente para o detetor ou para uma *trap* onde vai ser adsorvido para posterior dessorção.

1) Sem *Trap*

No headspace dinâmico sem *trap*, o vial headspace, onde ocorre a extração, encontra-se diretamente conectado ao detetor, isto significa que o fluxo de gás que transporta os analitos voláteis passa diretamente para o detetor. A monitorização do analito, nestas condições, resulta numa curva que terá uma fase ascendente desde a linha de base até estabilizar e depois decresce até o sinal obtido seja coincidente com a linha de base, este decréscimo é resultante da diminuição do analito na amostra. A parte estabilizada é chamada de estado estacionário, este é caracterizado por ter um fluxo de gás constante, a uma dada temperatura, onde a velocidade de evaporação do analito e a velocidade de transporte são constantes, por isso a quantidade que é arrastada no tempo será igualmente constante. A integração da curva obtida vai resultar na quantidade total de analito detetado.

2) Com *Trap*

No headspace dinâmico com *trap*, os analitos voláteis são transferidos para a *trap*, por ação de uma corrente de gás inerte, e são retidos a temperaturas relativamente baixas. [25] A *trap* é aquecida e os componentes voláteis, previamente adsorvidos, são dessorvidos e transferidos para um detetor ou coluna de separação. [26]

A concentração de compostos na fase de headspace sofrerá decaimento exponencial conforme descrito pela equação 17, onde C_t é a concentração de analito no headspace a um dado tempo, C_0 é a concentração inicial, F_p é taxa de purga do gás transportador, t é o tempo de purga e V_G é volume de headspace. [20]

$$C_t = C_0 \cdot e^{\frac{-F_p \cdot t}{V_G}} \quad eq. 17$$

A recuperação dos compostos voláteis depende de fatores tais como a temperatura de dessorção dos analitos, tempo de dessorção, dentre outros. [27]

2.3.3 Métodos de deteção e determinação de 2,4,6-tricloroanisol

a) Análise sensorial (ISO 22308)

A análise sensorial baseia-se na deteção de odores por via olfativa, através da maceração de uma rolha em solução hidroalcoólica a 12%, água ou vinho. Segundo a norma ISO 22308, os odores diferenciam-se como odores vegetais, terrosos, bolores/mofos, nos quais se enquadra o TCA, e decomposição.[28]

O procedimento analítico está expresso na norma ISO 22308 e tem a vantagem de não só descrever metodologia para identificar aromas a mofo, como também outros aromas que, eventualmente, possam estar presentes nas rolhas de cortiça. [8]

Uma vez que esta técnica recorre ao olfato ou paladar, os limites de deteção e identificação dos compostos podem variar de analista para analista, tendo em conta a sua experiência, o método seguido, e ainda fatores como o stress e/ou fadiga. [29]

O Projeto Quercus, trabalho de investigação levado a cabo pelo setor corticeiro, com o apoio da Comunidade Europeia, teve como resultados o desenvolvimento de metodologias de análise e controlo que permitam a produção de rolhas isentas de desvios organoléticos, bem como os seus respetivos limiares de deteção olfativa. [30]

b) Análise pela ISO 20752

1) Cromatografia gasosa (GC)

A GC é uma técnica que permite a separação e análise de misturas de substâncias voláteis. A amostra é vaporizada e introduzida num fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste que transporta os componentes da amostra até ao detetor.[28] No trajeto da amostra pela coluna, a amostra é separada em consequência de sua partição e interação das moléculas entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida. [31]

A cromatografia gasosa é composta por seis componentes principais: a fonte de gás e seus controladores de fluxo, o injetor, o detetor, o forno, a coluna, e o sistema de dados, Figura 9.

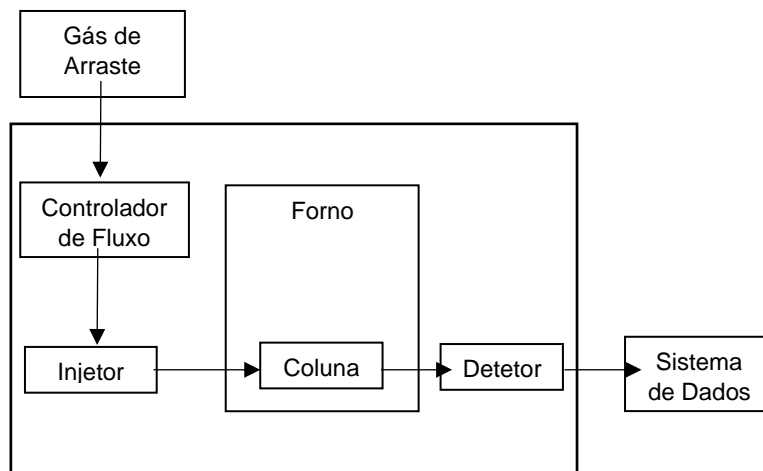


Figura 9 - Representação esquemática dos componentes principais da cromatografia gasosa.

Na norma ISO 20752 encontra-se descrito o procedimento de determinação do TCA, onde estão especificados os tipos de detetores que podem ser acoplados ao GC, sendo estes o detetor de espectrometria de massa (MS) e o detetor de captura de eletrões (ECD).

2) Detetores indicados pela ISO 20752

1) MS

A MS é uma técnica analítica poderosa utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais de moléculas; pode ser realizada com quantidades bem pequenas e a concentrações bem baixas em misturas quimicamente complexas. [32]

O acoplamento da GC com a MS é extremamente vantajoso para a deteção e determinação do TCA, pois este é um composto muito volátil e encontra-se presente em concentrações bastante reduzidas. Na Figura 10 encontra-se representado um esquema de um GC/MS.

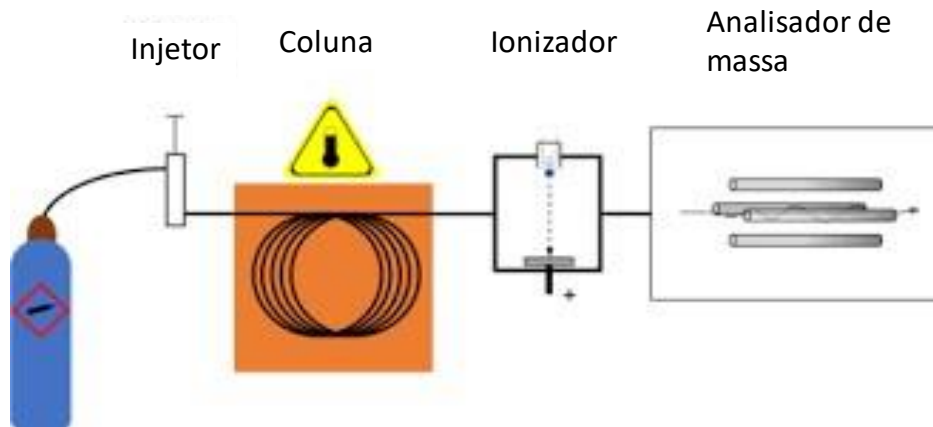


Figura 10 – Representação esquemática do GC/MS

II) ECD

O ECD é um detetor bastante seletivo e de grande sensibilidade para compostos que “capturem eletrões”. É um detetor de ionização, mas ao contrário da maioria dos detetores desta classe, as amostras são detetadas ao causar uma diminuição no nível de ionização. A resposta do detetor surge num cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades são proporcionais à absorção ou captura do analito, que por sua vez é proporcional à concentração do mesmo e à sensibilidade do detetor. [29] A junção desses detetores com a cromatografia gasosa confere ao sistema uma elevada sensibilidade e precisão na análise de substâncias voláteis com concentrações vestigiais, tais como o TCA. [33]

2.4 Procedimento genérico da técnica de amostragem por headspace

Quando se desenvolve um procedimento de amostragem por headspace deve-se ter em conta a amostra. Deve-se ter em consideração se o analito é suficientemente volátil e se o estado físico da amostra é adequado para se obter reprodutibilidade. [17]

A concentração do analito a determinar também tem de ser considerada. Se esta for demasiado alta, a amostra deve ser diluída. Por outro lado, se esta for demasiado baixa, as condições experimentais, como volume de amostra (razão de fases) e temperatura de termostatização (constante de partição), devem ser ajustadas ou pode-se recorrer ao uso de uma *trap* para pré-concentração. [17]

Depois avalia-se o tempo necessário para o equilíbrio térmico, para tal pode-se colocar um número de vials com a mesma quantidade de amostra num forno e termostatizá-los por

tempos cada vez mais longos. A temperatura de termostatização pode ser aumentada para se diminuir o tempo de equilíbrio, mas tal deve ser feito com cuidado para não aumentar a temperatura ao ponto de criar uma pressão demasiado alta dentro do vial que leve à rutura do septo e perda de material. [17] A temperatura deve ser definida de forma que a quantidade máxima de analito seja movida para o espaço superior no mínimo de tempo. Também se deve considerar a estabilidade térmica da amostra ao definir a temperatura de termostatização. [34]

O tempo de termostatização deve ser o tempo necessário para que o equilíbrio do analito entre a amostra e o headspace se estabeleça. O resultado analítico não mudará se o tempo de termostato for maior do que o tempo necessário para o equilíbrio. Uma termostatização excessivamente longa deve ser evitado porque algumas amostras podem ser sensíveis ao aquecimento prolongado. Depois que o equilíbrio foi alcançado, o vial é pressurizado pelo gás de arraste a uma pressão superior à pressão da *trap*. [34]

A agulha é aquecida para que a amostra do headspace não se condense na sua superfície durante o processo de transporte. Esta deve ser mantida a uma temperatura mais elevada do que a temperatura do termostatização. [34]

A amostra pode ser armazenada na *trap*, para isso existem as temperaturas de adsorção e dessorção. A temperatura de adsorção é a temperatura a ser usada para a adsorção dos analitos durante o carregamento da *trap* e deve ser baixa o suficiente para capturar os componentes de interesse, mas não muito baixa, pois, as temperaturas muito baixas podem causar condensação de humidade na própria *trap*. A temperatura de dessorção é a temperatura a ser usada para a dessorção dos componentes aprisionados e sua subsequente injeção na coluna e deve ser alto o suficiente para garantir a dessorção rápida e completa da amostra para um meio gasoso. [34] A amostra segue pela linha de transferência, cuja temperatura é ligeiramente superior à temperatura de termostatização.

De seguida deve-se estabelecer o fluxo da coluna, bem como definir quaisquer programas de pressão ou fluxo que sejam necessários como parte do método GC. [34] Também se deve escolher entre as diferentes formas de operação, tais como, split, splitless, conexão direta e conexão na coluna.

No presente trabalho experimental foram usados os modos splitless e a conexão na coluna. Na operação splitless, a linha de transferência de sílica fundida é conectada diretamente à coluna do GC dentro do forno do GC (conexão direta). Alternativamente, a coluna capilar GC é levada através da manga da linha de transferência e conectada diretamente à unidade de agulha do HS (conexão na coluna). Nesta configuração, o HS fornece o fluxo total do gás de arraste para o sistema HS-GC. [34]

2.5 Validação de Métodos

O processo de validação possibilita uma avaliação da eficiência de um processo analítico, daí que deva ser sempre realizado aquando da proposta de uma nova metodologia de análise. [35]

O objetivo final da validação de um método analítico é garantir que todas as medições futuras em análises de rotina serão próximas o suficiente do valor verdadeiro desconhecido para o conteúdo do analito na amostra. [36] Os objetivos da validação não são simplesmente obter estimativas de veracidade ou viés e precisão, mas também avaliar aqueles riscos que podem ser expressos pela incerteza de medição associada ao resultado [37].

Uma validação de método fornece prova de que um método é adequado para o uso pretendido e que atende aos requisitos de qualidade necessários. [38] Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade de um método de ensaio analítico, embora este possa envolver a presença de possíveis erros (sistemáticos ou aleatórios) e, conseqüentemente, a eventual alteração significativa do valor do resultado final. [39]

A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições como para os clientes destes, na medida em que é fundamental saber selecionar o método que melhor se adapta a cada análise e assegure a validade dos resultados. [40]

A validação do método pode ser realizada em um único laboratório ou, de preferência, deve ser testada em vários laboratórios. A validação do método de um único laboratório deve ser realizada para estabelecer o desempenho do método e é o mínimo exigido para fins de acreditação. Embora um método possa parecer ter um bom desempenho nas mãos do originador e as características de desempenho da validação interna possam ser aceitáveis, na prática é frequentemente o caso de que algumas etapas do método podem ser mal descritas ou o próprio método pode ser específico do instrumento e, portanto, difícil de reproduzir em outro lugar, por esse motivo, a maneira recomendada de demonstrar que um método tem ampla aceitabilidade é realizar uma validação de método interlaboratorial completa. [41]

Geralmente os parâmetros avaliados num processo de validação são a especificidade e seletividade, gama de linearidade/curva de calibração, precisão (repetibilidade), reprodutibilidade, exatidão, limite de deteção e limite de quantificação. [35]

2.5.1 Identificação

O ensaio de identificação tem como objetivo demonstrar a capacidade do método em identificar inequivocamente a presença ou ausência do analito na amostra, evidenciando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está diretamente relacionada com a presença do analito. O processo de identificação é feito através da comparação de uma propriedade da amostra com a mesma propriedade de um padrão de referência. [42]

2.5.2 Seletividade e Especificidade

A seletividade é definida como " a capacidade do método bioanalítico de medir inequivocamente e diferenciar o(s) analito(s) na presença de componentes, que podem estar presentes. Normalmente, estes podem incluir metabólitos, impurezas, degradantes, componentes da matriz, etc. ". [43]

A ausência absoluta de efeitos de interferência pode ser considerada como "especificidade", portanto, especificidade = 100% de seletividade [44].

A seletividade avalia a capacidade de um método identificar um analito e um número restrito de interferentes numa mistura complexa. Já a especificidade tem a capacidade de responder apenas a um analito de interesse presente numa mistura complexa, não existindo interferentes no método. [45]

2.5.3 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. [46] Esta corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de calibração. [47]

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. [48]

2.5.4 Linearidade e Gama analítica

a) Gama analítica

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão. Para que esta seja definida é necessário que a resposta instrumental seja, preferencialmente, linear e que haja homogeneidade de variâncias na variável dependente. [47]

b) Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do mesmo produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de trabalho. Na prática, para traçar a curva de calibração são necessários definir, no mínimo, cinco pontos, não incluindo o ponto zero da curva, para que não existam eventuais erros associados. [47]

A escolha de um modelo de calibração apropriado é necessária para uma quantificação confiável. Portanto, a relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta correspondente deve ser investigada. [49]

I) Correlação Linear

O coeficiente de correlação, r^2 , é um dos parâmetros utilizados para verificar a linearidade de uma curva, sendo que valores acima de 0,98 são geralmente considerados satisfatórios. [50]

Apesar de não ser recomendável, muitos autores usam o coeficiente de correlação do ajuste da reta de calibração como critério de avaliação da linearidade.

II) Método de Mandel (norma ISO 8466-1)

Em métodos baseados na curva de calibração, é necessário mostrar a linearidade do modelo estatístico, conforme descrito na ISO 8466-1 [51]. Podendo-se usar a teste de Mandel e Fisher. Usando o teste Mandel, os desvios padrões residuais, lineares e não lineares, $s^2_{y/x(1)}$ (equação 18) e $s^2_{y/x(2)}$ (equação 19), são determinados.

$$s_{y/x(1)}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (mC_i + b))^2}{n - 2} \quad eq. 18$$

$$s_{y/x(2)}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - (m_2C_i^2 + mC_i + b))^2}{n - 3} \quad eq. 19$$

O valor teste é calculado pelas equações, 20 e 21:

$$DS^2 = (n - 2)s_{\frac{y}{x}(1)}^2 - (n - 3)s_{y/x(2)}^2 \quad eq. 20$$

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y/x(2)}^2} \quad eq. 21$$

Se $VT \leq F(1; n-3; 99\%)$, os pontos de calibração são definidos em uma linha reta.

Se $VT > F(1; n-3; 99\%)$, os pontos de calibração não se encaixam numa linha. A faixa de concentração deve ser reduzida ou aplicada a uma função de calibração de segundo grau ou superior.

III) Teste da Áreas Normalizadas

O teste de área normalizada é baseado na distribuição dos valores normalizados das áreas dos picos cromatográficos para as concentrações de analito usadas.

O objetivo da distribuição dos valores normalizados é avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, que não ultrapassem uma faixa previamente estabelecida.

A partir da equação de reta obtida na regressão linear, estimam-se as áreas dos picos para as concentrações utilizadas. Para cada uma dessas áreas, é calculada a relação entre o valor da área obtido experimentalmente e o valor da área estimada por regressão linear.

A concentração para a qual essa relação está mais próxima de 1 é chamada de C100, ou seja, é a concentração correspondente ao ponto experimental com a melhor correlação. A distribuição dos valores normalizados é obtida aplicando a seguinte expressão a cada concentração, equação 22.

$$\text{Área normalizada} = 100 \frac{A_i/C_i}{A_{100}/C_{100}} \quad eq. 22$$

Para admitir a existência de linearidade, em uma dada faixa de concentração, é previamente definido que os valores normalizados não podem ter um desvio maior que um determinado percentual.

IV) Teste de Rikilt

O teste de RIKILT permite a análise de linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para isso, traça-se um gráfico de linearidade para avaliar seu comportamento linear. Uma relação foi determinada para cada concentração e para cada sinal instrumental. Uma resposta média de todos os relatórios foi calculada para todos os pontos de calibração. O valor médio foi atribuído a um valor de 100% e a percentagem de cada valor foi calculada com base no valor médio.

O valor das concentrações é colocado no eixo das abcissas e o valor da relação, em percentagem, no eixo das ordenadas.

Para a linearidade perfeita, cada ponto de calibração, deve dar um valor de 100%. Para admitir linearidade em uma dada faixa de trabalho, é definido que os valores normalizados não devem ter um valor de desvio maior que 10%, ou seja, os valores devem estar entre 90 e 110%. Se houver valores que não se enquadrem nesta faixa, esses valores devem ser rejeitados e o teste RIKILT reprocessado na faixa reduzida, até que os requisitos selecionados sejam atendidos.

2.5.5 Limiares analíticos

Indiscutivelmente, os parâmetros de desempenho mais críticos para um procedimento diagnóstico são os relacionados à quantidade ou concentração mínima de analito, dependendo dos detetores, que pode ser detetada e quantificada [52].

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são definidos como a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada e quantificada com segurança, respetivamente. [53]

a) Limite do Branco (LoB)

O limite de branco é definido como a concentração aparente de analito mais alta que se espera encontrar quando são testadas réplicas de uma amostra que não contém analito. [54] LoB é estimado medindo réplicas de uma amostra em branco e calculando o resultado médio e o desvio padrão, equação 23. [55]

$$LoB = média_{branco} + 1,645s_{branco} \quad eq. 23$$

Assumindo uma distribuição gaussiana dos sinais analíticos brutos de amostras em branco, o LoB representa 95% dos valores observados. Os 5% restantes dos valores em branco representam uma resposta que poderia realmente ser produzida por uma amostra contendo uma concentração muito baixa de analito. [55]

b) Limite de deteção (LoD)

Em termos qualitativos o limite de deteção corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística, o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal, indicar se o analito em questão está ausente ou presente na amostra. [56] Qualquer leitura que seja inferior ao limite de deteção não significa que o analito esteja ausente, apenas indica que a concentração do composto em causa é inferior a um certo valor. [57]

O LoD é determinado utilizando o LoB medido e réplicas de teste de uma amostra conhecida por conter uma baixa concentração de analito, equação 24. [54]

$$LoD = LoB + 1,645s_{concentração\ mais\ baixa} \quad eq. 24$$

Novamente, assumindo uma distribuição gaussiana das amostras de baixa concentração, 95% dos valores excederão o LoB previamente definido e apenas 5% das amostras de baixa concentração produzirão valores abaixo do LoB e erroneamente parecem não conter analito. [55]

c) Limite de Quantificação (LoQ)

O limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser estatisticamente determinada com adequada precisão e exatidão, em determinadas condições operacionais. [56]

O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. Efetua-se a determinação da razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser quantificado. [58]

O LoQ pode ser equivalente ao LoD ou pode estar em uma concentração muito maior, mas não pode ser inferior ao LoD. [55]

2.5.6 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. Assim, é possível verificar se o método tem capacidade de repetir e reproduzir os resultados obtidos em análises sobre a mesma amostra/padrão. [47]

a) Repetibilidade

Repetibilidade é uma medida da capacidade do método de gerar resultados semelhantes para preparações múltiplas da mesma amostra. [59]

A repetibilidade (precisão entre ensaios) refere-se à dispersão dos resultados do método, operando num curto intervalo de tempo e nas mesmas condições (mesma amostra, analista, equipamento, método, laboratório, etc.). [60]

As condições de repetibilidade envolvem resultados de testes independentes que são obtidos com o mesmo método, em itens de teste idênticos, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento e em curtos intervalos de tempo. Assim, a repetibilidade reflete a melhor precisão interna alcançável. Os resultados são geralmente relatados em termos de desvio padrão, coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD). [61]

b) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade está relacionada com a dispersão de resultados de um método obtida com estudos interlaboratoriais, refletindo erros aleatórios de quantificação. Ela permite

avaliar a concordância dos resultados entre ensaios dependentes e/ou independentes sobre a mesma amostra e/ou padrão em condições operacionais bem definidas. [60]

A reprodutibilidade é uma medida da sensibilidade do método às mudanças laboratoriais. Podem ser mudanças moderadas no desempenho do equipamento ou variação na técnica do operador e no ambiente do laboratório. A reprodutibilidade é gerada por dois laboratórios separados executando o teste e, portanto, também é chamada de precisão interlaboratorial. [62]

c) Precisão Intermédia

A precisão intermédia, também conhecida por variabilidade intralaboratorial, exprime a precisão estimada sobre a mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, dentro do mesmo laboratório, estabelecendo exatamente as condições que sofrem alterações.[63]

A precisão intermédia é semelhante à repetibilidade, mas esta representa a concordância entre os resultados obtidos de medições efetuadas em diferentes condições experimentais, mesmo método, mas por exemplo, equipamento ou analista diferente. De uma maneira geral, a precisão intermédia é obtida em condições intermédias entre a repetibilidade e reprodutibilidade. [64]

2.5.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico é obtida pela aproximação dos valores entre resultados avaliados de forma individuais da análise em relação ao valor de referência, que normalmente é dado pela análise de um material de referência certificado, MRC, ensaios interlaboratoriais, EIL, e/ou por meio de ensaios de recuperação. [65]

Os quatro métodos principais, propostos para o estudo da exatidão, são baseados no uso de material de referência certificado (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos. [66]

Materiais de referência (MR) e materiais de referência certificados (MRC) são as bases para verificação da exatidão de medições analíticas, visando a garantir a sua confiabilidade. [67] Segundo o Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025, os MRC são “preparados por entidades reconhecidas, sendo atribuídos valores certificados e respetivas incertezas aos parâmetros”. [68]

A avaliação dos resultados obtidos na análise de um MRC pode ser feita usando processos suplementares tais como: [47]

- erro relativo;
- teste de hipóteses (t-test);
- fator de desempenho (z-score);
- erro normalizado.

A exatidão também pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (método com precisão e exatidão avaliadas). Após análise de diferentes amostras com ambos os métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado (nesse caso, zero). [58]

Estudos colaborativos implicam na aceitação de pelo menos oito laboratórios (número mínimo) em desenvolver determinado método. Somente quando for impossível reunir tal número de laboratórios, o estudo poderá ser conduzido com o mínimo absoluto de cinco participantes. [69]

2.5.8 Robustez

Segundo a International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez do método é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado sob pequenas, mas estudadas variações nos parâmetros do método e prover indicação da sua dependência durante o uso normal. [70]

Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem influenciar, significativamente, a resposta do método estudado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório. [60]

Os testes de robustez foram introduzidos originalmente para evitar problemas em estudos interlaboratoriais e para identificar os fatores potencialmente responsáveis. [71]

A validação completa não deve incluir necessariamente testes de robustez, mas deve ser realizada se um método tiver que ser transferido para outro laboratório. [72]

3. Procedimento Experimental

3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

3.1.1 Materiais e Equipamentos

Durante todo o trabalho experimental foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- Frascos de vidro de 100 e 250 mL;
- Micropipeta Gilson Pipetman P100;
- Micropipeta 200-1000 uL AHN Pipet4u;
- Micropipeta 0,5-5 mL Brand Transferpette;
- Ponteiras de polipropileno;
- Balança analítica Mettler AE200;
- Vials de Headspace 20 mL ILC;
- Micro espátula;
- Dispositivo de ultrassom;
- Headspace Sampler com *Trap*, PerkinElmer TurboMatrix 40;
- Gas Chromatograph, PerkinElmer Clarus 680;
- Mass Spectrometer, PerkinElmer Clarus SQ 8 T;
- Coluna BPX5 30m x 0,32 mm x 0,25 um, SGE Analytical.

3.1.2 Reagentes

Na preparação de soluções foram utilizados os seguintes reagentes:

- Metanol CHROMASOLV GC/MS 99,9% Honeywell;
- Etanol 96% (d=0,81 g/mL) Carlo Erba Reagents;
- Água ultra-pura, 18 MΩ.cm;
- 2,4,6-trichloroanisol (TCA) 99% Aldrich;
- Solução etanólica de 2,4,6-trichloroanisol pentadeuterado (D5-TCA) 10 ug/L fornecida pela empresa.

3.2 Preparação de Soluções

3.2.1 Solução Stock de TCA (1000 ppm)

Com auxílio da balança analítica pesou-se rigorosamente, para um vial de headspace, 15 mg de TCA sólido e dissolveu-se em 15,00 mL de metanol. Para garantir a dissolução completa do sólido colocou-se durante 15 minutos em um banho de ultrassom.

3.2.2 Diluições

3.2.2.1 Primeira Diluição (400 ppb)

A partir da solução stock, preparou-se uma solução de TCA diluída por diluição de 100 μ L de solução stock em 250 mL de água. Para tal, pesou-se a água necessária, adicionou-se, com uma micropipeta, a solução stock e colocou-se no ultrassom por 5 minutos.

3.2.2.2 Segunda Diluição (320 ppt)

A partir da solução de TCA de 400 ppb (S400), preparou-se uma solução de TCA mais diluída por diluição de 200 μ L da S400 em 250 mL de água. Para tal, pesou-se a água necessária, adicionou-se, com uma micropipeta, a S400 e colocou-se no ultrassom por 5 minutos.

3.2.3 Soluções Padrão ensaiadas

A partir da solução de TCA de 320 ppt (S320) e da solução de D5-TCA (SPI), foram preparadas soluções padrão de TCA, de concentração compreendida entre 0,5 e 20 ppt, numa mistura de etanol (12%)/água (v/v), os volumes da S320 e da SPI, bem como o volume total estão referidos na Tabela 1. Para isso, pesou-se as quantidades necessárias de água e de etanol e adicionou-se os volumes da S320.

Tabela 1 - Valores de volumes necessários no preparo das Soluções Padrão

Concentração/ppt	Volume de S320/μL	Volume de Solução de D5-TCA/μL	Volume total de Solução Padrão/mL
0,5	160	500	100
1	160	250	50
2	315	250	50
4	630	250	50
6	940	250	50
10	1600	250	50
20	3200	250	50

3.3 Condições Operacionais

3.3.1 Condições do HS-Trap

O TCA foi extraído da solução alcoólica utilizando um procedimento semelhante ao descrito no ponto 2.4. Nas tabelas 2 a 5 encontram-se referidas as condições de temperatura, tempo, pressões e tempo de adsorção do headspace.

Tabela 2 - Temperaturas dos componentes de Headspace

Componentes	Temperaturas/$^{\circ}$C
Agulha	100
Forno	70
Linha de Transferência	140
High Trap	280
Low Trap	40

Tabela 3 – Tempos dos procedimentos do Headspace

Procedimentos	Tempos/min
Termostatização	20,0
Desorção	0,1
Purga	5,0
Trap Hold	15,0
Ciclo GC	30,0

Tabela 4 - Pressões dos componentes do Headspace

Componentes	Pressões/psi
Vial	30,0
Desorção	20,0
Coluna	20,0

Tabela 5 – Tempo de adsorção

Procedimento	Tempo/min
Ciclos	3 ciclos
Pressurização do vial	1,0
Decaimento da pressão no vial	1,6

3.3.2 Condições do GC/MS

Depois de extraído, o TCA é separado de outros componentes por cromatografia gasosa, utilizando o programa de temperaturas da coluna abaixo apresentado (Tabela 6).

Tabela 6 - Programa de Temperaturas

Velocidade (°C/min)	Temperaturas (°C)	Tempo de espera (min)
---	50	2,0
9,0	150	0,5
20,0	260	5,0

O TCA é detetado por espectrometria de massa, com o detetor a uma temperatura de 250 °C, em modo SIR e os fragmentos de massa detetadas foram 195, 199, 210, 212, 215 e 217 m/z, com um dwell de 0,07 segundos e um inter-channel delay de 0,01 segundos. Para a confirmação da presença de TCA fez-se um ensaio em modo full-scan, num intervalo de fragmentos de massa de 50 a 300 m/z.

4. Resultados e Discussão

4.1 Cromatogramas Típicos

Na figura seguinte, Figura 11, encontram-se representados os cromatogramas típicos das soluções padrão de TCA na presença de padrão interno (D5-TCA) em modo SIR com a avaliação de seis fragmentos de massa, das quais estão representadas individualmente os fragmentos 195, 210 e 215 m/z. No cromatograma de TIC (último), onde está representada a informação agregada obtidas pelos fragmentos 195, 199, 210, 212, 215 e 217 m/z, encontram-se os picos de TCA e D5-TCA sobrepostos a 10,75 e 10,69 minutos, respetivamente. Para se distinguir os picos usaram-se os registos dos fragmentos 195 (terceiro) e 210 (segundo), para o TCA, e o fragmento 215 (primeiro), para o D5-TCA. Para se confirmar que o pico a 10,75 era o pico de TCA fez-se um ensaio com o detetor em modo full-scan, ou seja a detetar todas as massas do intervalo previamente definido, e pesquisou-se o espectro de massa obtido na biblioteca de espectros tendo sido confirmado a presença de TCA como composto mais provável.

Apesar das soluções serem soluções padrão, preparadas a partir da substância pura á qual foi adicionada, durante a preparação das soluções a ensaiar, apenas metanol, etanol e água ultra-pura, foram detetadas impurezas/interferências desconhecidas provenientes de várias fontes, provavelmente, do sistema de headspace ou da solução, que afetam a estabilidade da linha de base.

, 17-Jun-2021 + 04:22:39

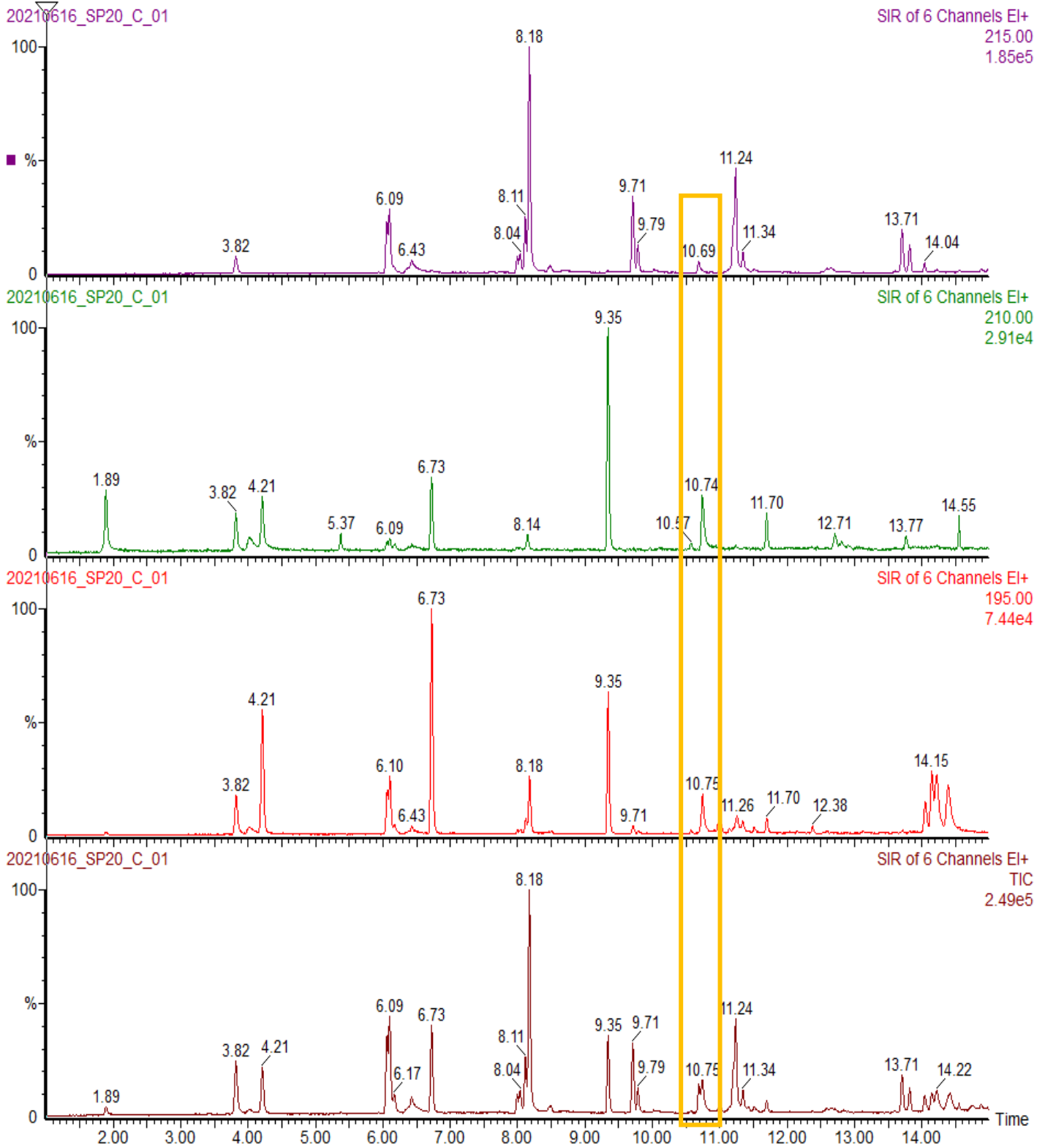


Figura 11 - Exemplo dos Cromatogramas obtidos (Solução padrão de 20 ppt com padrão interno)

4.2 Teste da homogeneidade da variância

Para avaliar a homogeneidade de variância foram preparadas duas soluções padrão de TCA de 0,5 e 20 ppt, as quais representam os extremos do intervalo de trabalho, tendo-se seguido o procedimento previamente descrito. Ambas as soluções foram ensaiadas 10 vez, de acordo com o recomendado pela norma ISO 8466-2, no entanto os ensaios da solução de 0,5 ppt foram divididos em dois dias (Tabela 7), sendo posteriormente usados para avaliar a repetibilidade.

Tabela 7 - Conjunto de Resultados para avaliação de homogeneidade e repetibilidade

Solução de TCA de 0,5 ppt		Solução de TCA de 20 ppt	
Dia 1	Dia 2	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
Razão entre A195 e A215		0,90	0,43
1,18	2,07	0,80	0,34
1,01	1,87	0,74	0,35
0,96	1,77	0,78	0,33
0,94	2,08	0,80	0,35
	2,16	0,80	0,39
	2,22	0,76	0,38
Razão entre A210 e A215		0,28	0,73
0,45	1,13	0,83	0,33
0,37	1,09	0,85	0,40
0,35	1,11		
0,36	1,20		
	1,25		
	1,17		

A195 – Área correspondente ao pico do TCA do fragmento de massa 195 m/z; A210 - Área correspondente ao pico do TCA do fragmento de massa 210 m/z; A215 – Área correspondente ao pico do D5-TCA do fragmento de massa 215 m/z.

Na tabela seguinte, Tabela 8, encontram-se os resultados do teste, onde se pode ver que apenas existe homogeneidade de variância para o fragmento de massa 210 m/z. É de salientar que estes resultados vão contra a Lei de Horwitz, que diz que o coeficiente de variação do sinal analítico diminui com o aumento da concentração do analito.

Tabela 8 - Teste de Homogeneidade de Variância

	195 m/z	210 m/z
$s_{0,5}^2$	0,03	0,003
s_{20}^2	0,003	0,002
$s_{0,5}^2 / s_{20}^2$	9,18	1,81
F(9;9;99%)	5,35	

Quando se compara todas as variâncias nota-se que três delas são bastante similares e uma é completamente distinta, cerca de dez vezes maior. Para o fragmento de massa 195 m/z, apesar do teste estatístico (teste F) originar um valor de 9,18, este reflete uma estimativa por excesso o que significa que poder-se-ia ter repetido, posteriormente, o ensaio para confirmar a falta de homogeneidade. No entanto para prosseguir com os estudos seguintes, não se valorizou a falta de homogeneidade para o fragmento de massa 195 m/z.

4.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para calcular os limites de deteção e quantificação recorreu-se à razão sinal/ruído (S/N). Ensaiou-se dez vezes uma solução padrão de TCA de 0,5 ppt, obteve-se o valor S/N e calculou-se os limites, cujos valores encontram-se registados na Tabela 9.

Comparou-se os limites de quantificação e assumiu-se que o valor mais elevado (ensaio 3 – LoQ=0,06 ppt) seria o mais adequado para continuar o estudo dos limites, procedeu-se, então, á preparação de uma solução padrão de TCA com concentração ligeiramente superior ao limite de quantificação (0,09 ppt) e obteve-se e uma razão S/N de 247,12, é de salientar que o valor de S/N é superior aos previamente obtidos para a concentração de 0,5 ppt e ao que seria esperado.

Observa-se, paralelamente que a área obtida (900 UA) também é superior às previamente registadas para a concentração, isto ocorreu pois não se conseguiu controlar a linha de base de forma a esta só oscilar dentro de pequeno intervalo aceitável.

Tabela 9 - Valores de Razão sinal-ruído e limites de detecção e quantificação

Ensaio	S/N	LoD/ppt	LoQ/ppt
1	123,96	0,02	0,05
2	111,21	0,02	0,05
3	105,25	0,02	0,06
4	110,28	0,02	0,05
5	212,96	0,01	0,03
6	201,59	0,01	0,03
7	247,22	0,01	0,02
8	238,99	0,01	0,02
9	218,30	0,01	0,03
10	235,34	0,01	0,02

4.4 Linearidade

O método de análise, quando executado experimentalmente, exibiu, ao longo do tempo, falta de repetibilidade quer para as soluções padrão quer para macerados. Por este fato houve necessidade de se efetuar vários conjuntos de ensaios.

Nas tabelas abaixo, Tabelas 10 a 18, encontram-se os resultados obtidos com o intuito de avaliar a linearidade. Estes estão divididos em conjuntos por representarem tentativas calibrações diferentes, ou seja, com soluções de proveniência diferente, preparadas em dias diferentes ou ensaiadas em dias diferentes.

Conjunto de Resultados 1 e 2

Estes resultados são provenientes de ensaios de soluções fornecidas pela empresa, com concentrações compreendidas entre 0,5 e 20 ppt, feitos em duplicado. As soluções do Conjunto de Resultados 1 foram preparadas numa solução alcoólica de 12% etanol sem padrão interno enquanto as do conjunto 2 têm padrão interno. Todas estas soluções foram preparadas por volume, por isso, visto que a concentração de padrão não foi fornecida e é a mesma para todas, a razão de concentrações é feita ao dividir a concentração de TCA por um.

Tabela 10 - Conjunto de Resultados 1

Concentração (ug/L)	A195	A210
0,5	932,0	529,7
1	924,5	509,0
2	975,5	533,5
4	1116	552,5
6	1341,5	770,5
10	1571	848,5
20	1924,0	1033,0

Tabela 11 - Conjunto de Resultados 2

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,5	0,54	0,28
1	0,59	0,35
2	0,81	0,41
4	0,65	0,32
6	0,70	0,36
10	0,97	0,63
20	1,42	0,90

Conjunto de Resultados 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9

Estes resultados foram obtidos pelos ensaios de soluções preparadas pelo procedimento descrito previamente, com exceção do conjunto 8 que foram preparadas em água. As soluções dos Conjuntos de Resultados de 3 a 8, com concentrações de TCA compreendidas entre 0,5 e 20 ppt, foram ensaiadas em duplicado com exceção do conjunto 6, onde as soluções de 0,5 e 20 ppt foram ensaiadas 10 vezes cada uma. As soluções usadas, para obter os dados do Conjunto de Resultados 9, foram ensaiadas em quadruplicado. Todas as razões foram obtidas por cálculo da média.

Tabela 12 - Conjunto de Resultados 3

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,074	11,5	3,8
0,14	9,3	2,9
0,29	10,4	3,2
0,52	7,1	2,0
0,77	8,4	2,9
1,32	8,2	2,6
2,86	14,9	4,3

Tabela 13 - Conjunto de Resultados 4

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,013	0,80	0,37
0,025	0,74	0,25
0,051	0,87	0,45
0,10	0,90	0,49
0,15	0,93	0,54
0,25	1,09	0,60
0,51	1,19	0,67

Tabela 14 - Conjunto de Resultados 5

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,013	1,63	0,85
0,026	0,51	0,27
0,051	0,47	0,28
0,10	0,48	0,29
0,15	0,43	0,27
0,26	0,51	0,33
0,41	0,80	0,36

Tabela 15 - Conjunto de Resultados 6

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,013	1,33	0,72
0,026	1,06	0,63
0,051	1,15	0,60
0,10	0,71	0,61
0,15	0,27	0,56
0,26	1,11	0,68
0,52	1,10	0,66

Tabela 16 - Conjunto de Resultados 7

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,025	1,35	0,81
0,048	0,98	0,59
0,097	1,35	0,77
0,14	1,09	0,62
0,24	1,12	0,69
0,49	1,20	0,72

Tabela 17 - Conjunto de Resultados 8

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,012	0,534	0,348
0,025	0,728	0,433
0,048	0,764	0,465
0,097	0,841	0,500
0,14	0,882	0,548
0,25	0,808	0,537
0,49	1,031	0,635

Tabela 18 - Conjunto de Resultados 9

Razão entre Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
0,012	1,44	0,60
0,048	1,48	0,63
0,14	1,42	0,56
0,25	1,59	0,69
0,49	1,70	0,78

Na figura seguinte, Figura 12, encontram-se as representações gráficas das diferentes tentativas de traçado da reta de calibração para a avaliação de linearidade do método analítico. Observa-se, visualmente, que 4 conjuntos não apresentam um comportamento linear, por isso não foram considerados para o estudo de linearidade

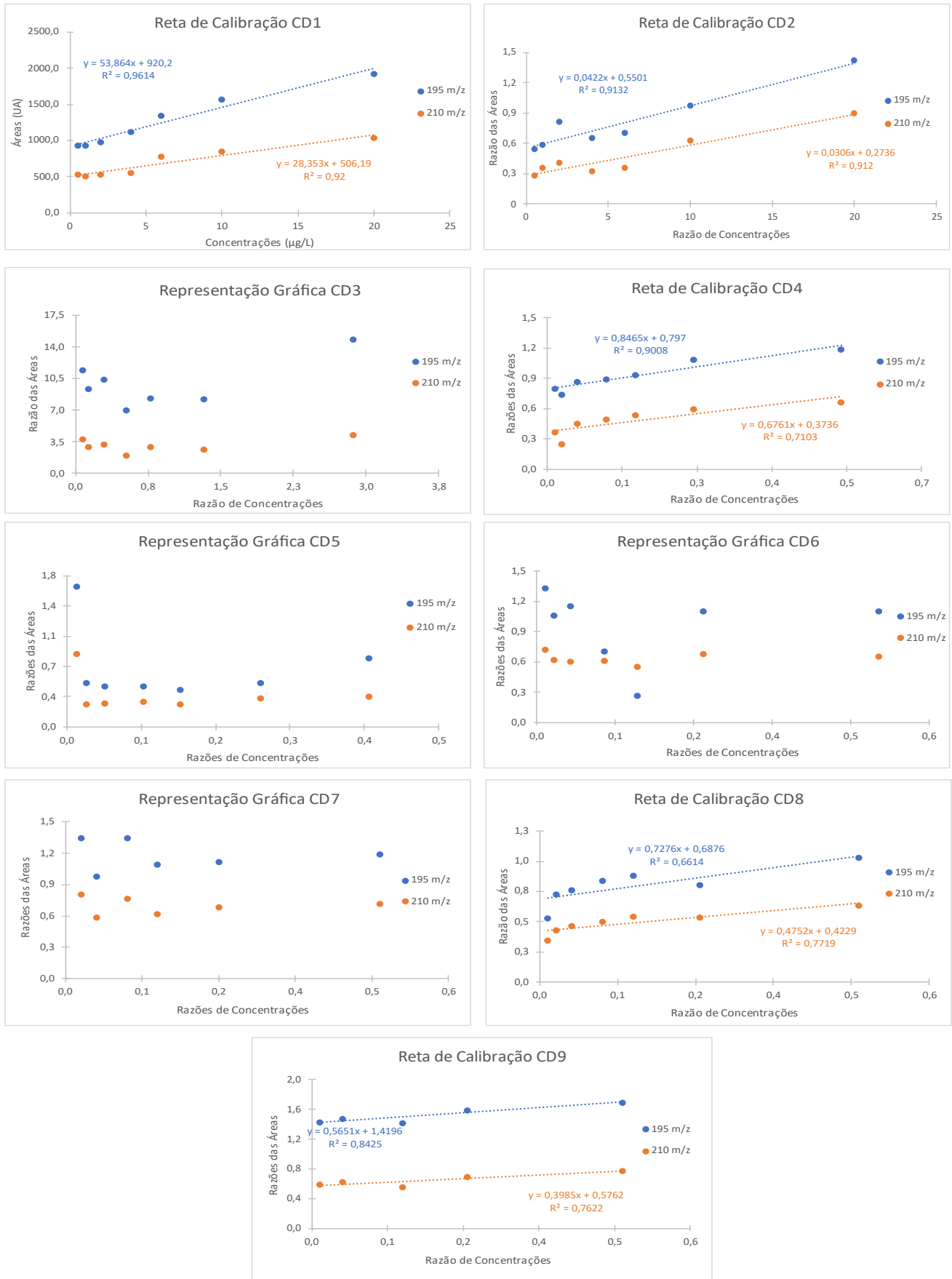


Figura 12 - Representações Gráficas de todos os Conjuntos de Resultados

4.2.2 Testes de Mandel

Nas tabelas 19 a 23 encontram-se os resultados dos testes de Mandel para os conjuntos de resultados não rejeitados (1, 2, 4, 8 e 9). Estes mostram que todos os conjuntos podem ser representados por uma função linear, tanto para 195 m/z como para 210 m/z, porque todos os valores de VT calculados são menores que os respetivos valores de F tabelado. Apesar do método de Mandel confirmar que a sequência dos pontos dos conjuntos de ensaios tem comportamento linear observa-se uma variação nos parâmetros lineares das diferentes retas obtidas, ou seja, uma dispersão bastante mais elevada do que a que seria de esperar para um método de análise.

Tabela 19 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 1

	195 m/z	210 m/z
Grau 1 $s_{y/x}$	81,76	63,33
Grau 2 $s_{y/x}$	43,02	56,54
DS²	26024,15	7266,17
VT	14,06	2,27
F(1;4;99%)	21,20	

Tabela 20 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 2

	195 m/z	210 m/z
Grau 1 $s_{y/x}$	0,099	0,072
Grau 2 $s_{y/x}$	0,104	0,077
DS²	0,0055	0,0023
VT	0,51	0,40
F(1;4;99%)	21,20	

Tabela 21 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 4

	195 m/z	210 m/z
Grau 1 $s_{y/x}$	0,054	0,083
Grau 2 $s_{y/x}$	0,039	0,077
DS²	0,0085	0,018
VT	5,48	4,27
F(1;4;99%)	21,20	

Tabela 22 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 8

	195 m/z	210 m/z
Grau 1 $s_{y/x}$	0,097	0,048
Grau 2 $s_{y/x}$	0,10	0,042
DS²	0,0058	0,0045
VT	0,56	2,51
F(1;4;99%)	21,20	

Tabela 23 - Teste de Mandel para o Conjunto de Resultados 9

	195 m/z	210 m/z
Grau 1 $s_{y/x}$	0,054	0,049
Grau 2 $s_{y/x}$	0,065	0,055
DS²	0,00043	0,0012
VT	0,10	0,39
F(1;4;99%)	98,5	

Apesar do teste de Mandel validar a linearidade, os parâmetros obtidos nas regressões lineares, nomeadamente o R^2 e a ordenada na origem, são demasiado dispares ou longe do esperado, o que leva a concluir que, para os resultados obtidos, o teste de Mandel não é sensível o suficiente para negar a linearidade, por isso recorreu-se a outros métodos de avaliação de linearidade. Dois métodos alternativos são o teste das áreas normalizadas, que é o mais indicado para a cromatografia, e o teste de Rikilt, que apesar de ser um método de validação de linearidade não é muito usado para técnicas cromatográficas.

4.2.3 Testes das Áreas Normalizadas

Nas tabelas seguintes, Tabelas 24 a 33, encontram-se os resultados obtidos para os testes das áreas normalizadas dos conjuntos 1 a 9, para os fragmentos de massa 195 e 210 m/z. Antes de cada par de tabelas encontra-se uma pequena interpretação dos resultados, lembrando que para se aceitar um valor a percentagem correspondente deste tem que estar compreendido entre 90 e 110 %. Normalmente remove-se pontos fora dos limites de aceitação, no entanto não se deve remover mais de um ponto.

Conjunto de Resultados 1: Para o fragmento de massa 195 m/z todos os pontos encontram-se dentro do limite de aceitação, enquanto para o fragmento de massa 210 m/z o

quinto ponto marcado a vermelho, que corresponde á solução de TCA de 6 µg/L, encontra-se fora do limite, por isso deve ser removido.

Tabela 24 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)

Concentração	A195	Aestimada	RA/Aestimada	%
0,5	932,00	947,13	0,98	100,00
1	924,50	974,07	0,95	96,45
2	975,50	1027,93	0,95	96,44
4	1116,00	1135,66	0,98	99,86
6	1341,50	1243,39	1,08	109,64
10	1571,00	1458,84	1,08	109,44
20	1924,00	1997,48	0,96	97,89

Tabela 25 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)

Concentração	A210	Aestimada	RA/Aestimada	%
0,5	529,67	520,36	1,02	100,00
1	509,00	534,54	0,95	93,55
2	533,50	562,89	0,95	93,11
4	552,50	619,60	0,89	87,60
6	770,50	676,31	1,14	111,93
10	848,50	789,72	1,07	105,56
20	1033,00	1073,25	0,96	94,56

Conjunto de Resultado 2: Para o fragmento de massa 195 m/z, o terceiro e quinto ponto, 2 e 6 µg/L, respetivamente, estão fora do limite de aceitação. Para o fragmento de massa 210 m/z, são os pontos correspondentes a 1, 2 e 6 µg/L.

Tabela 26 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,5	0,54	0,57	0,95	94,84
1	0,59	0,59	0,99	99,02
2	0,81	0,63	1,28	128,32
4	0,65	0,72	0,91	91,17
6	0,70	0,80	0,87	87,20
10	0,97	0,97	1,00	100,00
20	1,42	1,39	1,02	102,15

Tabela 27 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,5	0,28	0,29	0,97	95,51
1	0,35	0,30	1,17	115,34
2	0,41	0,33	1,21	120,09
4	0,32	0,40	0,82	81,00
6	0,36	0,46	0,78	76,95
10	0,63	0,58	1,09	107,63
20	0,90	0,89	1,01	100,00

Conjunto de Resultados 4: Para o fragmento de massa 195 m/z, apenas o segundo ponto (1 ppt) está fora dos limites de aceitação. Para o fragmento de massa 210 m/z, só dois pontos (0,5 e 20 ppt) estão dentro dos limites.

Tabela 28 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	0,80	0,81	0,99	98,29
0,03	0,74	0,82	0,91	89,86
0,05	0,87	0,84	1,03	102,53
0,10	0,90	0,88	1,02	100,77
0,15	0,93	0,93	1,01	100,00
0,25	1,09	1,01	1,08	106,75
0,51	1,19	1,23	0,97	95,81

Tabela 29 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	0,37	0,38	0,96	100,00
0,03	0,25	0,39	0,63	66,22
0,05	0,45	0,41	1,11	115,83
0,10	0,49	0,44	1,12	116,50
0,15	0,54	0,48	1,13	117,57
0,25	0,60	0,55	1,10	115,05
0,51	0,67	0,72	0,93	96,72

Conjunto de Resultados 8: Para o fragmento de massa 195 m/z, 3 pontos (0,5, 4 e 6 ppt) estão fora dos limites de aceitação, enquanto para o fragmento de massa 210 m/z estão 2 pontos (0,5 e 6 ppt) fora dos limites.

Tabela 30 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	0,53	0,70	0,77	77,71
0,02	0,73	0,71	1,03	104,65
0,05	0,76	0,72	1,06	107,15
0,10	0,84	0,76	1,11	112,48
0,14	0,88	0,79	1,11	112,88
0,25	0,81	0,87	0,93	94,63
0,49	1,03	1,05	0,99	100,00

Tabela 31 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	0,35	0,43	0,81	81,45
0,02	0,43	0,43	1,00	100,00
0,05	0,46	0,45	1,04	104,66
0,10	0,50	0,47	1,07	107,19
0,14	0,55	0,49	1,12	112,06
0,25	0,54	0,54	1,00	99,95
0,49	0,64	0,66	0,97	97,19

Conjunto de Resultados 9: Tanto os pontos do fragmento de massa 195 m/z como os do 210 m/z encontram-se dentro do limite de aceitação.

Tabela 32 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	1,44	1,43	1,01	100,52
0,05	1,48	1,45	1,02	102,14
0,14	1,42	1,50	0,95	94,55
0,25	1,59	1,56	1,02	102,14
0,49	1,70	1,70	1,00	100,00

Tabela 33 - Teste das Áreas Normalizadas do Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	Razão Aestimada	Razão de RA/RAestimada	%
0,01	0,60	0,58	1,03	101,32
0,05	0,63	0,60	1,05	104,25
0,14	0,56	0,63	0,88	87,15
0,25	0,69	0,67	1,03	101,62
0,49	0,78	0,77	1,01	100,00

O teste das áreas normalizadas tem uma maior capacidade para apontar pontos que não se encontram na sequência linear. Comparando o teste das áreas normalizadas com o teste anterior (teste de Mandel) observa-se que alguns conjuntos de resultados não apresentam a linearidade previamente confirmada.

4.2.4 Testes de Rikilt

Nas tabelas seguintes, Tabelas 35 a 43, encontram-se os resultados dos testes de Rikilt. Como se pode observar a maioria dos pontos, de ambas os fragmentos de massa, são rejeitados. À semelhança do teste das áreas normalizadas, se os pontos não estiverem dentro do limite compreendido entre 90 e 110 % estes devem ser rejeitados, no entanto não se deve rejeitar mais de um ponto. Apenas 5 pontos, de diferentes conjuntos e diferentes fragmentos de massa, destacados a verde, se encontram dentro dos limites de aceitação.

Tabela 34 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)

Concentração	A195	RC/A	%
0,5	932,00	1864,00	323,60
1	924,50	924,50	160,50
2	975,50	487,75	84,68
4	1116,00	279,00	48,44
6	1341,50	223,58	38,82
10	1571,00	157,10	27,27
20	1924,00	96,20	16,70

Tabela 35 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)

Concentração	A210	RC/A	%
0,5	529,67	1059,33	331,32
1	509,00	509,00	159,20
2	533,50	266,75	83,43
4	552,50	138,13	43,20
6	770,50	128,42	40,16
10	848,50	84,85	26,54
20	1033,00	51,65	16,15

Tabela 36 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	R C/RA	%
0,5	0,54	1,08	300,24
1	0,59	0,59	162,53
2	0,81	0,41	112,81
4	0,65	0,16	45,40
6	0,70	0,12	32,35
10	0,97	0,10	26,94
20	1,42	0,07	19,73

Tabela 37 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	RC/A	%
0,5	0,28	0,56	286,30
1	0,35	0,35	182,03
2	0,41	0,20	104,30
4	0,32	0,08	41,60
6	0,36	0,06	30,42
10	0,63	0,06	32,37
20	0,90	0,04	22,98

Tabela 38 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	R C/RA	%
0,01	0,80	63,11	337,59
0,03	0,74	29,23	156,37
0,05	0,87	16,96	90,72
0,10	0,90	8,83	47,22
0,15	0,93	6,11	32,69
0,25	1,09	4,29	22,96
0,51	1,19	2,33	12,44

Tabela 39 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	RC/A	%
0,01	0,37	28,87	339,45
0,03	0,25	9,77	114,92
0,05	0,45	8,84	104,00
0,10	0,49	4,86	57,12
0,15	0,54	3,51	41,33
0,25	0,60	2,37	27,85
0,51	0,67	1,30	15,34

Tabela 40 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	R C/RA	%
0,01	0,53	43,40	278,86
0,02	0,73	29,60	190,19
0,05	0,76	15,77	101,34
0,10	0,84	8,68	55,78
0,14	0,88	6,11	39,24
0,25	0,81	3,29	21,12
0,49	1,03	2,10	13,47

Tabela 41 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	RC/A	%
0,01	0,35	28,27	291,48
0,02	0,43	17,59	181,37
0,05	0,46	9,60	98,92
0,10	0,50	5,17	53,27
0,14	0,55	3,80	39,13
0,25	0,54	2,18	22,52
0,49	0,64	1,29	13,32

Tabela 42 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A195 e A215	R C/RA	%
0,01	1,44	116,78	349,38
0,05	1,48	30,57	91,45
0,14	1,42	9,84	29,43
0,25	1,59	6,48	19,39
0,49	1,70	3,46	10,34

Tabela 43 - Teste de Rikilt para o Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)

Razão de Concentrações	Razão entre A210 e A215	RC/A	%
0,01	0,60	48,44	347,56
0,05	0,63	12,97	93,07
0,14	0,56	3,87	27,75
0,25	0,69	2,82	20,22
0,49	0,78	1,59	11,40

Deve-se destacar que para declives de reta com pouca inclinação e ordenadas na origem não nulas, o teste de Rikilt não é o mais recomendado porque o método origina resultados que levam á falta de linearidade com uma ordem de gravidade elevada.

4.3 Precisão – Repetibilidade

Para o cálculo do desvio padrão usou-se a parte da solução de TCA de 0,5 ppt do conjunto de resultados da tabela 7, previamente utilizados para a homogeneidade de variância. Como os resultados foram obtidos em dias diferentes, calcula-se o desvio padrão combinado e o desvio padrão relativo combinado, Tabela 44 e 45, respetivamente. A repetibilidade de um método pode ser avaliada através do desvio padrão relativo e quando este valor é superior a 10% considera-se que o método apresenta pouca repetibilidade, no entanto dado que a concentração é demasiado baixa e a adequação do método se encontra numa fase inicial deve-se aceitar resultados da ordem de 20%. Analisando os resultados obtidos conclui-se que a repetibilidade, para os fragmentos de massa 195 e 210 m/z, é aceitável.

Tabela 44 – Valores do desvio Padrão Combinado

	195 m/z		210 m/z	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
s_r	0,11	0,17	0,04	0,06
n-1	3	5	3	5
(n-1)s_r²	0,04	0,15	0,01	0,02
S_rpooled	0,16		0,06	

Tabela 45 – Valores do desvio Padrão Relativo Combinado

	195 m/z		210 m/z	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
RSD	0,11	0,085	0,11	0,052
n-1	3	5	3	5
(n-1)RSD²	0,035	0,036	0,039	0,014
RSD_{pooled}	0,10		0,087	
RSD_{pooled} (%)	10,08		8,67	

Quando se compara os resultados de repetibilidade com os resultados previamente obtidos, nomeadamente a homogeneidade e a linearidade, conclui-se que esta é uma repetibilidade pontual e que não é representativa do sistema.

4.4 Exatidão

4.4.1 Soluções Amostras

Juntamente com o conjunto de soluções padrão que resultaram no conjunto de resultados 2 vieram 10 soluções amostra. Essas soluções foram ensaiadas e resultaram na tabela seguinte, Tabela 46.

Tabela 46 - Razões das Áreas para 195 e 210 m/z para as Amostras

Amostras	Razão entre A195 e A215	Razão entre A210 e A215
Amostra 1	1,47	0,26
Amostra 2	0,52	0,18
Amostra 3	0,36	0,23
Amostra 4	0,51	0,60
Amostra 5	0,97	0,24
Amostra 6	0,54	0,19
Amostra 7	0,36	0,62
Amostra 8	0,99	0,32
Amostra 9	0,57	0,31
Amostra 10	0,60	0,27

Através dos resultados anteriores e a reta de calibração do conjunto de resultados 2 tentou-se calcular as concentrações correspondentes. Na tabela abaixo, Tabela 47, encontram-se as concentrações calculadas e as concentrações da empresa.

Ao usar as retas de calibração obteve-se valores negativos, não se podendo quantificar, só se pode dizer que para ambos os fragmentos de massa, 195 m/z e 210 m/z, são soluções de TCA com concentrações que se encontram abaixo do limite de quantificação.

Tabela 47 – Valores das concentrações Calculadas e da Empresa

Amostras	Concentração 195 m/z (ppt)	Concentração 210 m/z (ppt)	Concentração da empresa (µg/L)
Amostra 1	<LoQ	<LoQ	0,3
Amostra 2	<LoQ	<LoQ	0,3
Amostra 3	<LoQ	<LoQ	2,8
Amostra 4	10,1	10,7	12,4
Amostra 5	<LoQ	<LoQ	3,1
Amostra 6	<LoQ	<LoQ	2,0
Amostra 7	10,5	11,4	18,5
Amostra 8	0,5	1,4	5,8
Amostra 9	1,1	1,3	5,8
Amostra 10	<LoQ	<LoQ	1,7

Para se avaliar a exatidão comparou-se as concentrações calculadas com as concentrações obtidas pela empresa, pois o laboratório da mesma é acreditado e utiliza o método oficial. Normalmente, para se poder comparar as concentrações tem que se representar graficamente e ver a correlação (R^2), pois as unidades a serem comparadas são diferentes. Visto que para cada fragmento de massa apenas 4 amostras têm concentrações quantificáveis apenas essas foram usadas na comparação como representado na Figura 14. Como se pode observar os pontos não são ajustados por uma reta o que leva a concluir que a exatidão do método não é elevada.

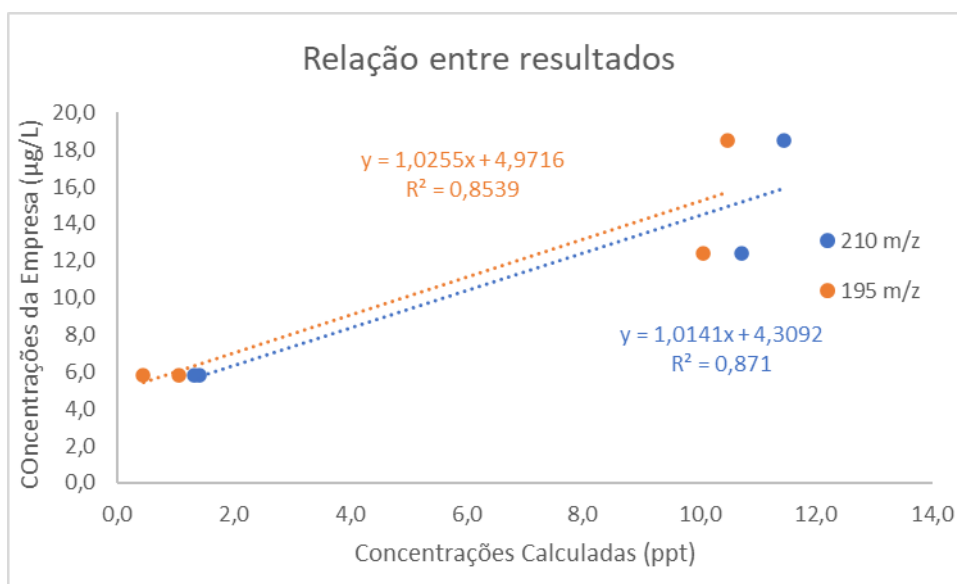


Figura 13 - Concentrações Calculadas vs Concentrações da Empresa (4 pontos)

4.5 Evolução do Branco

Como observado nos testes de normalização de áreas e nos testes de Rikilt, a linearidade não é suficientemente aceitável para se poder quantificar a maioria das soluções amostra. Inicialmente achou-se que poderia haver uma contaminação na água pura ou no etanol, no entanto fizeram-se ensaios com apenas água e apenas etanol estes deram áreas baixas, resultado que não condiz com a hipótese da contaminação.

Resolveu-se avaliar a estabilidade dos ensaios brancos, ou seja, soluções de etanol(12%)/água (v/v) sem TCA o padrão interno, ao longo do tempo. Representando esses resultados obteve-se os gráficos das Figuras 15 e 16, para as os fragmentos de massa 195 e 210 m/z, respetivamente (as linhas verticais representam pausas no trabalho experimental onde o equipamento foi limpo por *TrapClean/TrapTest*, brancos etanol/água, brancos secos (vials sem qualquer solução), água, etanol ou pelo técnico).

Observando os gráficos, pode-se ver que não se consegue uma linha de base estável. Nos primeiros ensaios existe de facto uma contaminação de TCA proveniente da *Trap* que foi removida por sucessivas limpezas da *Trap* e por uma limpeza feita pelo técnico. Depois da limpeza a linha de base baixou para um nível aceitável, infelizmente passado pouco tempo esta voltou a subir. Tentou-se limpar apenas com água e depois com pequenos volumes de etanol o que resultou numa descida progressiva das áreas obtidas, no entanto, depois do fim de semana, houve uma recuperação, voltou-se a tentar limpar com água e volumes de etanol mas a linha de base não desceu.

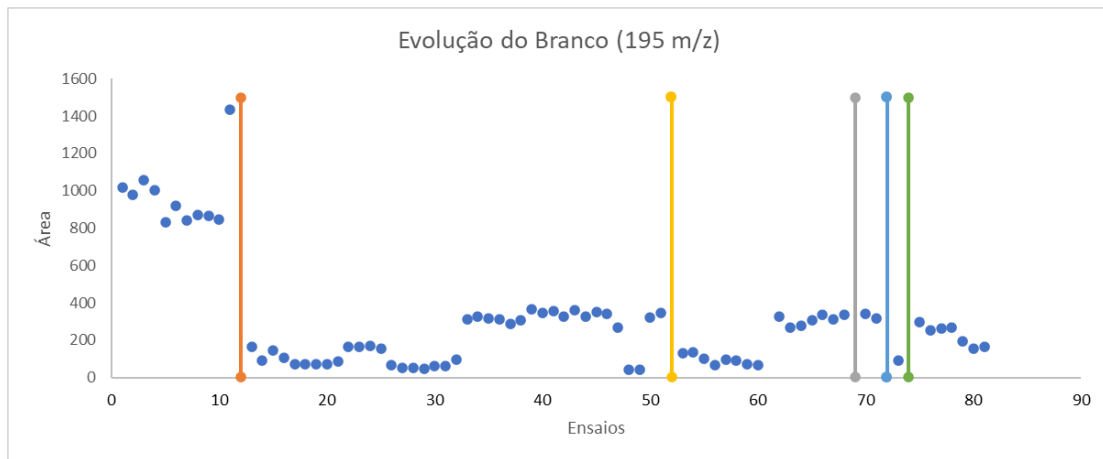


Figura 15 - Evolução do Branco (195 m/z)

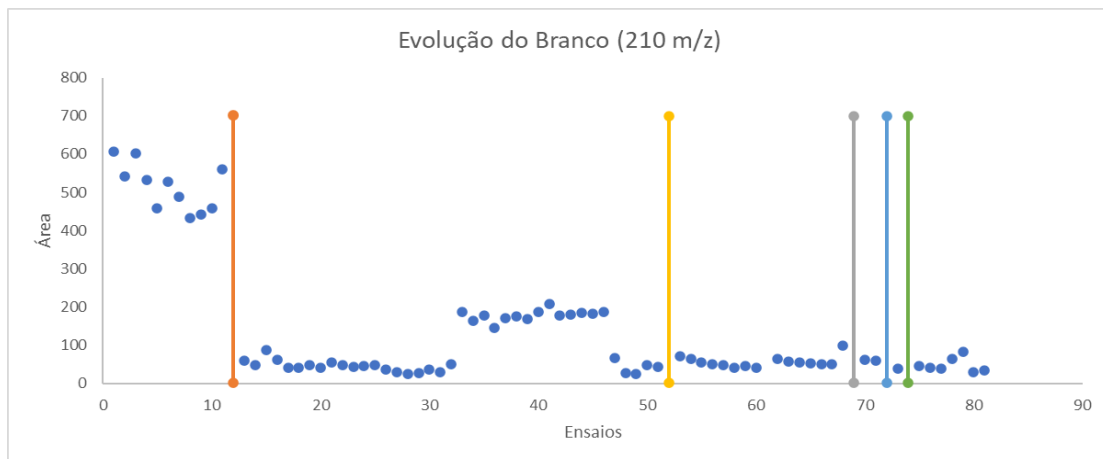


Figura 16 - Evolução do Branco (210 m/z)

Para confirma se a contaminação é de TCA decidiu-se verificar a proporção de 210 m/z em relação com 195 m/z, pois se a contaminação for do analito a proporção entre os dois deve se manter aproximadamente a mesma, obtendo-se o gráfico da Figura 17. Considerando que a percentagem de 210 m/z teórica é de 68% é de esperar que a percentagem prática fosse aproximadamente igual, no entanto nos ensaios brancos finais mostram que a

quantidade de 195 m/z é muito superior ao esperado, demonstrando que a contaminação não é de TCA e sim de um composto que aparece no fragmento de massa 195 m/z com o mesmo tempo de retenção.

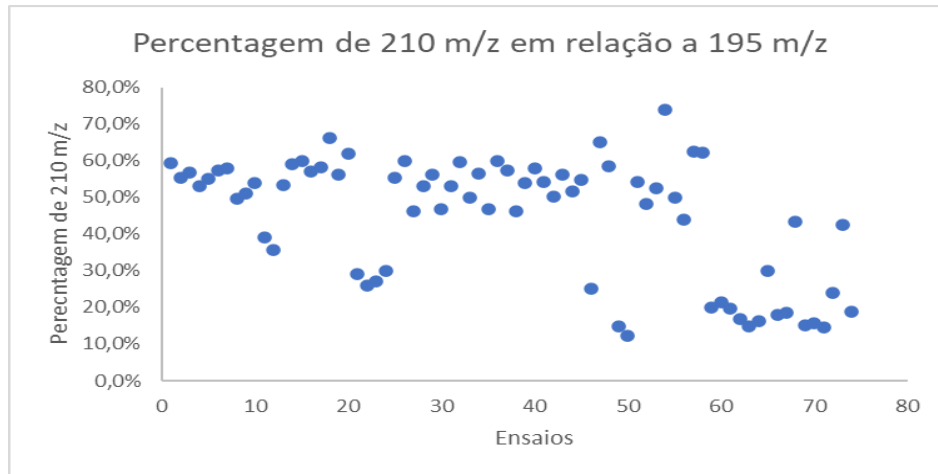


Figura 14 - Proporção de 210 m/z em relação a 195 m/z

4.6 Intervalos de Áreas e Razões de Áreas para cada Concentração

Através das médias das áreas, ou das razões de áreas, e dos respetivos desvios padrão calculou-se o intervalo de áreas (razões de áreas) que corresponde a cada concentração. Nas tabelas abaixo, Tabelas 48 a 57, encontram-se os desvios padrão, os desvios padrões relativos e os intervalos.

Conjunto de Resultados 1: Para ambos os fragmentos de massa, os intervalos das áreas das 4 primeiras concentrações se sobrepõem não se podendo distinguir, os outros 3 não se sobrepõem. Só se consegue distinguir as concentrações 6, 10 e 20 ppt.

Tabela 48 – Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 1 (195 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	932,0	3082,79	5629,0	5,96	821,0	1043,0
SP1	924,5		1200,5	6,01	813,5	1035,5
SP2	975,5		364,5	5,69	864,5	1086,5
SP4	1116,0		1682,0	4,98	1005,0	1227,0
SP6	1341,5		112,5	4,14	1230,5	1452,5
SP10	1571,0		6962,0	3,53	1460,0	1682,0
SP20	1924,0		---	2,89	1813,0	2035,0

Tabela 49 – Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 1 (210 m/z)

	Média	sr²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	529,7	3082,79	14,3	4,33	483,8	575,5
SP1	509,0		0	4,50	463,2	554,8
SP2	533,5		1984,5	4,29	487,7	579,3
SP4	552,5		1624,5	4,15	506,7	598,3
SP6	770,5		12,5	2,97	724,7	816,3
SP10	848,5		24,5	2,70	802,7	894,3
SP20	1033,0		---	2,22	987,2	1078,8

Conjunto de Resultados 2: Para o fragmento de massa 195 m/z, os intervalos de 0,5 a 10 se sobrepõem e o 20 também se sobrepõem somente com o 10, enquanto para o fragmento de massa 210 m/z os intervalos 0,5 a 6 se sobrepõem, o 6/10 se sobrepõem com 10/20, respetivamente. Não se consegue distinguir nenhuma concentração.

Tabela 50 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 2 (195 m/z)

	Média	sr²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,54	0,023	0,056	27,93	0,24	0,84
SP1	0,59		0,0060	25,80	0,28	0,89
SP2	0,81		---	18,59	0,51	1,12
SP4	0,65		0,00018	23,09	0,35	0,96
SP6	0,70		0,025	21,60	0,40	1,00
SP10	0,97		0,046	15,57	0,67	1,27
SP20	1,42		0,0042	10,63	1,12	1,72

Tabela 51 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 2 (210 m/z)

	Média	sr²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,28	0,0057	0,026	27,06	0,13	0,43
SP1	0,35		0,000030	21,28	0,20	0,51
SP2	0,41		---	18,57	0,26	0,56
SP4	0,32		0,00080	23,28	0,17	0,48
SP6	0,36		0,0015	21,22	0,20	0,51
SP10	0,63		---	11,97	0,48	0,78
SP20	0,90		0,00050	8,43	0,74	1,05

Conjunto de Resultados 9: Em ambos os fragmentos de massa todos os intervalos se sobrepõem não sendo possível distinguir nenhum.

Tabela 52 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 9 (195 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	1,44	0,065	0,090	17,75	0,93	1,95
SP2	1,48		0,045	17,22	0,97	1,99
SP6	1,42		0,027	17,93	0,91	1,93
SP10	1,59		0,069	15,98	1,08	2,10
SP20	1,70		0,094	14,99	1,19	2,21

Tabela 53 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 9 (210 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,60	0,014	0,012	19,81	0,36	0,83
SP2	0,63		0,0079	18,79	0,39	0,86
SP6	0,56		0,013	21,12	0,32	0,79
SP10	0,69		0,014	17,03	0,46	0,93
SP20	0,78		0,023	15,11	0,55	1,02

Conjunto de Resultados 4: Para o fragmento de massa 195 m/z os intervalos do 0,5 a 4 se sobrepõem e o 4/10 se sobrepõem com o 6/20, respetivamente. Enquanto para o fragmento de massa 210 m/z todos se sobrepõem. Não se conseguindo distinguir nenhuma concentração.

Tabela 54 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 4 (195 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,80	0,00064	0,00022	3,16	0,75	0,85
SP1	0,74		0,00088	3,42	0,69	0,79
SP2	0,87		0,00040	2,92	0,82	0,92
SP4	0,90		0,00091	2,82	0,85	0,95
SP6	0,93		---	2,71	0,88	0,98
SP10	1,09		0,00117	2,33	1,04	1,14
SP20	1,19		0,00026	2,13	1,14	1,24

Tabela 55 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 4 (210 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,37	0,015	0,0000082	33,04	0,12	0,61
SP1	0,25		0,083	48,80	0,01	0,49
SP2	0,45		0,00020	26,71	0,21	0,69
SP4	0,49		0,000017	24,51	0,25	0,74
SP6	0,54		---	22,52	0,30	0,78
SP10	0,60		0,00081	20,14	0,36	0,84
SP20	0,67		0,0038	18,16	0,42	0,91

Conjunto de Resultados 8: Para o fragmento de massa 195 m/z, os intervalos de 1 a 10 se sobrepõem, fazendo com que não se consiga distinguir qualquer concentração. Para o fragmento massa 210 m/z, os intervalos se sobrepõem sequencialmente.

Tabela 56 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 8 (195 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,53	0,0020	0,00083	8,39	0,44	0,62
SP1	0,73		0,00027	6,15	0,64	0,82
SP2	0,76		0,0017	5,87	0,67	0,85
SP4	0,84		0,0029	5,33	0,75	0,93
SP6	0,88		0,0079	5,08	0,79	0,97
SP10	0,81		0,00048	5,54	0,72	0,90
SP20	1,03		3,73E-06	4,35	0,94	1,12

Tabela 57 - Valores de Desvio Padrão e Desvio Padrão Relativo do Conjunto de Resultados 8 (210 m/z)

	Média	sr ²	Variância	RDSr (%)	Intervalo	
SP0,5	0,35	0,00078	0,00089	8,01	0,29	0,40
SP1	0,43		0,0020	6,43	0,38	0,49
SP2	0,46		0,0018	5,99	0,41	0,52
SP4	0,50		3,04E-05	5,56	0,44	0,56
SP6	0,55		5,05E-09	5,08	0,49	0,60
SP10	0,54		0,00046	5,18	0,48	0,59
SP20	0,64		0,00025	4,38	0,58	0,69

Esta avaliação demonstra que a flutuação do valor da área para cada ponto é superior à variação que a reta de calibração prevê entre dois pontos consecutivos. Isto reforça as conclusões obtidas anteriormente, nomeadamente, a linha de base não estar estável e a falta de robustez do método.

5. Conclusão

Este trabalho consistiu na tentativa de proceder à adequação e conseqüente validação do método de determinação de TCA em rolhas por GC/MS com amostragem por HS-Trap.

Na avaliação da homogeneidade, conclui-se que esta apenas existe para o fragmento de massa 210 m/z. No entanto, não se valorizou a falta de homogeneidade para o fragmento de massa 195 m/z e prosseguiu-se com os restantes estudos.

No estudo dos limites de deteção e quantificação recorreu-se à razão sinal/ruído (S/N) e obteve-se os valores 0,02 e 0,06 ppt respetivamente. No entanto, o S/N obtido para o ensaio de confirmação foi superior ao que seria esperado, o que leva a crer que os limites de deteção e quantificação do método são superiores aos calculados.

No estudo da linearidade do método, usaram três testes de avaliação de linearidade. O teste de Mandel confirma o ajuste linear dos pontos dos conjuntos de ensaios, no entanto, este não é suficientemente sensível para rejeitar alguma calibração. Por isso, recorreu-se ao teste das áreas normalizadas e ao teste de Rikilt onde se verifica que a maioria dos conjuntos não apresenta uma linearidade aceitável, embora as representações gráficas mostrem retas mais ou menos adequadas.

Na análise da precisão do método, foi avaliada apenas a repetibilidade. Concluindo-se que, para um desvio padrão relativo inferior a 20%, a repetibilidade é aceitável para os fragmentos de massa 195 e 210 m/z. No entanto, este resultado contradiz os anteriores o que leva a concluir que esta é uma repetibilidade pontual e que não é representativa do sistema.

Para avaliação da exatidão foram fornecidas soluções, previamente ensaiadas por outro laboratório, para serem ensaiadas pelo novo método. Das 10 amostras ensaiadas apenas 4 foram quantificáveis e mesmo estas, quando comparadas, demonstraram pouca exatidão.

Realizou-se um estudo de linha de base e descobriu-se que esta não se mantém estável o suficiente para se poder quantificar soluções amostra. Considerou-se que poderia existir uma contaminação de TCA na água ou no etanol, no entanto os ensaios realizados para verificar a mesma concluíram que, se existe uma contaminação, esta não se encontra na água ou no etanol. Também se concluiu que a contaminação tem pouca probabilidade de ser TCA porque a razão entre os fragmentos de massa do espectro não se encontra perto da razão teórica. Todos os aspetos acima mencionados demonstram que o método apresenta pouca robustez.

Bibliografia

- [1] Gil, L. Cortiça. "Ciência e Engenharia de Materiais de Construção", IST, (2012), cap. 13, 663-715
- [2] Vasconcelos, B.C. (2012). *Migração de 2,4,6-tca através de rolhas Neutrocork para um vinho e implementação do método de análise para MDMP*. Relatório de Estágio em Mestrado de Engenharia Alimentar. Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa. 62.
- [3] Gil L. (1998). Cortiça — Produção, Tecnologia e Aplicação, Ed INETI, Lisboa.
- [4] Associação Portuguesa da Cortiça (2019). Cortiça – Matéria-prima. Cork Information Bureau, APCOR. Aveiro
- [5] Associação Portuguesa da Cortiça (2019). Cortiça – Rolhas de Cortiça. Cork Information Bureau. APCOR. Aveiro
- [6] Marques, J.I. (2009). Desenvolvimento de um método para determinação de cloroanisóis e clorofenóis em amostras de solo. Tese de Mestrado Integrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 43;
- [7] Pereira, C., Gil, L., (2006), O problema do odor a mofo nas rolhas de cortiça e processos para a sua redução/eliminação. *Silva Lusitana*. 101-111.
- [8] Associação Portuguesa da Cortiça (2011). Rolhas - Manual Técnico. APCOR. Aveiro
- [9] Soares, J.S.F. (2013) Caracterização do processo de cozedura SRCC e do período de estabilização pós-cozedura. Dissertação em Mestrado de Processos Químico e Biológicos. Instituto Superior de Engenharia de Coimbra. 93.
- [10] Queiroz, S. C. N., Collins C. H., Jardim I. C. S. F., (2001) Métodos De Extração E/Ou Concentração De Compostos Encontrados Em Fluidos Biológicos Para Posterior Determinação Cromatográfica, *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 68-76.
- [11] Pico, J., Gómez, M., Bernal, J., Bernal, J., L., (2016) Analytical methods for volatile compounds in wheat bread, *Journal of Chromatography A*, 1428, 55–71.
- [12] Filippis, F., M., (2001) Extração com CO₂ Supercrítico de Óleos Essenciais de Hon-sho e Ho-sho – Experimentos e Modelagem, Dissertação em Mestrado de Engenharia Química, Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- [13] ISO 20752:2014 (E), Cork stoppers — Determination of releasable 2, 4, 6-trichloroanisol (TCA), 2^o Edição
- [14] Valente, A. L. P., Augusto, F., (2000) Microextração por fase sólida. *Química Nova*. 523-530.
- [15] Queiroz, M.E.C. (2009) Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. *Scientia Chromatographica*. 11-19.
- [16] Rodinkov, O. V., Bugaichenko, A. S., Moskvina L. N., (2020), Static Headspace Analysis and Its Current Status, *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 75, 1–17.
- [17] B. Kolb, L.S. E., (2006) *Static Headspace-Gas Chromatography, Theory and Practice*, 2nd ed., Wiley – VCH, New York.
- [18] Soria, A.C., García-Sarrió, M.J., Sanz, M.L., (2015) Volatile sampling by headspace techniques, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 71, 85–99.
- [19] Schlosser, P. M., Asgharian, B. A., Medinsky, M., (2010) *General Principles*, *Comprehensive Toxicology*.
- [20] Tipler, A., (2014) *An Introduction To Headspace Sampling In Gas Chromatography Fundamentals And Theory*, *Chromatography Research and Technology Manager* PerkinElmer, Inc.
- [21] Schoene K., Steinhanses J., Konig A., (1988) Determination of the solubility of vapours in polymers by automated headspace gas chromatography, *J. Chromatogr.* 455, 67–75.
- [22] Schoene K., Steinhanses J., (1985) Determination of Henry's Law Constant by Automated Head Space-Gas Chromatography, *Z. Anal. Chem.* 321, 538–543.
- [23] Robbins G. A., Wang S., Stuart J. D., (1993) Using the static headspace method to determine Henry's law constants, *Anal. Chem.* 65, 3113–3118.
- [24] Wampler T. P., (2001) *Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques*, *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*, 2nd Edition, Marsili Consulting Group, Rockford, IL, USA.
- [25] Zellner, B. A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. (Apr 2008) Gas chromatography-olfactometry in food flavor analysis. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, NL, v. 1186, n. 1-2, 123-143.

- [26] Ventura, S. J. (2012) Compostos Voláteis Em Frutos De Coquinho-Azedo (*Butia Capitata*) Determinados Por Headspace E Cg-Em. Dissertação em Mestrado de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Minas Gerais. 59.
- [27] Brunetto, M. R.; Cayama, Y. D.; Gutiérrez, L.; Roa, S. C.; Méndez, Y. C.; Galliagnani, M.; Zambrano, A.; Gómez, A.; Ramos, G. (2009) Headspace gas chromatography-mass spectrometry determination of alkylpyrazines in cocoa liquor samples. *Food Chemistry*, London, GB, v.112, 253-527.
- [28] Oliveira, D.J.A. (2016) Implementação de Dry Soak em Rolhas de Cortiça. Relatório de Estágio em Mestrado de Química. Faculdade de Ciências – Universidade do Porto. 80.
- [29] Ravasco, T., C., (2015) Validação do Método Cromatográfico de Análise de 2,4,6-Tricloroanisol, Dissertação em Mestrado de Engenharia Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [30] Moutinho, S., (2008) Análise sensorial - Uma ferramenta analítica na garantia da inocuidade sensorial das rolhas de cortiça, CTCOR.
- [31] Queiroz, C. N., Campelo, J. M., França, C. O., Junior, S. G. (2015) A Importância E Aplicação Da Cromatografia Gasosa Na Área Farmacêutica: Uma Revisão Da Literatura. 17.
- [32] Azevedo, D.A. (2004) Espectrometria de Massas. LABEM. Departamento de Química Orgânica. Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro
- [33] Patnaik, P., (2004) Dean's Analytical Chemistry Handbook, Second Edition, McGraw-Hill Handbooks, New York.
- [34] PerkinElmer, (2008), TurboMatrix – Headspace Sampler and HS 40/110 Trap User's Guide, Inc., UK;
- [35] Costa, H. C. F., (2014) Desenvolvimento e validação de uma metodologia para a determinação da composição em ácidos gordos da membrana de eritrócitos por cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama. Relatório de Projeto em Mestrado de Tecnologia Biomédica. Escola Superior de Tecnologia e Gestão – Instituto Politécnico de Bragança.

- [36] Hubert Ph., Nguyen-Huu J.J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.A., Dewé W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L., (2003) STP Pharma Pratiques, 13, 101.
- [37] González A.G., Herrador M.A., Asuero A.G., (2005) Talanta 65, 1022.
- [38] Pum J., (2019) A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory, Advances in Clinical Chemistry, 90, 215-281.;
- [39] Valentini, S. R., Sommer, W. A, Matioli G., (2007) Validação de Métodos Analíticos, Arq. Mudi, 11, 26-31;
- [40] Leite, F., (1996) Validação em Análise Química, 1ª Edição, Editora Átomo, Campinas;
- [41] Senyuva H., (2014) History, Science and Methods in Encyclopedia of Food Safety, Reference Module in Food Science, 152-158.;
- [42] Thompson M., Ellison S. L. R., Wood R., (2002) Harmonized guidelines for single – laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, Vol. 74, No. 5, 835–855.;
- [43] Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., Yacobi A., (2000) Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress, Pharm. Res. 17 1551–1557.
- [44] Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E., (2004), Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance Trends Anal. Chem. 23, 535-552.
- [45] Guia Relacre 13 (2000) – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Lisboa: Relacre;
- [46] Amarante Jr., O. P. de; Caldas, E. P. A.; Brito, N. M.; Santos, T. C. R. Dos; Vale, M. L. B. F., (2001) Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. Cad. Pesq., v. 12, 116-131.
- [47] Martins, A. F. S., (2016) Implementação E Validação De Métodos Analíticos. Dissertação em Mestrado de Química. FCTUC – Universidade de Coimbra. 126.

- [48] Brito, N. M., Junior, O. P. A., Polese, L., Ribeiro, M. L., (2003) Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, v. 13, 129-146
- [49] Frank T. Peters, Olaf H. Drummer, Frank Musshoff, (2007) Validation of new methods, *Forensic Science International* 165, 216–224;
- [50] Silva J.M., Zini C.A. (2011). Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente com microdetector de captura de elétrons para determinação de agrotóxicos em sedimentos. *Química Nova*, 34, 962-967.
- [51] ISO. (1990). ISO 8466-1:1990(en) Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics.
- [52] Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (4) 611–622;
- [53] Holst-Jensen A., (2007) Sampling, detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs), *Food Toxicants Analysis*,
- [54] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, Approved Guideline. CLSI document EP17. Wayne, CLSI; PA USA;
- [55] Armbruster D. A., Pry T., (2008) Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation, *Clin Biochem Rev* Vol 29 Suppl (i) August
- [56] Thompson, M. Ellison, S. Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem* 74, 835–855.
- [57] Instituto Português De Acreditação (2011), Guia para a acreditação de laboratórios químicos (OGC 002), IPAC, Almada;
- [58] Brito, N. M. (2001) Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação. São Paulo, Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

- [59] Lister A. S., (2005) Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Separation Science and Technology
- [60] Amarante Jr., O. P. (2002) Determinação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético e seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. São Luís, Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Maranhão.
- [61] Olivieri A.C., Faber N.M (2009), Comprehensive Chemometrics, Chemical and Biochemical Data Analysis, 91-120;
- [62] Fang X. F., Carr G., Freeze R.C., (2017) Chapter 21 - Analytical Development and Validation for Solid Oral Dosage Forms, Pharmaceutical Theory and Practice, 593-611;
- [63] ISO 5725 – 3 (1994), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method, International Standard Organization.
- [64] RELACRE (1996), Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos.
- [65] Dias, F. R. S., (2019) Desenvolvimento E Validação De Métodos Analíticos. Dissertação em Pós-graduação de Fármacos e Medicamentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 15
- [66] González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G., (1999) Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta*, v. 48, 729-736.
- [67] Cardoso, M. H. W. M., Nóbrega, A. W., Vital, H. C., Abrantes, S., (2010) Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros: estudo da homogeneidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(2): 429-438
- [68] Instituto Português De Acreditação, (2010) Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 (OGC 001), IPAC.
- [69] International Standards Organization (1994). ISO 5725: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. *Géneve, ISO. Part 1-4, 6.*
- [70] Maroto, A.; Riu, J.; Boqué, R.; Rius, F. X., (1999) Estimating uncertainties of analytical results using informations from the validation process. *Anal. Chim. Acta.*, v. 391, 173-185.

- [71] Youden, E.H. (1975) Steiner, Statistical manual of the association of official analytical chemists, The Association of Official Analytical Chemists ed., Arlington, 33–36, 70–71, 82–83.
- [72] Vander-Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J., Vandeginste B.G., Massart D.L., (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, J. Pharm. Biomed. Anal. 24; 723–753.