



Validação de Métodos analíticos, pelas Técnicas Espectrofotometria UV-Vis e GC-FID, para a caracterização de Vinhos e Álcool Neutro

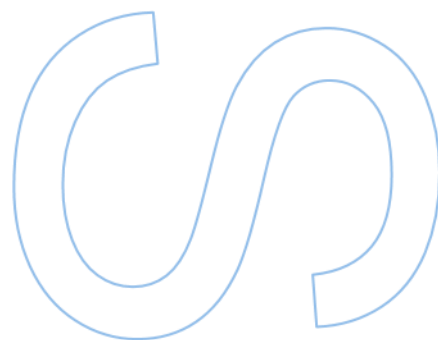
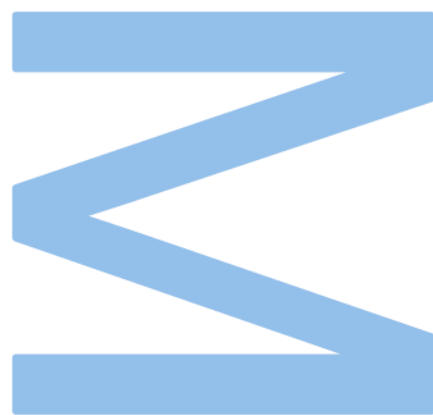
Juliana Freitas Faria

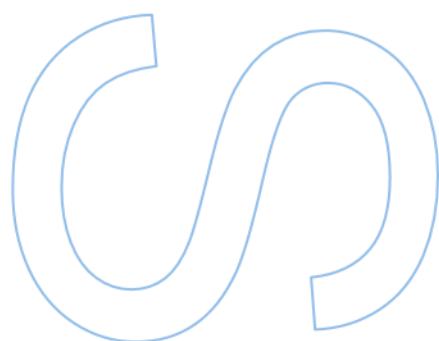
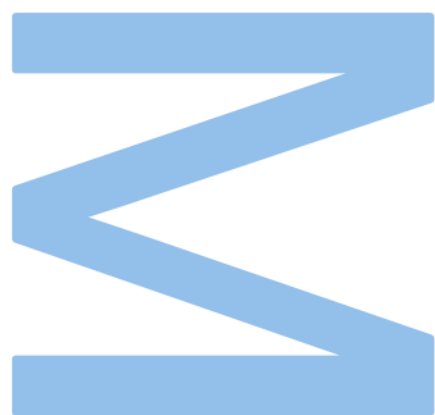
Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise
Química

Departamento de Química e Bioquímica
2022/2023

Orientador

Carlos Manuel de Melo Pereira, Professor Associado, Faculdade
de Ciências da Universidade do Porto





Agradecimentos

Concluído este trabalho, é com alegria e satisfação que olho para trás e vejo que o esforço e empenho no meu percurso ao longo destes anos valeram a pena. No entanto, a realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição e apoio por parte de quem me acompanhou neste processo.

Começo por agradecer aos meus orientadores, ao professor Carlos Pereira, pela sua mentoria, partilha de conhecimento e pronta disponibilidade. À doutora Patrícia Reis, pelo seu apoio e ajuda incansável, pela partilha de conhecimento e pela sua palavra amiga, que tornaram esta experiência muito mais enriquecedora.

A todo o pessoal do Laboratório LPVBE, o meu agradecimento pelo bom ambiente de trabalho, pelo carinho e amizade, que fizeram com que me sentisse em casa.

À minha família e amigos, por estarem do meu lado e de uma forma ou de outra prestarem o seu apoio e carinho. Agradeço especialmente ao Francisco, por ser meu companheiro, por me tranquilizar, pelo carinho, por estar sempre comigo e nunca deixar que me faltasse nada.

A todos expresso a minha gratidão e o meu muito obrigada,

Juliana Faria

Resumo

No contexto do consumo alimentar, o controlo dos produtos representa uma importante contribuição para a segurança dos consumidores, através da fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação. Dentro do setor alimentar, as bebidas alcoólicas carecem igualmente de um controlo restrito a várias dimensões, quer na garantia da autenticidade e segurança, quer no cumprimento de regulamentos em vigor.

O Vinho Madeira é um vinho fortificado e envelhecido, produzido na ilha da Madeira e conhecido pelas suas características únicas e complexidade de sabor. Produzido com castas como a Sercial, Verdelho, Boal e Malvasia, é um vinho com mais de 500 anos de história. Enquanto bebida alcoólica, consumida em todo o mundo, o Vinho Madeira é sujeito a diversas análises sensoriais e físico-químicas. O IVBAM assegura este controlo, bem como a sua fiscalização e comercialização, estando prevista a análise de parâmetros físico-químicos, como a quantificação do ácido sórbico.

O álcool neutro, por sua vez, é um produto obtido de matéria-prima como o vinho. É utilizado para fortificar bebidas como o Vinho Madeira e, tal como este, está sujeito a análises físico-químicas por parte do IVBAM. A quantificação dos aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol é um requisito legal.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Vitivinícolas e de Bebidas Espirituosas do IVBAM (LPVBE) e teve como objetivo a validação de métodos analíticos para a análise destes produtos. Numa primeira parte, procedeu-se à validação do método de determinação dos aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol no álcool neutro, através da técnica GC-FID, em que se otimizaram previamente algumas condições, com base no Regulamento (UE) n.º 2022/1303 e no Regulamento (CE) n.º 2870/2000. Numa segunda parte, foi realizada a validação do método de determinação de ácido sórbico no Vinho Madeira, pela técnica Espectrofotometria UV-VIS, segundo o método OIV-MA-AS313-14A.

Na validação dos métodos foi tido em consideração os critérios descritos na Norma NP EN ISO/IEC 17025:2018, assim como os Guia Relacre 13 e 31, com importantes linhas guia para a validação de métodos internos de ensaio em análise química.

Palavras-chave: Vinho Madeira, ácido sórbico, álcool neutro, aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol, validação de métodos analíticos, GC-FID, Espectrofotometria UV-Vis

Abstract

Regarding food consumption, product control makes an important contribution to consumer safety, by monitoring and assuring compliance with legislation. Within the food sector, alcoholic beverages also require strict control in several areas, both in terms of guaranteeing authenticity and safety, and in terms of compliance with the regulations in force.

Madeira Wine is a fortified and aged wine produced on the island of Madeira and known for its unique characteristics and complexity of flavour. Produced from grape varieties such as Sercial, Verdelho, Boal and Malvasia, it is a wine with more than 500 years of history. As an alcoholic drink consumed all over the world, Madeira Wine is subject to various sensory and physical-chemical analyses. IVBAM ensures this control, as well as its inspection and marketing, with the analysis of physical-chemical parameters, such as the quantification of sorbic acid.

Neutral alcohol, on the other hand, is a product obtained from raw materials such as wine. It is used to fortify drinks such as Madeira Wine and is also subject to physico-chemical analysis by IVBAM. The quantification of aldehydes, esters, total higher alcohols and metanol is a legal demand.

This work was carried out at IVBAM “Laboratório de Produtos Vitivinícolas e de Bebidas Espirituosas” (LPVBE) and aimed to validate analytical methods for analyzing these products. Firstly, the method for the determination of total higher alcohols in neutral alcohol was validated using the GC-FID technique, in which some conditions were previously optimized, based on Regulation (EU) No. 2022/1303 and Regulation (EC) No. 2870/2000. Additionally, in the second part, the method for the determination of sorbic acid in Madeira Wine was validated using the UV-VIS Spectrophotometry technique according to the method OIV-MA-AS313-14A.

The validation of the methods took into account the criteria described in Standard NP EN ISO/IEC 17025:2018, as well as Relacre Guides 13 and 31, which provide important guidelines for the validation of internal test methods in chemical analysis.

Keywords: Madeira Wine, sorbic acid, neutral alcohol, aldehydes, esters, total higher alcohols and metanol, validation of analytical methods, GC-FID, UV-Vis Spectrophotometry

Índice

Lista de Tabelas	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos	xi
Objetivos e enquadramento	1
1. Introdução.....	2
1.1. História do Vinho Madeira.....	2
1.2. Cultura da vinha e produção do Vinho Madeira	3
1.3. Controlo e legislação – Vinho Madeira.....	7
1.4. Entidade de acolhimento	9
2. Validação de métodos analíticos	15
2.1. Homogeneidade de variâncias do sinal analítico	15
2.2. Linearidade.....	16
2.3. Limites analíticos	17
2.3.1. Limite de deteção	17
2.3.2. Limite de quantificação	19
2.4. Sensibilidade	20
2.5. Seletividade	20
2.6. Precisão	22
2.6.1. Repetibilidade.....	22
2.6.2. Precisão intermédia.....	23
2.6.3. Reprodutibilidade.....	24
2.6.4. Incerteza padrão da precisão	24
2.7. Veracidade	25
2.7.1. Incerteza padrão da veracidade.....	25
2.8. Exatidão e avaliação da incerteza	26
2.9. Teste estatístico de avaliação de <i>outliers</i>	27
3. Álcool neutro – Determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol por GC-FID.....	29

3.1.	Definição e aplicações	29
3.2.	Controlo e legislação – Álcool neutro	31
3.3.	Aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol.....	31
3.4.	Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama	33
3.5.	Materiais e métodos	39
3.5.1.	Princípio do método	39
3.5.2.	Reagentes e equipamentos	39
3.5.3.	Otimização das condições cromatográficas	41
3.6.	Resultados obtidos e discussão – Validação do método	43
3.6.1.	Gama de trabalho e curva de calibração	43
3.6.2.	Homogeneidade de variâncias	44
3.6.3.	Linearidade.....	45
3.6.4.	Limites analíticos	46
3.6.5.	Sensibilidade	48
3.6.6.	Seletividade e Resolução	48
3.6.7.	Precisão	50
3.6.8.	Veracidade	53
3.6.9.	Exatidão e quantificação da incerteza	56
4.	Vinho Madeira – Determinação de ácido sórbico por Espectrofotometria UV-Vis ..	58
4.1.	Ácido sórbico	58
4.2.	Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis	59
4.3.	Materiais e métodos	63
4.3.1.	Princípio do método.....	63
4.3.2.	Reagentes e equipamentos	64
4.4.	Resultados obtidos e discussão – Validação do método	65
4.4.1.	Gama de trabalho e curva de calibração	65
4.4.2.	Homogeneidade de variâncias	66
4.4.3.	Linearidade.....	67

4.4.4.	Limites analíticos	67
4.4.5.	Sensibilidade	68
4.4.6.	Seletividade	68
4.4.7.	Precisão	68
4.4.8.	Veracidade	71
4.4.9.	Exatidão e quantificação da incerteza	72
5.	Conclusão e perspectivas futuras.....	73
6.	Referências bibliográficas e <i>webgrafia</i>	75
7.	Anexos	79
	Anexo 1 – Procedimento experimental.....	79
	Anexo 2 – Relatórios de calibração	91
	Anexo 3 – Cálculos incertezas padrão da veracidade	99
	Anexo 4 – Certificados de calibração	102

Lista de Tabelas

Tabela 1-i - Tipos de castas de uva utilizadas no Vinho Madeira e características dos vinhos respetivos. <i>Imagens de livre acesso acedidas em</i> ⁵ , <i>a 12 de setembro de 2023.</i>	4
Tabela 1-ii - Excerto de parâmetros alvo de controlo na matriz Vinho Madeira e respetivos limites.	8
Tabela 1-iii - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para a matriz Bebidas espirituosas.	12
Tabela 1-iv - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para as matrizes Vinho, Vinho licoroso e Licor.....	13
Tabela 1-v - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para a matriz Álcool neutro.	14
Tabela 2-i - Valores máximos toleráveis para as taxas de Recuperação em função da concentração de analito. <i>Adaptada e acedida em</i> ¹⁷ , <i>a 5 de julho de 2023 (uso com</i> <i>permissão Elsevier B.V.).</i>	22
Tabela 3-i - Parâmetros alvo de controlo na matriz álcool neutro e respetivos limites.	31
Tabela 3-ii - Características da coluna cromatográfica.....	41
Tabela 3-iii - Condições sistema cromatográfico GC-FID.....	42
Tabela 3-iv - Gamas de trabalho definidas para cada composto.....	44
Tabela 3-v – Resultados da aplicação do teste F para avaliar a homoscedasticidade das gamas de trabalho.	45
Tabela 3-vi - Avaliação da linearidade das retas de calibração de cada composto, pelo Teste de Mendel.	46
Tabela 3-vii - Limites de Quantificação (LQ) e Limites de Detecção (LD) de cada analito, do instrumento e do método.	47
Tabela 3-viii - Valores da sensibilidade para cada composto.	48
Tabela 3-ix - Valores obtidos para o Fator de separação e Resolução dos picos cromatográficos.	49
Tabela 3-x - Valores quantitativos da repetibilidade, determinada para cada analito, pelo desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade.	50
Tabela 3-xi - Valores quantitativos da repetibilidade do método para Bebidas Espirituosas do Regulamento (CE) n.º 2870/2000 e comparação dos valores com o método para o Álcool Neutro.	51
Tabela 3-xii - Valores quantitativos da precisão intermédia, determinada para cada analito, pelo desvio padrão, coeficiente de variação e limite de precisão intermédia. .	52

Tabela 3-xiii - Valores da incerteza padrão de precisão para cada analito, em absoluto e relativo.	53
Tabela 3-xiv - Ensaios de Recuperação de uma amostra sem analitos nativos a 3 níveis de concentração, para estudo da veracidade.	54
Tabela 3-xv - Valores da incerteza padrão de veracidade para cada analito.	55
Tabela 3-xvi - Valores da incerteza padrão combinada e da incerteza expandida em percentagem, para cada analito.	56
Tabela 3-xvii - Valores das incertezas padrão combinadas e das incertezas expandidas em percentagem calculadas por grupo de compostos.	57
Tabela 4-i - Dados para curva de calibração do Ácido Sórbico.	65
Tabela 4-ii - Teste F para avaliar a homoscedasticidade da curva de calibração.	66
Tabela 4-iii - Avaliação da linearidade pelo Teste de Mendel.	67
Tabela 4-iv - Determinação dos Limites Analíticos da técnica e do método a partir de ensaios do branco.	67
Tabela 4-v - Ensaios de recuperação numa amostra para estudo da seletividade.	68
Tabela 4-vi - Valores quantitativos da repetibilidade expresso em desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade.	69
Tabela 4-vii - Valores quantitativos da precisão intermédia, expressos em desvio padrão, coeficiente de variação e limite de precisão intermédia.	70
Tabela 4-viii - Ensaios de Recuperação de uma amostra sem analito nativo a 3 níveis de concentração, para estudo da veracidade.	71
Tabela 7-i - Valores intermédios envolvidos na quantificação da incerteza associada à concentração fortificada.	99
Tabela 7-ii - Valores das massas medidas de cada composto na solução SI, concentrações preparadas de Cfortificada para os três níveis em cada composto e incerteza relativa da mesma.	100
Tabela 7-iii - Valores intermédios envolventes no cálculo da incerteza padrão da veracidade e resultado da mesma para todos os compostos.	100
Tabela 7-iv - Valores intermédios envolvidos na quantificação da incerteza associada à concentração fortificada.	101
Tabela 7-v - Valores intermédios envolventes no cálculo da incerteza padrão da veracidade e resultado da mesma.	101

Lista de Figuras

Figura 1-i - Fotografia de cálices com Vinho Madeira para prova sensorial.	2
Figura 1-ii - Esquema da relação entre a cor, grau de doçura e idade do Vinho Madeira. <i>Imagem de cálices de vinho madeira de livre acesso, acedida em ⁷, a 12 de setembro</i> <i>de 2023.</i>	5
Figura 1-iii - Esquema do processo de vinificação do Vinho Madeira, com início na vindima. <i>Imagens acedidas em ⁸, a 12 de setembro de 2023 (uso com permissão).</i>	6
Figura 1-iv - Excerto do organograma representativo da entidade IVBAM, IP-RAM. <i>Adaptado de e acedido em ¹³ (uso com permissão).</i>	10
Figura 1-v - Organograma representativo das funções no LPVBE. <i>Adaptado de e acedido</i> <i>em ¹³ (uso com permissão).</i>	11
Figura 2-i - Ilustração da linha de base de um cromatograma e da Amplitude máxima do ruído num determinado intervalo de tempo.	18
Figura 3-i – Imagem do processo industrial da fermentação alcoólica no álcool. <i>Imagem</i> <i>de acesso livre, acedida em ²⁶ a 14 de junho 2023.</i>	29
Figura 3-ii - Ilustração da fermentação em células de leveduras, no processamento de bebidas alcoólicas.	30
Figura 3-iii - Exemplo de coluna capilar utilizada em cromatografia em fase gasosa. .	34
Figura 3-iv – Fotografia de um cromatógrafo em fase gasosa, com identificação dos componentes: 1 – injetor, 2 – forno, 3 – coluna cromatográfica, 4 – detetor e 5 – software.	35
Figura 3-v - Ilustração dos modos de injeção na coluna capilar: modo <i>split</i> , modo <i>splitless</i> e modo <i>on-column</i> (da esquerda para a direita).....	36
Figura 3-vi - Fotografia de um detetor FID.	37
Figura 3-vii - Esquema ilustrativo do detetor FID.	38
Figura 3-viii - Sistema Cromatográfico GC-FID.	40
Figura 3-ix – Cromatograma do padrão de concentração inferior da calibração.....	43
Figura 4-i - Estrutura química do ácido sórbico.	58
Figura 4-ii - Esquema de um espectrofotómetro de feixe duplo. <i>Imagem de livre acesso,</i> <i>adaptada de e acedida em ⁴⁹, a 01 de agosto de 2023.</i>	61
Figura 4-iii - Esquema ilustrativo dos quatro tipos de transições eletrónicas em moléculas orgânicas.	62
Figura 4-iv – Fotografias dos equipamentos Aparelho por destilação a vapor (esquerda) e Espectrofotómetro de Absorção Molecular UV-Visível (direita).	64

Figura 4-v - Gráfico da curva de calibração da absorvância em função da concentração de ácido sórbico.....	66
--	----

Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

A ou Abs	Absorvância
AG1	Ajuste de Grau 1
AG2	Ajuste de Grau 2
C	Concentração de determinado composto
CE	Comissão Europeia
EN	Norma Europeia (<i>European Standard</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
FID	Detetor de Ionização de Chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
IEC	Comissão Internacional Eletrotécnica (<i>International Electrotechnical Commission</i>)
ISO	Organização Internacional de Normalização (<i>International Organization for Standardization</i>)
IVBAM, IP-RAM	Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, Instituto Público-Região Autónoma da Madeira
IVM	Instituto do Vinho da Madeira
LD	Limite de Detecção
LPVBE	Laboratório de Produtos Vitivinícolas e Bebidas Espirituosas
LQ	Limite de Quantificação
MIVM	Método Interno Instituto do Vinho Madeira
NP	Norma Portuguesa
OIV	Organização Internacional do Vinho e da Vinha (<i>Organisation Internationale de La Vigne e du Vin</i>)
PI	Padrão Interno
RAM	Região Autónoma da Madeira
Reg.	Regulamento
SCN1	Solução de Calibração de Nível 1
SG	Sistema de Gestão
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
TAV	Título Alcoométrico Volúmico
u.a.	Unidades arbitrárias
UE	União Europeia

UV	Ultravioleta
Vis	Visível
α	Fator de separação
$C_{\text{fortificada}}$	Concentração fortificada adicionada no ensaio de Recuperação
CV	Coeficiente de Variação
DS^2	Diferença de variâncias
G	Parâmetro Teste de <i>Grubbs</i>
λ	Comprimento de onda
m	Declive
n	Número total de um conjunto de valores
piL	Limite de precisão intermédia
piL'	Limite de precisão intermédia relativo
R (%)	Taxa/ Percentagem de Recuperação
r^2	Coeficiente de determinação
rL	Limite de repetibilidade
rL'	Limite de repetibilidade relativo
R_s	Resolução do pico cromatográfico
s	Desvio padrão de um conjunto de valores
s^2	Variância de um conjunto de valores
S/N	Razão Sinal Ruído (<i>Signal-to-Noise ratio</i>)
t	Valor de t da distribuição t de <i>Student</i>
t_m	Tempo morto
t_r	Tempo de retenção
u	Incerteza padrão combinada
u'	Incerteza padrão combinada relativa
U	Incerteza expandida
U'	Incerteza expandida relativa
VT	Valor de Teste
% Vol.	Percentagem em Volume
w	Largura do pico cromatográfico

Objetivos e enquadramento

O presente trabalho teve como objetivos principais a validação de um método analítico para a determinação de ácido sórbico em Vinho Madeira através de Espectrofotometria UV-Vis e a validação de um método analítico para a determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol em álcool neutro com recurso à técnica de cromatografia gasosa, GC-FID.

Os objetivos específicos passam pela determinação dos vários parâmetros de validação – homogeneidade de variâncias, linearidade, limites analíticos, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão, com a quantificação da incerteza de medição.

No contexto do IVBAM, a validação de métodos analíticos torna-se imperativa para o controlo e análise de bebidas alcoólicas e outros produtos vitivinícolas, transpondo credibilidade aos agentes económicos e aos próprios consumidores finais, por estar assegurada a qualidade da análise e, consequentemente, dos produtos. Os procedimentos foram realizados com base na legislação em vigor.

1. Introdução

1.1. História do Vinho Madeira

O **Vinho Madeira** é um vinho licoroso fortificado, envelhecido em barris de carvalho e produzido na Ilha da Madeira, ilustrado na Figura 1-i. Um vinho único que possui características especiais, resultantes da combinação entre o tipo de casta, o solo de origem vulcânica, o clima e o seu processo de produção, apresenta aromas intensos e complexos, tons acastanhados e sabores singulares e inigualáveis. A sua história remonta ao século XV, numa altura em que a ilha começou a ser colonizada depois de ter sido descoberta em 1419 por João Gonçalves Zarco, Tristão Vaz Teixeira e Bartolomeu Perestrelo. Tendo o domínio das capitânias sob direção do Infante D. Henrique, estes três capitães ocuparam o solo com cultura de trigo, vinha e cana.^{1,2}



Figura 1-i - Fotografia de cálices com Vinho Madeira para prova sensorial.

A exportação do Vinho Madeira não tardou, sendo concretizada passados cerca de 25 anos do início da colonização da ilha, com a casta predominante Malvasia. À medida que o século XV avançava, as exportações ganhavam cada vez mais destaque, e nos séculos XVI e XVII, tornava-se um dos vinhos mais populares da época, principalmente na Europa.¹

Chegando-se ao século XVIII, as exportações para a Europa eram secundárias, dirigindo-se essencialmente para as Índias e para a América do Norte. A ligação do Vinho Madeira à América do Norte era de tal maneira próxima, que foi o vinho eleito para o brinde da celebração da Declaração de Independência dos Estados Unidos da América, a 4 de julho de 1776, pelo primeiro presidente George Washington. Mais tarde, no século XIX, as exportações para a Grã-Bretanha ganharam mais dimensão,

expandindo-se também o mercado russo e havendo, contudo, um decréscimo para o mercado da América do Norte. Nesta altura, a maior produção de Vinho Madeira seria de castas como Verdelho, Tinta Negra, Boal e Terrantez.¹

Atualmente, o Vinho Madeira, com mais de 500 anos de história, continua a ser um vinho exuberante e de alta qualidade, conhecido por ter uma longa vida útil e complexidade de sabor. O processo de amadurecimento deste vinho, mediante o calor e oxidação, em barris de carvalho, transcorre ao longo de um período que pode variar entre três e mais de 50 anos, resultando numa ampla variedade de características, desde vinhos secos e frutados até vinhos doces e encorpados.¹

1.2. Cultura da vinha e produção do Vinho Madeira

A **cultura da vinha** está situada na “Região Demarcada da Madeira”, ou seja, na Ilha da Madeira e na Ilha do Porto Santo, somando um total de, aproximadamente, 1775 viticultores. Nesta área, superior a 700 km², os concelhos que detêm zonas vitícolas mais expressivas são Câmara de Lobos, na costa Sul, e São Vicente e Santana na costa Norte. Numa zona orográfica caracterizada por um relevo acidentado, a maior parte da área de cultura possui declives entre 16 e 25 % inclinação, pelo que o desenvolvimento de terrenos agrícolas (através de construção de socalcos ou “poios”) só foi e continua apenas a ser possível pela utilização de mão de obra. Além das questões de orografia, o clima típico da Ilha da Madeira (clima temperado) leva a verões quentes e húmidos e a invernos amenos, com variabilidade microclimática, um pouco diferente da Ilha do Porto Santo, com um clima mais seco (possui uma altitude média inferior). Assim, a Madeira possui uma paisagem agrícola que é também caracterizada pelo sistema de rega, onde a água é captada nas zonas mais altas e conduzida ao longo da ilha por canais denominados “levadas”, cuja construção remonta ao século XV. O **ciclo da vinha** tem início nas podas, entre fevereiro e março, passando posteriormente à fase de maturação, em que as uvas aumentam de volume, a acidez diminui e aumenta a quantidade de açúcar. Entre agosto e outubro ocorre então a vindima, dependendo das variedades e das condições climáticas, na qual são colhidas as uvas e levadas para as adegas.^{1,3,4}

A produção de Vinho Madeira é feita com uma variedade de **castas de uva** e atualmente as mais utilizadas, de entre as que estão autorizadas e recomendadas, são: Sercial, Verdelho, Malvasia, Boal, Terrantez e Tinta Negra. O teor alcoólico dos vinhos pode atingir valores entre 17 e 22 % Vol. (mencionado em frente como Título

Alcoométrico Volúmico – TAV), variando no estilo do vinho com diferentes graus de doçura. A Tabela 1-i possui as características típicas de um vinho proveniente de cada casta, todas elas oriundas de Portugal, no entanto, cultivadas em diversas áreas.

Tabela 1-i - Tipos de castas de uva utilizadas no Vinho Madeira e características dos vinhos respetivos. *Imagens de livre acesso acedidas em ⁵, a 12 de setembro de 2023.*

Casta	Origem Região de cultivo	Estilo	Características organoléticas Aromas, sabor e estrutura
Sercial 	Portugal Madeira, Bucelas e norte de Portugal	Extra seco Seco	Cítricos, vegetais, mel, frutos secos, leves, frescos, longos
Verdelho 	Portugal Madeira, Açores	Meio seco	Cítricos, tropicais, fumados, corpo médio, acidez equilibrada
Malvasia 	Península Ibérica Madeira	Doce	Melaço, figos, passas, sultanas, especiarias, encorpado, textura macia e aveludada
Boal 	Portugal Madeira, Dão e Douro	Meio doce	Café, baunilha, frutos secos, especiarias, corpo médio, textura macia
Terrantez 	Portugal Madeira e Douro	Meio seco Meio doce	Frutos secos, madeira, tabaco, iodo, elegante, complexo, equilíbrio entre doçura, acidez e amargor típico da casta
Tinta Negra 	Portugal Madeira, Estremadura e Beira Interior	Todos os tipos, desde Seco a Doce	Cítricos, frutos secos, especiarias, aromas doces e tostados, leves a medianamente encorpados e frescura equilibrada

Quanto às **características organoléticas do vinho**, em termos de cor, como representado na Figura 1-ii, o Vinho Madeira varia entre o muito pálido (cítrico), pálido (palha), dourado, meio escuro (castanho claro, âmbar) e escuro com tons acastanhados, de cor intensa e com reflexos esverdeados nos vinhos que apresentam mais idade. A cor está então bastante relacionada com a idade e com o estilo do vinho (de acordo com o grau de doçura), pelo que vinhos mais jovens e mais secos apresentam cor mais clara, em direção ao “muito pálido”. Por outro lado, quanto mais doce e envelhecido o vinho, mais tendência tem para apresentar uma cor escura, cuja riqueza cromática deriva da migração das matérias extrativas do casco e oxidação da matéria corante. A sua estrutura, por sua vez, varia entre leve, encorpado, fino, macio, aveludado e amadurecido.^{1,5-7}



Figura 1-ii - Esquema da relação entre a cor, grau de doçura e idade do Vinho Madeira. Imagem de cálices de vinho madeira de livre acesso, acedida em ⁷, a 12 de setembro de 2023.

Após a colheita das uvas da **vindima**, inicia-se a produção propriamente dita do vinho. O **método** particular **de produção do Vinho Madeira** (vinificação) promove as propriedades únicas e características organoléticas apuradas do mesmo. Na Figura 1-iii, está representado um esquema reduzido deste método de produção. Em primeiro lugar, nas adegas, é realizada uma **triagem** das uvas em que ocorre a pesagem das mesmas, a verificação do grau alcoólico provável, através da medição do teor de açúcar, e estas são selecionadas conforme o tipo de vinho que se pretende. Após este passo, começa a transformação da uva – são pisadas e prensadas para obtenção do mosto. Este segue para a **fermentação alcoólica**, procedimento no qual os açúcares dão origem a álcool (etanol) na presença de leveduras (referido com mais detalhe em 3.1). O passo que se segue é o processo de **fortificação**, com a paragem da fermentação e adição de álcool

vínico com um TAV de 96 % Vol. (álcool obtido da destilação de vinhos). Assim sendo, dependendo da casta e do estilo do vinho a produzir, é do interesse do produtor realizar a interrupção mais cedo para vinhos doces (menor quantidade de açúcar convertido em etanol) ou mais próxima do final da fermentação, no caso de vinhos mais secos. Finda a fortificação, o vinho é submetido a um de dois possíveis processos de **envelhecimento**: “Canteiro” ou “Estufagem”. No método de “Canteiro”, o vinho sofre um envelhecimento oxidativo em cascos de madeira, que são colocados nos pisos mais elevados dos armazéns, em canteiros, onde a temperatura é mais elevada (20 a 35 °C). A circulação do ar neste tipo de envelhecimento provoca a evaporação do vinho, concentrando compostos que apuram os aromas (mais intensos e complexos). O tempo mínimo de envelhecimento é de dois anos. O outro método é denominado “Estufagem” e envolve depósitos em aço inox (em estufa), nos quais o aquecimento do vinho é controlado, até uma temperatura máxima de 50 °C (por um período mínimo de 3 meses). A “Estufagem” surgiu no século XVIII, como uma técnica baseada no “Vinho da Roda”, de forma a produzir artificialmente as condições por que passava ao ser transportado para o seu principal mercado, a Índia, na altura do século XVII. Este vinho, Vinho Madeira, era carregado nos porões dos navios e sujeito a temperaturas muito altas na passagem pelos trópicos. Quando este regressara à Europa, verificaram que a viagem enriquecia o vinho, através da aceleração do seu envelhecimento, aprimorando a sua complexidade e qualidade.



Figura 1-iii - Esquema do processo de vinificação do Vinho Madeira, com início na vindima. *Imagens acedidas em* ⁸, a 12 de setembro de 2023 (uso com permissão).

1.3. Controlo e legislação – Vinho Madeira

Para comercialização de produtos, devem estar assegurados o controlo de diversos parâmetros regulamentados, tal como sucede no álcool neutro e noutros produtos para consumo regulamentados. Logo, enquanto produto largamente utilizado e consumido por todo o mundo, os vinhos possuem numerosos parâmetros necessários e obrigatórios por lei para controlo prévio à certificação e comercialização dos mesmos.

O manual internacional de referência na área da Vitivinicultura e Enologia⁹, da Organização Internacional do Vinho e da Vinha (OIV), compreende vários métodos quer de análise física, quer química e entre os vários, podem-se enumerar alguns dos parâmetros a analisar: teor de açúcares, título alcoométrico volúmico, título alcoométrico volúmico total, acidez (total, fixa e volátil), ácido cítrico, ácido sórbico, cloretos, sulfatos, metais (sódio, ferro, cobre e chumbo), entre outros. De acordo com o tipo de vinho, seja tranquilo ou licoroso, branco ou tinto, os limites admitidos por lei de substâncias empregues ou de contaminantes nos vinhos, podem diferir entre si.

Segundo a Tabela 1-ii e de acordo com a legislação⁹⁻¹¹, os limites legais que se aplicam ao Vinho Madeira são:

Tabela 1-ii - Excerto de parâmetros alvo de controlo na matriz Vinho Madeira e respetivos limites.

Parâmetro	Limite	Base Legal
	Consoante o grau de doçura em Grau Baumé a 20 °C (°Bé)	
Teor de açúcares	• Extra seco: $\leq 0,5$ °Bé (* ≤ 49 g/L) • Seco: $< 1,5$ °Bé (* ≤ 65 g/L) • Meio seco: $1 \leq$ °Bé $\leq 2,5$ (* 57 a 80 g/L) • Meio doce: $2,5 \leq$ °Bé $\leq 3,5$ (* 80 a 96 g/L) • Doce: $> 3,5$ °Bé (* > 96 g/L)	Portaria n.º 39/2015 de 13/02
Título Alcoométrico Volúmico	$17,0 \text{ \% vol.} \leq \text{TAV} \leq 22,0 \text{ \% vol.}$	Portaria n.º 39/2015 de 13/02
Título Alcoométrico Volúmico Total	$> 17,5 \text{ \% vol.}$	Portaria n.º 39/2015 de 13/02
Acidez total	$< 3,5$ gramas de ácido tartárico por litro	
	Idade ≤ 10 anos: $\leq 1,2$ g ácido acético por litro ou 20 miliequivalentes por litro	
Acidez volátil	Idade entre 10 anos e 20 anos: $\leq 1,5$ g ácido acético por litro ou 25 miliequivalentes por litro Idade ≥ 20 anos: $\leq 1,8$ g ácido acético por litro ou 30 miliequivalentes por litro	Portaria n.º 39/2015 de 13/02
Ácido cítrico	< 1 grama por litro	
Ácido sórbico	< 200 miligramas por litro	
Cloretos	< 1 grama de cloreto de sódio por litro	
Dióxido de enxofre total	≤ 200 miligramas por litro	Regulamento Delegado (UE) n.º 2019/934 de 12/03
Sulfatos	< 2 gramas por litro	
Chumbo	$< 0,20$ miligramas por quilo	
Cobre	≤ 1 miligramas por litro	Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis, OIV
Sódio	≤ 80 miligramas por litro	

*Valores do teor de açúcares relacionados com o grau Baumé.

1.4. Entidade de acolhimento

Em 1979, tendo em vista a importância do Vinho Madeira, a Região Autónoma da Madeira (RAM) criou o Instituto do Vinho da Madeira (IVM), que assegurou a produção e o comércio do Vinho, bem como a coordenação das atividades vitivinícolas na RAM. O setor da vinha e do vinho na RAM ficou, portanto, ao encargo do Instituto, que, por sua vez, se organizou de forma a responder aos pedidos dos agentes económicos do setor. Para esse efeito, foi criado um quadro jurídico-geral para disciplinar o setor da vinha e do vinho na RAM, tendo internamente uma diversidade de serviços para cumprir o seu papel.¹²

O IVM seria o organismo responsável pela fiscalização das atividades vitivinícolas regionais e pela certificação e controlo de qualidade do Vinho da Madeira. Os serviços desta entidade englobam, portanto, a fiscalização, controlo e comercialização de vinhos (registo das instalações de fermentação, destilação, retificação, entre outros) através da colheita de amostras de vinhos, de modo a analisar e emitir selos de garantia e certificados de origem. Com uma adega própria, a produção seria também assegurada.

Mais tarde, em 2006, surgiu o **Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira**, IP-RAM (IVBAM), que resulta da fusão do antigo Instituto do Vinho da Madeira e do antigo Instituto do Bordado, Tapeçarias e Artesanato da Madeira.¹³

Incluído no IVBAM, o **Laboratório de Produtos Vitivinícolas e Bebidas Espirituosas** (LPVBE), hoje integrado na Divisão de Laboratórios e Câmara de Provadores, está encarregue de realizar os ensaios laboratoriais e as análises necessárias à emissão dos boletins para a certificação dos produtos. Os ensaios laboratoriais de natureza físico-química são realizados em bebidas de origem vínica, designadamente, vinhos tranquilos e licorosos, mostos, bebidas aromatizadas, runs, cervejas, cidras, licores, álcool de origem agrícola e bebidas espirituosas. Além da análise físico-química, é realizada a análise sensorial dos vinhos na Câmara de Provadores, que pretende assegurar a qualidade e genuinidade do produto.¹²

O **LPVBE**, está inserido na organização do IVBAM, na Divisão de Laboratórios e Câmara de Provadores, dentro do núcleo de laboratórios. Na Figura 1-iv, tem-se o excerto do organograma geral do IVBAM¹³.

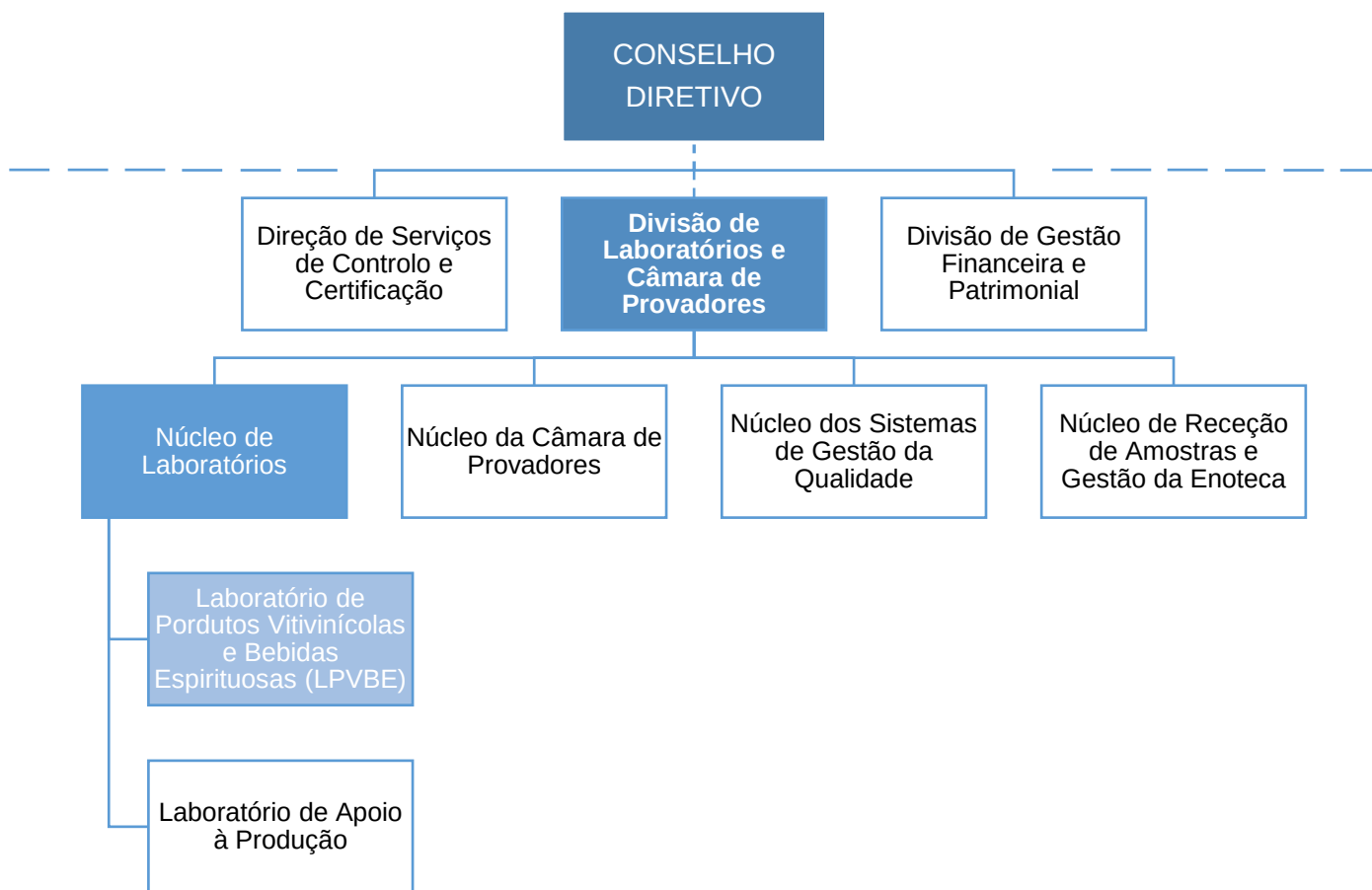


Figura 1-iv - Excerto do organograma representativo da entidade IVBAM, IP-RAM. Adaptado de e acedido em ¹³ (uso com permissão).

Relativamente ao Sistema de Gestão (SG) do LPVBE, no organograma funcional mais pormenorizado representado na Figura 1-v, está identificado o quadro técnico e estão identificadas as várias funções em relação hierárquica.¹³

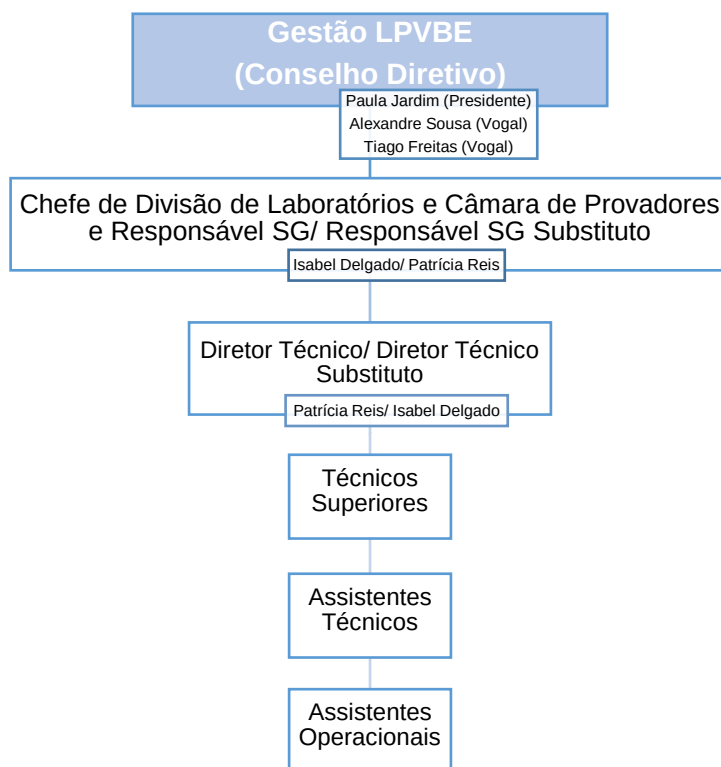


Figura 1-v - Organograma representativo das funções no LPVBE. Adaptado de e acedido em ¹³ (uso com permissão).

Cada membro do quadro do LPVBE, deve desempenhar as suas competências, no que diz respeito ao Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) e ao desempenho das atividades técnicas. As competências de gestão são asseguradas pela Direção (Conselho Diretivo, Chefe de Divisão e Diretor Técnico) e compreendem tarefas como, por exemplo, a descrição de funções e responsabilidades no SGQ, definição de procedimentos para a análise de consultas, aquisição de produtos e cooperação com clientes. Quanto às competências técnicas, os requisitos, tais como, competência e qualificação do pessoal, condições ambientais e de segurança, descrição dos métodos de ensaio, procedimentos de controlo de qualidade, entre outros, devem também ser assegurados.

O LPBVE é o organismo do IVBAM onde o presente trabalho foi desenvolvido e trata-se de uma unidade laboratorial acreditada pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC) para diversos ensaios nas matrizes vinho, álcool neutro, entre outras. Os métodos acreditados são, essencialmente, métodos descritos em Regulamentos (Reg. (CE)), pela OIV ou então Métodos Internos do Laboratório (MIVM).¹³ Na Tabela

1-iii, Tabela 1-iv e Tabela 1-v, encontram-se os métodos acreditados deste laboratório, organizados consoante o tipo de ensaio e a matriz a que se aplicam.

Tabela 1-iii - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para a matriz Bebidas espirituosas.

Matriz	Ensaio/ Técnica	Método
Bebidas espirituosas	Acidez fixa/ Volumetria	Reg.(CE) n.º 2870/2000
	Acidez total/ Volumetria	Reg.(CE) n.º 2870/2000
	Acidez volátil/ Cálculo	Reg.(CE) n.º 2870/2000
	Álcoois superiores totais/ Cálculo	MIVM-20
	Determinação de etanal, acetato de etilo, acetal, metanol, 2-butanol, 1-propanol, isobutanol, álcool alílico, 1- butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, álcoois amílicos/ GC	MIVM-20
	Extrato seco total/ Gravimetria	Reg.(CE) n.º 2870/2000
	Substâncias voláteis/ Cálculo	MIVM-20
	Título alcoométrico volúmico real/ Densimetria eletrónica	Reg.(CE) n.º 2870/2000
Bebidas espirituosas incolores	Título alcoométrico volúmico bruto/ Densimetria eletrónica	MIVM-29

Tabela 1-iv - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para as matrizes Vinho, Vinho licoroso e Licor.

Matriz	Ensaio/Técnica	Método
Licor e vinho licoroso	Açúcares totais/ Volumetria	MIVM-15
Vinho e vinho licoroso	Acidez fixa/ Cálculo	OIV-MA-AS313-03
	Acidez total/ Titulação potenciométrica	OIV-MA-AS313-01
	Acidez volátil (sem determinação de ácido sórbico e ácido salicílico)/ Destilação e volumetria	MIVM-27
	Açúcares totais/ Método enzimático	MIVM-35
	Densidade relativa a 20 °C/ Cálculo	OIV-MA-AS2-01
	Dióxido de enxofre livre/ Titulação potenciométrica	MIVM-05
	Dióxido de enxofre total/ Titulação potenciométrica	MIVM-05
	Extrato não redutor/ Cálculo	MIVM-33
	Extrato seco total/ Cálculo	OIV-MA-AS2-03B
	Massa volúmica a 20 °C/ Densimetria eletrónica	OIV-MA-AS2-01
	pH/ Potenciometria	OIV-MA-AS313-15
	Título alcoométrico volúmico total/ Cálculo	MIVM-31
	Título alcoométrico volúmico/ Densimetria eletrónica	OIV-MA-AS312-01

Tabela 1-v - Métodos acreditados no IVBAM-LPVBE para a matriz Álcool neutro.

Matriz	Ensaio/Técnica	Método
Álcool neutro	Extrato seco/ Gravimetria	MIVM-42
	Massa volúmica/ Densimetria eletrónica	OIV-MA-BS-06
	Metanol/ Cromatografia em fase gasosa	MIVM-17
	Título alcoométrico volúmico/ Densimetria eletrónica	MIVM-29

Desta forma, o LPVBE, tem a sua competência técnica reconhecida pelo IPAC, de acordo com a Norma NP EN ISO 17025:2018¹⁴ desde 2002 e, anteriormente, pelo Instituto Português da Qualidade segundo a norma NP EN 45001, entre 2000 e 2002. Funciona, portanto, como laboratório oficial responsável pelo controlo do setor vitivinícola na RAM.¹³

2. Validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é muito importante na prática da análise química realizada em laboratório, no sentido de ser entregue ao cliente uma resposta apropriada com base nas necessidades do mesmo. Para isto, os métodos analíticos utilizados devem estar devidamente validados consoante o seu objetivo, ou seja, devem estar definidos requisitos analíticos para o método, com a confirmação de que o mesmo apresente capacidade para responder ao que a sua aplicação requer, de forma consistente e credível.^{14,15}

No presente trabalho será apresentada a validação de dois métodos analíticos quantitativos, com uma abordagem que contempla apenas o laboratório. Além desta abordagem, o processo de validação pode ser realizado por avaliação direta dos parâmetros em estudo ou por avaliação indireta. A avaliação direta visa determinar a exatidão do método analítico, ou seja, combina a componente dos erros aleatórios e a dos erros sistemáticos através de processos como a análise de Materiais de Referência Certificados, Ensaio Interlaboratoriais e Testes Comparativos.¹⁶ A avaliação indireta será o processo de validação utilizado neste relatório, em que são determinados e evidenciados vários parâmetros: homogeneidade de variâncias, linearidade, limites analíticos, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Trata-se de um processo menos dispendioso e possível de ser realizado no laboratório.^{14,16}

A abordagem a seguir para a quantificação da incerteza de medição será uma **abordagem intralaboratorial e empírica** (baseada em dados de validação realizada no laboratório – desvio padrão de precisão e erro de veracidade do método de ensaio).

2.1. Homogeneidade de variâncias do sinal analítico

Nos métodos em que se recorre a curvas de calibração, a gama de trabalho a escolher previamente (com base na literatura e nas concentrações esperadas de analito) deve ser avaliada pelo **Teste de homogeneidade de variâncias da resposta analítica**, segundo a norma ISO 8466-1.^{16,17}

O procedimento consiste em analisar 10 réplicas do primeiro e do último padrão da gama e posterior determinação da variância associada ao primeiro padrão (s_1^2) e da variância associada ao último padrão (s_{10}^2):

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (1)$$

em que $i=1$ e $i=10$, s_1^2 e s_{10}^2 .

i – número do padrão (1 ou 10, neste caso)

j – número de repetições de cada padrão

De seguida, é feita a avaliação que permite concluir se existe uma diferença significativa entre as variâncias através de um teste F de *Fisher*:

$$F_{exp} = \frac{s_{10}^2}{s_1^2}, \text{ se } s_{10}^2 > s_1^2 \quad (2) \quad \text{ou} \quad F_{exp} = \frac{s_1^2}{s_{10}^2}, \text{ se } s_1^2 > s_{10}^2. \quad (3)$$

Por comparação com o valor tabelado da distribuição de *Fisher*, se $F_{experimental} \leq F_{tabelado}$, então a diferença entre as variâncias não é estatisticamente significativa e a gama está ajustada – temos uma gama de trabalho homoscedástica (onde há homogeneidade). No entanto, se $F_{experimental} > F_{tabelado}$, há diferenças estatísticas entre as variâncias – temos uma gama de trabalho heteroscedástica – e é necessário reduzir o intervalo da gama de trabalho até que se verifique que $F_{experimental} \leq F_{tabelado}$.

2.2. Linearidade

Após a aceitação da gama de trabalho, segundo a norma ISO 8466-1¹⁸, deve ser avaliada a **linearidade** da mesma através de um modelo estatístico como o **Teste de Mendel**. É calculada então a função de calibração com um ajuste de grau 1 (linear), a função de calibração com ajuste de grau 2 (não linear) e os desvios padrões residuais de cada ajuste.^{16,17}

O teste consiste em calcular a diferença das variâncias (DS^2):

$$DS^2 = (N - 2) \times s_{y/x(1)}^2 - (N - 3) \times s_{y/x(2)}^2 \quad (4)$$

sendo N o número de níveis da calibração e $s_{y/x(1)}^2$ e $s_{y/x(2)}^2$ as variâncias residuais do Ajuste de Grau 1 (AG1) e Ajuste de Grau 2 (AG2), respetivamente.

O cálculo do Valor de Teste (VT) é então efetuado segundo a expressão:

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y/x(2)}^2} \quad (5)$$

A decisão é tomada tendo por base a comparação do VT com o valor tabelado da distribuição de F para o grau de confiança definido, em que, se $VT \leq F_{tabelado}$, então os pontos da calibração são adequadamente ajustados por uma reta. No entanto, se $VT > F_{tabelado}$, os pontos de calibração não são bem ajustados a uma reta e deve ser reduzido o intervalo de calibração até que $VT \leq F_{tabelado}$, ou, em alternativa, recorrer a uma função polinomial de grau 2, com o devido fundamento (essencialmente, na impossibilidade da redução do intervalo escolhido e na inexistência de uma relação retilínea entre os pontos da calibração).

2.3. Limites analíticos

Os limites analíticos são conceitos a ter em conta, especialmente quando são analisadas amostras com baixos níveis de concentração, de forma a ter fiabilidade nos resultados.

2.3.1. Limite de deteção

O **limite de deteção** (LD) é o valor mínimo a partir do qual se pode detetar analito, mas não é possível quantificá-lo corretamente. Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)^{15,19}, o limite de deteção é definido como “o valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência dum constituinte num material é β , sendo α a probabilidade de declarar falsamente a sua presença”. Assim, uma leitura inferior ao limite de deteção indica que, se o analito estiver presente, a sua concentração será inferior ao LD, não se podendo afirmar com certeza a sua presença ou ausência.^{16,17}

A estimativa deste limite pode ser feita através da **análise de brancos** e respetivo desvio padrão associado (10 a 20 repetições), em que se reproduzam ao máximo as condições da rotina. O limite de deteção do método, LD_c obtém-se de:

$$LD = \frac{3,3 s_0}{m} \quad (6)$$

onde s_0 o desvio padrão associado ao sinal dos brancos e m é o declive da reta de calibração.

O fator **3,3** advém do facto de se considerar uma distribuição gaussiana para a probabilidade do sinal médio dos brancos, com um grau de confiança de aproximadamente 99,7 %. Isto significa que quando o sinal do analito é 3,3 vezes

superior ao desvio padrão do sinal do branco, há uma grande probabilidade de concluir, de forma correta, que o analito está presente e evitam-se erros do tipo I (α) (falsos positivos, em que se conclui que o analito está presente quando na verdade não está).

Sendo os métodos descritos neste relatório baseados numa **curva de calibração**, é também possível realizar este cálculo com base na informação da mesma, tendo-se o limite de deteção do método através da expressão:

$$LD_c = \frac{3,3 s_{y/x}}{m} \quad (7)$$

em que $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e m o declive.

Para métodos que apresentam um sinal de linha de base, é vantajoso o cálculo dos limites através da determinação da **razão sinal/ruído (S/N)**, como é o caso do método com a técnica GC-FID. É conseguida através da sua estimativa pela análise de soluções com concentrações que se esperam já encontrar próximas destes limites. No GC-FID, o registo do sinal analítico é contínuo e tem-se a seguinte relação entre a Amplitude máxima, em determinado intervalo deste sinal da linha de base (ruído), e o desvio padrão representativo do mesmo (s_e) (expressão (8)).

$$s_e = \frac{\text{Amplitude}}{5} \quad (8)$$

A Figura 2-i ilustra a determinação desta Amplitude máxima do ruído da linha de base, para um intervalo de tempo escolhido, que deve ser perto do pico de um analito.

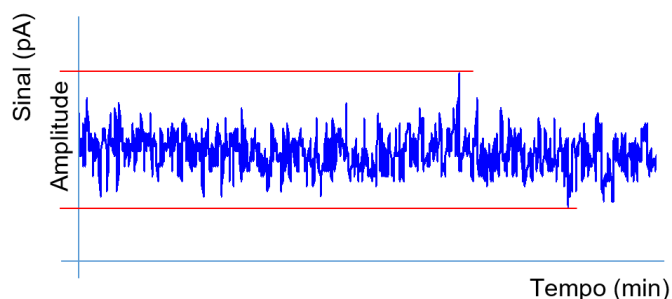


Figura 2-i - Ilustração da linha de base de um cromatograma e da Amplitude máxima do ruído num determinado intervalo de tempo.

Obtendo-se o desvio padrão do ruído, s_e , substitui-se o mesmo na expressão da razão S/N:

$$\begin{aligned}\frac{S}{N} &= \frac{\text{sinhal do pico}}{\text{desvio padrão ruído}} \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow S/N &= \frac{\text{sinhal do pico}}{s_e}\end{aligned}\quad (9)$$

Quando temos uma razão S/N = 3,3, o sinal do pico pode ser identificado como sendo o limite de detecção da técnica (LD_s):

$$\text{sinhal pico} = LD_s = 3,3 s_e \quad (10)$$

O limite de detecção do método, LD_c , será então a concentração obtida por interpolação do LD_s na reta.

2.3.2. Limite de quantificação

O **limite de quantificação** (LQ) apresenta um valor medido superior ao de detecção e indica o valor a partir do qual é possível determinar a concentração de analito com determinada exatidão.

Novamente, limite de quantificação do método pode ser determinado pela **análise de vários brancos** (10 a 20 repetições) e obtém-se de forma análoga ao LD_c :

$$LQ_c = \frac{10 s_0}{m} \quad (11)$$

Neste caso, o fator é **10** em vez de 3,3, uma escolha aceite e convencional que permite que a determinação seja feita com confiança, evitando erros do tipo II (β) (falso negativo, em que se conclui que o analito não está presente quando na verdade está).

Com recurso à informação da **calibração** temos:

$$LQ_c = \frac{10 s_{y/x}}{m} \quad (12)$$

Por fim, tem-se a determinação do limite de quantificação da técnica através da **razão S/N**, através da informação do desvio padrão associado ao ruído:

$$LQ_s = 10 s_e \quad (13)$$

a partir da qual se determina por interpolação na reta a concentração **LQ_c** (limite de quantificação do método).

2.4. Sensibilidade

A **sensibilidade**, está relacionada com a variação do sinal analítico lido (ΔL) à medida que há um incremento ou decréscimo de concentração do analito (ΔC), refletindo-se na razão entre ambos^{16,17}:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} = m \quad (14)$$

ou seja, esta sensibilidade reflete-se no declive (***m***) da reta de calibração (sendo uma função linear).

2.5. Seletividade

A **seletividade** é dos parâmetros com maior relevância quando se implementa um método novo, uma vez que é necessário o método distinguir o analito de outros compostos e determiná-lo sem a interferência dos mesmos.^{16,17}

Em técnicas cromatográficas, o conceito da própria cromatografia já pressupõe que a técnica tem de ser seletiva para que seja possível separar o analito de outros compostos e determinar a sua concentração. Assim sendo, há parâmetros característicos que permitem avaliar a seletividade, como o **fator de seletividade** ou de separação, α :

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M} \quad (15)$$

em que t_{R1} é o tempo de retenção do analito, t_{R2} o tempo de retenção de outro composto vizinho e t_M o tempo morto.

Quanto maior o valor de α , mais seletivo é o método para o composto 1, uma vez que maior é a diferença entre o tempo de retenção do analito e o tempo de retenção do composto mais próximo (melhor separação).

Quando não se trata de cromatografia, o estudo da seletividade e avaliação de possíveis interferências é conseguido através de **Ensaio de Recuperação**, em que amostras com a mesma matriz e diferentes concentrações bem conhecidas são submetidas a análise. Os ensaios devem ser realizados em duplicado e em condições de repetibilidade, podendo ser realizados vários níveis de fortificação em cada amostra ao longo da gama de trabalho.^{16,17,20} O método é tanto mais seletivo para um composto, quanto mais próxima a taxa de recuperação ($R(\%)$) for de 100 %, tendo em conta a expressão:

$$R(\%) = \frac{C_{amostra\ fortificada} - C_{nativa}}{C_{fortificada}} \times 100 \quad (16)$$

em que C_{nativa} é a concentração do analito previamente presente na amostra, $C_{amostra\ fortificada}$ a concentração da amostra após a fortificação e $C_{fortificada}$ a concentração que foi adicionada à amostra para o ensaio.

No caso de a amostra não conter à partida analito na sua constituição, a expressão da taxa de recuperação ($R_i(\%)$) a utilizar deve ser a seguinte:

$$R_i(\%) = \frac{C_{observada}}{C_{fortificada}} \times 100 \quad (17)$$

em que $C_{observada}$ é a concentração obtida da amostra após a fortificação e $C_{fortificada}$ a concentração fortificada adicionada na amostra.

A recuperação média ($\bar{R}(\%)$) para o analito é calculada a partir das recuperações dos vários níveis de concentração (i) fortificada:

$$\bar{R}(\%) = \sum_{i=1}^n R_i(\%) / n \quad (18)$$

A utilização destas expressões é adequada com a devida uniformização das condições em que foi determinada cada concentração. Para determinar o sucesso do ensaio e admitir que o método é seletivo, o valor da taxa de recuperação deve encontrar-se dentro de um determinado intervalo estabelecido pelo laboratório, consoante a realidade e tipologia do método. Pode ainda ser definido segundo diretrizes provenientes de manuais adequadas à matéria em causa, como é o caso da tabela presente no manual de referência de Química Enológica^{17,21}, adaptada na Tabela 2-i.

Tabela 2-i - Valores máximos toleráveis para as taxas de Recuperação em função da concentração de analito. *Adaptada e acedida em ¹⁷, a 5 de julho de 2023 (uso com permissão Elsevier B.V.).*

Analito (%)	Fração de analito	Expressão	Recuperação (%)
100	1	100 %	98 – 102
10	10 ⁻¹	10 %	98 – 102
1	10 ⁻²	1 %	97 – 103
0,1	10 ⁻³	0,1 %	95 – 105
0,01	10 ⁻⁴	100 ppm	90 – 107
0,001	10 ⁻⁵	10 ppm	80 – 110
0,0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80 – 110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80 – 110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ppb	60 – 115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	40 – 120

2.6. Precisão

A avaliação da **precisão** é importante para que a dispersão dos resultados entre ensaios seja conhecida. Este parâmetro compreende o estudo dos efeitos aleatórios entre ensaios repetidos sobre uma amostra, amostras semelhantes ou então sobre padrões.^{16,17,20}

Quando o assunto é a precisão, tem-se como medidas de avaliação a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.^{16,22}

2.6.1. Repetibilidade

A **repetibilidade** é avaliada quando são efetuadas medições sobre uma mesma amostra ou padrão, nas mesmas condições, ou seja, no mesmo laboratório, mesmo analista, equipamento, reagentes e num curto espaço de tempo (no mesmo dia).^{16,17,20}

A determinação da repetibilidade dos métodos a descrever neste relatório será realizada no próprio laboratório, em que é feita a análise com várias medições ($n \geq 10$) e calculado o desvio padrão das mesmas (s_r).^{16,17,20} Nos métodos alvo de validação neste relatório, a repetibilidade será estudada apenas através de um padrão, pelo que o cálculo é feito através da expressão mais simples do desvio padrão (equação (19)).

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}} \quad (19)$$

Em que y_i é o valor da concentração e $\bar{y}$ a média da concentração de n valores.

Além do desvio padrão, é possível obter também esta informação em percentagem, através do coeficiente de variação:

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{y}} \times 100 \quad (20)$$

em que s é um desvio padrão de um conjunto de valores e $\bar{y}$ é a média desses valores.

A informação da repetibilidade é importante para definir o limite de repetibilidade (rL) que permite aceitar ou não, durante as análises em rotina, concentrações de duplicados:

$$rL = t \sqrt{2} s_r = 2,8 s_r \quad (21)$$

em que $t = 1,96$, para um intervalo de confiança a 95 % de probabilidade na distribuição t de *Student*. Para que os duplicados sejam aceites, a diferença entre os valores deve ser inferior ao limite de repetibilidade.^{16,17,20}

2.6.2. Precisão intermédia

A **precisão intermédia** é uma medida da precisão, como o nome indica, intermediária, entre a repetibilidade e a reprodutibilidade. Neste caso, são definidos o(s) fator(es) a variar na análise de uma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Esses fatores podem ser: diferença no analista, no equipamento e/ou na época. Uma vez que a precisão flutua consoante a gama de concentrações, é interessante este procedimento ser realizado em amostras/padrões que abranjam mais valores.^{16,17,20}

O cálculo do valor da precisão intermédia (s_{pi}) é realizado pela seguinte expressão:

$$s_{pi} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (22)$$

em que t é o número de amostras analisadas; n o número de ensaios por cada amostra; j o número da amostra; k o número do resultado para a amostra j ; y_{jk} o resultado k para a amostra j entre 1 a t e $\bar{y}_j$ a média dos resultados dessa amostra. O valor do produto $t(n-1)$ deve ser no mínimo 15.^{16,22} Esta informação pode ser igualmente expressa em percentagem segundo o coeficiente de variação (equação (20)).

Da mesma forma que na repetibilidade, é importante definir o limite de precisão intermédia (piL) de modo a aceitar valores de concentração em análise em condições de precisão intermédia:

$$piL = t \sqrt{2} s_i = 2,8 s_{pi} \quad (23)$$

em que $t = 1,96$, para um intervalo de confiança a 95 % de probabilidade na distribuição t de Student.

2.6.3. Reprodutibilidade

A **reprodutibilidade** implica um estudo da precisão em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método e uma mesma amostra, com a variação de fatores que podem ser: o laboratório, o operador, o equipamento e /ou diferentes alturas. Uma vez que requer a análise da amostra noutra laboratório, esta medida da precisão não será determinada neste trabalho.¹⁶

2.6.4. Incerteza padrão da precisão

A incerteza padrão da precisão, $u_{precisão}$, é o desvio padrão de precisão, que pode ser calculada em absoluto ou em termos relativos, $u'_{precisão}$, à mensuranda – grandeza que se pretende medir, neste caso o valor obtido de concentração. Esta incerteza pode estar dependente do nível de concentração em que se encontre o analito, podendo ficar definidas diferentes incertezas para diferentes intervalos de concentração. No presente trabalho, a $u_{precisão}$ será quantificada em condições de precisão intermédia (com recurso a replicados de amostras).^{20,22} O valor desta incerteza em termos relativos é obtido com divisão de $u_{precisão}$ pela média da concentração em causa (expressa em percentagem multiplicando por 100).

2.7. Veracidade

Da mesma maneira que a precisão está relacionada com o efeito dos erros aleatórios, a **veracidade** está associada aos **erros sistemáticos**. A determinação da veracidade reflete-se então na proximidade de uma média de um número de resultados a um valor de referência. A avaliação da mesma é conseguida na prática pelo cálculo do desvio (estimativa de um erro sistemático, não relacionado com erros aleatórios). As abordagens possíveis para esta determinação contemplam a análise de Materiais de Referência, Ensaio de Recuperação com amostras fortificadas e Comparação com resultados obtidos noutros métodos.^{15-17,20}

A disponibilidade e a aquisição de materiais de referência certificados é escassa e dispendiosa, pelo que muitos laboratórios escolhem recorrer a Ensaio de Recuperação com amostras fortificadas (já discutido em 2.5) para determinar o parâmetro veracidade. Este estudo pode ser feito a mais do que um nível de fortificação, sobre uma ou mais amostras, que contenham ou não analito nativo (analito pré-existente na amostra ou não).

2.7.1. Incerteza padrão da veracidade

Neste trabalho, a incerteza padrão da veracidade, $u_{veracidade}$, será avaliada por ensaios de recuperação, ou seja, estimada através dos dados de recuperação média da fortificação de amostras a vários níveis de concentração, sem analito nativo.

No caso em que se recorrem a amostras sem analito nativo, a expressão da recuperação utilizada é a equação (17) e a recuperação média ($\bar{R}(\%)$), calculada a partir das recuperações dos vários níveis de concentração (i) fortificada, sendo obtida através da equação (18). Assim, a $u_{veracidade}$ é quantificada pela seguinte expressão^{20,22}:

$$u_{veracidade}(\bar{R}(\%)) = \bar{R}(\%) \times \sqrt{\left(\frac{s_{Ri}^2(\%)}{n \times \bar{R}(\%)^2}\right) + \left(\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}\right)^2} \quad (24)$$

Para o cálculo de $u(C_{fortificada})$, recorre-se à abordagem por modelação, ou passo-a-passo, tendo em conta os passos envolvidos para obter $C_{fortificada}$. Nestes passos está previsto o uso de instrumentos de medição de massa e de volume, sendo as incertezas respetivas calculadas de acordo com as equações (25) e (26) ou obtidas diretamente do certificado de calibração do instrumento, se este contiver a incerteza discriminada.²²

$$u_{m(u)} = \sqrt{(u_{Bal}^{Calib})^2 + (u_{Bal}^{Rep})^2} \quad (25) \quad u_v = \sqrt{(u_v^{Calib})^2 + (u_v^{Rep})^2 + (u_v^{Temp})^2} \quad (26)$$

em que u_{Bal}^{Calib} é a incerteza associada à calibração ou erro máximo admissível da balança; onde $u_v^{Calib} = \frac{Tolerância}{\sqrt{3}}$ segue uma função de densidade de probabilidade associada à Tolerância do material volumétrico regida por uma distribuição retangular; u_{Bal}^{Rep} e u_v^{Rep} são as incertezas associadas à repetibilidade da pesagem (desvio padrão de um conjunto de medições de uma massa ou volume) e u_v^{Temp} é a incerteza associada ao efeito da temperatura, que pode ser desprezada quando as medições de volume são realizadas num intervalo de ± 4 °C em torno da temperatura de referência (20 °C).

Esta incerteza pode também ser calculada em termos relativos, $u'_{veracidade}$, sendo obtida com a divisão de $u_{veracidade}$ pela média da concentração em causa (expressa em percentagem ao multiplicar por 100).

2.8. Exatidão e avaliação da incerteza

Por fim, a **exatidão** é a combinação de componentes de erros aleatórios e de componentes de erros sistemáticos, ou seja, é uma junção das componentes precisão e veracidade, respetivamente. A exatidão é definida como a proximidade de um resultado isolado a um valor de referência.^{15,16}

Como suprarreferido, a **abordagem para a quantificação da incerteza** neste trabalho é intralaboratorial e empírica, uma vez que será feita a validação do método de ensaio. Assim, serão determinados os parâmetros precisão e veracidade aquando da validação interna do método de ensaio, através do cálculo dos desvios padrões.

A quantificação da incerteza será, portanto, uma combinação dos elementos envolventes: incerteza padrão de precisão, $u_{precisão}$, e incerteza padrão de veracidade, $u_{veracidade}$.

Tendo-se $u_{precisão}$ e $u_{veracidade}$, é possível proceder ao cálculo da **incerteza padrão combinada** ($u(y)$)²² para um determinado valor de concentração y, sendo que esta deve ser a contribuição de ambas as incertezas de forma relativa, $u'_{precisão}$ e $u'_{veracidade}$, no caso de se aplicar a diferentes níveis de concentração^{20,22}:

$$u(y) = y \times \sqrt{(u'_{precisão})^2 + (u'_{veracidade})^2} \quad (27)$$

A incerteza final que expressa a exatidão de um determinado resultado isolado é então a **incerteza expandida**, U ,²² que para um nível de confiança de 95% se reflete na multiplicação da incerteza padrão combinada por um fator de expansão k igual a 2 (equação (28)).

$$U = u(y) \times 2 \quad (28)$$

O **resultado** determinado exprime-se com incerteza da seguinte forma:

$$\text{Resultado} = y \pm U \quad (29)$$

2.9. Teste estatístico de avaliação de *outliers*

Ao longo do processo de validação, os dados recolhidos estão sujeitos a muitos fatores que podem afetar os resultados. Assim sendo, devem ser feitas avaliações quanto à consistência dos mesmos, previamente à determinação de um ou mais parâmetros. De acordo com a norma ISO 5725²³, é possível apurar se um conjunto de dados é ou não consistente, pela aplicação de testes de rejeição como o teste de *Cochran* e o teste de *Grubbs*.

Nos trabalhos desenvolvidos neste relatório, recorreu-se ao Teste de *Grubbs* a valor extremo. Tendo-se um conjunto de valores em que y_1 é o valor mínimo e y_p o valor máximo, os parâmetros estatísticos a calcular são:

$$G_1 = \frac{\bar{y} - y_1}{s} \quad (30)$$

$$G_p = \frac{y_p - \bar{y}}{s} \quad (31)$$

em que

$$\bar{y} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p y_i \quad (32)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (y_i - \bar{y})^2} \quad (33)$$

O teste é realizado pelo cálculo dos parâmetros G_1 , para valores mínimos (equação (30)), e G_p , para valores máximos (equação (31)). Tendo-se estes calculados, procede-se à comparação dos mesmos com os valores tabelados para determinado nível de significância: se i) o resultado do teste (valor de G) for inferior ou igual a $G_{\text{tabelado}(0,05)}$, para um nível de significância de 5 %, então o valor extremo em causa é aceite como correto; se ii) o resultado do teste for maior do que $G_{\text{tabelado}(0,01)}$, para um nível de significância de 1 %, neste caso o valor extremo não é aceite como correto e é

rejeitado (considerado aberrante) e, por fim, se iii) o resultado do teste se encontrar entre $G_{\text{tabelado}(0,05)}$ e $G_{\text{tabelado}(0,01)}$ o valor extremo é considerado suspeito e deve ser isolado até investigada a razão. Quando algum resultado é considerado aberrante, deve ser realizado um novo teste estatístico para o conjunto de resultados restante. Os valores tabelados variam consoante o nº de ensaios do conjunto de valores.

3. Álcool neutro – Determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol por GC-FID

3.1. Definição e aplicações

O termo **álcool neutro** é usado para designar um líquido altamente concentrado em álcool etílico (etanol) e obtido através de um processo de destilação até que o TAV alcance um valor de 96 % Vol. Este tipo de álcool não contém nenhum sabor, aroma ou impureza detetável, como o termo “neutro” indica.²⁴

O etanol obtido por destilação e retificação (processo realizado na destilação em que se obtém um álcool neutro, sem sabor ou aroma), após a fermentação alcoólica de matérias-primas como mosto de uva, bagaço de uvas, vinho, borras de vinho, entre outros, é denominado de **álcool neutro de origem vitivinícola**. Além desta, o **álcool neutro** pode ter **origem agrícola** e, neste caso, as matérias-primas serão, por exemplo, batata, melaço, beterraba, grãos, cana-de-açúcar, aguardentes de origem agrícola, entre outros.²⁵

Este processo de **fermentação alcoólica**, ilustrado na Figura 3-i e esquematizado na Figura 3-ii, baseia-se na transformação de açúcares em etanol. Naturalmente, a matéria-prima possui açúcares (glucose, frutose ou sacarose) e contém leveduras (como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*).



Figura 3-i – Imagem do processo industrial da fermentação alcoólica no álcool. *Imagem de acesso livre, cedida em* ²⁶ *a 14 de junho 2023.*

Assim, o primeiro passo na fermentação e respiração celular é a glicólise – processo metabólico que converte a glucose em piruvato (ácido pirúvico). É um processo que não necessita de oxigénio e ocorre não só em microrganismos, como também em qualquer célula viva. Este envolve vários passos e a contribuição de uma mistura de várias enzimas e coenzimas (por exemplo, a nicotinamida adenina dinucleótido, NADH). Tendo ocorrido a glicólise e havendo oxigénio disponível, o piruvato sofre várias transformações e procede para a cadeia respiratória do microrganismo. Já em condições anaeróbias, o piruvato é metabolizado e sofre a dita fermentação alcoólica em que este é convertido em etanol (álcool) e dióxido de carbono (CO_2), através da presença de leveduras. Além destes produtos, são também produzidos metabolitos voláteis ou subprodutos (substâncias voláteis) em concentrações relativamente baixas.²⁷

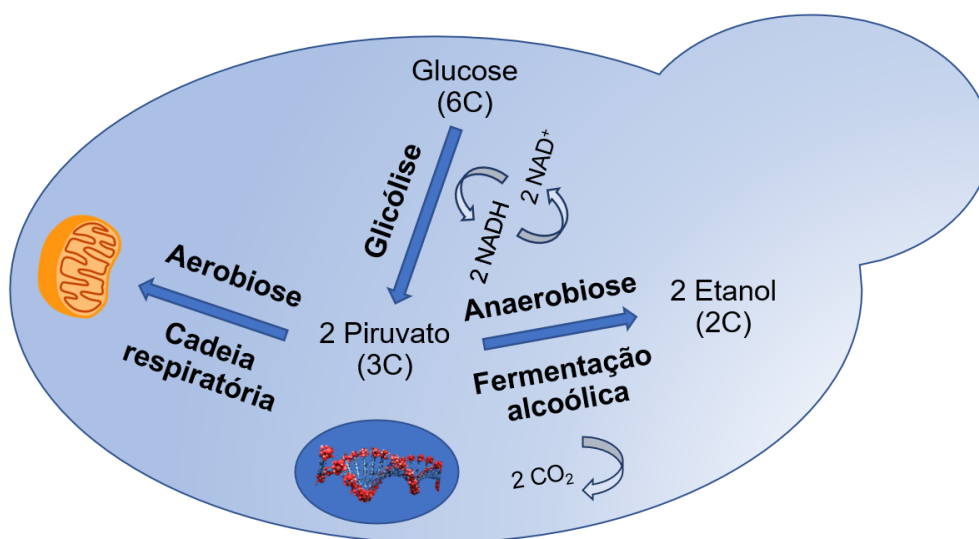


Figura 3-ii - Ilustração da fermentação em células de leveduras, no processamento de bebidas alcoólicas.

As suas aplicações passam essencialmente pela produção de bebidas espirituosas (como vodka, gin, licores, entre outros), fortificação de vinhos licorosos (como o Vinho Madeira), podendo ainda ser utilizado na área alimentar, na indústria farmacêutica e na indústria de perfumes e cosméticos, devido à neutralidade do etanol destilado e retificado.

3.2. Controlo e legislação – Álcool neutro

Segundo o Regulamento Delegado (UE) n.º 2022/1303, o álcool etílico de origem agrícola (álcool neutro) tem parâmetros que devem ser controlados, de modo que os resíduos que possa conter não ultrapassem os limites máximos estipulados.^{28,29}

Na Tabela 3-i, estão presentes os parâmetros a determinar nesta matriz, sendo estes ésteres, aldeídos, álcoois superiores, metanol e furfural.^{28,29}

Tabela 3-i - Parâmetros alvo de controlo na matriz álcool neutro e respetivos limites.

Matriz	Parâmetro	Limite
Álcool neutro	Ésteres	1,3 gramas de acetato de etilo por hectolitro de álcool a 100 % volume
	Aldeídos	0,5 gramas de acetaldeído por hectolitro de álcool a 100 % volume
	Álcoois superiores	0,5 gramas de isobutanol por hectolitro de álcool a 100 % volume
	Metanol	30 gramas por hectolitro de álcool a 100 % volume
	Furfural	Indetetável

3.3. Aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol

Segundo o Regulamento (CE) n.º 2870/2000, entende-se por “compostos aparentados” as substâncias voláteis formadas, juntamente com o etanol, durante a fermentação, destilação ou maturação de bebidas. O álcool neutro pode também apresentar resíduos destes compostos aquando da fermentação e destilação, sendo estes: os **aldeídos** (etanal e acetal), **ésteres** (acetato de etilo), **álcoois superiores** (2-butanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol) e **metanol**.³⁰

Ao transpor os valores máximos permitidos por lei da concentração destes compostos no álcool neutro em gramas por hectolitro de álcool absoluto (TAV a 100 % Vol.) para miligramas por litro de álcool neutro (TAV a cerca de 96 % Vol.), obtém-se, aproximadamente os seguintes valores: somatório de **aldeídos** a cerca de 5,0 miligramas de acetaldeído por litro, somatório dos **ésteres** a cerca de 12,5 miligramas de acetato de etilo por litro, somatório dos **álcoois superiores totais** a cerca de 5,0 miligramas de isobutanol por litro e **metanol** a 288 miligramas por litro.

O controlo da concentração destes compostos em bebidas é de elevada importância, uma vez que estas substâncias podem ter efeitos negativos na saúde dos consumidores de bebidas alcoólicas.

Os **aldeídos** são compostos orgânicos que possuem o grupo funcional carbonilo (-CHO), sendo exemplos o etanal (acetaldeído) e o acetal (1,1-dietoxietano). Estes tipos de compostos ocorrem naturalmente em alimentos, plantas e no nosso organismo, no entanto, são substâncias geralmente tóxicas em grandes concentrações. Por serem bastante reativas e formarem facilmente espécies reativas de oxigénio (ROS), é comum terem efeitos negativos, nomeadamente, originarem danos celulares resultantes do stress oxidativo e ainda danos no próprio ADN, levando a mutações genéticas. O etanal, que é um subproduto da metabolização do álcool pelo nosso organismo, resulta da oxidação do etanol (álcool etílico presente nas bebidas alcoólicas). Este processo de oxidação ocorre também naturalmente no fabrico de bebidas alcoólicas e decorre posteriormente à fermentação alcoólica, daí o controlo deste composto nas bebidas alcoólicas. Um consumo excessivo e prolongado de álcool e, por conseguinte, de etanal, acarreta efeitos adversos que estão associados à suspeita do potencial cancerígeno deste composto, além dos perigos supracitados. O etanal é também a substância responsável pelo mal estar derivado deste consumo excessivo (vulgarmente denominado de ressaca), desde as dores de cabeça, às náuseas e rubidez facial, sendo tanto mais intenso quanto menor a capacidade do nosso organismo em metabolizar esta substância.^{31,32}

Conhecidos pelos aromas agradáveis, os **ésteres** são compostos orgânicos com um átomo de oxigénio ligado a um carbono através de uma ligação dupla e outro átomo de oxigénio ligado por uma ligação simples (RCOOR'). Estes são também subprodutos decorrentes do processo da fermentação alcoólica, mais propriamente resultado de reações de esterificação (reação entre álcoois e ácidos carboxílicos, como o ácido acético ou málico, no seio de uma reação enzimática). Estes compostos dão origem a perfis aromáticos agradáveis e frutados nas bebidas alcoólicas, sendo o acetato de etilo um responsável pelas características organoléticas dos vinhos. No entanto, uma concentração elevada de ésteres conduz a aromas indesejáveis e excessivamente fortes, afetando largamente a qualidade sensorial de uma bebida.³²

Os **álcoois superiores** representam um grupo de álcoois com mais de dois átomos de carbono na sua molécula, incluindo substâncias como 2-butanol, 1-propanol, isobutanol (2-metil-1-propanol), 1-butanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. São também subprodutos do metabolismo das leveduras durante a fermentação e

contribuem para a complexidade do aroma de bebidas (caráter frutado). A níveis de concentrações mais acentuados, o cheiro forte, mais desagradável e pungente dos álcoois sobressai negativamente, embora os limites de deteção sensorial destes compostos sejam bem elevados. O controlo do teor de álcoois superiores está mais relacionado com a importância em garantir uma boa qualidade organolética e características equilibradas a este nível. É de notar, ainda, que estes álcoois podem apresentar alguma toxicidade e os sintomas típicos da ingestão de álcool.^{31,32}

Outro dos compostos, cujo controlo do seu teor é de extrema importância, é o **metanol**. Este álcool, que não é considerado um álcool superior, possui um grupo funcional hidroxilo (-OH) e está presente em quantidades habitualmente apreciáveis em bebidas. O metanol possui uma elevada toxicidade em seres humanos e animais quando ingerido, inalado ou absorvido pela pele. A exposição do metanol por ingestão representa um grave perigo, resultando em danos ao nível de vários órgãos, principalmente no sistema nervoso central, no sistema gastrointestinal e ao nível ocular. Decorrente da ingestão deste composto, o metanol é metabolizado no organismo por oxidação a formaldeído (composto cancerígeno) e ácido fórmico, ambas substâncias tóxicas e lentamente eliminadas do corpo humano (efeito cumulativo perigoso). A intoxicação por metanol pode ainda levar a distúrbios oculares (em casos mais graves à cegueira), problemas intestinais, evoluindo, em exposições extremas, para uma intoxicação aguda e potencialmente fatal.³²

3.4. Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama

A **cromatografia gasosa** (GC) é uma técnica analítica de separação química em fase gasosa, simples e versátil. Em GC podem ser analisadas amostras de compostos voláteis e semivoláteis, no estado gasoso e líquido, no entanto, amostras com compostos não voláteis podem também ser analisadas quando sujeitas a uma derivatização prévia, por exemplo. Com a inclusão de um detetor, este instrumento fornece informação qualitativa e quantitativa dos analitos. A separação destes ocorre por meio do transporte da amostra pela fase móvel – um gás quimicamente inerte e de pureza elevada – e interação física com uma fase estacionária que se opõe seletivamente ao transporte dos compostos. A fase estacionária será, por exemplo, um filme líquido fino a revestir o interior da coluna capilar, no caso da cromatografia de partição gás-líquido, ou um sólido adsorvente nas colunas de enchimento, quando se trata da cromatografia de adsorção gás-sólido.^{33,34} Na Figura 3-iii, tem-se uma fotografia

de uma coluna capilar num forno de GC, coluna esta utilizada no método do presente capítulo.

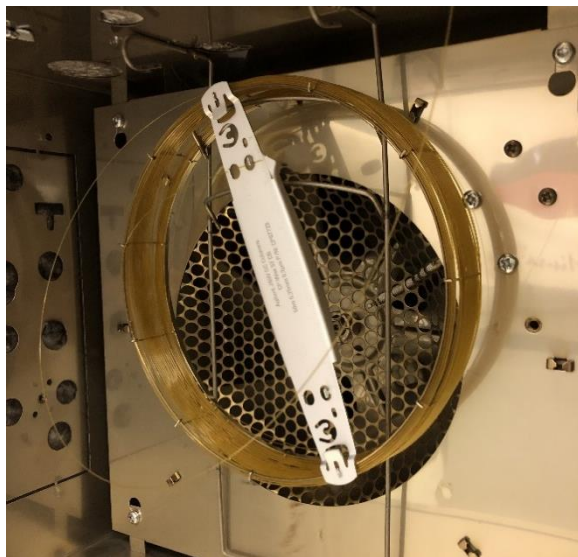


Figura 3-iii - Exemplo de coluna capilar utilizada em cromatografia em fase gasosa.

O cromatógrafo gasoso, de uma forma geral, é composto por 5 partes: o injetor (1), o forno (2), a coluna cromatográfica (3), o detetor (4) e o computador com o software de aquisição dos dados (5), como ilustrado na Figura 3-iv. Este exemplo de um sistema GC-FID, contempla um amostrador automático (1.1) que recolhe o vial contendo a amostra e injeta um volume da mesma através de um septo num injetor aquecido (*inlet* 1.2) para volatilizar logo à partida amostras líquidas. Esta amostra volatilizada é arrastada para a coluna (3), que se encontra no forno (2), pelo gás de arraste (tipicamente hélio, nitrogénio ou hidrogénio). Os analitos separados são eluídos até o detetor (4), cujo sinal é recolhido e tratado posteriormente pelo software (5) e apresentado numa representação do sinal do detetor em função do tempo, que constitui o cromatograma.



Figura 3-iv – Fotografia de um cromatógrafo em fase gasosa, com identificação dos componentes: 1 – injetor, 2 – forno, 3 – coluna cromatográfica, 4 – detector e 5 – software.

Na **introdução da amostra** pode ser acoplada anteriormente ao GC uma técnica de pré-concentração ou preparação da amostra volátil. Para isso existem técnicas de extração como a extração líquido-líquido, microextração em fase sólida (SPME) e ainda a técnica de *headspace* (entre outras).^{33,34}

A **injeção da amostra** no GC tem, por sua vez, diferentes modos consoante o tipo de amostras e as concentrações dos compostos alvo. Numa coluna de enchimento, o modo de injeção é direto, no entanto, para uma coluna capilar, em que o volume de injeção necessário é bastante inferior (na ordem dos microlitros), existem outros modos de injeção, como exemplificado na Figura 3-v. Por exemplo, num sistema de injeção *split/splitless*, no **modo split**, a micro seringa passa por um septo de borracha e, em vez de a amostra ser injetada diretamente na coluna, atravessa primeiramente um *liner* de vidro onde esta se mistura com o gás de arraste. O *split* ocorre e parte da amostra é introduzida na coluna e o restante é rejeitado pela purga do *split* (a razão entre ambas as partes é previamente definida consoante o método). Já no **modo splitless**, muito útil para amostras com compostos vestigiais (< 0,01 % da amostra), a válvula da purga do *split* é fechada e toda a amostra entra na coluna. Neste caso, a amostra permanece mais tempo no *liner* e, quando passa para o início da coluna, o solvente condensa com a temperatura abaixo do seu ponto de ebulição, permitindo que os solutos se vão

concentrando, para que depois seja feita a separação na coluna. Este último modo não é aconselhado para amostras com solutos em concentrações mais elevadas, uma vez que os picos têm tendência para serem mais largos. No sistema *split/splitless*, está contemplada ainda uma purga do septo para eliminar, essencialmente, volumes de gás excedente. Existe ainda a **injeção on-column**, em que a amostra é injetada diretamente na coluna, uma opção muito utilizada para amostras instáveis que se possam decompor.^{33,34}

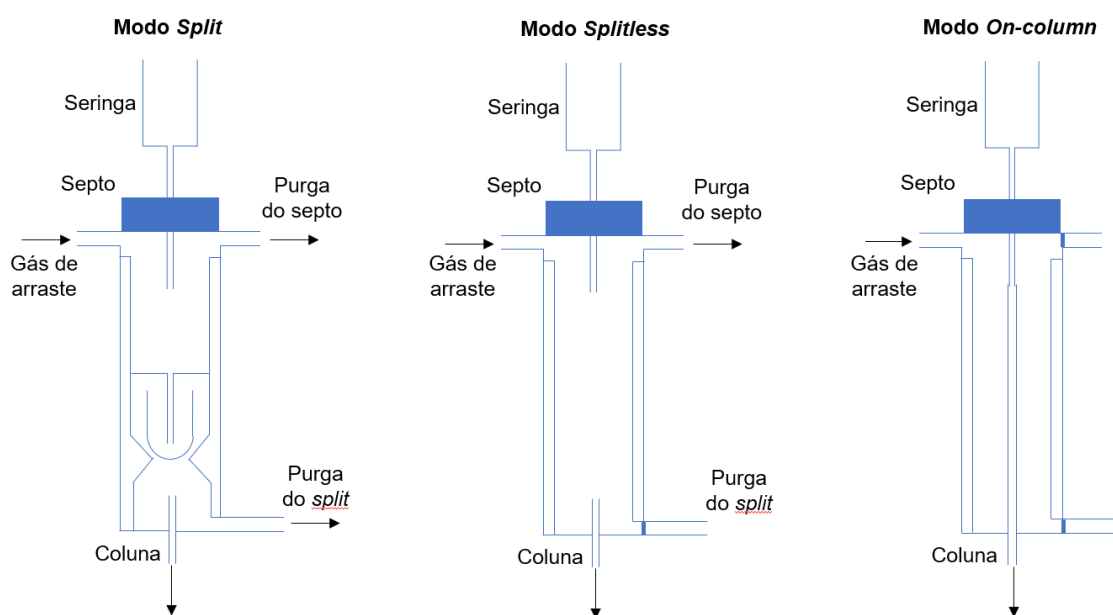


Figura 3-v - Ilustração dos modos de injeção na coluna capilar: modo *split*, modo *splitless* e modo *on-column* (da esquerda para a direita).

A **separação dos compostos** depende, por exemplo, de um dos fatores principais em jogo nesta técnica – a **temperatura**. A cromatografia gasosa é considerada uma técnica de partição (distribuição seletiva entre a fase móvel e a fase estacionária), no entanto, a interação dos compostos com a fase estacionária é mínima e a separação depende crucialmente das suas diferentes volatilidades. Assim sendo, a ordem de saída dos mesmos pela coluna é, principalmente, consoante os seus pontos de ebulição, na qual são eluídos primeiramente os que apresentam pontos de ebulição inferiores. Para que isto aconteça, pode ser utilizado um programa de temperatura isotérmico (mantém-se a temperatura da coluna constante) ou um programa com uma ou mais rampas de temperatura (a temperatura na coluna aumenta de forma gradual e controlada).

Para a **identificação e quantificação dos analitos**, como referido anteriormente, o fluxo da coluna é eluído para um detetor que fornece um sinal analítico

resultante da medição de uma propriedade física proporcional à quantidade de analito que passa nesta parte do sistema. De entre os vários detetores possíveis para acoplamento com o cromatógrafo, são exemplos: o detetor de captura eletrónica, de condutividade térmica, de espectrometria de massa e de ionização de chama.

O **Detetor de Ionização de Chama** (FID), ilustrado na Figura 3-vi, é um dos detetores mais empregues na cromatografia gasosa devido à sua versatilidade e ao seu fácil manuseamento. O FID apresenta baixos limites de deteção, pouco ruído, uma gama linear de resposta abrangente e responde à maioria dos compostos orgânicos hidrocarbonetos, sendo insensível a substâncias como CO, CO₂, H₂O, NH₃, NO, H₂S, entre outras. Trata-se de um detetor destrutivo, uma vez que recorre à combustão dos analitos para dar origem a um sinal. De uma forma geral, à medida que são eluídos, os compostos orgânicos são queimados numa chama de hidrogénio (H₂) e de ar comprimido. Os átomos de carbono produzem radicais CH[•], que por sua vez produzem iões CHO⁺ e eletrões (e⁻) na chama, de acordo com a reação seguinte³³⁻³⁷:

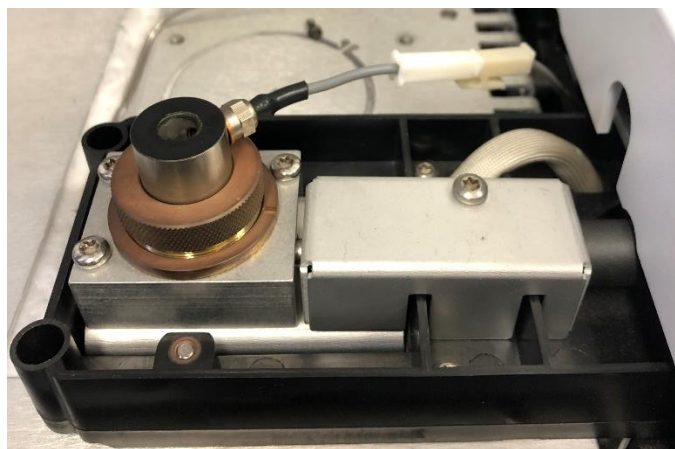
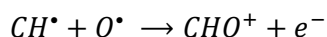


Figura 3-vi - Fotografia de um detetor FID.

Segundo o esquema da Figura 3-vii, é possível visualizar as várias partes que se situam no interior do detetor FID: o *jet*, o eletródo coletor, a entrada de ar, a entrada do gás de arraste (por exemplo, hidrogénio) e de gás *make up* (por exemplo, nitrogénio) e ainda a entrada do eluente. Os iões e eletrões produzidos são recolhidos no eletródo coletor do FID (que se encontra em redor da chama) e a corrente elétrica resultante gera o sinal do detetor no software de aquisição de dados. Este sinal é monitorizado de forma a se registar o cromatograma, que apresenta os vários picos de analitos, cada um com o seu tempo de retenção característico. O cromatograma apresenta um sinal

aproximadamente constante, designado de linha de base, que corresponde à queima do hidrogénio. De acordo com a presença de impurezas, esta linha de base terá um sinal médio mais ou menos perto de zero. A quantificação dos analitos, por fim, é realizada tendo por base uma relação de proporcionalidade entre a resposta do detetor (corrente produzida) e a quantidade de amostra/número de carbonos (detetor sensível à massa e não à concentração).^{33,34,37}

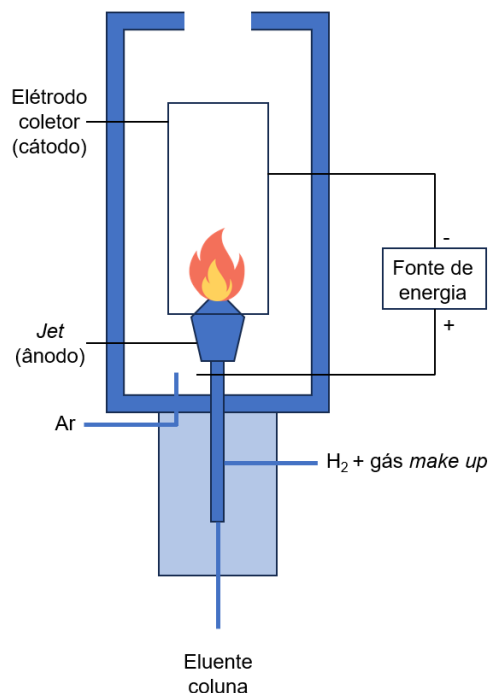


Figura 3-vii - Esquema ilustrativo do detetor FID.

As suas **aplicações** têm, naturalmente, a ver com áreas de estudo de compostos orgânicos, seja na área alimentar, para controlo de contaminantes e pesticidas, na área farmacêutica, em estudos de substâncias ativas e deteção de impurezas, bem como, ainda na área ambiental, para análise de poluentes orgânicos.³⁸⁻⁴¹

3.5. Materiais e métodos

3.5.1. Princípio do método

O método alvo de validação, segundo indicações do Regulamento Delegado (UE) 2022/1303²⁹, teve por base um método de referência existente no laboratório para a análise de bebidas espirituosas, o MIVM-20 (Anexo 1 – Procedimento experimental) que segue o Regulamento (CE) n.º 2870/2000³⁰. A análise dos compostos supracitados no álcool neutro é efetuada por injeção direta das amostras no sistema de cromatografia em fase gasosa (sem proceder a preparações que não as previstas para a junção de padrão interno).

3.5.2. Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados neste método devem ser próprios para análise cromatográfica (pureza elevada, superior a 97 %), sendo estes:

- Etanol absoluto (CAS 64-17-5) ($\geq 99,8$ %, Honeywell Riedel-de Haën)
- Etanal (CAS 75-07-0) ($\geq 99,5$ %, Honeywell Riedel-de Haën)
- Acetato de etilo (CAS 141-78-6) ($\geq 99,99$ %, Carlo Erba Reagents)
- Acetal (CAS 105-57-7) ($\geq 99,9$ %, Alfa Aesar)
- Metanol (CAS 67-56-1) ($\geq 99,99$ %, Honeywell Riedel-de Haën)
- 2-Butanol (CAS 78-92-2) ($\geq 99,8$ %, Honeywell Riedel-de Haën)
- 1-Propanol (CAS 71-23-8) ($\geq 99,95$ %, Alfa Aesar)
- Isobutanol (CAS 78-33-1) ($\geq 99,7$ %, Alfa Aesar)
- 1-Butanol (CAS 71-36-3) ($\geq 99,9$ %, Alfa Aesar)
- 2-Metil-1-butanol (CAS 137-32-6) ($\geq 99,4$ %, Alfa Aesar)
- 3-Metil-1-butanol (CAS 123-51-3) ($\geq 99,8$ %, Honeywell Riedel-de Haën)
- 1-Pentanol (padrão interno) (CAS 71-41-0) ($\geq 99,9$ %, Sigma-Aldrich)
- Água desionizada (Millipore)

Para a curva de calibração foi preparada uma **solução individual de cada analito** (balões de 100,0 mL). De seguida, uma **solução mãe** foi preparada a partir de todas as soluções individuais, num balão volumétrico de 200,0 mL. Em 5 balões de 50,00 mL, foram feitas **soluções de calibração dos níveis 1 a 5 (SCN)**, por diluição da

solução mãe. Por fim, para preparar o conteúdo a inserir no **vial**, foram transferidos 9,00 mL de solução de um nível de calibração e 1,00 mL de **solução de padrão interno** (previamente preparada num balão de 200,0 mL) para um recipiente pequeno. Este último passo é repetido para cada nível de calibração e a mistura é colocada no *vial* para posterior análise no GC-FID. Como solvente, foi utilizada uma solução de etanol a 96 % Vol., preparada com água desionizada e etanol absoluto.

Os equipamentos utilizados para a análise foram a **Balança Analítica** Mettler Toledo modelo ME204T 00 ($\pm 0,0001$ g), e o Sistema cromatográfico **GC-FID** – Cromatografia Gasosa acoplado com Detetor de Ionização de Chama – Agilent Technologies 7890A GC Systems + Autosampler, ilustrado na Figura 3-viii, equipado com um auto-amostrador e um injetor *split/splitless*.



Figura 3-viii - Sistema Cromatográfico GC-FID.

Em relação ao sistema cromatográfico, a injeção das amostras é feita por um amostrador automático. A coluna para a separação dos compostos é uma coluna capilar com as características apresentadas na Tabela 3-ii.

Tabela 3-ii - Características da coluna cromatográfica.

Características coluna capilar GC-FID	
Coluna	Coluna capilar de alta resolução CP-WAX 57 CB
Marca	Agilent J&W GC Columns
Comprimento	50 m
Diâmetro Interno	0,25 mm
Espessura da fase estacionária (filme)	0,20 µm
Composição da fase estacionária	polietilenoglicol estabilizado (fase polar)
Temperatura máx. (modo isotérmico)	200 °C
Temperatura máx. (modo programa T)	225 °C

A coluna cromatográfica CP-WAX 57 CB, é recomendada para a análise de aldeídos, ésteres, éteres e fenóis (fazendo os compostos alvo parte destes grupos), apresenta uma elevada inércia química, é termicamente estável (com uma temperatura máxima de 200 °C em modo isotérmico e de 225 °C em modo programa de temperaturas) e é resistente a várias injeções de amostras com a presença de água.

O controlo do equipamento é feito de forma remota através do software, onde se definem todas as características dos métodos e onde se obtêm os cromatogramas e informações necessárias das análises realizadas. O software utilizado é *Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition Ver. C.01.10*.

3.5.3. Otimização das condições cromatográficas

Tendo em conta que o presente método foi uma adaptação de outro utilizado em bebidas espirituosas, onde a concentração dos compostos é superior e a matriz se trata de etanol a 40 % Vol. (em vez de a 96 % Vol.), foi necessário redefinir as condições e proceder a algumas alterações. Na Tabela 3-iii, estão então reunidas as condições do sistema cromatográfico para o presente método.

O método do laboratório, adaptado do Regulamento (CE) n.º 2870/2000³⁰, que serviu de base para a implementação e validação do presente método para o álcool neutro, tinha como grande diferença a razão de *split* (antes 1/10) e o programa de temperatura (anteriormente 40 °C durante 6 min, rampa de temperatura de 8 °C/min até 124 °C). Uma vez que os picos apresentados dos compostos estavam com uma má definição e má resolução, primeiro tentou-se aumentar o fluxo da coluna para se

obterem picos de menor largura, uma vez que diminuir a quantidade de amostra injetada à primeira vista não era solução devido às baixas concentrações. Uma vez que o efeito, apesar de se ter verificado, não mostrou ser significativo, foi-se experimentando outras razões de *split* até se chegar à razão 1/55, considerada adequada por observação dos cromatogramas. A Figura 3-ix é um exemplo de um dos cromatogramas, mais especificamente do padrão de concentração inferior da calibração realizada. Aliados à razão de *split*, foram sendo testados programas de temperatura que permitissem a separação dos picos num tempo total mínimo, no entanto com uma resolução adequada. Assim sendo, o aumento do tempo da isotérmica inicial foi necessário de modo que os picos iniciais fossem eluídos mais lentamente (no programa anterior verificava-se a sobreposição dos mesmos).

Tabela 3-iii - Condições sistema cromatográfico GC-FID.

Condições GC-FID	
Volume de injeção	1 µL (seringa com capacidade de 10 µL)
Modo de injeção	<i>Split</i>
Razão Split	1:55
Temperatura Inlet	210 °C
Detetor FID Temperatura	250 °C
Gás de arraste (fase móvel)	Hélio (He)
Fluxo da coluna (He)	1,5 mL/min
Gás make up	Nitrogénio (N ₂)
Fluxo do gás make up (N ₂)	30 mL/min
Combustível	Hidrogénio (H ₂)
Fluxo combustível (H ₂)	30 mL/min
Comburente	Ar comprimido
Fluxo ar	300 mL/min
Programa de temperatura	40 °C por 14 min, rampa de 15 °C/min até 135 °C (tempo de corrida total aprox. 20 min) + 5 min a 190°C

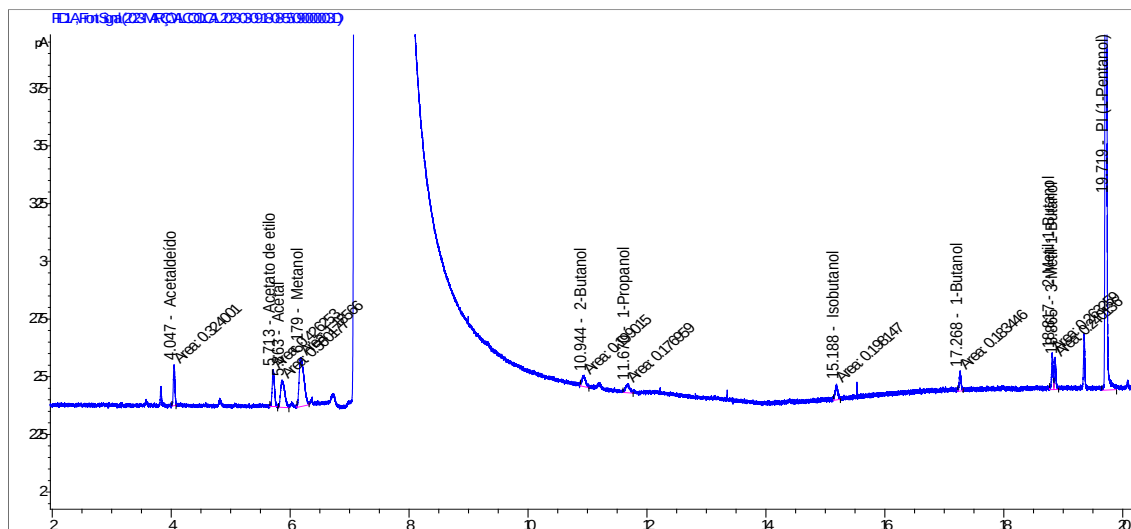


Figura 3-ix – Cromatograma do padrão de concentração inferior da calibração.

3.6. Resultados obtidos e discussão – Validação do método

Neste capítulo serão analisados e discutidos os resultados obtidos da **validação do método quantitativo** para a determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol em álcool neutro por GC-FID. Os **parâmetros** analisados para objeto de validação do método por meio de avaliação indireta foram: homogeneidade de variâncias, linearidade, limites analíticos, sensibilidade, seletividade, resolução, precisão e exatidão.

3.6.1. Gama de trabalho e curva de calibração

Em primeiro lugar, foi estabelecida uma gama de trabalho que satisfizesse as condições necessárias para assegurar o controlo dos limites máximos destas substâncias, admitidos por lei.²⁹ Para isso, teve-se em conta tais limites e a base de um método existente supramencionado e semelhante para análise destes compostos, mas em bebidas espirituosas.

Assim, as **gamas de trabalho** escolhidas foram as seguintes, apresentadas na Tabela 3-iv, com os compostos por ordem de eluição na coluna, cujas equações das retas de calibração se encontram no relatório no Anexo 2 – Relatórios de calibração.

Tabela 3-iv - Gamas de trabalho definidas para cada composto.

Composto	Gama de Trabalho (mg/L)
Etanal	3,5 - 35
Acetato de etilo	3,2 - 32
Acetal	3,2 - 32
Metanol	12,5 - 125
2-Butanol	0,7 - 7
1-Propanol	0,7 - 7
Isobutanol	0,7 - 7
1-Butanol	0,7 - 7
2-Metil-1-butanol	1 - 10
3-Metil-1-butanol	0,9 - 9

Na cromatografia, a curva de calibração é, tipicamente, um gráfico que representa a área do pico cromatográfico do analito em função da concentração de padrão. Neste caso, a função de calibração tem como base o **método quantitativo do padrão interno** (equação (34)), sendo que as **abscissas** (eixo dos xx) são a razão entre a concentração do composto ($C_{analito}$) e a concentração de padrão interno (C_{PI}) e as **ordenadas** (eixo dos yy) são a razão da área do composto ($A_{analito}$) pela área do padrão interno (A_{PI}).

$$\frac{A_{analito}}{A_{PI}} = K \times \frac{C_{analito}}{C_{PI}} \quad (34)$$

O **padrão interno** utilizado foi 1-pentanol, escolhido por ser o composto recomendado no regulamento³⁰, com semelhanças aos analitos, contudo, sem interferência na análise dos mesmos. O recurso ao padrão interno permite, através do quociente, a correção de variações ao longo do processo, questões inerentes ao próprio sistema cromatográfico, à variabilidade associada ao volume injetado e à quantificação em geral.

3.6.2. Homogeneidade de variâncias

Para garantir que a gama de trabalho é a adequada quanto à variância do sinal analítico ao longo do intervalo, foi aplicado o teste F. Assim sendo, foram analisadas 10 réplicas do padrão de calibração de concentração inferior (SCN1) e 10 réplicas do

padrão de concentração superior (SCN5). Os valores foram sujeitos a um teste de *Grubbs* de forma a avaliar a presença de *outliers*, onde se calculam os valores de *G* (equações (30) e (31)) e se compara com os valores tabelados para $n=10$, $G_{\text{tabelado}}(0,05;10)$ e $G_{\text{tabelado}}(0,01;10)$. Sendo que nenhum valor foi excluído, realizou-se o teste *F* para cada curva de calibração de forma a averiguar a existência de **homogeneidade de variâncias**. Na Tabela 3-v, foram reunidos os valores e a decisão relativa à existência, ou não, de homogeneidade.

Tabela 3-v – Resultados da aplicação do teste *F* para avaliar a homoscedasticidade das gamas de trabalho.

Composto	Teste de F		
	$F_{\text{experimental}}$	F_{tabelado}	Curva homoscedástica
Etanal	0,167	5,351	Sim
Acetato de etilo	0,230		Sim
Acetal	0,408		Sim
Metanol	0,005		Sim
2-Butanol	0,012		Sim
1-Propanol	0,009		Sim
Isobutanol	0,111		Sim
1-Butanol	0,094		Sim
2-Metil-1-butanol	1,780		Sim
3-Metil-1-butanol	0,152		Sim

Concluiu-se que, como $F_{\text{experimental}} < F_{\text{tabelado}}$, há homogeneidade de variâncias do sinal analítico para cada gama de trabalho (Tabela 3-iv), ou seja, as curvas são homoscedásticas e as gamas de trabalho estão bem ajustadas.

3.6.3. Linearidade

A **linearidade** foi avaliada através do modelo estatístico Teste de Mendel (subcapítulo 2.2), que se resume na comparação da variância dos resíduos do ajuste dos pontos a uma reta ($s_{y/x(1)}^2$), AG1, e da variância dos resíduos do ajuste dos pontos a um polinómio de grau 2 ($s_{y/x(2)}^2$), AG2. O teste *F* realizado para este efeito demonstrou que os pontos das várias calibrações são adequadamente ajustados por retas,

verificando-se um ajuste linear, uma vez que se verificou $VT < F_{tabelado}$, para todos os compostos (Tabela 3-vi).

Tabela 3-vi - Avaliação da linearidade das retas de calibração de cada composto, pelo Teste de Mendel.

Composto	AG1 $S_{y/x}^2 (1)$	AG2 $S_{y/x}^2 (2)$	DS^2	VT	$F_{tabelado}$	Decisão
Etanal	$7,34 \times 10^{-06}$	$7,70 \times 10^{-07}$	$2,05 \times 10^{-05}$	26,6	98,5	Ajuste linear
Acetato de etilo	$9,53 \times 10^{-07}$	$5,41 \times 10^{-07}$	$1,78 \times 10^{-06}$	3,3		Ajuste linear
Acetal	$5,57 \times 10^{-06}$	$5,74 \times 10^{-06}$	$5,23 \times 10^{-06}$	0,9		Ajuste linear
Metanol	$2,07 \times 10^{-05}$	$1,09 \times 10^{-05}$	$4,03 \times 10^{-05}$	3,7		Ajuste linear
2-Butanol	$1,92 \times 10^{-06}$	$1,15 \times 10^{-06}$	$3,47 \times 10^{-06}$	3,0		Ajuste linear
1-Propanol	$1,43 \times 10^{-06}$	$6,87 \times 10^{-07}$	$2,90 \times 10^{-06}$	4,2		Ajuste linear
Isobutanol	$8,71 \times 10^{-07}$	$2,85 \times 10^{-07}$	$2,04 \times 10^{-06}$	7,2		Ajuste linear
1-Butanol	$1,03 \times 10^{-06}$	$1,07 \times 10^{-06}$	$9,56 \times 10^{-07}$	0,1		Ajuste linear
2-Metil-1-butanol	$8,79 \times 10^{-07}$	$8,40 \times 10^{-07}$	$9,58 \times 10^{-07}$	1,1		Ajuste linear
3-Metil-1-butanol	$3,55 \times 10^{-06}$	$4,83 \times 10^{-06}$	$9,96 \times 10^{-07}$	0,2		Ajuste linear

3.6.4. Limites analíticos

Os **limites analíticos** foram determinados com recurso à razão Sinal Ruído (sendo o registo do sinal analítico contínuo). Analisou-se o padrão mais baixo da curva de calibração (SCN1) e registou-se o sinal do pico de cada analito, neste caso a altura (em picoAmperes, pA).

Através da equação (9), estimou-se qual a razão sinal ruído que correspondia ao SCN1 de cada analito. Em certos compostos, a concentração de SCN1 já correspondeu ao limite de quantificação do método, LQ_C , e, consequentemente, a altura desse pico correspondeu ao limite de quantificação instrumental, LQ_S (para uma razão sinal ruído $S/N = 10$). Para os restantes compostos, foi estimada a concentração provável do LQ_C , através da equação (13), que depois de preparada deveria ser analisada para que se comprovasse que corresponderia realmente a $S/N = 10$. Este último passo não se concretizou devido a problemas técnicos associados a uma avaria no cromatógrafo. Assim sendo, para estes casos, o LQ_C corresponde a uma determinação por estimativa (pela relação da razão S/N obtida de SCN1 com a razão $S/N = 10$), tendo em conta as possibilidades.

Os limites de deteção (LD_S e LD_C) foram calculados a partir do valor correspondente do LQ, tendo em conta a relação entre as razões S/N correspondentes. A informação relativa aos limites analíticos encontra-se na Tabela 3-vii.

Tabela 3-vii - Limites de Quantificação (LQ) e Limites de Deteção (LD) de cada analito, do instrumento e do método.

Composto	Instrumental		Método	
	LQ _S (pA)	LD _S (pA)	LQ _C (mg/L)	LD _C (mg/L)
Etanal*	0,055	0,018	0,93	0,31
Acetato de etilo*	0,044	0,015	0,87	0,29
Acetal*	0,054	0,018	1,4	0,48
Metanol*	0,084	0,028	5,0	1,7
2-Butanol	0,048	0,015	0,73	0,24
1-Propanol	0,042	0,013	0,72	0,24
Isobutanol	0,062	0,019	0,72	0,24
1-Butanol*	0,056	0,018	0,47	0,16
2-Metil-1-butanol*	0,040	0,013	0,25	0,082
3-Metil-1-butanol*	0,040	0,013	0,26	0,084

* compostos cujos valores foram obtidos por estimativa, a partir da concentração e sinal do pico de SCN1.

Assim sendo, os limites de quantificação do método apresentam todos valores inferiores ou iguais (no caso dos compostos que não se encontram assinalados) ao próprio padrão da calibração SCN1.

3.6.5. Sensibilidade

Os valores da **sensibilidade** para cada analito encontram-se reunidos na tabela seguinte, Tabela 3-viii, sendo esta o declive respetivo.

Tabela 3-viii - Valores da sensibilidade para cada composto.

Composto	Sensibilidade
Etanal	0,25
Acetato de etilo	0,47
Acetal	0,61
Metanol	0,38
2-Butanol	0,70
1-Propanol	0,70
Isobutanol	0,83
1-Butanol	0,81
2-Metil-1-butanol	0,88
3-Metil-1-butanol	0,94

Analisando os valores obtidos, conclui-se que o cromatógrafo mostra ser mais sensível ao incremento da concentração de analitos como os álcoois amílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol), no entanto a mesma sensibilidade não se verifica no caso do etanal, por exemplo. Ou seja, a propriedade física medida pelo equipamento, a intensidade de corrente, aumenta com uma taxa de variação superior para os álcoois amílicos.

3.6.6. Seletividade e Resolução

Sendo a cromatografia baseada no princípio da **seletividade**, enquanto método de separação, este parâmetro é analisado através de parâmetros próprios, como o fator de seletividade, α , (segundo a equação (15)). Uma vez que o fator de seletividade não permite interpretar a distinção dos picos, mas sim da separação dos centros dos picos, é também importante ter em conta o parâmetro da resolução, R_s , que fornece essa informação extra.

O parâmetro da Resolução, R_s , foi calculado segundo a expressão (35), apresentada de seguida (definida no software do sistema cromatográfico).

$$R_s = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{w_{1/2\ 2} - w_{1/2\ 1}} \quad (35)$$

em que $w_{1/2\ x}$ é a largura do pico a meia altura, estimada pelo próprio software.

Obtiveram-se então os seguintes valores para cada composto, apresentados na Tabela 3-ix, através da média do tempo de retenção e da largura de cada pico – dados retirados das análises realizadas ao padrão SCN1, aquando da avaliação da homogeneidade de variância.

Tabela 3-ix - Valores obtidos para o Fator de separação e Resolução dos picos cromatográficos.

Composto	α	R_s
Etanal	2,5	25,5
Acetato de etilo	1,1	1,5
Acetal	1,1	1,5
Metanol	2,5	2,2
2-Butanol	1,1	5,4
1-Propanol	1,1	5,4
Isobutanol	1,2	24,7
1-Butanol	1,1	27,6
2-Metil-1-butanol	1,0	1,0
3-Metil-1-butanol	1,0	1,0

Um **fator de seletividade** superior a 1 sugere uma separação dos centros dos picos, sendo que tanto maior é a separação dos picos, quanto maior o valor deste fator. É possível aferir que os centros dos picos se encontram separados, por visualização dos valores de α , que foram calculados para cada analito tendo em conta o pico adjacente que se encontrava mais perto do pico do composto.

A **resolução**, segundo o método regulamentado^{29,30}, deveria ser um valor de, no mínimo, 1,3 para todos os compostos, excluindo deste requisito os álcoois amílicos (pois tratam-se de isómeros). Este parâmetro foi também calculado para cada analito em relação ao pico adjacente que se encontrava mais próximo. Uma vez que se obteve uma resolução superior a 1,5 para todos os analitos, conclui-se que os mesmos se encontram bem resolvidos e com uma boa distinção dos picos, à exceção dos álcoois já mencionados.

3.6.7. Precisão

A **precisão** do método foi estudada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia, com recurso a soluções padrão dos analitos, uma vez que as amostras habituais de álcool neutro raramente possuem algum destes compostos na sua constituição.

Para a determinação da **repetibilidade**, (equações (19), (20) e (21)) utilizou-se a informação da homogeneidade de variância, para $n=10$. Tendo em conta a realidade do método em causa – na qual os praticamente todos os padrões da calibração SCN1 já correspondem ao limite legal máximo e onde as amostras raramente apresentam concentrações expressivas dos analitos – utilizou-se apenas a informação de SCN1. Para aferir algo acerca da presença de valores aberrantes, foi aplicado o teste de *Grubbs* como descrito anteriormente em 3.6.2, no qual nenhum valor foi rejeitado. Na Tabela 3-x, está reunida a informação relativa à repetibilidade – o desvio padrão (s_r), coeficiente de variação (CV), limite de repetibilidade em absoluto (rL) e relativo (rL').

Tabela 3-x - Valores quantitativos da repetibilidade, determinada para cada analito, pelo desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade.

Composto	s_r (mg/L)	CV (%)	rL (mg/L)	rL' (%)
Etanal	0,1961	4,2	0,55	12
Acetato de etilo	0,0910	2,7	0,25	8
Acetal	0,1260	3,6	0,35	10
Metanol	0,0957	0,77	0,27	2
2-Butanol	0,0377	4,6	0,11	13
1-Propanol	0,0409	4,9	0,11	14
Isobutanol	0,0416	4,9	0,12	14
1-Butanol	0,0413	5,0	0,12	14
2-Metil-1-butanol	0,0518	5,0	0,15	14
3-Metil-1-butanol	0,0486	5,3	0,14	15

No presente método, a determinação destes dez compostos implicou a utilização de concentrações baixas, com o padrão SCN1 abaixo de 1 mg/L nos compostos desde o 2-butanol ao 3-metil-1-butanol. Para estas condições, os valores obtidos em termos de coeficiente de variação já rondam os 5 % em condições de repetibilidade. Além disso, o software não prevê a integração automática nestes termos, havendo alguma variabilidade associada também a este aspeto. Os limites de repetibilidade, em

percentagem, encontram-se maioritariamente próximos dos 15 %, o que significa que as concentrações de duplicados analisados não devem diferir mais de 15 % entre si. Os compostos que estão associados a variações mais expressivas são os que possuem concentrações inferiores a 1 mg/L e o etanal, que é o composto mais volátil e aquele a que está associada uma maior dificuldade no manuseamento.

De forma a obter um termo de **comparação** para os valores quantitativos da repetibilidade, teve-se em conta os resultados estatísticos de um teste interlaboratorial realizado no âmbito do método do Regulamento (CE) n.º 2870/2000³⁰. Como já referido, este regulamento foi direccionado primeiramente para bebidas espirituosas, que possuem um TAV inferior ao álcool neutro, e cujas amostras possuem em geral concentrações mais significativas dos 10 compostos. Os valores de CV e rL' do teste interlaboratorial foram organizados na Tabela 3-xi, bem como os valores obtidos neste relatório para o álcool neutro (CV_{AN} e rL'_{AN}). Está especificada também a amostra utilizada para a comparação, cuja concentração era a mais baixa e mais semelhante à do padrão SCN1.

Tabela 3-xi - Valores quantitativos da repetibilidade do método para Bebidas Espirituosas do Regulamento (CE) n.º 2870/2000 e comparação dos valores com o método para o Álcool Neutro.

Composto	Amostra	Concentração média (µg/g)	CV (%)	CV_{AN} (%)	rL' (%)	rL'_{AN} (%)
Etanal	D	25,9	16	4,2	45	12
Acetato de etilo	A	96,8	2,3	2,7	6	8
Acetal	D	13,4	6,1	3,6	17	10
Metanol	E	23,2	5,6	0,77	16	2
2-Butanol	A	5,9	6,8	4,6	19	13
1-Propanol	A	86,4	3,4	4,9	10	14
Isobutanol	A	3,8	11	4,9	29	14
1-Butanol	B	111,7	1,4	5,0	4	14
2-Metil-1-butanol	B	48,3	3,1	5,0	9	14
3-Metil-1-butanol	D	133,3	1,8	5,3	5	15

Na tabela anterior, observa-se que, em primeiro lugar, o etanal, está associado uma maior variabilidade, o que não suscita dúvidas, uma vez que é o composto mais difícil de manusear por apresentar um ponto de ebulição próximo dos 20 °C. Para os compostos em que CV e rL' estão a negrito, verificou-se que os mesmos são superiores

ou muito semelhantes aos obtidos neste relatório, para o álcool neutro. Além disso, tendo em conta que, em termos relativos, uma menor concentração está normalmente associada a maior variabilidade, pode-se concluir que a quantificação da repetibilidade no método para o álcool neutro foi muito satisfatória, por comparação.

Relativamente à **precisão intermédia**, o padrão utilizado foi de concentração ligeiramente acima do SCN1 e o fator que contribuiu para a variação foi o tempo. Novamente, os valores foram sujeitos a um teste de *Grubbs*, como mencionado anteriormente, e nenhum destes foi rejeitado. As análises foram realizadas em duplicado, com o devido controlo através do limite de repetibilidade determinado. A Tabela 3-xii contém a informação acerca deste parâmetro, o desvio padrão (s_{pi}), o coeficiente de variação (CV) e o limite de precisão intermédia absoluto (piL) e relativo (piL'), calculados através das equações (19) (adaptada para s_{pi}), (20) e (23), respetivamente.

Tabela 3-xii - Valores quantitativos da precisão intermédia, determinada para cada analito, pelo desvio padrão, coeficiente de variação e limite de precisão intermédia.

Composto	s_{pi} (mg/L)	CV (%)	piL (mg/L)	piL' (%)
Etanal	0,656	10	1,8	28
Acetato de etilo	0,510	7,0	1,4	19
Acetal	0,343	5,1	0,96	14
Metanol	0,574	2,2	1,6	6
2-Butanol	0,098	6,2	0,27	17
1-Propanol	0,115	6,7	0,32	19
Isobutanol	0,111	7,0	0,31	20
1-Butanol	0,099	6,7	0,28	19
2-Metil-1-butanol	0,119	6,2	0,33	17
3-Metil-1-butanol	0,123	6,7	0,35	19

Para a determinação da precisão intermédia, o ideal seria ter-se $n \geq 15$, no entanto, não foi possível concretizar esta recomendação devido a problemas técnicos associados ao equipamento. Dentro das possibilidades, os resultados foram recolhidos no espaço de cerca de uma semana, em dias diferentes, tendo-se $n=5$. Como seria expectável, os valores obtidos para a precisão intermédia são mais expressivos

comparativamente aos da repetibilidade, sendo que neste caso os limites de precisão intermédia sobem, em geral, para perto dos 20 %.

Verifica-se, novamente, que o etanal é o composto que apresenta maior variabilidade nas medições de concentração. Além da questão da integração do software já mencionada, o etanal possui um ponto de ebulição de aproximadamente 20 °C, pelo que este composto está bastante suscetível a perdas entre o seu armazenamento a frio (em *vials*, entre 2 e 8 °C) e as suas análises. Além disso, verificou-se na prática alguma instabilidade por parte do mesmo, que poderia estar associada a interações com o solvente (etanol a 96 % Vol.), com outro composto ou com a perda do solvente por evaporação. Por sua vez, o metanol não está associado a tanta variabilidade, em termos relativos, uma vez que a sua concentração de SCN1, comparativamente à dos restantes compostos, é superior.

Tendo-se a informação da precisão, é possível quantificar a incerteza padrão da precisão, $u_{\text{precisão}}$, expressa em condições de precisão intermédia, em que $u_{\text{precisão}} = s_{pi}$. Na Tabela 3-xiii, temos esta incerteza absoluta e relativa.

Tabela 3-xiii - Valores da incerteza padrão de precisão para cada analito, em absoluto e relativo.

Composto	$u_{\text{precisão}}$ (mg/L)	$u'_{\text{precisão}}$ (%)
Etanal	0,656	10
Acetato de etilo	0,510	7,0
Acetal	0,343	5,1
Metanol	0,574	2,2
2-Butanol	0,098	6,2
1-Propanol	0,115	6,7
Isobutanol	0,111	7,0
1-Butanol	0,099	6,7
2-Metil-1-butanol	0,119	6,2
3-Metil-1-butanol	0,123	6,7

3.6.8. Veracidade

O estudo da **veracidade** foi realizado através de **Ensaio de Recuperação**, de acordo com as possibilidades do laboratório. Procedeu-se à fortificação a três níveis de concentração em amostras sem concentração nativa de qualquer um dos compostos.

Na Tabela 3-xiv, encontram-se os dados recolhidos para cada analito, na qual a solução de fortificação de cada nível foi analisada em duplicado e as percentagens de recuperação calculadas de acordo com a equação (17).

Tabela 3-xiv - Ensaíos de Recuperação de uma amostra sem analitos nativos a 3 níveis de concentração, para estudo da veracidade.

Composto	Níveis	C_{fortificada} (mg/L)	Concentração obtida média (mg/L)	Recuperação (%)
Etanal	1	6,51	5,27	80,8
	2	16,29	15,3	94,3
	3	29,31	26,8	91,4
Acetato de etilo	1	6,51	6,26	96,1
	2	16,28	15,8	97,1
	3	29,31	28,3	96,4
Acetal	1	6,42	6,21	96,7
	2	16,05	15,5	96,6
	3	28,89	27,6	95,7
Metanol	1	25,01	25,10	100
	2	62,54	61,6	98,6
	3	112,57	109,6	97,3
2-Butanol	1	1,50	1,51	101
	2	3,75	3,57	95,2
	3	6,74	6,30	93,4
1-Propanol	1	1,46	1,55	107
	2	3,64	3,58	98,3
	3	6,55	6,09	93,0
Isobutanol	1	1,50	1,55	103
	2	3,75	3,62	96,5
	3	6,75	6,26	92,7
1-Butanol	1	1,49	1,48	99,6
	2	3,72	3,59	96,5
	3	6,70	6,32	94,4
2-Metil-1-butanol	1	1,93	1,94	100
	2	4,84	4,72	97,5
	3	8,70	8,39	96,4
3-Metil-1-butanol	1	1,74	1,92	101
	2	4,36	4,50	103
	3	7,85	8,31	106

Enquanto método que inclui o manuseamento de compostos voláteis, com destaque para o etanal cujo ponto de ebulição é próximo da temperatura do laboratório, o intervalo de recuperação para aceitar os ensaios de recuperação foi definido pelo laboratório (tendo em conta o histórico de ensaios). Assim, aceitam-se as recuperações que estão entre **70 e 110 %**, principalmente pela possibilidade de ocorrerem perdas de composto na preparação das soluções, levando à obtenção de recuperações baixas. Assim sendo, tendo em conta este critério, todas as percentagens de recuperação respeitam o intervalo imposto.

Através das percentagens de Recuperação obtidas, calculou-se a incerteza padrão da veracidade, $u_{veracidade}$, de acordo com a equação (24), pelo cálculo da recuperação média dos níveis ($\bar{R}(\%)$) para cada composto (sendo a veracidade definida enquanto a proximidade de uma média de resultados ao valor de referência). Envolveu ainda o cálculo da variância das recuperações dos três níveis ($s_{Ri}^2(\%)$) e a incerteza associada à concentração da solução preparada para a fortificação ($u(C_{fortificada})$). Esta incerteza foi determinada por meio de modelação, atentando aos vários passos e materiais envolventes na preparação da solução em causa. Os valores intermédios encontram-se no Anexo 3 – Cálculos incertezas padrão da veracidade, sendo que as informações necessárias para o cálculo das incertezas dos materiais volumétricos e de medição de massa (equações (25) (26)) estão presentes nos certificados de calibração, no Anexo 4 – Certificados de calibração. Desta forma, obteve-se para cada composto, $u_{veracidade}$, em percentagem de recuperação, assim como o seu valor em termos relativos em percentagem, $u'_{veracidade}$, reunidos Tabela 3-xv.

Tabela 3-xv - Valores da incerteza padrão de veracidade para cada analito.

Composto	$u_{veracidade}$ (%)	$u'_{veracidade}$ (%)
Etanal	4,09	4,6
Acetato de etilo	0,51	0,5
Acetal	0,53	0,6
Metanol	0,98	1,0
2-Butanol	2,31	2,4
1-Propanol	4,03	4,1
Isobutanol	3,19	3,3
1-Butanol	1,56	1,6
2-Metil-1-butanol	1,18	1,2
3-Metil-1-butanol	1,39	1,4

3.6.9. Exatidão e quantificação da incerteza

A **exatidão** é definida como sendo a combinação dos componentes de erros aleatórios e dos componentes de erros sistemáticos. A sua expressão em termos quantitativos é apresentada como a **incerteza padrão combinada**, u (equação (27)).

De forma relativa em percentagem, esta incerteza, u' , seria quantificada como na equação (27), no entanto sem a multiplicação do valor de y (valor de concentração). A incerteza expandida, igualmente em termos relativos em percentagem, U' , compreende a multiplicação de u' pelo fator $k = 2$ (equação (28)). Na Tabela 3-xvi, estão apresentados os valores das incertezas combinadas em termos relativos para cada analito.

Tabela 3-xvi - Valores da incerteza padrão combinada e da incerteza expandida em percentagem, para cada analito.

Composto	u' (%)	U' (%)
Etanal	11	22
Acetato de etilo	7	14
Acetal	5	10
Metanol	2	5
2-Butanol	7	13
1-Propanol	8	16
Isobutanol	8	15
1-Butanol	7	14
2-Metil-1-butanol	6	13
3-Metil-1-butanol	7	14

Verificou-se que a componente que mais contribuiu para a incerteza padrão combinada, para todos os analitos, foi a componente associada aos erros aleatórios, $u_{\text{precisão}}$. A abordagem utilizada para avaliação da veracidade (ensaios de recuperação) não incorpora uma dispersão muito significativa, como se poderia obter num ensaio interlaboratorial, e obteve-se um valor muito baixo da incerteza padrão da veracidade, por comparação com o valor da incerteza padrão da precisão. A determinação destas incertezas em termos absolutos não foi possível, uma vez que não existia no laboratório nenhuma amostra com a presença destas substâncias.

Os resultados emitidos deste conjunto de compostos são fornecidos por grupos: os aldeídos (etanal e acetal), os ésteres (acetato de etilo), os álcoois superiores totais

(2-butanol, 1-propanol, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e o metanol. Expressos como um somatório, para que o resultado de cada grupo seja fornecido com a devida incerteza, as incertezas individuais relativas foram tidas em conta, segundo a propagação de incertezas da equação (36):

$$u'_{total} = \sqrt{u'^2_1 + u'^2_2 + \dots + u'^2_n} \quad (36)$$

em que a incerteza de todo o somatório inclui as incertezas individuais de 1 a n.

Tem-se, por fim, as incertezas padrão combinadas e as incertezas expandidas obtidas para cada grupo, reunidas na Tabela 3-xvii.

Tabela 3-xvii - Valores das incertezas padrão combinadas e das incertezas expandidas em percentagem calculadas por grupo de compostos.

Composto	u' (%)	U' (%)
Aldeídos	12	24
Ésteres	7	14
Álcoois Superiores Totais	17	35
Metanol	2	5

4. Vinho Madeira – Determinação de ácido sórbico por Espectrofotometria UV-Vis

4.1. Ácido sórbico

Na área da enologia, existem diversos produtos usados para proceder a tratamentos de controlo do crescimento de microrganismos, como conservantes e antifúngicos. A estabilização a nível microbiano pode ser conseguida com dióxido de enxofre (SO₂), o composto mais empregue neste campo, no entanto, existem ainda outros produtos enológicos para estas funções. Os **agentes antifúngicos e antissépticos** têm como objetivo, não propriamente eliminar todos os microrganismos, mas sim impedir o crescimento dos mesmos a níveis inadequados para posterior consumo humano.^{21,32}

O **ácido sórbico** (ácido trans,trans-hexa-2,4-dienóico, C₆H₈O₂) é um exemplo de um agente conservante com ação antifúngica, ou seja, inibidor do crescimento de leveduras e fungos, não sendo tão eficiente no controlo de bactérias. A sua estrutura química, representada na Figura 4-i, inclui o grupo funcional carboxilo, tratando-se de um ácido orgânico fraco. Este é um aditivo alimentar utilizado não só na produção vitivinícola, como também na restante indústria alimentar e de bebidas, com a vantagem de ser incolor e praticamente impercetível. Enquanto aditivo considerado seguro pela *Food and Drug Administration*, além de ser aplicado na área alimentar, o ácido sórbico pode também ser utilizado em produtos farmacêuticos com um caráter conservante, bem como a um nível estético e de estabilidade.^{32,42,43} À parte das suas claras vantagens, o ácido sórbico pode, contudo, reagir com polifenóis originados no processo de fermentação em vinhos, alterando as propriedades sensoriais do vinho e comprometendo, portanto, o aroma, sabor e cor.³²

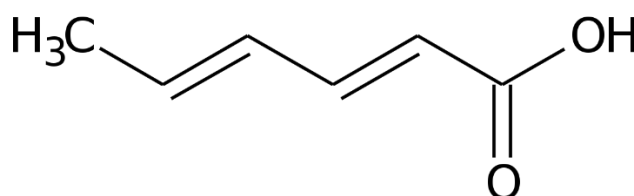


Figura 4-i - Estrutura química do ácido sórbico.

O mecanismo de ação deste composto, enquanto agente conservante, resume-se na inibição da atividade enzimática de microrganismos. Os conservantes de ácidos fracos existem em solução num estado de equilíbrio entre o ácido (no caso do ácido sórbico, C_5H_7-COOH) e o anião respetivo (anião sorbato, $C_5H_7-COO^-$). A um pH baixo o ácido sórbico é mais eficaz, tem-se em maior quantidade a forma não ionizada, que sendo mais lipossolúvel, penetra facilmente a membrana. Após permear a membrana, a difusão da molécula na célula do microrganismo ocorre até que se atinja um equilíbrio de acordo com o gradiente de pH e como resultado, há uma acumulação de aniões e protões no interior. A ação inibitória do ácido sórbico é, sendo assim, devido a uma provável acumulação de iões tóxicos, stress intracelular ou ainda consequente inibição de reações metabólicas essenciais ao microrganismo. Deste modo, a atividade deste tipo de antimicrobianos, segundo resultados de diversos estudos, apesar de ainda não completamente esclarecida, está associada ao grupo funcional carboxilo ($-COOH$) presente em ácidos orgânicos.^{42,43}

Segundo recomendações da OIV e de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1333/2008⁴⁴, o limite máximo de concentração admitida deste conservante em vinhos é de 200 mg/L.

4.2. Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis

O conceito de colorimetria, atualmente, advém da sua prática numa altura em que a análise do processo (absorção de luz visível) era visual através de uma comparação de cores entre a amostra e a referência, com recurso a um prisma de reflexão total. Posteriormente, no final do século XIX, a lei de Lambert-Beer vem estabelecer uma relação matemática entre a concentração e a absorvância. Permitiu que, através da absorvância (A) registada (por meio da transmitância, T , $A = -\log T$), se obtenha a concentração (C) do composto, segundo a expressão $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ (em que ε é a absortividade molar e l o percurso ótico). Os aparelhos deste tipo de métodos, nos dias de hoje, obtêm gráficos com informação da transmitância (razão entre a intensidade da luz transmitida e a intensidade da luz incidente do próprio feixe) para então obter os valores de absorvância. A aplicação desta lei sucede até o presente por quem recorre a análise química em técnicas espectrofotométricas.^{45,46}

Em geral, a **Espectrofotometria** tem como finalidade a determinação de concentrações de compostos com recurso à luz e evoluiu a partir da colorimetria de outros tempos. Tendo em conta a dualidade onda-partícula, quando se fala em Energia

(E), a luz é descrita como fotões de determinada frequência (ν), apresentando um comportamento típico de uma partícula. O seu comportamento ondulatório, por sua vez, está relacionado com um campo magnético, em que a radiação apresenta um comprimento de onda (λ), sendo este campo perpendicular ao campo elétrico. Consoante a frequência e o comprimento de onda, o espectro eletromagnético é dividido em regiões, no qual se incluem a radiação **Ultravioleta** (num intervalo espectral aproximado de $10 < \lambda < 380$ nm) e a radiação **Visível** (de seguida no espectro até, aproximadamente, $\lambda = 800$ nm).^{46,47}

O recurso à Espectrofotometria de Radiação Ultravioleta (UV) e Visível (Vis), em que se determina a concentração do analito com base na absorção de radiação nestas gamas, é muito comum e diversos são os métodos analíticos utilizados para este tipo de quantificação. Sendo elevado o número de compostos orgânicos e inorgânicos que absorvem radiação UV e/ou Vis, a técnica Espectrofotométrica de Absorção Molecular nesta região é de facto amplamente utilizada. Aliada à simplicidade que apresenta, a sua procura justifica-se ainda pela possibilidade de ajustar condições experimentais, sendo exemplo a obtenção de derivados dos compostos de interesse para proceder à análise quando estes não absorvem a radiação em causa.³⁴

O equipamento típico utilizado é um espectrofotómetro que possui, no caso mais simples de um feixe único, uma fonte de luz, um monocromador (que separa a radiação proveniente da fonte de radiação), a célula onde se coloca a amostra e o detetor com a célula fotoelétrica.^{33,45,48}

As fontes de luz na Espectrofotometria UV-Vis são comumente uma lâmpada de hidrogénio e deutério ($160 < \lambda < 380$ nm) com uma lâmpada de tungsténio ($240 < \lambda < 2500$ nm). O monocromador, por sua vez, tem como função separar a radiação em vários comprimentos de onda (dependendo da sua resolução), para que depois seja selecionado apenas o comprimento onde deve ocorrer a absorção de radiação por parte da amostra. A célula da amostra é constituída por quartzo, já que o material é transparente tanto na zona UV como na zona Visível – não há absorção por parte do quartzo ou não é significativa nestas zonas do espectro eletromagnético.^{33,34,49}

Existe ainda o espectrofotómetro de feixe duplo, esquematizado na Figura 4-ii, que inclui a comparação do sinal obtido da célula da amostra com o sinal de uma célula de referência, no qual se pretende descontar a absorção de radiação por parte do solvente utilizado ou outras interferências. É o caso do método deste capítulo, em que o equipamento é de feixe duplo (o feixe da fonte de luz é dividido através de um espelho,

por exemplo) e no qual se desconta o sinal do solvente usado, a água. A água pode absorver alguma da radiação na zona UV, devido à presença da ligação O–H, pelo que neste equipamento, o sinal lido não sofre influência da mesma.^{33,34,49}

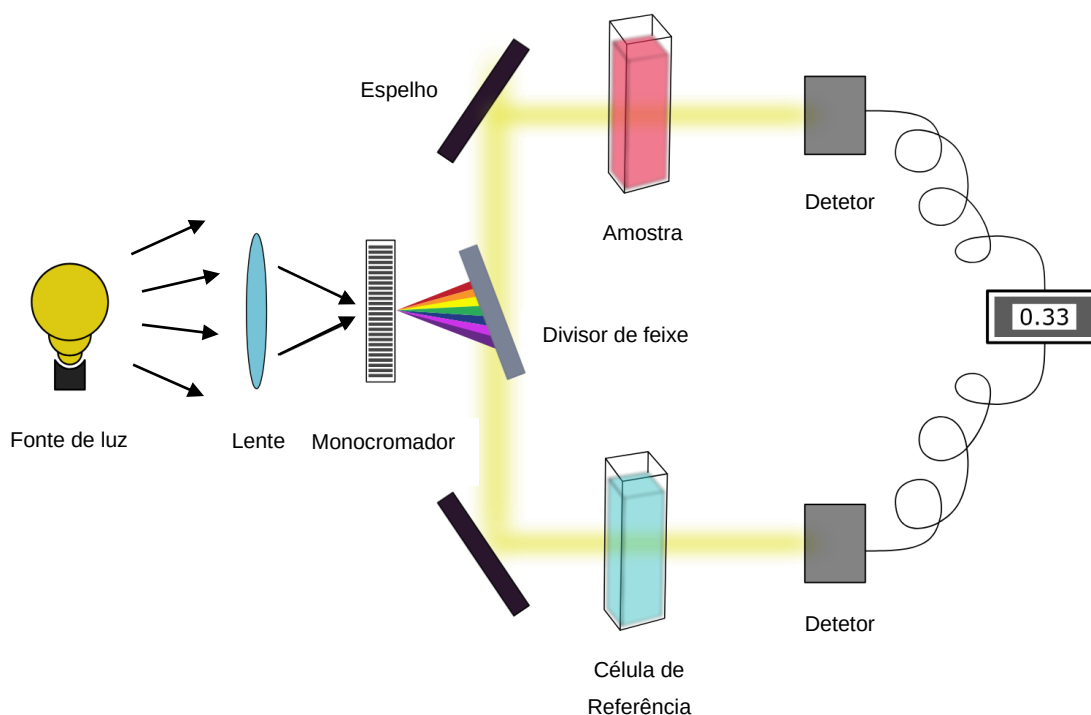


Figura 4-ii - Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. Imagem de livre acesso, adaptada de e acedida em ⁴⁹, a 01 de agosto de 2023.

Para a determinação do ácido sórbico em vinhos recorre-se a esta técnica. O fenómeno em que a mesma se baseia, ocorre através da absorção de um fotão e consequente incremento energético da molécula, que é promovida a um estado excitado. Mais concretamente, a radiação Ultravioleta e Visível promove os eletrões envolvidos nas ligações químicas a orbitais de energia mais elevada e as espécies com a capacidade para sofrer este processo podem ser orgânicas ou inorgânicas. Na qualidade de **composto orgânico**, a maioria dos compostos estudados nesta área, a energia absorvida tem de corresponder obrigatoriamente à diferença de energia entre uma orbital preenchida e uma orbital vazia. Estas transições envolvem eletrões de orbitais σ ou π ou ainda orbitais não ligantes n com eletrões de átomos leves como o hidrogénio (H), nitrogénio (N) e oxigénio (O) e ainda enxofre (S) e cloro (Cl). São

possíveis transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, como esquematizado na figura seguinte (Figura 4-iii).

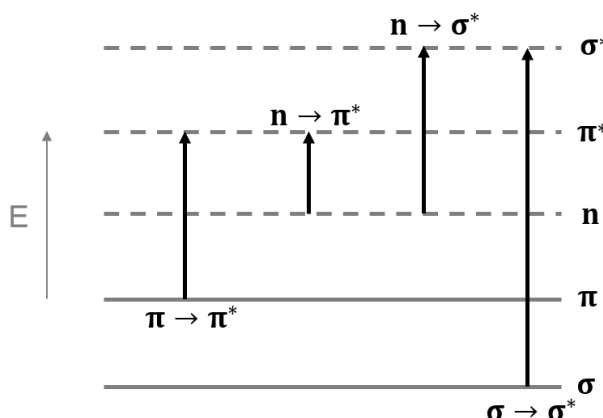


Figura 4-iii - Esquema ilustrativo dos quatro tipos de transições eletrônicas em moléculas orgânicas.

Segundo este esquema, a transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é estabelecida como sendo a que implica uma maior quantidade de energia para a passagem do eletrão desde a orbital molecular σ ligante à orbital molecular σ^* antiligante. É a transição tipicamente encontrada em hidrocarbonetos saturados, que apenas apresentam este tipo de ligação C–C e que ocorre, portanto, na zona UV de menor comprimento de onda (mais energética, $E \propto 1/\lambda$). A transição $n \rightarrow \sigma^*$, por sua vez envolve eletrões n não compartilhados de átomos como N, O, S e átomos de halogéneos como o Cl. Não possui um valor energético tão alto como a anterior, no entanto é ainda uma transição de intensidade moderada e comprimentos de onda entre os 180 a 220 nm, que se observa em álcoois, éteres, derivados de halogéneos e aminas. De menor intensidade, a transição $n \rightarrow \pi^*$ resulta da passagem de um eletrão n não compartilhado numa orbital molecular não ligante para a orbital antiligante π^* . Esta orbital fica disponível e é tipicamente observada em sistemas hidrocarbonados insaturados, com ligações múltiplas e estruturas de ressonância, em que está inserido um heteroátomo com eletrões n , como num grupo C=O, C=S ou N=O, por exemplo. Sendo menos energética, esta passagem deverá refletir-se em comprimentos de onda superiores, até perto dos 300 nm. Chegando à transição $\pi \rightarrow \pi^*$, o grau de insaturação é igualmente importante para que a mesma ocorra e estão em causa compostos como alcenos, alcinos, compostos aromáticos, ou seja grupos cromóforos que podem ou não estar conjugados. A passagem de eletrões neste caso também pode envolver heteroátomos, no entanto, apresenta um maior nível energético em comparação com a transição anterior. ^{33,45,46,50}

Por fim, as **espécies inorgânicas** podem também absorver radiação, envolvendo transições $d \rightarrow d$ que ocorrem em sais inorgânicos com eletrões presentes em orbitais d parcialmente preenchidas. Responsável por uma absorção fraca, de energia mais baixa, a transição localiza-se na zona Visível do espectro, logo, atribui cor perceptível às soluções destes compostos (por exemplo, um complexo octaedro de Co (II) com 6 moléculas de H_2O). Pode ocorrer ainda **transferência de carga** nestes complexos quando a absorção de radiação leva à passagem de um eletrão dos ligandos (por exemplo, H_2O) para o metal de transição (por exemplo, Co (II)), ou vice-versa.^{33,45,46}

O ácido sórbico absorve radiação Ultravioleta numa zona do espectro que corresponde a uma menor energia, pelo que no método do presente capítulo, a absorvância é registada a $\lambda = 256$ nm. Tendo em conta a estrutura química do composto (Figura 4-i), a transição provavelmente responsável pela absorção de radiação será a transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ que envolve o heteroátomo oxigénio do grupo carboxilo ($C=O$) num sistema insaturado.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Princípio do método

A determinação do ácido sórbico em vinho é realizada por meio de espectrofotometria de absorção ultravioleta, passando previamente por uma extração por destilação por arraste de vapor, segundo as indicações do OIV-MA-AS313-14A⁵¹, inserido no Compêndio Internacional dos Métodos de Análise de Vinhos e Mostos – OIV. Entre o início do processo em que é realizada a destilação de 10,00 mL de vinho e recolhidos 250,0 mL de destilado (com um aumento de volume derivado do vapor condensado que foi utilizado no arraste). Ainda é feita uma diluição de 5,00 mL do destilado para um balão de 20,00 mL (completou-se o volume com água), de onde, por fim, se retira uma parte para leitura no equipamento. Assim sendo, há uma diluição de fator = 100. A leitura é realizada a um comprimento de onda na gama Ultravioleta a $\lambda = 256$ nm.

4.3.2. Reagentes e equipamentos

Para este método são utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido tartárico cristalino (FarmaQuímica Sur S.L., FQS)
- Solução padrão de ácido sórbico, 20 mg/L.

Os equipamentos necessários foram:

- Balança Analítica (Mettler Toledo modelo ME204T 00 ($\pm 0,0001$ g))
- Aparelho de Destilação por arraste de vapor (Laboratories Dujardin-Salleron (LDS), D.E. 2000) (Figura 4-iv)
- Espectrofotómetro de Absorção Molecular UV-Vis de feixe duplo (leitura da absorvância a 256 nm e célula de quartzo com um percurso ótico de 1 cm), (PerkinElmer Lambda 365) (Figura 4-iv).



Figura 4-iv – Fotografias dos equipamentos Aparelho por destilação a vapor (esquerda) e Espectrofotómetro de Absorção Molecular UV-Visível (direita).

4.4. Resultados obtidos e discussão – Validação do método

Neste trabalho, a **validação do método quantitativo** para a determinação de ácido sórbico em Vinho Madeira compreendeu uma análise de **parâmetros**, sendo estes: homogeneidade de variâncias, linearidade, limites analíticos, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão. Este capítulo será, portanto, espaço para análise e discussão dos resultados obtidos nestes termos.

4.4.1. Gama de trabalho e curva de calibração

A gama de trabalho escolhida é a sugerida pelo método OIV-MA-AS313-14A⁵¹. Como o limite máximo permitido por lei num vinho é de 200 mg/L de ácido sórbico e, uma vez que, no processo a amostra sofre uma diluição com um fator = 100, a **gama de trabalho** está estipulada entre **0,5 e 5 mg/L de ácido sórbico**.

Assim sendo, foi desenhada a curva de calibração com 4 pontos, cujas concentrações e respetivas absorvâncias se encontram apresentadas na Tabela 4-i.

Tabela 4-i - Dados para curva de calibração do Ácido Sórbico.

Eixo xx - Concentração (mg/L)	Eixo yy – Absorvância (u.a.)
0,50	0,1125
1,0	0,2255
2,5	0,5467
5,0	1,0974

Os dados da calibração foram utilizados para ser desenhado o gráfico da curva de calibração da Figura 4-v, tendo-se obtido a equação **$y = 0,2185x + 0,00405$** com um coeficiente de determinação bem elevado, $r^2 = 0,99998$, sugerindo um excelente ajuste dos pontos à reta.

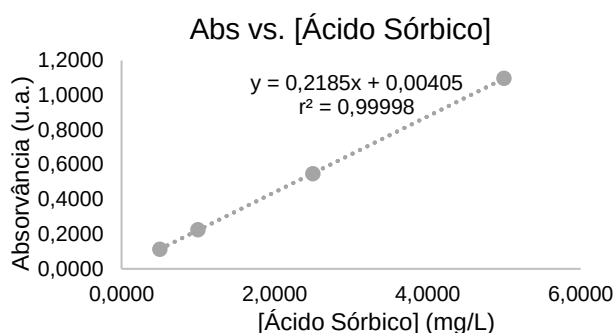


Figura 4-v - Gráfico da curva de calibração da absorvância em função da concentração de ácido sórbico.

4.4.2. Homogeneidade de variâncias

Depois de desenhada a curva de calibração, foi realizada a avaliação da **homogeneidade de variâncias do sinal analítico** ao longo da gama de trabalho, sendo que para isso se realizaram 10 leituras de absorvância de cada um dos padrões limite (o inferior – SCN1 e o superior – SCN4). Foi realizado um teste para detetar valores aberrantes e para esse efeito foi usado o Teste de *Grubbs*, em que se compararam os valores calculados de *G* (equações (30) e (31)) com os valores tabelados. O teste *F* foi aplicado para aferir o resultado. Na Tabela 4-ii, temos os valores de ambos os testes e respetivas conclusões.

Tabela 4-ii - Teste *F* para avaliar a homoscedasticidade da curva de calibração.

s (u.a.)		SCN1	SCN4
		0,0006	0,0030
Teste de Grubbs	mínimo	0,111	1,087
	máximo	0,113	1,096
	média	0,112	1,091
	G1	1,696	1,284
	Gp	1,463	1,759
	G _{tabelado} (0,05;10)	2,290	
	G _{tabelado} (0,01;10)	2,480	
Teste F	Decisão	Não rejeitar	Não rejeitar
	<i>F_{experimental}</i>	0,040	
	<i>F_{tabelado}</i>	5,351	
	Decisão	Curva homoscedástica	

Assim, verificou-se que, uma vez que $F_{experimental} < F_{tabelado}$, a curva é homoscedástica, há homogeneidade de variâncias do sinal analítico e a gama de trabalho está bem ajustada.

4.4.3. Linearidade

Assim como no método do álcool neutro, para a avaliação da **linearidade**, foi realizado o Teste de Mendel, em que se obteve o VT calculado a partir das variâncias quer dos resíduos do ajuste de grau 1 (AG1) quer dos de grau 2 (AG2). De seguida, conforme na Tabela 4-iii, comparou-se o VT com um valor de $F_{tabelado}$ da distribuição de Fisher e o que se verificou foi que, uma vez que $VT < F_{tabelado}$, os pontos utilizados são adequadamente ajustados por uma reta, ou seja verifica-se um ajuste linear. Observa-se ainda que a variância dos resíduos do ajuste de grau 1 chega a ser mais baixa que a correspondente ao ajuste de grau 2.

Tabela 4-iii - Avaliação da linearidade pelo Teste de Mendel.

AG1	AG2	DS^2	VT	$F_{tabelado}$	Decisão
$s^2_{y/x(1)}$ (u.a.)	$s^2_{y/x(2)}$ (u.a.)				
1,14E-5	1,63E-5	6,54E-6	0,4	98,5	Ajuste linear

4.4.4. Limites analíticos

A estimativa dos **limites analíticos** da técnica (LD_s e LQ_s) e do método (LD_c e LQ_c) foi feita através da análise de brancos (sinal correspondente ao solvente utilizado, a água) e respetivo desvio padrão associado (s_0). Registaram-se os valores de absorvância de 10 leituras de um branco e procedeu-se ao cálculo dos limites, inseridos na Tabela 4-iv, de acordo com as equações (6) e (11).

Tabela 4-iv - Determinação dos Limites Analíticos da técnica e do método a partir de ensaios do branco.

Sinal do detetor		Técnica		Método	
Média (u.a.)	s_0 (u.a.)	LD_s (u.a.)	LQ_s (u.a.)	LD_c (mg/L)	LQ_c (mg/L)
0,0027	0,0012	0,0068	0,0150	0,019	0,056

4.4.5. Sensibilidade

A **sensibilidade** pode ser analisada quanto à técnica instrumental, refletindo-se, como referido no subcapítulo 2.4, no declive da curva de calibração, ou seja, é a taxa de variação do sinal analítico à medida que há um incremento na concentração do analito (equação (14)). O valor para a sensibilidade toma então um valor de 0,2185 L/mg.

4.4.6. Seletividade

Para o estudo da **seletividade**, foram realizados ensaios de recuperação a três níveis de fortificação (preparados previamente à destilação) numa amostra com uma concentração nativa de ácido sórbico de cerca de 75 mg/L. As percentagens de recuperação foram calculadas de acordo com a equação (17) e encontram-se discriminadas na Tabela 4-v.

Tabela 4-v - Ensaios de recuperação numa amostra para estudo da seletividade.

Níveis	C _{fortificada} (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)		Média (mg/L)	Recuperação (%)
C _{nativa}	-----	75,1	75,0	75,0	-----
Nível 1	5,0	80,0	79,9	80,0	98,5
Nível 2	50,0	123,1	123,2	123,2	96,3
Nível 3	125,0	194,6	194,5	194,6	95,6

Os valores de percentagem de recuperação aos 3 níveis de fortificação estão inseridos num intervalo entre **90 e 107 %**, logo, conclui-se que este método é seletivo para o ácido sórbico, de acordo com a informação da Tabela 2-i.

4.4.7. Precisão

A validação deste método, a nível da **precisão**, compreende a sua avaliação em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, uma vez que o desempenho do laboratório é avaliado em ambiente intralaboratorial.

A **repetibilidade** foi avaliada pela análise de uma amostra **A** (vinho licoroso) para uma série de valores lidos num só dia (n=10). Para tal, determinou-se o desvio padrão (s_r), o coeficiente de variação (CV) e o limite de repetibilidade absoluto (rL) e relativo

(rL'), através das equações (19), (20) e (21), respetivamente. O conjunto de valores obtidos foi sujeito a um Teste de *Grubbs* para avaliação de *outliers*, como mencionado em 4.4.2, e o que se obteve encontra-se na Tabela 4-vi.

Tabela 4-vi - Valores quantitativos da repetibilidade expresso em desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade.

Amostra		A
Teste de <i>Grubbs</i>	mínimo	47,79
	máximo	51,39
	média	49,26
	G1	1,563
	Gp	-2,272
	G(0,05;10)	2,290
	G(0,01;10)	2,480
	Decisão	Não rejeitar
Repetibilidade	s_r (mg/L)	0,94
	CV (%)	1,6
	rL (mg/L)	2,6
	rL' (%)	5

A amostra **A** apresenta uma média de concentração de ácido sórbico 49,26 mg/L e nenhum dos resultados recolhidos foi rejeitado ou considerado aberrante. Obteve-se um coeficiente de variação de 1,6 % e o limite de repetibilidade calculado foi de 2,6 mg/L, que em percentagem deu um valor de 5 %. O valor do limite de repetibilidade relativo de 5 % está concordante com o valor num método idêntico, para a determinação de ácido sórbico, validado no laboratório (método não acreditado).

A **precisão intermédia**, por sua vez, foi avaliada pela análise das amostras **A** e **B** (igualmente de vinho licoroso), com a diferença de a recolha dos valores ter sido feita ao longo de 3 meses, num total de 11 análises realizadas em duplicado. Os valores foram igualmente sujeitos ao Teste de *Grubbs*, como já mencionado, e os duplicados foram controlados através do limite de repetibilidade que foi determinado. O desvio padrão ponderado (s_{pi}) foi determinado utilizando a equação (22), o coeficiente de variação (CV) determinado segundo a equação (20) e o limite de precisão intermédia

em absoluto (piL) e relativo (piL') calculado pela equação (23), estando estes apresentados na Tabela 4-vii.

Tabela 4-vii - Valores quantitativos da precisão intermédia, expressos em desvio padrão, coeficiente de variação e limite de precisão intermédia.

Amostra		A	B
Teste de Grubbs	mínimo	47,14	190,54
	máximo	52,12	198,99
	média	49,81	193,98
	G1	2,088	1,300
	Gp	-1,807	-1,893
	G(0,05;10)	2,290	2,290
	G(0,01;10)	2,480	2,480
	Decisão	Não rejeitar	Não rejeitar
Precisão Intermédia	s_{pi} (mg/L)	3,0	
	CV (%)	2,5	
	piL (mg/L)	8,4	
	piL' (%)	6	

Para a amostra **A** obteve-se uma concentração de ácido sórbico de 49,81 mg/L, para a média das determinações no modo de precisão intermédia. No mesmo período e com o mesmo número de ensaios, foi realizada a determinação da concentração de ácido sórbico na amostra **B**, tendo-se obtido o valor médio de 193,17 mg/L. Nenhum dos valores obtidos foi considerado aberrante e o desvio padrão associado à precisão intermédia é superior ao da repetibilidade, assim como o coeficiente de variação e os limites respetivos. Isto verifica-se naturalmente porque a precisão intermédia incorpora outros efeitos aleatórios, neste caso o efeito do tempo e quantificações realizadas em dias diferentes. O limite de precisão intermédia relativo neste método, 6 %, está igualmente de acordo com o limite do método semelhante validado no laboratório.

Uma vez que na quantificação da incerteza combinada está prevista uma componente associada à precisão, a **incerteza padrão de precisão**, $u_{precisão}$, foi determinada de acordo com informação da precisão intermédia, ou seja:

$$u_{precisão} = s_{pi} = 3,0 \text{ mg/L}$$

Uma vez que a incerteza será aplicada a mais do que um nível de concentração, calcula-se o seu valor em percentagem, $u'_{\text{precisão}}$, e obtém-se:

$$u'_{\text{precisão}} = 2,1 \%$$

4.4.8. Veracidade

O estudo da **veracidade** foi realizado através de **Ensaio de Recuperação**, de acordo com as possibilidades do laboratório. A fortificação nestes ensaios foi feita a três níveis de concentração numa amostra sem concentração nativa de ácido sórbico. Os dados dos ensaios encontram-se na Tabela 4-viii.

Tabela 4-viii - Ensaio de Recuperação de uma amostra sem analito nativo a 3 níveis de concentração, para estudo da veracidade.

Níveis	$C_{\text{fortificada}}$ (mg/L)	Concentração obtida (mg/L)		Média (mg/L)	Recuperação (%)
Nível 1	50,0	47,3	47,5	47,4	94,8
Nível 2	100,0	95,7	94,9	94,9	94,9
Nível 3	150,0	145,3	146,4	146,4	97,6

Recolhidos estes dados é possível obter a **incerteza padrão da veracidade**, $u_{\text{veracidade}}$, segundo a equação (24), definida para o caso desta abordagem. É calculada a recuperação média ($\bar{R}(\%)$), uma vez que a veracidade é definida como a proximidade de uma média de vários resultados a um valor de referência. Calculam-se também a variância das recuperações de cada nível ($s_{Ri}^2(\%)$) e ainda a incerteza associada à concentração da solução preparada para a fortificação ($u(C_{\text{fortificada}})$). Esta última incerteza foi determinada através de modelação tendo em conta os passos e materiais envolventes para chegar às concentrações fortificadas. Os valores intermédios encontram-se no Anexo 3 – Cálculos incertezas padrão da veracidade e as informações relativas às incertezas dos materiais utilizados nas equações (25) e (26) estão discriminadas nos certificados de calibração respetivos, no Anexo 4 – Certificados de calibração.

Apurando esta informação, obteve-se uma incerteza padrão da veracidade em percentagem de recuperação de:

$$u_{\text{veracidade}} = 0,93 \%$$

Em termos relativos, $u'_{\text{veracidade}}$, calculou-se também, uma vez que estas incertezas não se aplicam apenas a um nível de concentração:

$$u'_{\text{veracidade}} = 0,97 \%$$

4.4.9. Exatidão e quantificação da incerteza

Sendo a **exatidão** a combinação das componentes de erros aleatórios e das componentes de erros sistemáticos, a sua expressão em termos quantitativos é a **incerteza padrão combinada**, u (equação (27)).

Em percentagem, esta incerteza relativa, u' , seria quantificada como na equação (27), no entanto sem a multiplicação do valor de y :

$$u' = 2,3 \%$$

em que a componente que mais contribuiu para este valor foi a componente da precisão, ou seja, a que está associada aos erros aleatórios. A abordagem para a determinação da veracidade, através de ensaios de recuperação, inclui muito pouca dispersão comparativamente com um ensaio interlaboratorial e, neste caso, a sua contribuição para a incerteza padrão combinada é muito baixa.

A incerteza expandida, igualmente em percentagem, U' , compreende a multiplicação de u pelo fator $k = 2$ (equação (28)), em que se obtém:

$$U' = 5 \%$$

Para a sua determinação em termos absolutos, a título de exemplo, foi quantificada a concentração de ácido sórbico numa amostra de vinho licoroso. Obteve-se uma concentração de 49,93 mg/L. Desta forma, a incerteza expandida, U , apresenta um valor de:

$$U = 2 \text{ mg/L}$$

O **resultado final** da concentração desta amostra é expresso da seguinte forma (equação (29)):

$$\text{Resultado} = 50 \pm 2 \text{ mg/L}$$

5. Conclusão e perspetivas futuras

O trabalho realizado ao longo do estágio curricular contemplou a validação de dois métodos analíticos – a determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol em álcool neutro e a determinação de ácido sórbico em Vinho Madeira. Os objetivos, no geral, foram cumpridos tendo-se determinado os vários parâmetros inerentes à validação dos métodos, pela abordagem intralaboratorial.

No álcool neutro, a validação foi realizada posteriormente a uma implementação do método e otimização das suas condições, com algum desafio, seguindo-se a recomendação do Regulamento Delegado (UE) n.º 2022/1303 em utilizar como método de referência o do Regulamento (CE) n.º 2870/2000. Foi possível a determinação de todos os parâmetros, no entanto, alguns destes foram determinados com certas condicionantes.

Este método validado para a determinação de aldeídos, ésteres, álcoois superiores totais e metanol, com utilização de padrão interno, compreende, na verdade, dez métodos de determinação individuais (para cada um dos dez compostos) incorporados numa só análise. Tendo-se recorrido à técnica cromatográfica GC, a seletividade para cada composto foi garantida através do fator de separação (superior a 1) e da resolução de cada pico (igual ou superior a 1,5). Para este efeito, foi realizado um estudo de vários programas de temperatura de forma a obter aquele que permitisse uma análise rápida, assim como um cromatograma com clara distinção entre os picos das substâncias a analisar. Obteve-se, portanto, uma boa seletividade para os compostos e as dez retas de calibração foram desenhadas, de forma a respeitar os limites legais impostos sobre o produto álcool neutro. Quanto à linearidade, todas as retas apresentaram um comportamento considerado linear para as gamas de trabalho estabelecidas, conclusão esta resultante da aplicação do Teste de Mendel. Os limites analíticos respetivos foram calculados através da razão sinal/ ruído e apresentaram valores abaixo do primeiro nível de cada gama, conforme esperado. No entanto, muitos foram calculados por estimativa, devido a problemas técnicos relacionados com o equipamento. A determinação do parâmetro da precisão, em modo de repetibilidade e em modo de precisão intermédia, foi efetuada, contudo desafiante no sentido em que o manuseamento e o armazenamento das soluções padrão analisadas foram muito dificultados pelas características voláteis dos compostos. O estudo da veracidade foi realizado através de ensaios de recuperação, em que se apresentaram valores entre 70 e 110 %, um intervalo considerado adequado pelo laboratório, tendo em conta as

limitações. Por fim, a quantificação da incerteza associada à medição teve a contribuição da incerteza padrão da precisão e da incerteza padrão da veracidade, consoante a abordagem definida, com um peso muito mais expressivo por parte da componente associada à precisão.

Em suma, o método aplicado ao álcool neutro foi considerado adequado, no sentido de ser uma alternativa mais segura ao método que era recomendado anteriormente na legislação. Ainda assim, para ser adequado para análise carece de alguns ajustes na questão da estabilidade das soluções para que se possa efetuar, simultaneamente à validação, um controlo de qualidade apropriado. Nesta linha de pensamento, uma vez que a preparação das soluções implica despende de tempo e de recursos, devido aos vários passos necessários, seria interessante, numa perspetiva futura, testar outro solvente para a preparação das soluções individuais dos compostos. Avaliando o histórico na otimização das condições do método e a comparação deste com outro método semelhante, a causa da instabilidade poderá estar associada ao solvente etanol a 96 % Vol. De modo a melhorar a praticabilidade e a durabilidade das soluções para calibração e controlo de qualidade, o próximo passo seria testar, por exemplo, apenas água como solvente na preparação das soluções individuais.

O método para a determinação de ácido sórbico em Vinho Madeira foi igualmente alvo de validação. Recorrendo à técnica Espectrofotometria UV-Vis, foi desenhada a reta de calibração, de acordo com o método recomendado do OIV-MA-AS313-14A, e obteve-se uma reta com comportamento linear na gama estabelecida (de acordo com o Teste de Mendel realizado). Os limites analíticos foram calculados através da análise de brancos, com valores obtidos distantes dos correspondentes ao primeiro nível da calibração. A seletividade foi avaliada através de ensaios de recuperação, cujas percentagens se situaram no intervalo de 90 a 107 %, indicando que este é um método seletivo para o ácido sórbico. O estudo da precisão (através da dispersão em modo repetibilidade e modo precisão intermédia) e o estudo da veracidade (com recurso a ensaios de recuperação) foram realizados e determinadas as incertezas padrão respetivas. Esta informação foi utilizada para, numa última instância, quantificar a incerteza associada à medição da concentração de ácido sórbico, tendo a componente da precisão contribuído largamente.

Em conclusão, um método simples e prático, demonstrou ser adequado para a determinação do ácido sórbico, com a validação do mesmo conseguida para o efeito.

6. Referências bibliográficas e *webgrafia*

1. *História do Vinho Madeira*. Acedido a 24 de maio de 2023, em <https://vinhomadeira.com/o-vinho-madeira/historia>
2. *Madeira Wine*. (2023). Acedido a 24 de maio de 2023, em <https://www.madeirawinecompany.com/en/madeira/madeira-wine.html>
3. *Vinho Madeira - DOP*. Acedido a 12 de setembro de 2023, em <https://vinhomadeira.com/o-vinho-madeira/dop>
4. *Vinho Madeira - Região Vitivinícola*. Acedido a 12 de setembro de 2023, em <https://vinhomadeira.com/o-vinho-madeira/regiao>
5. *Vinho Madeira - Castas*. Acedido a 12 de setembro de 2023, em <https://vinhomadeira.com/>
6. *Vinhos Portugueses*. (2022). Acedido a 24 de maio de 2023, em <https://winesofportugal.com/pt/vinhos-portugueses/estilos-de-vinhos/>
7. *Vinho Madeira - Tipos de Vinho Madeira*. Acedido a 12 de setembro de 2023, em <https://vinhomadeira.com/o-vinho-madeira/tipos-categorias>
8. Justino's Madeira. (2018). *Imagens*. Acedido a 12 de setembro de 2023, em http://www.justinomadeira.com/pages.php?page_id=109#imagens
9. OIV. (2023). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis International Organisation of Vine and Wine* (2023.^a ed.).
10. Portaria n.º 39/2015 de 13 de fevereiro. *Jornal Oficial da Região Autónoma da Madeira, I Série*(28).
11. Regulamento Delegado (UE) n.º 2019/934 da Comissão de 12 de março. *Jornal Oficial da União Europeia*.
12. *IVBAM Histórico*. Acedido a 16 de junho de 2023, em <https://ivbam.madeira.gov.pt/historico>
13. *Manual da Qualidade IVBAM, IP-RAM* (34.^a ed.). (2023).
14. *NP EN ISO/IEC 17025:2018 Norma Portuguesa - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*.
15. Magnusson, B., & Ornemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2.^a ed.).
16. *Guia RELACRE 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química* (1.^a ed.). (2000).

17. Rambla-Alegre, M., Esteve-Romero, J., & Carda-Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050>
18. ISO 8466-1:1990 *Water Quality-Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*.
19. *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) (1.ª ed.)*. (2012).
20. Barwick, V. J., Ellison, S. L. R., & Barwick, V. (2000). *VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data Protocol for uncertainty evaluation from validation data*.
21. Curvelo-Garcia, A. S., & Barros, P. (2015). *Química Enológica - métodos analíticos (2.ª ed.)*. Agrobook.
22. *Guia RELACRE 31 - Quantificação da incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos*. (2018). RELACRE.
23. ISO 5725-2:1994 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.
24. *The Complete Guide to Neutral Spirits for Beverages*. (2019, Julho 22). Acedido a 14 de junho de 2023, em <https://www.ethimex.com/blog/2019/07/22/the-complete-guide-to-neutral-spirits-for-beverages/>
25. *Spirits, Alcohols and Spirit Beverages of Vitivinicultural Origin*. (2022). Acedido a 14 de junho de 2023, em <https://www.oiv.int/standards/international-code-of-oenological-practices/part-i-definitions/spirits%2C-alcohols-and-spirit-beverages-of-viticultural-origin>
26. Vicki Denig. (2020). *What is Alcoholic Fermentation?* Acedido a 14 de junho de 2023, em <https://www.liquor.com/alcoholic-fermentation-5086917>
27. Alba-Lois, L., & Segal-Kischinevsky, C. (2010). *Yeast Fermentation and the Making of Beer and Wine*. Acedido a 14 de junho de 2023, em <https://www.nature.com/scitable/topicpage/yeast-fermentation-and-the-making-of-beer-14372813/#:~:text=Alcoholic%20fermentation%20occurs%20by%20the,by%20the%20action%20of%20bacteria>
28. Regulamento (UE) n.º 2019/787 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de abril de 2019. *Jornal Oficial da União Europeia*.
29. Regulamento Delegado (UE) n.º 2022/1303 da Comissão de abril de 2022. *Jornal Oficial da União Europeia*.

30. Regulamento (CE) n.º 2870/2000 da Comissão de 19 de dezembro de 2000. (2000). *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.
31. Jackson, R. S. (2008). *Wine Science Principles and Applications* (3.^a ed.). Elsevier Inc.
32. Curvelo-Garcia, A. S. (1988). *Controlo de Qualidade dos Vinhos Química Enológica - Métodos Analíticos*.
33. Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis* (7.^a ed.). Craig Bleyer.
34. Harvey, D.. *Analytical Chemistry 2.1*. LibreTexts Chemistry.
35. *Flame Ionization Detector*. Acedido a 2 de junho de 2023, em <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/flame-ionization-detector>
36. Grob, R. L., & Barry, E. F. (2004). *Modern Practice Of Gas Chromatography* (4.^a ed.). John Wiley & Sons, Inc.
37. Crouch, Holler, F. J., Skoog, D. A., & West, D. M. (2006). *Fundamentos de Química Analítica* (8^a edição). Editora Thomson.
38. Mansur, A. R., Oh, J., Lee, H. S., & Oh, S. Y. (2022). Determination of ethanol in foods and beverages by magnetic stirring-assisted aqueous extraction coupled with GC-FID: A validated method for halal verification. *Food Chemistry*, 366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130526>
39. Tankiewicz, M., Namieśnik, J., & Sawicki, W. (2016). Analytical procedures for quality control of pharmaceuticals in terms of residual solvents content: Challenges and recent developments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 328–344. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.09.008>
40. Poster, D. L., Schantz, M. M., Sander, L. C., & Wise, S. A. (2006). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: A critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), 859–881. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0771-0>
41. Tungkijjanansin, N., Alahmad, W., Nhujak, T., & Varanusupakul, P. (2020). Simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, and propionic acid in fermented food by headspace solid-phase microextraction followed by GC-FID. *Food Chemistry*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127161>
42. Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)

43. Mohammadzadeh-Aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanehbandi, D., Dehghan, P., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*, 257, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.020>
44. Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*.
45. Rouessac, F., & Rouessac, A. (2007). *Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques* (2ª). John Wiley & Sons, Ltd.
46. Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2019). Essentials of Pharmaceutical Analysis. Em *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7>
47. Rocha, F. S., Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Kaliaguine, S., & Patience, G. S. (2018). Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(12), 2512–2517. <https://doi.org/10.1002/cjce.23344>
48. Mohammed, A. M. (2018). UV-Visible Spectrophotometric Method and Validation of Organic Compounds. *European Journal of Engineering Research and Science*, 3(3), 8. <https://doi.org/10.24018/ejers.2018.3.3.622>
49. PSIBERG Team. (2022). *UV-Vis Spectroscopy: Principle, Instrumentation, and Applications*. Acedido a 1 de agosto de 2023, em <https://psiberg.com/uv-vis-spectroscopy/>
50. Reutenauer, L., Farmer, S., Soderberg, T., & Kennepohl, D. 3.4: Ultraviolet Absorption. Em *Introduction to Organic Spectroscopy*. LibreTexts Chemistry.
51. OIV. (2023). Method OIV-MA-AS313-14A - Sorbic Acid. Em *Compendium of International Methods of Analysis*.

7. Anexos

Anexo 1 – Procedimento experimental

Álcool neutro

1. Objetivo

O presente método descreve o processo para determinar os teores dos compostos voláteis: etanal (acetaldeído), acetato de etilo (etanoato de etilo), acetal (1,1-dietoxietano), metanol (álcool metílico), 1-butanol (n-butanol), 2-butanol (sec-butanol), 2-metil-1-propanol (isobutanol), 1-propanol (n-propanol), 2-metil-1-butanol (álcool amílico) e 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) por cromatografia em fase gasosa.

Descreve também o processo para determinar os teores de aldeídos e dos álcoois superiores totais por cálculo a partir dos compostos voláteis.

2. Âmbito

Este método é adequado a álcool neutro e vodka.

3. Definições

Álcool neutro – líquido alcoólico destinado ao consumo humano, com um título alcoométrico volúmico igual ou superior a 96 %vol.

Álcoois superiores totais (AST) – somatório das concentrações dos seguintes álcoois superiores: 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, convertidos em 2-metil-1-propanol.

Aldeídos, expressos em etanal – somatório do etanal (acetaldeído) e das frações etanálticas do 1,1-dietoxietano (acetal);

Estéres, expressos em acetato de etilo;

Sequence Table – designação usada no software do cromatógrafo para a tabela onde é elaborada a sequência de trabalho a ser analisada;

Vial - frascos de vidro de 2 ml de capacidade, usados para colocar a amostra no injetor automático.

4. Siglas e abreviaturas

AST – Álcoois superiores totais

AN – Álcool neutro

CQI - Controlo da qualidade interno

FID – Flame Ionization Detector (detetor de ionização de chama)

GC – Cromatografia em fase gasosa

g/hl aa – gramas por hectolitro de álcool absoluto

P.I. – Padrão interno

Rintra – Reprodutibilidade intralaboratorial

SCNi – Solução de calibração nível i

SCQNi – Solução de controlo da qualidade nível i

SCR – Solução de calibração de referência

SCQR – Solução de controlo da qualidade de referência

TAV – Título alcoométrico volúmico

5. Resumo do processo

A determinação de compostos voláteis presentes numa bebida é efetuada por injeção da amostra, eventualmente diluída, com adição de um padrão interno, num sistema de cromatografia em fase gasosa.

A separação dos compostos voláteis é efetuada por programação de temperatura numa coluna apropriada e a deteção é efetuada por um detetor de ionização de chama.

A concentração de cada composto em relação ao padrão interno, é determinada com base nos fatores de resposta obtidos durante uma calibração efetuada em condições cromatográficas idênticas às seguidas na análise da amostra.

6. Aparelhagem e equipamento

6.1 Equipamento

- Balança analítica, com um mínimo de quatro casas decimais;
- Aparelho de destilação para a determinação do título alcoométrico volúmico que deverá obedecer aos critérios estabelecidos no método em vigor no laboratório;
- Densímetro digital que permita exprimir a massa volúmica em g/ml com o mínimo de cinco casas decimais;
- Cromatógrafo de fase gasosa, com programação de temperatura, equipado com um detetor de ionização de chama (FID), um injetor automático e um Software de aquisição e tratamento de dados (ver ficha do equipamento);
- Coluna capilar CP-WAX 57 CB com 50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme (polietilenoglicol estabilizado) ou semelhante;
- Indicação das temperaturas máximas da coluna capilar CP-WAX 57 CB:
 - Tmáx.(isotérmica): 200°C
 - Tmáx.(programa): 225°C
- Seringa de 10 µl;
- Frigorífico com temperatura controlada entre 2 e 8°C.

6.2 Indicação das condições cromatográficas

Injetor

- Temperatura no injetor: 210°C
- Volume injetado: 1 µl
- Razão de split: 1:55
- Fluxo do split: 15 ml/min
- Gás vetor e pressão de gases (Hélio): 22,7 psi
- Fluxo total: 87 ml/min
- Fluxo da purga do septo: 3 ml/min

Coluna

- Fluxo: 1,5 ml/min
- Pressão: 22,7 psi

Forno

- Temperatura inicial: 40°C
- Rampa de temperatura: 40°C durante 14 minutos, aumento de 40°C para 135°C à razão de 15°C/min, manutenção a 190 °C durante 5 minutos em *PostRun* (tempo de análise: 20,(3) minutos).
- Temperatura máxima: 200°C

Detetor

- Temperatura no detetor: 250°C
- Fluxo Ar: 300 ml/min
- Fluxo Hidrogénio: 30 ml/min
- Fluxo Azoto (make up): 30 ml/min
- Fluxo Hélio (gás de arraste): 1,5 ml/min

7. Calibração analítica

7.1 Reagentes e material

7.1.1 Reagentes

- Etanol absoluto (CAS 64-17-5)
- Padrão interno: 1-pentanol (CAS 71-41-0)
- Acetaldeído (CAS 75-07-0)
- Acetato de etilo (CAS 141-78-6)
- Acetal (CAS 105-57-7)
- Metanol (CAS 67-56-1)
- 2-butanol (CAS 78-92-2)
- 1-propanol (CAS 71-23-8)
- 2-metil-1-propanol (CAS 78-83-1)
- 1-butanol (CAS 71-36-3)
- 2-metil-1-butanol (CAS 1565-80-6)
- 3-metil-1-butanol (CAS 123-51-3)
- Água bidestilada ou de qualidade equivalente com uma condutividade inferior a 2 µs/cm.

Nota: Todos os reagentes devem ter qualidade analítica adequada para cromatografia.

7.1.2 Material de vidro necessário à preparação das soluções

Tabela 1: Material de vidro necessário à preparação das soluções.

Soluções	balão volumétrico				pipeta volumétrica, classe AS ou A					
	25 ml	50 ml	100 ml	200 ml	1 ml	2,5 ml	5 ml	7,5 ml	10 ml	9 ml
SC (Padrões individuais)	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-
SCQ (Padrões individuais)	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-
SCR	-	-	-	1	-	-	2	9	-	-
SCQR	-	-	-	1	-	-	2	9	-	-
SCNi (N1,...,N5)	5	5	-	-	1	1	1	1	1	1
SCQNi (N1,N3,N5)	3	3	-	-	1	-	1	-	1	1
P.I.	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-
Amostra	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1

Todo o material usado deverá estar lavado e seco no momento de utilização.

7.2 Gama de trabalho

Tabela 2: Gama de trabalho dos diversos componentes voláteis.

Componentes	Gama de trabalho mg/l
Acetaldeído (Etanal)	[3,5 – 35]
Acetato de Etilo	[3,2 – 32]
Acetal (1,1-Dietoxietano)	[3,2 – 32]
Metanol	[12,5 – 125]
2-butanol	[0,7 – 7]
1-propanol	[0,7 – 7]
2-metil-1-propanol	[0,7 – 7]
Álcool alílico (1-propeno-1-ol)	[0,7 – 7]
1-butanol	[0,7 – 7]
2-metil-1-butanol	[1 – 100]
3-metil-1-butanol	[0,9 – 9]

7.3 Preparação e conservação de soluções

A massa dos componentes deverá ser registada às gramas com um mínimo de quatro casas decimais.

Todas as soluções preparadas, SC individuais, SCQ individuais, SCR, SCQR, P.I., SCNi, SCQNi são conservadas no frigorífico de forma a garantir a sua estabilidade/validade.

7.3.1 Solução de etanol a aproximadamente 96% (V/V)

Deitar 960 ml de etanol absoluto num balão volumétrico de 1 litro e 30 ml de água bidestilada ou qualidade equivalente. Homogeneizar bem a solução.

7.3.2 Soluções de calibração (padrões individuais)

Numa balança analítica, pesar os componentes indicados na Tabela 3 com auxílio de pipetas, para balões volumétricos de 100 ml que contenham já cerca de 20 ml de solução de etanol (7.3.1).

Completar o volume com a solução de etanol (7.3.1). Homogeneizar.

As SC são codificadas usando o mês e o dia da sua preparação. Ex: SC/0310 – solução de calibração preparada a 10 de Março do respetivo ano.

As massas dos componentes (massa alvo $\pm 0,0099$ g) são registadas na **Ficha nº 39 (Registo das massas para a preparação das soluções de calibração individuais)** e guardados em suporte eletrónico.

Tabela 3: Massas alvo para a preparação das soluções de calibração individuais.

Componentes	Pureza %	Massas alvo (g)	Volume (ml)
Acetaldeído (Etanal)	x	1,4000	100
Acetato de Etilo (Etanoato de etilo)	x	1,3000	“
Acetal (1,1-Dietoxietano)	x	1,3000	“
Metanol (álcool metílico)	x	5,0000	“
2-butanol (sec-butanol)	x	0,3000	“
1-propanol (n-propanol)	x	0,3000	“
2-metil-1-propanol (Isobutanol)	x	0,4000	“
1-butanol (n-butanol)	x	0,3000	“
2-metil-1-butanol (álcool amílico)	x	0,4000	“
3-metil-1-butanol (álcool isoamílico)	x	0,3500	“

7.3.3 Solução de calibração de referência (SCR)

Medir, com pipeta volumétrica, para um balão volumétrico de 200 ml que contenha já cerca de 50 ml de solução de etanol (7.3.1) os volumes das soluções individuais indicados na Tabela 4.

Completar o volume com solução de etanol (7.3.1) e homogeneizar a solução.

Nota: De modo a minimizar as perdas por evaporação, adicionar o acetal e o acetaldeído em último lugar.

Tabela 4: Volumes para a preparação da solução de calibração de referência (SCR).

Soluções	Volume de solução de calibração individual a medir (ml)	Volume final (ml)
Acetaldeído (Etanal)	2,5	200
Acetato de Etilo (Etanoato de etilo)	“	
Acetal (1,1-Dietoxietano)	“	
Metanol (álcool metílico)	“	
2-butanol (sec-butanol)	“	
1-propanol (n-propanol)	“	
2-metil-1-propanol (Isobutanol)	“	
1-butanol (n-butanol)	“	
2-metil-1-butanol (álcool amílico)	“	
3-metil-1-butanol (álcool isoamílico)	“	

7.3.4 Soluções de calibração N1, N2, ..., N5 (SCN1,...,SCN5)

Para balões volumétricos de 50 ml medir, por pipeta de precisão, os volumes de SCR expressos na Tabela 4.

Completar o volume com solução de etanol (7.3.1) e homogeneizar.

Tabela 5: Preparação das soluções de calibração SCN₁, SCN₂,..., SCN₅

Solução	SCR (ml)	Volume Final (ml)
SCN ₁	1	50
SCN ₂	2,5	50
SCN ₃	5	50
SCN ₄	7,5	50
SCN ₅	10	50

7.3.5 Solução de padrão interno (P.I.)

Numa balança analítica pesar cerca de **0,1000 g** de 1-pentanol para balão volumétrico de 200 ml. Completar o volume com solução de etanol (7.3.1) e homogeneizar.

A massa do componente (massa alvo $\pm 0,0099$ g) é registada na **Ficha nº 99 (Registo das massas para a preparação das soluções de calibração individuais)** e guardados em suporte eletrónico.

7.3.6 Soluções de controlo da qualidade (SCQNi)

Esta preparação implica a repetição do procedimento descrito no ponto 7.3.2 com reagentes independentes, no ponto 7.3.3 e na preparação de três soluções de controlo de qualidade (SCQN₁, SCQN₃ e SCQN₅) de acordo com o ponto 7.3.4.

As SCQ são codificadas usando o mês e o dia da sua preparação. Ex: SCQ/0310 – solução de controlo da qualidade preparada a 10 de Março do respetivo ano.

As massas dos componentes são registadas (massa alvo $\pm 0,0099$ g) na **Ficha Nº100 (Registo das massas para a preparação das soluções de controlo da qualidade)** e guardados em suporte eletrónico.

7.4 Procedimento de calibração

7.4.1 Adição do P.I. às soluções de calibração (SCN₁,...,SCN₅)

Para balões de 25 ml medir 9 ml das soluções de calibração SCN₁, SCN₂, SCN₃, SCN₄ e SCN₅ (7.3.4) e adicionar 1 ml de P.I. (7.3.5). Homogeneizar as soluções e transferi-las para os *vials*, colocando-os no amostrador do injetor automático acoplado ao cromatógrafo.

7.4.2 Calibração

Os valores obtidos para as massas de SC individuais, SCQ individuais e P.I. são registados na folha de cálculo FC_GCcal, para a determinação de concentrações das soluções de calibração, de controlo da qualidade e de P.I.

A calibração analítica é codificada usando o mês e o ano da sua preparação. Ex: ALCOOL3_0323.M – calibração analítica efetuada em Março de 2023.

Selecionar no *software* do cromatógrafo o método em uso (ALCOOL3_ mêsano.M) e sequência ALCOOLCAL.s.

Gravar o método com o nome atualizado (alterar o mês e o ano) e proceder à elaboração/atualização da *SequenceTable* (Tabela 6).

Tabela 6: Exemplo da construção de uma *SequenceTable*, BEBESPCAL.s para uma calibração

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj./ Locat.	Sample Type	Cal Level	Update RF	Update RT	ISTD Amount	Multip.	Inj. Vol.
1	1	Branco	ALCOOL3_0323	2	Sample				50.00	1	1.0
2	2	SCN1	ALCOOL3_0323	1	Calibration	1	Replace	Replace	50.00	1	1.0
3	2	SCN1	ALCOOL3_0323	2	Calibration	1	Average	Average	50.00	1	1.0
4	3	SCN2	ALCOOL3_0323	1	Calibration	2	Replace	Average	50.00	1	1.0
5	3	SCN2	ALCOOL3_0323	2	Calibration	2	Average	Average	50.00	1	1.0
6	4	SCN3	ALCOOL3_0323	1	Calibration	3	Replace	Average	50.00	1	1.0
7	4	SCN3	ALCOOL3_0323	2	Calibration	3	Average	Average	50.00	1	1.0
8	5	SCN4	ALCOOL3_0323	1	Calibration	4	Replace	Average	50.00	1	1.0
9	5	SCN4	ALCOOL3_0323	2	Calibration	4	Average	Average	50.00	1	1.0
10	6	SCN5	ALCOOL3_0323	1	Calibration	5	Replace	Average	50.00	1	1.0
11	6	SCN5	ALCOOL3_0323	2	Calibration	5	Average	Average	50.00	1	1.0

Nota: Usar o Multiplier ou fator multiplicativo (F), F=1 para se obter resultados em mg/l (na calibração, SCQ's e amostras) e F = 10/TAV para se obter resultados em g/hlaa (amostras).

O branco injetado no início da sequência é feito com uma solução hidroalcoólica a aproximadamente 96% vol. (de preferência a solução da preparação das soluções de calibração/controlo).

As curvas de calibração são obtidas analisando sucessivamente e em quadruplicado, cada uma das soluções de calibração SCN₁, SCN₂, SCN₃, SCN₄ e SCN₅.

7.5 Controlo da qualidade das calibrações

7.5.1 Declive, coeficiente de correlação e ordenada na origem

O controlo das curvas de calibração revela-se extremamente importante na deteção de falhas (instrumentais e/ou analíticas). Este controlo é efetuado através da análise dos parâmetros da curva de calibração:

- **Declive:** o resultado obtido deverá corresponder a um valor dentro da Média $\pm$ 3S ou Média $\pm$ 10%. Se não for este o caso, investigar a fonte de erro e proceder a uma recalibração.
- **Coeficiente de correlação (R):** a reta de calibração obtida, após regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, é do tipo:

$$A_i / A_{PI} = b (C_i / C_{PI}) + m$$

A reta de calibração obtida deverá apresentar um traçado linear, com um coeficiente de correlação não inferior a **0,995**. Caso esta condição não se verifique, proceder a uma recalibração.

- **Ordenada na origem:** o resultado obtido deverá corresponder a um valor dentro da Média $\pm$ 3S ou Média $\pm$ 10%. Se não for este o caso, investigar a fonte de erro e proceder a uma recalibração.

7.5.2 Verificação da calibração

A verificação da calibração é efetuada através da injeção das soluções SCQN₁, SCQN₃, SCQN₅ e da repetição de uma amostra anteriormente analisada.

Para as **SCQ** admitem-se **desvios de $\pm$ 10%** relativamente ao valor medido.

Para a **amostra** reanalisada admitem-se **desvios menores ou iguais** aos valores da **Rintra** do método.

Se os componentes das SCQ apresentarem desvios superiores aos permitidos, proceder da seguinte forma:

- 1º - repetir a análise cromatográfica das SCQ, após verificar que a fonte de erro não é instrumental;
- 2º - se os resultados se mantiverem, proceder à preparação de novas SCQ e a nova análise;
- 3º - se o problema persistir, proceder a uma recalibração usando as soluções de calibração já preparadas;
- 4º - em último caso, efetuar uma calibração partindo de novas soluções.

7.6 Periodicidade da calibração

A calibração tem a periodicidade definida no Quadro_ControloEquipamentos em vigor.

Todos os registos (Fichas nº99 e nº100, FC_GCcal com o registo das massas e concentrações das SC, SCQ e P.I., relatório de calibração, cromatogramas que estão envolvidos na aceitação da calibração) são arquivados em suporte eletrónico.

8. Procedimento de análise

8.1 Material de vidro necessário à preparação da amostra

- 1 balão volumétrico de 25 ml
- 1 pipeta volumétrica de 9 ml
- 1 pipeta volumétrica de 1 ml

Nota: As pipetas necessárias à preparação da amostra encontram-se num suporte de bancada com a designação “Material para cromatografia gasosa”.

8.2 Preparação da amostra

A determinação do TAV do álcool neutro é feita de acordo com os métodos em vigor, sendo este necessário para a conversão das unidade de mg/l em g/hlaa.

Para a quantificação das substâncias, homogeneizar a amostra, pipetar 9 ml para um balão de 25 ml e adicionar 1 ml de P.I.. Agitar a mistura (pelo menos 20 inversões), transferi-la para um *vial*.

Antes das análises, conservar as preparações no frigorífico, para minimizar as perdas de substâncias voláteis.

8.3 Determinação

Selecionar, no software do cromatógrafo, o método **ALCOOL3_mêsano.M** e a sequência **ALCOOL.S**. Elaborar/atualizar a SequenceTable (Tabela 7).

Em todas as sessões de trabalho procede-se à verificação da calibração analítica através da análise de SCQ nos extremos da curva de calibração.

No início da sequência de trabalho colocar um **Branco** e a **SCQ N1**, prosseguir com a(s) amostra(s) desconhecida(s) (AD) (preparadas conforme descrito no ponto 8.2), intervalando cada 5 amostras com uma SCQ.

Tabela 7: Exemplo da construção de uma *SequenceTable* para análise de rotina

Line	Location	Sample Name	Method Name	Inj./ Locat.	Sample Type	Cal Level	ISTD Amount	Multiplier	Inj. Volume
1	1	Branco	ALCOOL3_0323	1	Sample				1.0
2	2	SCQ N1	ALCOOL3_0323	2	Control Sample		50.00	1	1.0
3	3	AD1	ALCOOL3_0323	2	Sample		50.00	1	1.0
4	4	AD2	ALCOOL3_0323	2	Sample		50.00	1	1.0
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
7	7	AD5	ALCOOL3_0323	2	Sample		50.00	1	1.0
8	8	SCQ N5	ALCOOL3_0323	2	Control Sample		50.00	1	1.0

Nota: Usar o Multiplier ou fator multiplicativo (F), F=1 para se obter resultados em mg/l (na calibração, SCQ's e amostras) e F = 10/TAV para se obter resultados em g/hlaa (amostras).

O branco injetado no início da sequência é feito com uma solução hidroalcoólica a aproximadamente 96% vol. (de preferência a solução da preparação das soluções de calibração/controlo).

Cada preparação é analisada em **duplicado**.

8.4 Tratamento de resultados

A concentração da cada componente é obtida por interpolação na respetiva curva de calibração.

Após aceder aos cromatogramas e respetivos relatórios, os resultados são transcritos para uma folha de Excel designada **FC_GC_MIVM-71** e arquivados em suporte eletrónico.

Toma-se como resultado o valor da média aritmética dos duplicados, se a diferença for igual ou inferior ao valor das respetivas repetibilidades (Ver **Quadro_Validação_Álcool Neutro**, em vigor).

A aceitação da sequência de trabalho é feita de acordo com os requisitos descritos no ponto 9.

9. Controlo da Qualidade da análise cromatográfica de bebidas espirituosas

9.1 Controlo da Qualidade Interno

Por sessão de trabalho e para que um resultado seja aceite tem que obedecer a um conjunto de requisitos:

9.1.1 Soluções de controlo da qualidade (SCQ)

Na sequência de trabalho são usadas as **SCQ** para controlar a resposta do aparelho.

Admitem-se desvios de $\pm 10\%$ relativamente à concentração obtida a partir da pesagem dos componentes.

9.1.2 Duplicados

As **duplicados** (2 injeções consecutivas na mesma preparação) consideram-se concordantes se a **diferença** entre elas for **igual ou inferior à repetibilidade dos duplicados** determinada para o método (Ver **Quadro_Validação_Álcool Neutro**, em vigor).

9.1.3 Área do padrão interno (P.I.)

A **área do padrão interno** é controlada pelo coeficiente de variação (**CV %**) ou **RSD (%)** que deverá ser **igual ou inferior a 5%**.

9.1.4 Ações corretivas

À exceção dos componentes mais voláteis (etanal, acetato de etilo e acetal), o **não cumprimento dos pontos 9.1.1 e 9.1.2** em simultâneo implica a **repetição das amostras na totalidade**;

Para os três componentes mais voláteis aceitam-se os resultados desde que pelo menos uma das SCQ cumpra os critérios de aceitação;

O **não cumprimento dos pontos 9.1.3 ou 9.1.4** implica a **repetição da amostra** afetada;

No caso das SCQ não cumprirem os critérios de aceitação é necessário procurar uma explicação para o sucedido, assim como as possíveis fontes de erro (analíticas ou instrumentais). Contudo, e tendo em atenção a volatilidade dos componentes e a sua deterioração ao longo do tempo, as ações

corretivas devem ser ponderadas e conjugadas com outros fatores como o comportamento das SCQ e eventuais repetições das amostras.

Se estas ações não forem suficientes, proceder da seguinte forma:

1º - parar as análises;

2º - procurar e identificar a causa do erro (resposta do aparelho, necessidade de manutenção ou manutenção defeituosa, condições de operação inadequadas, desvios na preparação das soluções e/ou amostras, contaminações, desempenho do analista, etc..);

3º - corrigir o erro;

4º - reanalisar as amostras e concluir quanto à eficiência da ação corretiva.

Em amostras de rotina, qualquer valor declaradamente fora da margem normal ou suspeito, deverá levar à repetição da amostra e confirmação (ou não) do resultado.

10. Ensaio por cálculo

Para as parcelas cujos resultados individuais são inferiores ou iguais ao LQ, são considerados os valores dos LQ.

Álcoois superiores totais

O teor dos Álcoois superiores totais (AST) é obtido a partir do somatório dos seguintes álcoois superiores convertidos em 2-metil-1-propanol: 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), expressos enquanto álcoois individualizados, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, determinados enquanto álcoois individualizados ou os dois em conjunto.

Álcoois superiores totais (AST) = 1-propanol * MM (2-metil-1-propanol) / MM (1-propanol) + 1-butanol * MM (2-metil-1-propanol) / MM (1-butanol) + 2-butanol * MM (2-metil-1-propanol) / MM (2-butanol) + 2-metil-1-propanol (isobutanol) + 2-metil-1-butanol * MM (2-metil-1-propanol) / MM (2-metil-1-butanol) + 3-metil-1-butanol * MM (2-metil-1-propanol) / MM (3-metil-1-butanol)

Aldeídos (expresso em etanal (acetaldeído)) = etanal (acetaldeído) + MM (etanal) / MM (acetal) * 1,1-dietoxietano (acetal);

Aldeídos (expresso em etanal (acetaldeído)) = etanal (acetaldeído) + 0,3727 * 1,1-dietoxietano (acetal);

11. Apresentação de Resultados

Os resultados dos componentes individuais ou em conjunto (AST) são expressos em grama por 100 l de álcool absoluto ou mg/l de acordo com o **Quadro_ Validação_Álcool Neutro**, em vigor, e para valores obtidos abaixo do LQ lançar <xx (LQ).

Nos métodos por cálculo em que os resultados dos ensaios envolvidos sejam inferiores ao LQ, são considerados os valores dos mesmos.

12. Referências

- Regulamento Delegado (UE) nº 2022/1303 da Comissão de abril de 2022;

- Regulamento Delegado (CE) nº 2870/2000 da Comissão de 19 de dezembro de 2000;
- Relacre – Ação de Formação “Validação de métodos e instrumentos em cromatografia”, Lisboa 2002;
- Guia Relacre 13 – Validação de métodos internos de ensaio em análise química;
- Guia Relacre 17 - Elaboração de Procedimentos do Sistema da Qualidade.

Anexo 2 – Relatórios de calibração

Álcool neutro

```
=====
                        Calibration Table
=====
```

```
-----
                        General Calibration Setting
-----
```

Calib. Data Modified : 13/03/2023 10:01:09
 Signals calculated separately : No

Rel. Reference Window : 3.000 %
 Abs. Reference Window : 0.000 min
 Rel. Non-ref. Window : 3.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.000 min
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Included
 Weight : Equal

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Default Sample ISTD Information (if not set in sample table):

ISTD ISTD Amount Name

#

```
-----|-----|-----
1      301.50000    PI (1-Pentanol)
```

```
-----
                        Signal Details
-----
```

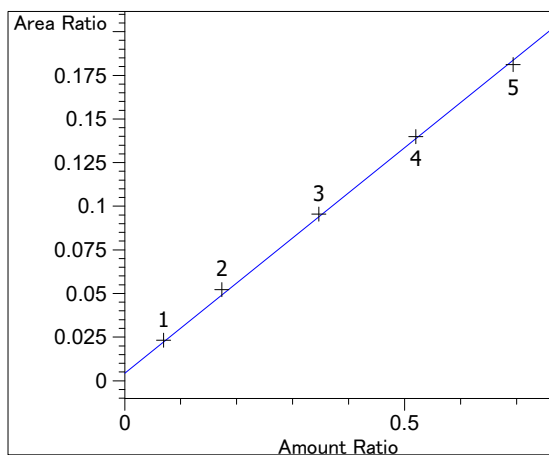
Signal 1: FID1 A, Front Signal

```
-----
                        Overview Table
-----
```

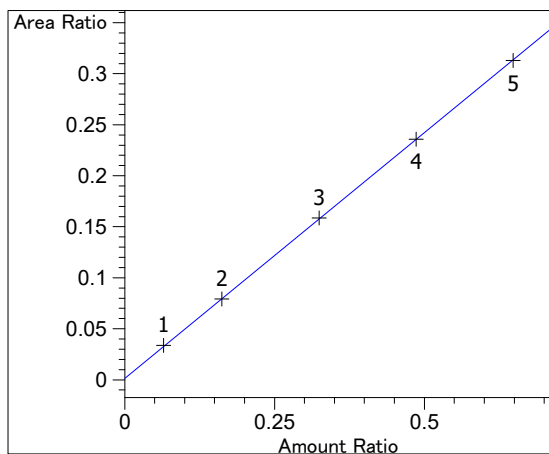
RT	Sig	Lvl	Amount	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD #	Compound
4.048	1	1	3.47000	2.99117e-1	11.60081	No	No 1	Acetaldeido
		2	8.67000	6.79776e-1	12.75419			
		3	17.35000	1.23295	14.07197			
		4	26.00000	1.81036	14.36179			
		5	34.70000	2.33072	14.88812			
RT	Sig	Lvl	Amount	Area	Rsp.Factor	Ref	ISTD #	Compound

No Entries in table

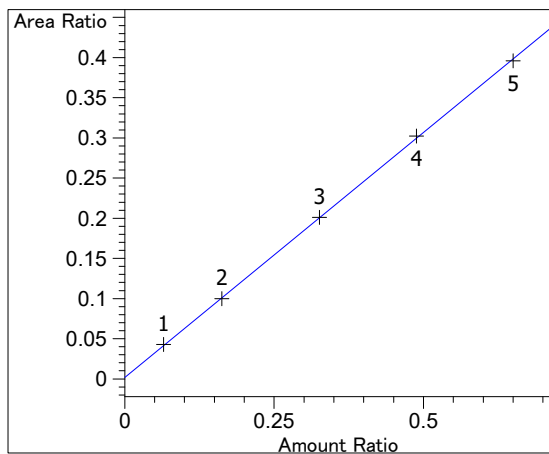
```
Warning : Overlapping peak time windows at 5.716 min, signal 1
Warning : Overlapping peak time windows at 18.817 min, signal 1
```

=====
Calibration Curves
=====

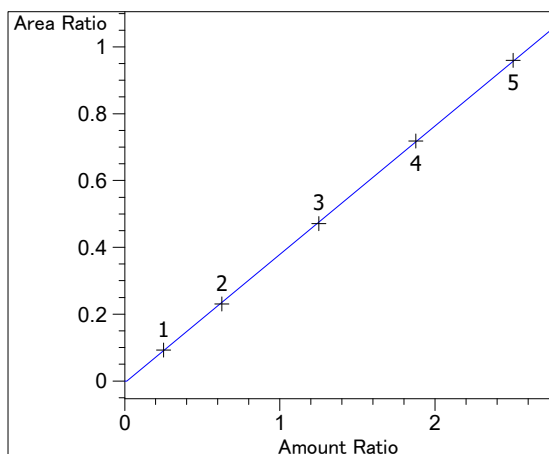
Acetaldeído at exp. RT: 4.048
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99919
Residual Std. Dev.: 0.00314
Formula: $y = mx + b$
m: 2.58502e-1
b: 4.26925e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



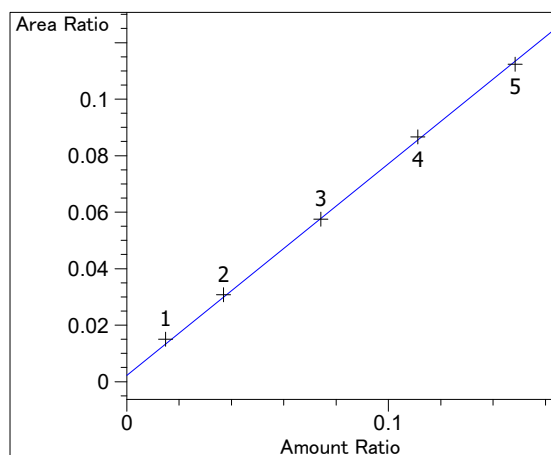
Acetato de etilo at exp. RT: 5.716
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99997
Residual Std. Dev.: 0.00111
Formula: $y = mx + b$
m: 4.81640e-1
b: 1.43167e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



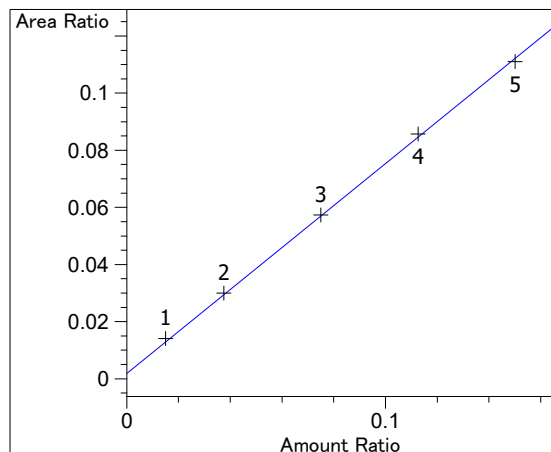
Acetal at exp. RT: 5.863
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99992
Residual Std. Dev.: 0.00220
Formula: $y = mx + b$
m: 6.10357e-1
b: 1.64566e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



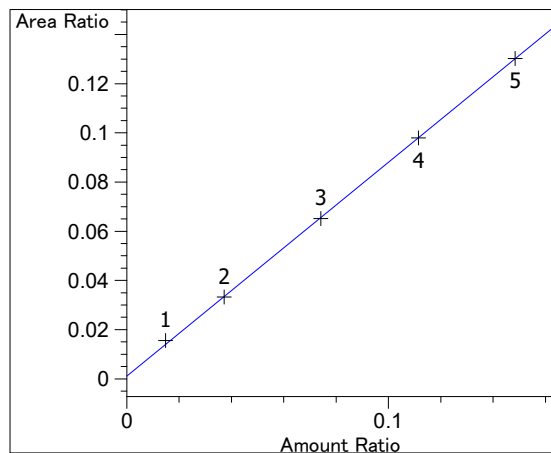
Metanol at exp. RT: 6.177
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99994
Residual Std. Dev.: 0.00467
Formula: $y = mx + b$
m: 3.84180e-1
b: -5.04038e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



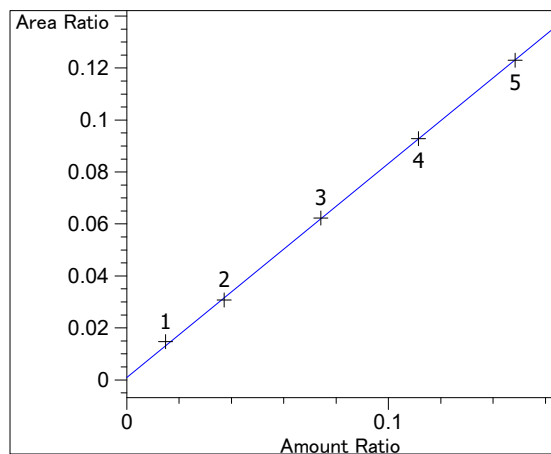
2-Butanol at exp. RT: 10.941
 FID1 A, Front Signal
 Correlation: 0.99943
 Residual Std. Dev.: 0.00163
 Formula: $y = mx + b$
 m: 7.49418e-1
 b: 2.21479e-3
 x: Amount Ratio
 y: Area Ratio



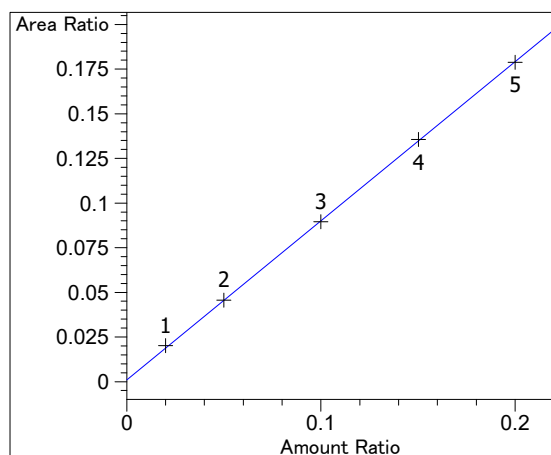
1-Propanol at exp. RT: 11.678
 FID1 A, Front Signal
 Correlation: 0.99958
 Residual Std. Dev.: 0.00140
 Formula: $y = mx + b$
 m: 7.34730e-1
 b: 1.87815e-3
 x: Amount Ratio
 y: Area Ratio



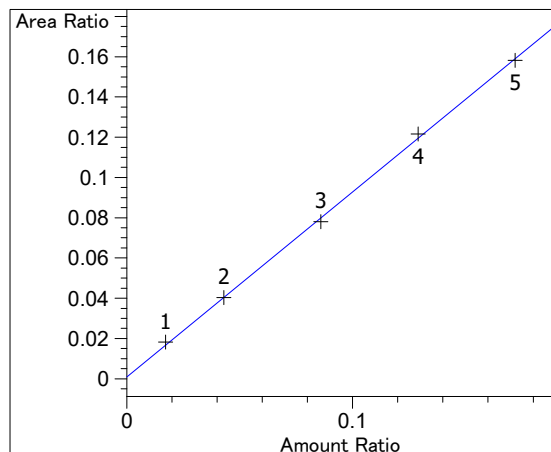
Isobutanol at exp. RT: 15.188
 FID1 A, Front Signal
 Correlation: 0.99985
 Residual Std. Dev.: 0.00097
 Formula: $y = mx + b$
 m: 8.69757e-1
 b: 1.07169e-3
 x: Amount Ratio
 y: Area Ratio



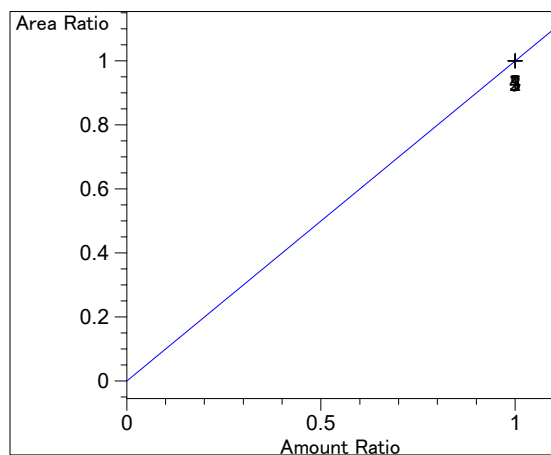
1-Butanol at exp. RT: 17.268
 FID1 A, Front Signal
 Correlation: 0.99982
 Residual Std. Dev.: 0.00100
 Formula: $y = mx + b$
 m: 8.23679e-1
 b: 9.39968e-4
 x: Amount Ratio
 y: Area Ratio



2-Metil-1-Butanol at exp. RT: 18.817
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99992
Residual Std. Dev.: 0.00096
Formula: $y = mx + b$
m: 8.90857e-1
b: 1.02239e-3
x: Amount Ratio
y: Area Ratio



3-Metil-1-Butanol at exp. RT: 18.866
FID1 A, Front Signal
Correlation: 0.99970
Residual Std. Dev.: 0.00169
Formula: $y = mx + b$
m: 9.19482e-1
b: 8.58547e-4
x: Amount Ratio
y: Area Ratio

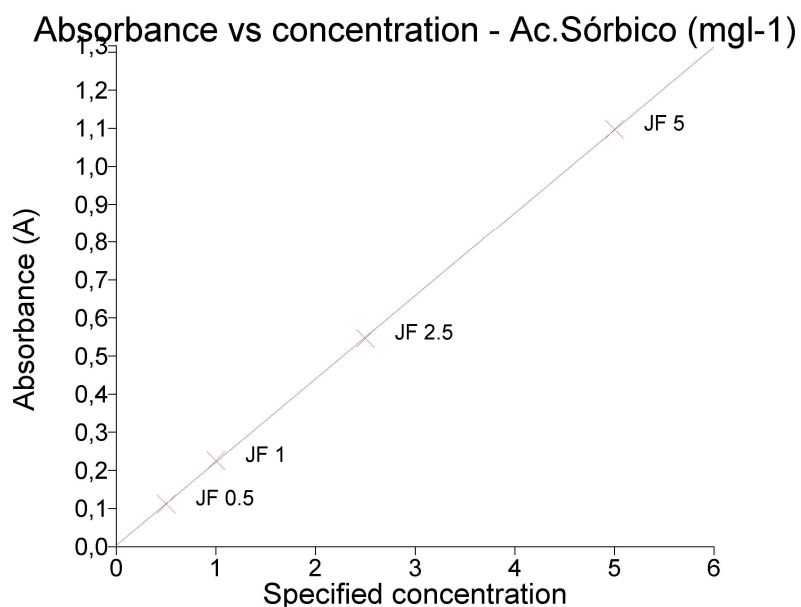


PI (1-Pentanol) at exp. RT: 19.719
FID1 A, Front Signal
Correlation: 1.00000
Residual Std. Dev.: 0.00000
Formula: $y = mx + b$
m: 1.00000
b: 0.00000
x: Amount Ratio
y: Area Ratio

=====

Vinho Madeira (Continuação Anexo 2)

Ac.Sórbico Juliana s/branco



Component Name	Ac.Sórbico
Units	mg/l-1
Slope	0,2185
Intercept	0,004050
Correlation Co-eff	1,000
Type of Fit	Linear
Calibration Date:	10-28-10
Wavelength(s) nm	256

Calibration Standards

Standard ID	Concentration	Absorbance
JF 0.5	0,5000	0,1125
JF 1	1,000	0,2255
JF 2.5	2,500	0,5467
JF 5	5,000	1,0974

Analytical Results

Sample ID	Description	Concentration	Ac.Sórbico	Ordinate
JF 0.5	JF 0.5	0,5000	0,4963	0,1125
JF 1	JF 1	1,0000	1,0139	0,2255
JF 2.5	JF 2.5	2,5000	2,4844	0,5467
JF 5	JF 5	5,0000	5,0054	1,0974
LQ64_1	LQ64_1		0,4689	0,1065
LQ64_2	LQ64_2		0,4684	0,1064

Anexo 3 – Cálculos incertezas padrão da veracidade

Álcool neutro

Para se obter $u_{\text{veracidade}}$, através de ensaios de recuperação, foram calculadas as incertezas relativas associadas a cada concentração fortificada, $\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}}$, onde

$$u(C_{\text{fortificada}}) = C_{\text{fortificada}} \times \sqrt{\left(\frac{u_m(u)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Balão SI}}}}{V_{\text{Balão SI}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Pipeta 1}}}}{V_{\text{Pipeta 1}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Balão SR}}}}{V_{\text{Balão SR}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Pipeta 2}}}}{V_{\text{Pipeta 2}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Balão Cfortificada}}}}{V_{\text{Balão Cfortificada}}}\right)^2} \quad (37).$$

Para se obter as soluções de $C_{\text{fortificada}}$, foram preparadas em primeiro lugar soluções individuais (SI) a partir da massa medida de cada composto (m) afetada pela respetiva pureza em balões volumétricos de volume $V_{\text{Balão SI}}$. A partir das SI, preparou-se a solução de referência (SR), ao retirar certo volume com uma pipeta volumétrica ($V_{\text{Pipeta 1}}$) para um balão volumétrico de volume $V_{\text{Balão SR}}$. Por fim, cada nível de concentração, $C_{\text{fortificada}}$, foi preparado numa solução por diluição de um volume de SR retirado com uma pipeta volumétrica ($V_{\text{Pipeta 2}}$) para um balão volumétrico ($V_{\text{Balão Cfortificada}}$).

Na Tabela 7-i e na Tabela 7-ii, encontram-se os valores tidos em conta na quantificação de $u(C_{\text{fortificada}})$, pela equação (37), assim como o seu valor relativo.

Tabela 7-i - Valores intermédios envolvidos na quantificação da incerteza associada à concentração fortificada.

$C_{SR} = \frac{m/V_{Bal\tilde{a}o\ SI} \times V_{Pipeta\ 1}}{V_{Bal\tilde{a}o\ SR}}$		$C_{fortificada} = \frac{\frac{m/V_{Bal\tilde{a}o\ SI} \times V_{Pipeta\ 1}}{V_{Bal\tilde{a}o\ SR}} \times V_{Pipeta\ 2}}{V_{Bal\tilde{a}o\ Cfortificada}}$			
$u_m(u)$ (g)	7,50x10 ⁻⁰⁵	V_{Pipeta} (mL)	2,00	5,00	9,00
$V_{Bal\tilde{a}o\ SI}$ (mL)	100,00				
$u_V\ Bal\tilde{a}o\ SI$ (mL)	5,78x10 ⁻⁰²	$u_V\ Pipeta$ (mL)	6,51x10 ⁻⁰³	9,00x10 ⁻⁰³	1,10x10 ⁻⁰³
$V_{Pipeta\ 1}$ (mL)	2,50				
$u_V\ Pipeta\ 1$ (mL)	7,00x10 ⁻⁰³	$V_{Bal\tilde{a}o\ Cfortificada}$ (mL)	50,00		
$V_{Bal\tilde{a}o\ SR}$ (mL)	200,00				
$u_V\ Bal\tilde{a}o\ SR$ (mL)	8,66x10 ⁻⁰²	$u_V\ Bal\tilde{a}o\ Cfortificada$ (mL)	3,47x10 ⁻⁰²		

Tabela 7-ii - Valores das massas medidas de cada composto na solução SI, concentrações preparadas de $C_{fortificada}$ para os três níveis em cada composto e incerteza relativa da mesma.

Composto	m (g)	$C_{fortificada}$ (mg/L)			$\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}$		
		Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Etanal	1,3068	6,51	16,29	29,31	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,46 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
Acetato de etilo	1,3028	6,51	16,28	29,31	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,46 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
Acetal	1,2968	6,42	16,05	28,89	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,46 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
Metanol	5,0080	25,0	62,5	112,6	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,46 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
2-Butanol	0,3018	1,50	3,75	6,74	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,47 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
1-Propanol	0,2914	1,46	3,64	6,55	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,47 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
Isobutanol	0,3000	1,50	3,75	6,75	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,47 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
1-Butanol	0,2980	1,49	3,72	6,70	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,47 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
2-Metil-1-butanol	0,3900	1,93	4,84	8,70	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,47 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$
3-Metil-1-butanol	1,3068	6,51	16,29	29,31	$4,41 \times 10^{-03}$	$3,46 \times 10^{-03}$	$2,98 \times 10^{-03}$

Quantificadas as incertezas relativas, substituiu-se na equação (24) o valor mais alto que se verificou de $\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}$ (destacado a negrito), segundo recomendação do Guia Relacre 31²². Todos os valores a ter em conta no cálculo e $u_{veracidade}$ estão apresentados na Tabela 7-iii.

Tabela 7-iii - Valores intermédios envolventes no cálculo da incerteza padrão da veracidade e resultado da mesma para todos os compostos.

Incerteza padrão da veracidade				
Composto	$\bar{R}(\%)$	$S_{Ri}^2(\%)$	$\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}}$	$u_{veracidade}(\%)$
Etanal	88,8	49,8	$4,41 \times 10^{-03}$	4,09
Acetato de etilo	96,5	0,243	$4,41 \times 10^{-03}$	0,512
Acetal	96,4	0,308	$4,41 \times 10^{-03}$	0,532
Metanol	98,8	2,31	$4,41 \times 10^{-03}$	0,979
2-Butanol	96,5	15,41	$4,41 \times 10^{-03}$	2,31
1-Propanol	99,3	48,04	$4,41 \times 10^{-03}$	4,03
Isobutanol	97,6	29,98	$4,41 \times 10^{-03}$	3,19
1-Butanol	96,8	6,71	$4,41 \times 10^{-03}$	1,56
2-Metil-1-butanol	98,0	3,64	$4,41 \times 10^{-03}$	1,18
3-Metil-1-butanol	101	5,17	$4,41 \times 10^{-03}$	1,39

Vinho Madeira (Continuação Anexo 3)

A fim de quantificar a $u_{\text{veracidade}}$, através de ensaios de recuperação, foram calculadas as incertezas relativas associadas a cada concentração fortificada, $\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}}$, onde

$$u(C_{\text{fortificada}}) = C_{\text{fortificada}} \times \sqrt{\left(\frac{u_m(u)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Balão SR}}}}{V_{\text{Balão SR}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Pipeta}}}}{V_{\text{Pipeta}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{Balão Cfortificada}}}}{V_{\text{Balão Cfortificada}}}\right)^2} \quad (38).$$

Cada solução de $C_{\text{fortificada}}$ foi preparada através de uma solução de referência, cuja concentração, C_{SR} , se obtém da massa medida de ácido sórbico (m) num volume do balão volumétrico ($V_{\text{Balão SR}}$). Por fim, da solução de referência foi retirado um determinado volume com uma pipeta volumétrica, V_{Pipeta} , para o balão volumétrico respetivo, $V_{\text{Balão Cfortificada}}$. As incertezas $u_m(u)$ e u_V foram retiradas dos certificados de calibração respetivos (Anexo) ou calculadas pela informação dos mesmos segundo as equações (25) e (26).

Na Tabela 7-iv, encontram-se os valores tidos em conta na quantificação de $u(C_{\text{fortificada}})$, pela equação (38), assim como o seu valor relativo.

Tabela 7-iv - Valores intermédios envolvidos na quantificação da incerteza associada à concentração fortificada.

Incertezas associadas aos Ensaios de Recuperação					
$C_{\text{SR}} = \frac{m}{V_{\text{Balão SR}}}$		$C_{\text{fortificada}} = \frac{m/V_{\text{Balão SR}} \times V_{\text{Pipeta}}}{V_{\text{Balão Cfortificada}}}$			
m (g)	$2,500 \times 10^{-01}$	V_{Pipeta} (mL)	10,00	20,00	30,00
$u_m(u)$ (g)	$7,50 \times 10^{-05}$	$u_{V_{\text{Pipeta}}}$ (mL)	$1,193 \times 10^{-02}$	$1,833 \times 10^{-02}$	$1,744 \times 10^{-02}$
$V_{\text{Balão SR}}$ (mL)	1000,0	$V_{\text{Balão Cfortificada}}$ (mL)	50,00		
$u_{V_{\text{Balão SR}}}$ (mL)		$u_{V_{\text{Balão Cfortificada}}}$ (mL)	$3,47 \times 10^{-02}$		
$u_{V_{\text{Balão SR}}}$ (mL)	$2,40 \times 10^{-01}$	$C_{\text{fortificada}}$ (g/mL)	$5,000 \times 10^{-05}$	$1,000 \times 10^{-04}$	$1,500 \times 10^{-01}$
		$\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}}$	$1,43 \times 10^{-03}$	$1,21 \times 10^{-03}$	$9,83 \times 10^{-04}$

Quantificadas as incertezas relativas, substituiu-se na equação (24) o valor mais alto que se verificou de $\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}}$ (destacado a negrito), segundo recomendação do Guia Relacre 31²². Todos os valores a ter em conta no cálculo e $u_{\text{veracidade}}$ estão apresentados na Tabela 7-v.

Tabela 7-v - Valores intermédios envolventes no cálculo da incerteza padrão da veracidade e resultado da mesma.

Incerteza padrão da veracidade			
$\bar{R}(\%)$	$s_{\text{Ri}}^2(\%)$	$\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}}$	$u_{\text{veracidade}}(\%)$
95,74	2,555	$1,43 \times 10^{-03}$	0,93

Anexo 4 – Certificados de calibração

Balança analítica

ULM CCO104 03



GOVERNO REGIONAL DA MADEIRA

Laboratório Regional de Engenharia Civil

UNIDADE LABORATORIAL DE METROLOGIA



CERTIFICADO Nº 665/22

Resultados de Ensaio

1. Ensaio prévio

Carga (g)	Erro (g)
49,9998	-0,0002
109,9998	0,0000

Foi efectuado um ensaio prévio à carga indicada na tabela, não tendo em seguida sido efectuada a regulação do IP segundo as instruções do fabricante.

2. Ensaio de exatidão

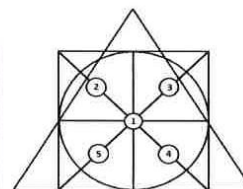
Carga (g)	Erro de indicação (g)	Incerteza ($U_{95\%}$) (g)	V_{eff}	k
0,00100	0,0000	$\pm 0,00018$	9	2,32
0,01000	0,0002	$\pm 0,00010$	550	2,00
0,05001	0,0002	$\pm 0,00013$	23	2,11
0,99998	0,0001	$\pm 0,00015$	15	2,18
19,99995	0,0003	$\pm 0,00011$	427	2,01
49,99981	0,0002	$\pm 0,00015$	45	2,06
79,99971	0,0001	$\pm 0,00024$	17	2,16
99,99980	0,0004	$\pm 0,00034$	8	2,37
149,99961	0,0003	$\pm 0,00031$	14	2,20
209,99986	0,0005	$\pm 0,00036$	60	2,04

3. Ensaio de reversibilidade

Erro máximo de reversibilidade (g)	0,0000
------------------------------------	--------

4. Ensaio de excentricidade

Carga (g)	Erro de indicação (g)	Posição
70	70,0006	1- Centro
	70,0000	2 - Esquerda Superior
	70,0002	3 - Direita Superior
	70,0000	4 - Direita Inferior
	69,9998	5 - Esquerda Inferior



O valor de excentricidade máxima, calculado como a maior diferença de erros de indicação entre os cantos e o centro por aplicação excentrica de uma carga de 70 g, foi de 0,0008 g

NOTAS:

Os erros absolutos de medição foram calculados segundo a definição constante do "Vocabulário Internacional de Metrologia", IPQ.

A incerteza expandida apresentada, está expressa pela incerteza padrão multiplicada pelo factor de expansão k, o qual para uma distribuição-t com $n-1$ graus de liberdade corresponde a uma probabilidade de cobertura de, aproximadamente, 95%. A incerteza foi calculada de acordo com o documento EA-4/02

Para os cálculos foram consideradas as contribuições das incertezas associadas ao padrão, à sua resolução, ao método de calibração e às condições de referência. A estabilidade a longo prazo do objecto de calibração não foi considerada.

Os resultados referem-se apenas aos itens calibrados.

Rua Agostinho Pereira de Oliveira - S. Martinho
9000-264 Funchal - Portugal - E-mail: info@lrec.pt
Telefone: 291 724 060
Fax: 291 724 061

*Calibração feita em todos os pontos na gama 0-210Jg
2022.12.02
#6
Equipamento apto
para restições.*

ULM.CC0104 03



GOVERNO REGIONAL DA MADEIRA
Laboratório Regional de Engenharia Civil
UNIDADE LABORATORIAL DE METROLOGIA



CERTIFICADO Nº 665/22

Entidade Requisitante	Instituto do Vinho, do Bordado e do Artesanato da Madeira, IP-RAM		
Endereço	Rua Visconde Anadia, nº44 / 9050-020 Funchal		
Equipamento	Instrumento de pesagem não automático	Ref. Int.	125
Marca / modelo	Mettler Toledo / ME204T/00	Nº Série	C041235597
Intervalo de medição (g)	0 - 220	Nº Inf.	-
Resolução (g)	0,0001	Classe	I
Procedimento	Procedimento de calibração PC01.04.11		
Norma de referência	-		
Rastreabilidade	Os resultados apresentados neste certificado estão rastreados a padrões nacionais ou internacionais que realizam as unidades de medição de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI)		
Data de calibração	28/11/2022	Local	Laboratório (Instalações do cliente)
Inspecção Visual	Nada a assinalar		
Observações Gerais	Nada a assinalar		
Condições ambientais	Temperatura (°C)	Humidade Relativa (%)	

Funchal, 28 de novembro de 2022

O Técnico

Carlos Teixeira

(Celso Teixeira)

O Responsável Técnico

Carlos Gonçalves

(Carlos Gonçalves)

Rua Agostinho Pereira de Oliveira - S. Martinho
9000-264 Funchal - Portugal · E-mail: info@lrec.pt
Telefone: 291 724 060
Fax: 291 724 061

Pipetas volumétricas – Álcool neutro (Continuação Anexo 4)

lote de 15 pipetas. 2022.10.18.PR

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 24-06-2021
Referência / Art. no. 4.3433704
Designação / Description
Pipeta volumétrica 1 traço, classe A, Normax 2,5 ml
Volumetric pipette 1 mark class A 2.5 ml

lote: 70604

Serie / Batch 60874
Unidade / Units ml
Volume nominal / Nominal volume 2.5
Divisão / Division
Norma / Standard ISO 648
Tolerância / Tolerance 0.012
Média / Mean value 2.499
Desvio padrão / Standard deviation 0.001

DP015 Rev.6

*Acuidade do lote
dp ≤ tol. ped.
0,001 < 0,012
OK
lote acurte!
2022/10/18 AF*

www.normax.pt

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2015 disponível em www.normax.pt
ISO 9001:2015 certificate available at

NORMAX

Certificado de qualidade conforme 2010/06/26

Certificado de qualidade

Certificate of performance

1) Entrega ao serviço a 20/06/26 (5 pipetas) ✓

Data / Date 18-11-2013
Referência / Art. no. 4.3433907
Designação / Description
Pipeta volumétrica 1 traço, classe AS, Normax 5 ml
Volumetric pipette one mark, class AS Normax 5 ml

Serie / Batch 13.426
Unidade / Units ml
Volume nominal / Nominal volume 5
Divisão / Division
Norma / Standard ISO 648
Tolerância / Tolerance 0.015
Média / Mean value 4.999
Desvio padrão / Standard deviation 0.002

*Acuidade da calibração
DP ≤ tol. ped.
0,002 < 0,015 OK
calibração feita a 2020/06/26 AF*

Normax, Lda. - Rua Santa Isabel, nº 17 - 2430-475 Marinha Grande - Portugal

NORMAX

Certificado de qualidade

Certificate of performance

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.

Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.

Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2008 disponível em www.normax.pt
ISO 9001:2008 certificate available at www.normax.pt

Certificado de
conformidade
2018.06.22
#8

Qualitätszertifikat certificate of performance - Certificat de qualité - Certificado de calidad Chargenzertifikat zur Konformitätsprüfung gemäß Eichordnung Lot certificate to control conformity according to the regulations of the German federal office for weights and measures - Certificat de lot pour vérifier la conformité selon les instructions du bureau de vérification des poids et mesures - Certificado de lote para controlar la conformidad de acuerdo con los reglamentos de la oficina de contraste de pesos y medidas -		Poulten & Graf GmbH FORTUNA®  	
Artikelbezeichnung: article - article - Artículo		Vollpipetten, Klasse KB braun, graduert	
Artikelnummer: number of article - numero de l' article - número del artículo		1.230-25-04	
Nennvolumen / Toleranz: nominal value / tolerance - volume nominale / tolérance - Volumen nominal / tolerancia		2,000 ml +/- 0,010 ml	
Serien - oder Chargennummer: number of lot - numero du lot - número de lote		9/01	
Gerät entspricht der Norm: item in conformity with norm - appareil es conforme avec la norme - aparato es conforme a la norma		DIN 12691	
Stichprobenprüfung nach ISO 3951 sampling inspection according to ISO 3951 - échantillonnage selon ISO 3951 - prueba al azar de acuerdo con ISO 3951			
Mittelwert: 100 / 50 / 20 % mean value - valeur moyenne - valor medio		2,001	
Standardabweichung: 100 / 50 / 20 % standard tolerance - tolérance standard - tolerancia standard		0,003	
Richtigkeit: 100 / 50 / 20 % accuracy - exactitude - exactitud		0,003 ≤ 0,010 ml	
Präzision: 100 / 50 / 20 % precision - précision - precisión		OK	
Annahmefaktor: acceptability constant - constante d'acceptabilité - factor de aceptación		Sollwert min.: nominal value valeur prescrite : valor teórico	Istwert: actual value valeur réelle valor efectivo
100 %		2,22	4,34 / 3,72
50 %			
20 %			
Gemessene Auslaufzeit: measured time of flow - écoulement mesuré - tiempo de vaciado medido		i.O.	
Losnummer: number of lot - numero du lot - número de test		379/01	
Chargenprüfung bestanden / Datum: lot examination passed / date - lot vérification réussie / date - Verificación de lote aprobado / fecha		2002-01-15	
Prüfer: operator - vérificateur - comprobador 			

Herma

ES a 2018.06.22 - 14 p.petas. PR

Qualitätszertifikat_Poulten & Graf GmbH

*Certificado está
conforme
2019/06/07
H8*



CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO

CERTIFICADO Nº 43369 ✓

IDENTIFICAÇÃO DO CLIENTE

Instituto do Vinho, Bordado e Artesanato da Madeira, I.P.
9000-079 Funchal ✓

IDENTIFICAÇÃO DO INSTRUMENTO

Pipeta volumétrica

NÚMERO 8771 (17.795) ✓

MARCA NORMAX

MODELO 1 traço

ALCANCE 9 ml ✓

DIVISÃO

CLASSE A (± 0.02 ml) ✓

MATERIAL Vidro sódico-cálcico

OBSERVAÇÕES

*Acentuação da calibração
 $|E_{rel}| + |I_{rel}| \leq CA$ (td. padrão)*

Calibração aceita a 2019.06.07. H8

PADRÕES UTILIZADOS RASTREABILIDADE CONDIÇÕES AMBIENTAIS

BALANÇA	BI018	IPAC M0002 (TAP)		
TERMÔMETRO	Tm018	IPAC M0003 (CATIM)	TEMPERATURA DO AR	21°C ✓
TERMOHIGRÔMETRO	Th005	IPAC M0003 (CATIM)	HUMIDADE RELATIVA	56%
BARÔMETRO	Ba002	IPAC M0002 (TAP)	PRESSÃO ATMOSFÉRICA	1007 hPa

Calibração efectuada pelo método gravimétrico, com base na norma ISO 4787:2010 e no documento IT III.22.2, ed.3, rev.1, à temperatura de referência de 20°C.

RESULTADOS

Indicação do instrumento	Valor medido	Incerteza expandida	$ E_{rel} + I_{rel} $ Incerteza	Erro	Unidade	k	vel
9	8.9941	0.0022	0.0081 <i>0.002</i>	-0.0059	ml	2.23	12

A incerteza expandida apresentada, está expressa pela incerteza-padrão multiplicada pelo factor de expansão k, o qual para uma distribuição-t com vel graus de liberdade efectivos corresponde a uma probabilidade de expansão de aproximadamente, 95%. A incerteza foi calculada de acordo com o documento EA-4/02. O valor apresentado para a soma $|E_{rel}| + |I_{rel}|$ é obtido a partir dos valores não arredondados das parcelas. Em alguns casos, a soma dos valores arredondados das parcelas poderá ser ligeiramente diferente do resultado apresentado que, contudo, é o mais exacto.

CALIBRAÇÃO EFECTUADA POR

DIRECTORA DO NORMALAB

Emilia Borges ✓

Drª Isabel Faria ✓

DATA DA CALIBRAÇÃO 17-05-2019

DATA DO CERTIFICADO 17-05-2019

NORMALAB - Laboratório de Calibração de Vidraria Volumétrica

www.normax.pt

Rua de Santa Isabel, 17

2430-475 MARINHA GRANDE

normalab@normax.pt

Mod. Lab 001.V, rev. 1 Página 1/1

Não pode ser reproduzido parcialmente, excepto com autorização escrita do NORMALAB

1) Entrada ao novo a 2023.03.01.PR



CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO

CERTIFICADO Nº 31424



IDENTIFICAÇÃO DO CLIENTE

Instituto do Vinho, Bordado e Artesanato da Madeira, I.P.
9000-079 Funchal

IDENTIFICAÇÃO DO INSTRUMENTO

Pipeta volumétrica

NÚMERO 7543 (14.034)

MARCA NORMAX

MODELO 1 traço

ALCANCE 1 ml

DIVISÃO

CLASSE AS (± 0.008 ml)

MATERIAL Vidro sódico-cálcico

OBSERVAÇÕES

Conforme
2015.06.26
#1

- Atestação da Calibração
 $|Emo| + |Inc.| \leq CA$ (tol. padrão)

Calibração feita a 2015.06.26 #1

PADRÕES UTILIZADOS

BALANÇA B1025
TERMÓMETRO Tm018
TERMOHIGRÓMETRO Th005
BARÓMETRO Ba002

RASTREABILIDADE

IPAC M0002 (TAP)
IPAC M0002 (TAP)
IPAC M0002 (TAP)
IPAC M0002 (TAP)

CONDIÇÕES AMBIENTAIS

TEMPERATURA DO AR 21°C
HUMIDADE RELATIVA 60%
PRESSÃO ATMOSFÉRICA 1009 hPa

Calibração efectuada pelo método gravimétrico, com base na norma ISO 4787:2010 e no documento IT III 22.2. ed.3, rev.1, à temperatura de referência de 20°C.

RESULTADOS

Indicação do instrumento	Valor medido	Incerteza expandida	Erro + Incerteza	Erro	Unidade	k	vef
1	0.9988	0.0014	0.0026	0.0012	ml	2.87	4

1) FS a 2019.01.02 para a cromatografia (medida do EI). PR

A incerteza expandida apresentada, está expressa pela incerteza-padrão multiplicada pelo factor de expansão k, o qual para uma distribuição-t com vef graus de liberdade efectivos corresponde a uma probabilidade de aproximadamente, 95%. A incerteza foi calculada de acordo com o documento EA-4/02.
O valor apresentado para a soma |Erro|+ incerteza é obtido a partir dos valores não arredondados das parcelas. Em alguns casos, a soma dos valores arredondados das parcelas poderá ser ligeiramente diferente do resultado apresentado que, contudo, é o mais exacto.

CALIBRAÇÃO EFECTUADA POR

Manuela Gomes

DATA DA CALIBRAÇÃO 01-06-2015

DIRECTORA DO NORMALAB

Drª Isabel Faria

DATA DO CERTIFICADO 01-06-2015

NORMALAB - Laboratório de Calibração de Vidraria Volumétrica

www.normax.pt

Rua de Santa Isabel, 17

2430-475 MARINHA GRANDE

normalab@normax.pt

Mod. Lab 001 V, rev. 0 Página 1/1

Não pode ser reproduzido parcialmente, excepto com autorização escrita do NORMALAB

Balões volumétricos – Álcool neutro (Continuação Anexo 4)

Lote de 20 balões - 2022/10/18 PR

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 02-01-2021
Referência / Art. no. 4.3168624
Designação / Description
Balão volumétrico, boro 3.3, impr. azul, rolha plást. Normax
12/21 cl-A 100 ml
Volumetric flask w/ plastic stopper blue printed 12/21 cl-A 100 ml

Serie / Batch *Acu. neut. do lote* 84717
Unidade / Units ml
Volume nominal / Nominal volume *dp ≤ tol. pad.* 100
Divisão / Division 0,003 ≤ 0,1 ISO 1042
Norma / Standard OK
Tolerância / Tolerance 0.100
Média / Mean value *lote acerte.* 99.995
Desvio padrão / Standard deviation 0.003

1) ES a 2022/10/18 PR DP015 Rev.6 2022/10/18 PR

www.normax.pt

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2015 disponível em
ISO 9001:2015 certificate available at **www.normax.pt**

20 balões ES a 2023.01.16

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 04-03-2020
Referência / Art. no. 4.3168632
Designação / Description
Balão volumétrico, boro 3.3, impr. azul, rolha plást. Normax
14/23 cl-A 200 ml
Volumetric flask w/ plastic stopper blue printed 14/23 cl-A 200 ml

Serie / Batch *CA: Dp < Tol. pad.* 85499
Unidade / Units 0,001 ≤ 0,150 ml
Volume nominal / Nominal volume 200
Divisão / Division OK
Norma / Standard 2020.11.30 ISO 1042
Tolerância / Tolerance 0.150
Média / Mean value *HE* 199.989
Desvio padrão / Standard deviation 0.001

DP015 Rev.6

www.normax.pt

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2015 disponível em
ISO 9001:2015 certificate available at **www.normax.pt**

Lote de 30 Balões - 2021/01/11 - HE

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 18-09-2020
Referência / Art. no. 4.3168617
Designação / Description
Balão volumétrico, boro 3.3, impr. azul, rolha plást. Normax
12/21 cl-A 50 ml
Volumetric flask w/ plastic stopper blue printed 12/21 cl-A 50 ml

Serie / Batch *Acu. neut. do lote* 83844
Unidade / Units *dp ≤ tol.* ml
Volume nominal / Nominal volume 50
Divisão / Division 0,001 ≤ 0,060 ml
Norma / Standard OK! ISO 1042
Tolerância / Tolerance 0.060
Média / Mean value 49.991
Desvio padrão / Standard deviation 0.001

DP015 Rev.6

www.normax.pt

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2015 disponível em
ISO 9001:2015 certificate available at **www.normax.pt**

Pipetas volumétricas – Vinho Madeira (Continuação Anexo 4)

Lote de 20 pipetas 2023/05/15 PR

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 2023-02-10
Referência / Art. no. 4.3433708
Designação / Description
Pipeta volumétrica 1 traço, imp. azul, classe A, Normax 10 ml
Volumetric pipette 1 mark, blue printing, class A, Normax 10 ml
Serie / Batch 64199
Unidade / Units ml
Volume nominal / Nominal volume 10
Divisão / Division
Norma / Standard ISO 648, ASTM E969
Tolerância / Tolerance 0.020
Média / Mean value 10.000
Desvio padrão / Standard deviation 0.003

CA: pipetas < tol. 0,003 < 0,02 OK!

lote a 2023/05/15

DP015 Rev.6



Certificado de série
Batch certificate

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787, à temperatura de 20°C.
Os padrões utilizados são calibrados por um laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.
Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.
The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.
The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2015 disponível em
ISO 9001:2015 certificate available at

www.normax.pt



Certificado de série

Batch certificate

2018.10.01 - 15 pipetas

Data / Date 18-11-2016
Referência / Art. no. 4.3433912
Designação / Description
Pipeta volumétrica 1 traço, classe AS, Normax 20 ml
Volumetric pipette 1 mark, class AS Normax 20 ml
Serie / Batch 16.482
Unidade / Units ml
Volume nominal / Nominal volume 20
Divisão / Division
Norma / Standard ISO 648
Tolerância / Tolerance 0.030
Média / Mean value 20.006
Desvio padrão / Standard deviation 0.006

desvio padrão < tol. 0,006 < 0,030 OK!

Normax, Lda. - Rua Santa Isabel, nº 17 - 2430-475 Marinha Grande - Portugal



Certificado de qualidade

Certificate of performance

Ensaio realizado segundo a norma ISO 4787,
à temperatura de 20°C

Tests performed according to ISO 4787, at 20°C.

Os padrões utilizados são calibrados por laboratório acreditado (ISO/IEC 17025) e são rastreáveis a padrões nacionais ou internacionais reconhecidos.

The standards used are calibrated by ISO/IEC 17025 accredited laboratories and are traceable to national or international recognized standards.

Os produtos certificados por este documento são produzidos no âmbito de um sistema de gestão da qualidade certificado desde 1995.

The products certified by this document are manufactured under a quality system certified since 1995.

Certificado ISO 9001:2008 disponível em www.normax.pt
ISO 9001:2008 certificate available at www.normax.pt

*Descontabilizado
em 2019.12.02*

**HIRSCHMANN®
LABORGERÄTE**

Chargen-Kalibrierzertifikat / Batch Calibration Report Certificate of Calibration par lot / Certificado de Calibración de Lote	
VOLLPIPETTEN AS 30 ML VOLUMETRIC PIPETTES 30 ML PIPETTES JAUGÉES AS 30 ML PIPETAS VOLUMET. CL. AS, 30 ML	
Art.Nr./Cat. No. Réf./Ref. 1340173	Chargen Nr./Batch no. N° du lot/Número de lote A-11
Nennvolumen/Nominal volume Volume nominal/Volumen nominal 30 mL	Justierung/Calibration Justage/Ajuste Ex 20 °C
Mittelwert/Mean value Valeur moyenne/Valor medio 30.024 ml OK	Toleranz/Tolerance Tolérance/Tolerancia 0.03 mL
Standardabweichung/Standard deviation Déviation standard/Desviación standard 0.002 mL	AQL Prüfung /AQL examination Exam AQL/ AQL examen OK
Prüfmittel/Testing devices/Instruments de contrôle/Instrumentos de medición: Waage/Balance/Balance/Balanza: R160P Gewicht/Weight/Poids/Peso: 0.01g / 162g Thermometer/Thermometer/Thermomètre/Termómetro: Omega INF-B-EI Barometer/Barometer/Baromètre/Barómetro: Omega iBTX-M/N	
Prüfer/Operator/Vérificateur/Comprobador: Krüger <i>L. Krüger</i>	Datum/Date/Date/Fecha 4/12/2011
Firma/Company/Firme/Empresa Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Hauptstraße 7-15 D-74246 Eberstadt Germany	Kunde/Customer/Client/Cliente V. Reis, Lda. Av. D. Carlos I, 35 - 1º Dto. 1200-646 Lisbon Portugal
Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20°C, d. h. gleiche Temperatur von Gerät, Umgebung und Wasser (nach ISO 3696). Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die bei den Messungen verwendeten Normale sind an die Normale PTB angeschlossen. These final test refer to 20°C, i. e. similar temperatur of the device, the surrounding and the water (acc. To ISO 3696). The test was effected according to ISO 4787. The standards used for the standards at the PTB. Les valeurs finales se réfèrent à 20°C, la température de l'appareil, la température ambiante et celle de l'eau (selon ISO 3696) étant les mêmes. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés pour la jauge ont été talonnés par le PTB. Los valores finales se refieren a 20°C, siendo similares las temperaturas del aparato, del ambiente y del agua (según ISO 3696). El test se ha ejecutado según ISO 4787. Para la medición se han utilizado los patrones del PTB.	

*Acção de
Calibração
DP < 0,03 ml
2002 < 0,03 ml
Calibração
acerte a
2019.11.27
HSA*

Entregado ao Serv. 2 pipetas a (2014.11.27) - PR

Balões volumétricos – Vinho Madeira (Continuação Anexo 4)

ISO 9001 CERTIFIED		HIRSCHMANN® LABORGERÄTE	
Chargen - Qualitätszertifikat Batch Certificate of Performance Certificat de qualité par lot			
Artikel Nr 2820193 Code no. Code no.	Chargen-Nr. F-05 Batch no. Numéro du lot.		
MESSKOLBEN NS 24/29 KB 1000 ML KL. A, BLAU GRAD. VOLUMETRIC FLASKS A CC 1000 ML DURAN, NS 24/29, POLYSTOPPER FIOLES JAUGÉES A CC 1000 ML DURAN, BOUCHON POLY, NS 24/29			
Nennvolumen 1000 ml Nominal volume Volume nominal	Vorgeschriebene Toleranz ± 0,4 ml Standard tolerance Tolérance standard		
Mittelwert 1000,021 ml Mean value Valeur moyenne	Standardabweichung 0,066 ml Standard deviation Deviation standard		
AQL-Prüfung bestanden AQL examination passed Examen AQL passé	JA ☒ NEIN ☐ YES NO OUI NON		
Prüfer Operator Vérificateur <i>V. Reis</i>	Datum 25.07.2005 Date Date		
Firma Hirschmann Laborgeräte & Co. KG Company Hauptstraße 7-15 Firme D-74246 Eberstadt			
Diese Angaben sind Endprüfwerte bezogen auf 20°C, d.h. die gleiche Temperatur von Gerät, Umgebung und Wasser (nach ISO 3696). Die Prüfung erfolgte gemäß ISO 4787. Die bei den Messungen verwendeten Normalen sind an die Normale der PTB angeschlossen. These final test refer to 20°C, i.e. similar temperature of the device, the surrounding and the water (acc. to ISO 3696). The test was effected according to ISO 4787. The standards used for the measurements are traced to the standards at the PTB. Les valeurs finales se réfèrent à 20°C, la température de l'appareil, la température ambiante et celle de l'eau (selon ISO 3696) étant les mêmes. Le test a été effectué selon ISO 4787. Les étalons utilisés pour la jauge ont été.			

Lote de 30 Balões. 2021/01/11 - H

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 18-09-2020
Referência / Art. no. 4.3168617

Designação / Description
Balão volumétrico, boro 3.3, impr. azul, rolha plást. Normax
12/21 cl-A 50 ml

Volumetric flask w/ plastic stopper blue printed 12/21 cl-A
50 ml

Serie / Batch *Acabado do Pote* 83844
Unidade / Units *dp ≤ tol.* ml
Volume nominal / Nominal volume *0,1001 < 0,060ml* 50
Divisão / Division
Norma / Standard *OK!* ISO 1042
Tolerância / Tolerance 0.060
Média / Mean value 49.991
Desvio padrão / Standard deviation 0.001

DP015 Rev.6

www.normax.pt

Lote de 30 Balões. 2021/01/11 - H

NORMAX Certificado de série
Batch certificate

Data / Date 18-09-2020
Referência / Art. no. 4.3168617

Designação / Description
Balão volumétrico, boro 3.3, impr. azul, rolha plást. Normax
12/21 cl-A 50 ml

Volumetric flask w/ plastic stopper blue printed 12/21 cl-A
50 ml

Serie / Batch *Acabado do Pote* 83844
Unidade / Units *dp ≤ tol.* ml
Volume nominal / Nominal volume *0,1001 < 0,060ml* 50
Divisão / Division
Norma / Standard *OK!* ISO 1042
Tolerância / Tolerance 0.060
Média / Mean value 49.991
Desvio padrão / Standard deviation 0.001

DP015 Rev.6

www.normax.pt