

# Relatório de Estágio

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de ureia no Vinho do Porto, por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) com detecção por fluorescência

Maria João Moreira Veiga  
Porto, Julho de 2004

66(047.3)  
LEQ 2003/VEIm



# Relatório de Estágio

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de ureia no Vinho do Porto, por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) com detecção por fluorescência

Maria João Moreira Veiga  
Porto, Julho de 2004



66(0973)/LE9 2003/VEFm

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca II	
Nº	91335
CDU	543-544 (0973)
Data	03/07/2004

## Agradecimentos

À Professora Doutora Arminda Alves, minha orientadora, pela sua orientação, disponibilidade e ajuda constante durante todo o período do estágio.

Ao Engenheiro Tomás Simões, meu supervisor pela disponibilidade, simpatia e confiança demonstrada na execução deste trabalho.

À Doutora Ana Oliveira, pela sua total disponibilidade, orientação, simpatia, ensinamentos e acompanhamento ao longo de todo o estágio.

Ao Doutor Paulo Herbert, pelo apoio, orientação e acompanhamento ao longo da realização deste trabalho.

A todas as pessoas que trabalham no IVDP, pelo seu acolhimento, amizade e disponibilidade durante o período do estágio.

Maria João Pereira Veiga

# Índice

	Página
1. Resumo .....	2
2. Introdução .....	4
• Carbamato de Etilo – o que é, sua importância nos vinhos .....	4
i. Carbamato – fórmula e propriedades .....	4
ii. Formação de carbamato de etilo nos vinhos .....	4
iii. Controlo de qualidade – limites legais .....	7
• Ureia – o que é, sua importância nos vinhos .....	8
i. Ureia – fórmula e propriedades .....	8
ii. Formação de ureia nos vinhos .....	8
iii. Controlo de qualidade – limites legais .....	10
3. Trabalho Experimental .....	11
• Fases do trabalho experimental .....	11
• Determinação de carbamato de etilo em vinhos .....	12
i. Princípio do método .....	12
ii. Reagentes .....	12
iii. Equipamento .....	12
iv. Procedimento Experimental .....	13
1. Amostras .....	13
2. Fase móvel .....	14
3. Arranque e limpeza do HPLC .....	14
4. Condições operatórias .....	14
5. Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos .....	15
v. Resultados e discussão .....	15
• Determinação de ureia em vinhos.....	25
i. Metodologia de trabalho.....	25
ii. Princípios do método .....	25
iii. Procedimento experimental .....	25
1 Amostras .....	25
2 Análise cromatográfica .....	26
iv. Resultados e discussão .....	27
4. Conclusões .....	36
5. Bibliografia .....	38

## Resumo

Este estágio realizou-se nos laboratórios do Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, no período compreendido entre 5 de Janeiro e 30 de Junho de 2004, sob a supervisão de Eng. Tomás Simões e sob a orientação de Eng. Arminda Alves.

O objectivo inicial deste estágio era o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação, por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC), de ureia no Vinho do Porto, partindo do método de determinação de carbamato de etilo no Vinho do Porto, por HPLC, descrito na Patente Portuguesa no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) com o n.º 102520.

No início do estágio realizou-se a aprendizagem do método de derivatização necessário à determinação da ureia em vinhos, bem como do modo de funcionamento do equipamento analítico – HPLC com detecção por fluorescência, associado a um amostrador automático.

Dado que este equipamento tinha sido adquirido recentemente e tinha como objectivo principal de utilização a determinação de carbamato de etilo em vinhos, houve a necessidade de conjugar o trabalho correspondente ao objectivo inicial deste estágio com o trabalho de arranque, optimização das condições de operação e validação do método analítico do carbamato de etilo.

Nesta perspectiva, este estágio passou a compreender duas actividades paralelas:

1. Optimização e validação do método de análise de carbamato de etilo;
2. Optimização do método de análise da ureia.

Relativamente à análise do carbamato de etilo, foi possível optimizar o método bem como validar o mesmo, sendo os resultados mais importantes:

- gama de linearidade: [4,72; 150,98] µg/L;
- limite de detecção: 17,47 µg/L;
- limite de quantificação: 58,24 µg/L;
- precisão intermédia: 36,96±4,0 (expressa em CV%, 18 determinações para cada um dos padrões considerados);
- exactidão média: 100,30±12,7 (expressa em % de recuperação, 17 determinações).

Relativamente à ureia, apesar de não ter sido possível atingir completamente os objectivos propostos para este estágio, por falta de tempo, foram realizados ensaios que permitiram otimizar alguns parâmetros operatórios e obter alguns parâmetros de validação, a saber:

- tempo de reacção de derivatização: 5 minutos;
- gama de linearidade: [0,21; 11,90] mg/L;
- limite de detecção: 0,99 mg/L;
- limite de quantificação: 3,30 mg/L;
- precisão intermédia:  $44,56 \pm 0,3$  (expressa em CV%, 10 determinações para cada um dos padrões considerados);
- exactidão média:  $120,02 \pm 30,0$  (expressa em % de recuperação, 4 determinações).

Com este estágio foi possível adquirir novas competências ao nível de:

- modo de funcionamento de um equipamento analítico de alta resolução com amostrador automático (HPLC PerkinElmer);
- procedimentos de validação de métodos analíticos;
- experiência de trabalho num Laboratório Acreditado.

# Introdução

## Carbamato de etilo – o que é, sua importância nos vinhos

O carbamato de etilo (CE), também conhecido por uretano [1,2], é um componente que se forma naturalmente em alimentos e bebidas fermentadas e que resulta muitas vezes como subproduto da fermentação [3].

Supõe-se que tenha características cancerígenas em humanos, pois exibe efeitos carcinogénicos em animais de laboratório quando administrado em doses elevadas (mg/g) [1,2] e dado que já foi identificado em bebidas espirituosas e vinhos, e em quantidades muito inferiores, em vários alimentos e bebidas fermentadas [3], o CE pode ser considerado um problema de saúde pública [4].

### i) Carbamato de etilo – fórmula e propriedades [5]

Fórmula molecular:  $\text{NH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$

Peso molecular: 89,09

Ponto de ebulição: 182-184 °C

Ponto de fusão: 48 - 50 °C

Solubilidade na água, a 25°C: 2 g/mL

Aspecto físico à temperatura ambiente: cristais incolores, granulado branco

### ii) Formação de Carbamato de etilo em vinhos

O problema relacionado com a presença de CE em bebidas alcoólicas, emergiu definitivamente quando em meados dos anos 80, o governo Canadano ordenou retirar-se do mercado diversas bebidas alcoólicas (entra as quais Vinho do Porto), após ter sido verificado que em algumas dessas bebidas havia CE em concentrações que podiam chegar aos 13400  $\mu\text{g/L}$  [6], o que levou a que fossem estabelecidos limites máximos para os diferentes tipos de bebidas neste país [7].

Actualmente, sabe-se já bastante acerca dos processos de formação do CE, bem como de factores que a condicionam nas bebidas alcoólicas, onde o CE existe naturalmente em quantidades vestigiais (normalmente na ordem dos  $\mu\text{g/L}$ ).



Pensa-se que seu processo de formação não seja por via enzimática, mas sim através da reacção entre o etanol e compostos que contenham um grupo carbamilo. Assim, as bebidas alcoólicas, nomeadamente as que contêm teores de etanol superiores, são meios que podem proporcionar a formação de CE.

Apesar da existência de compostos carbamilados nos mostos, não se detecta a presença de CE em sumos ou mostos, uma vez que nestes não existe etanol, nem se verifica a sua formação em condições normais durante a fermentação alcoólica, mesmo na presença de compostos carbamilados [6,8].

A ureia e a citrulina (em menor extensão) são considerados os principais precursores do CE em vinho [9, 10,11 12] pelo que o estudo dos factores que afectam a sua presença em mostos e vinhos se revelaram de maior importância no controlo da formação de CE nestas bebidas, apesar de, em bebidas alcoólicas destiladas, poderem existir outros precursores além destes (compostos não voláteis) [13]. Além destes compostos, uma origem reconhecida de compostos que podem reagir com o etanol e formar CE é o metabolismo da arginina. As vias metabólicas de degradação da arginina podem contribuir para a formação de ureia e de citrulina, e as leveduras possuem normalmente a maquinaria enzimática necessária para estas reacções [12,14].

A abordagem preventiva no sentido de evitar o aparecimento de altos teores de CE tem sido feita basicamente de duas formas: evitar a existência em grandes quantidades dos compostos precursores do CE nas bebidas alcoólicas ou, na impossibilidade de o fazer, promover a sua degradação ou desaparecimento.

No plano viticultural, como os níveis de fertilização azotada e o binómio casta/porta-enxerto influenciam os níveis de aminoácidos livres nos mostos, os níveis de arginina nos mostos e vinhos podem ser controlados pela avaliação do estado de nutrição azotada da vinha e, se necessário, pela utilização de castas de reconhecida baixa produção de arginina. Do mesmo modo, é desejável que se avaliem os teores de arginina e de azoto assimilável nos mostos, de forma a poder-se prever as quantidades de suplementos azotados que seja eventualmente necessário aplicar, visto que altos teores de azoto assimiláveis ou de arginina podem contribuir para um aumento da produção de ureia e/ou sua excreção pelas leveduras [9, 15,16,17], não sendo desejável que os teores de arginina ultrapassem os 1000 mg/L, mas por outro lado, também parecem inibir a reabsorção da ureia eventualmente produzida e que assim permanecerá no vinho [16]. Para além disto, é necessário frisar que os diferentes perfis de compostos azotados

existentes nos mostos, afectam de forma diversa o metabolismo da arginina por parte das leveduras [16,17,18].

Ao nível da fermentação alcoólica, há ainda que evidenciar que a utilização da arginina bem como a produção de ureia e a sua excreção, dependem estritamente da estirpe de levedura em causa [9,15,17].

Os factores tecnológicos, podem de igual forma afectar os níveis de CE produzidos. Para além dos já referidos e que influenciam a utilização dos aminoácidos durante a fermentação, há outros que podem assumir elevada importância. Um deles é o aquecimento a que certos vinhos estão sujeitos durante a sua manufactura, e que pode fazer aumentar significativamente os teores de CE [6,19]. De igual forma as condições físico-químicas durante o envelhecimento e a armazenagem influenciam a formação/quantidade final de CE nos vinhos [20]. O estágio dos vinhos sobre as borras, faz aumentar os teores de compostos azotados nos vinhos, embora não se tenha provado a influência negativa deste factor [21]. Além de todos estes factores, à elaboração de vinhos fortificados, pelo acréscimo de etanol que a fortificação representa, acresce um maior risco de formação de CE, quer pelos teores de CE que podem existir na aguardente a adicionar, quer pelo efeito inibitório do etanol sobre as leveduras que podem não poder reutilizar a ureia eventualmente formada. Uma outra fase em que podem aumentar os precursores de CE nos vinhos é a fermentação maloláctica. Embora haja bactérias que possuem as enzimas necessárias para degradar completamente a arginina via arginina deiminase [22], outras apenas possuem parte das enzimas necessárias a essa via metabólica, e originam a acumulação de citrulina [23]. Apesar da citrulina reagir mais lentamente com o etanol para formar CE a baixas temperaturas [10], a sua presença em altas concentrações ao longo do tempo nos vinhos, contribui para a sua formação. Uma vez que existe a possibilidade de utilização de estirpes de bactérias com demonstrada baixa produção de citrulina [10,24], ela pode ser explorada nos casos em que se pretenda realizar a fermentação maloláctica.

Ao nível das acções preventivas há ainda a assinalar a utilização de urease ácida em vinhos com altos teores de ureia, no sentido de os fazer baixar por via enzimática [25]. No entanto, e devido à potencial presença no vinho de compostos com capacidade inibitória (iões fluoreto, ácido málico e ácido gálico) relativamente a esta enzima, para que seja possível a sua utilização em enologia ainda é necessário efectuar estudos mais aprofundados [26].

### iii) Controlo de qualidade – limites legais

Apesar da sua importância, o CE não é quantificado por rotina nos laboratórios de enologia, especialmente se nos referirmos a vinhos e a vinhos licorosos.

A sua determinação em bebidas alcoólicas, nomeadamente em vinhos, coloca dificuldades ao nível analítico, devido às baixas concentrações em que normalmente se encontra, e à interferência da matriz [27]. O CE ocorre nos vinhos em teores que normalmente não ultrapassam a 2 ou 3 dezenas de microgramas por litro, podendo no entanto, atingir uma centena no caso de vinhos licorosos ou mesmo mais no caso de bebidas destiladas.

Desde que o Canadá, em 1985, estabeleceu limites para o CE nas bebidas alcoólicas, a indústria, instituições de investigação e laboratórios do governo na América do Norte, Europa e Japão iniciaram investigações sobre o CE [3]. Os limites máximos foram estabelecidos, nesse ano, pelo *Health and Welfare Canada*, sendo 30 ppb para vinho de mesa, 100 ppb para vinhos fortificados, 150 ppb para bebidas destiladas, 400 ppb para licores, aguardente vínica e aguardente de frutos [27]. Actualmente, os limites estabelecidos pela entidade reguladora *Canadian Food Inspection Agency (CFIA)* são os descritos na tabela 1 [4].

**Tabela 1** – Limites legais de concentração do CE em bebidas alcoólicas estabelecidos pela CFIA.

	Limite legal de CE ( $\mu\text{g/L}$ )
vinhos de mesa	30
vinhos licorosos	100
bebidas espirituosas	150

Em 1988, a *US Food and Drugs Administration (FDA)* aceitou um plano proposto pela maioria dos produtores de vinho americanos e apresentado pelo *Wine Institute and the Association of American Vintners*, de modo a reduzir os níveis de CE nos vinhos de mesa e licorosos. O acordo estabelecia que os vinhos de mesa ( $\leq 14^\circ$  álcool) produzidos após o Vinho do Porto de 1988 deviam conter, em média, uma concentração não superior a  $15 \mu\text{g/L}$  e que os vinhos licorosos ( $> 14^\circ$  álcool) deviam conter, em média, uma concentração não superior a  $60 \mu\text{g/L}$ . O objectivo que se pretendia atingir com a imposição destes limites era que a partir do Vinho do Porto de 1995, no máximo 1% da produção total de vinhos de mesa tivesse uma concentração superior a  $25 \mu\text{g/L}$  e que no máximo 1% da produção total de vinhos licorosos tivessem uma concentração superior a  $90 \mu\text{g/L}$  [28].

## Ureia – o que é, sua importância nos vinhos

A ureia é um composto azotado, também conhecido por carbamida, proveniente maioritariamente do metabolismo levuriano de aminoácidos como a arginina, citrulina e ornitina, e é considerado como sendo o principal precursor do carbamato de etilo durante o armazenamento [7,31].

A determinação da ureia é importante numa grande variedade de áreas, que incluem diagnósticos clínicos, monitorização ambiental e ciências alimentares [1].

Numerosas técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para a determinação da ureia, não havendo nenhuma dominante em todas as áreas devido à diversidade de aplicações [1].

O conhecimento da concentração de ureia durante o processo de fabrico do vinho é um factor importante, pois assegura que a quantidade de CE presente nos vinhos cumpre os limites legais [1], mas dado que as quantidades de ureia identificadas em bebidas com fermentação precocemente interrompida são normalmente da ordem dos  $\mu\text{g/L}$  ou inferiores [11], é extremamente difícil efectuar esta quantificação.

### i) Ureia – fórmula e propriedades [29,30]

Fórmula molecular:  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$

Peso molecular: 60,06

Ponto de fusão: 133-135 °C

Solubilidade na água, a 20°C: 1g/ 1 mg  $\text{H}_2\text{O}$

Estado físico à temperatura ambiente: cristais brancos

Odor: inodoro

Cor: incolor

### ii) Formação de ureia nos vinhos

A ureia forma-se durante o metabolismo da arginina *via* arginase, reacção onde também se forma, a ornitina [31]. Pode ser utilizada como uma fonte de azoto pela *Saccharomyces cerevisiae*, sendo degradada em amónia e dióxido de carbono *via* um complexo enzimático composto por ureia carboxilase e alofenato hidrolase [32].

A estripe da levedura [9], a arginina e concentrações elevadas de aminoácidos são factores identificados como sendo responsáveis pela formação de ureia durante a etapa de fermentação do vinho [31].

O arejamento contínuo do vinho provoca uma rápida inicial acumulação de ureia na fase de fermentação seguida de uma igualmente rápida e completa utilização da mesma, resultando assim numa concentração vestigial no vinho. No caso deste arejamento ser limitado (inicial fermentação aeróbia seguida de fermentação anaeróbia), vai provocar uma igualmente rápida acumulação no início, mas o seu consumo durante a posterior fase de armazenagem vai ser limitado levando a que se verifique uma elevada concentração desta no vinho. No entanto, se for adicionado ao mosto um suplemento de amónia (cerca de 1g/L), apesar do arejamento limitado e mesmo que existam concentrações elevadas de arginina, verificam-se baixas concentrações de ureia no vinho [31].

No processo de fabrico dos vinhos licorosos, a etapa de fortificação do mosto que ocorre ao longo da fermentação, origina uma variação nas quantidades dos precursores do carbamato de etilo [14]. Após a fermentação do mosto são libertados compostos azotados, particularmente os aminoácidos e a ureia. Assim, a ureia aparece no vinho como uma consequência do metabolismo da fermentação, apesar de não serem detectados níveis de ureia no sumo da uva [15].

A adição da aguardente vínica provoca uma maior percentagem de conversão, em ureia, no início e nas etapas intermédias da fermentação, quando na presença de levedura, no entanto, nas etapas finais não existem grande diferenças em relação à presença ou ausência de levedura [14].

Ao nível da fermentação alcoólica, há ainda que evidenciar que a utilização de arginina bem como a produção da ureia e a sua excreção, dependem estreitamente da estirpe de levedura em causa [9,15,32] e das quantidades de arginina que permanecem no vinho [32], dado que quantidade de azoto e a concentração de arginina presentes no mosto estão directamente relacionadas com a produção e aparecimento de ureia presente no vinho [18].

De modo a prevenir a formação de CE durante o envelhecimento do vinho, a remoção da ureia através de arejamento limitado e/ou do uso de estirpes de levedura com grande viabilidade, que permitem a libertação dos nutrientes azotados do vinho [32] e baixa capacidade de metabolização da arginina (nos casos em que tal se manifeste necessário, por exemplo quando existem altos teores de arginina nos vinhos) [31] deve ser efectiva.

### **iii) Controlo de qualidade – limites legais**

A *US Food and Drug Administration* recomenda que se tomem medidas na “indústria do vinho”, como evitar a excesso de fertilização e suplementos com azoto e monitorizar os níveis de azoto nos vinhos e solos de modo a minimizar as quantidades de CE nos vinhos [1].

Os níveis de ureia nos vinhos devem ser reduzidos para concentrações inferiores a 2 mg/L antes de se iniciar o período de envelhecimento/armazenagem [20,32] de modo a manter os índices de CE dentro dos níveis legais da indústria do vinho e que a temperatura de armazenamento não ultrapasse os 24°C [10].

É desejável que os níveis de ureia nos vinhos não ultrapassem os 5 mg/L [10,20].



# Trabalho Experimental

## Fases do trabalho experimental

Período	Descrição do trabalho efectuado
<b>5 Janeiro – 30 Janeiro</b>	Pesquisa de material bibliográfico relacionado com a determinação de ureia e carbamato de etilo em vinhos por HPLC.
<b>1 5 Janeiro – 28 Fevereiro</b>	Aprendizagem do modo de funcionamento do aparelho de HPLC.
<b>1 5 Janeiro – 28 Fevereiro</b>	Aprendizagem do método de derivatização.
<b>1 5 Janeiro – 30 Abril</b>	Optimização das condições de operação do aparelho de HPLC.
<b>30 Abril – 15 Maio</b>	Ensaio de optimização do método cromatográfico e de validação: análises com padrões com diferentes concentrações de CE de modo a estudar a relação entre o pico correspondente ao CE e a concentração dos padrões; estudo da linearidade; ensaios de repetibilidade, precisão intermédia e de recuperação com adição de padrão em amostras de vinhos do Porto e aguardentes.
<b>15 Maio – 30 Junho</b>	Ensaio de optimização do tempo do processo de derivatização: estudo da influência do tempo de reacção no pico correspondente à ureia.
	Realização de análises com padrões de ureia de modo a estudar a relação entre o aumento do pico e o aumento da concentração dos padrões.
	Ensaio com soluções de etanol com diferentes concentrações em etanol - estudo da área do pico.
	Ensaio de optimização do método cromatográfico e de validação: análises com padrões com diferentes concentrações de ureia de modo a estudar a relação entre o pico correspondente à ureia e a concentração dos padrões; estudo da linearidade; ensaios de repetibilidade, precisão intermédia e de recuperação com adição de padrão em amostras de vinhos do Porto e aguardentes.

# Determinação de Carbamato de Etilo em vinhos

## i) Princípios do método

O método de determinação de CE em vinhos por HPLC consiste na realização de uma reacção de derivatização e posterior análise. Esta reacção realiza-se adicionando a 250  $\mu\text{L}$  de amostra diluída, 50  $\mu\text{L}$  de solução reagente 9-X (0,02 mol/L). Posteriormente adicionam-se 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de HCl (1,5 mol/L). Após 15 minutos de reacção efectua-se a análise cromatográfica.

## ii) Reagentes

Os reagentes sólidos utilizados foram o carbamato de etilo da Aldrich, com pureza superior a 99 %, o 9-Xantidrol da Fluka, com pureza superior a 99 %, o acetato de sódio trihidratado (para análises) da Riedel-de Haën, com pureza superior a 99,5 % e o etanol absoluto da Riedel-de Haën, com pureza superior a 99,8 vol. %. Outro reagente utilizado, para a preparação dos eluentes, foi acetonitrilo da J. T. Baker com pureza superior a 99,8%.

O eluente preparado a partir do acetato de sódio foi posteriormente filtrado com filtros de membrana descartáveis de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro da Schleicher & Schuell (Dassel, Alemanha)

- **Preparação do reagente 9-xantidrol (9-X)**

A sua preparação foi efectuada como descrito na Patente Portuguesa registada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (n.º 102520), tendo consistido em dissolver a massa necessária de 9-X em 1-propanol, de forma a obter-se uma solução com a concentração final de 0,02 mol/L. Esta solução é estável durante mais de 2 meses desde que mantida no escuro e a temperatura inferior a 0°C.

## iii) Equipamento

Todas as análises foram realizadas num cromatógrafo PerkinElmer, equipado com um detector de fluorescência Series 200 PerkinElmer, tudo controlado através do software TotalChrom Navigator. A coluna analítica era uma HYPERSIL ODS 200x2.1 mm Agilent com partículas de 5  $\mu\text{m}$ .



## **iv) Procedimento Experimental**

### **1. Amostras**

#### **a) Preparação das amostras**

Os brancos de reacção consistiram numa solução de etanol a 20%, denominada solução hidroalcoólica a 20%.

Todas as amostras foram diluídas com água ultrapura ou com uma solução de etanol de concentração tal, que no final a solução resultante tivesse um teor de etanol de 20% (v/v), de modo a normalizar o seu teor alcoólico. As amostra de aguardente vínica foram diluídas 4 vezes (1:3) (v/v) com água ultrapura e as de vinhos licorosos foram diluídas 3 vezes (1:2) (v/v) com solução hidroalcoólica a 20%.

As soluções padrão foram preparadas em solução hidroalcoólica a 20%, por diluição de uma solução mãe de concentração aproximada de 5 g/L.

#### **b) Preparação das soluções padrão de carbamato de etilo (CE)**

#### **Solução-mãe**

Para um balão volumétrico de 100 mL, pesaram-se cerca de 0,5348 g de CE. Perfez-se o volume com solução hidroalcoólica a 50% (v/v) e homogeneizou-se. Calculou-se a concentração efectiva da solução em CE

#### **Solução 1**

Para um balão volumétrico de 100 mL, mediu-se por pipeta, 1 mL da solução-mãe. Perfez-se o volume com solução hidroalcoólica a 20% (v/v) e homogeneizou-se. Calculou-se a concentração efectiva da solução em CE

#### **Solução 2**

Para um balão volumétrico de 20 mL, mediu-se por pipeta, 1 mL da solução 1. Perfez-se o volume com solução hidroalcoólica a 20% (v/v) e homogeneizou-se. Calculou-se a concentração efectiva da solução em CE

#### **Soluções Padrão**

Da solução 2 retiraram-se 600  $\mu$ L, 800  $\mu$ L, 400  $\mu$ L, 150  $\mu$ L, 75  $\mu$ L e 37,5  $\mu$ L para balões volumétricos de 10 mL, no 1º caso, e de 20 mL para os restantes, perfizeram-se os

volumes com solução hidroalcoólica a 20% (v/v) e homogeneizaram-se. Obtiveram-se padrões com as seguintes concentrações, 4,72; 9,44; 18,87; 50,33; 100,65 e 150,98  $\mu\text{g/L}$ . Guardaram-se as soluções hermeticamente fechadas no frigorífico. As soluções mãe, 1, 2 e padrão após a sua preparação foram hermeticamente fechadas e guardadas no frigorífico.

## **2. Fase móvel**

A fase móvel era constituída por uma solução aquosa de acetato de sódio 20 mM (diluição de aproximadamente 2,72g de acetato de sódio em 1 L de água ultrapura), com pH 7.2 e por acetonitrilo. Para a correcção do pH da solução de acetato de sódio foram adicionadas 1 a 2 gotas de ácido acético a 2%.

## **3. Arranque e limpeza do aparelho de HPLC**

Existem procedimentos operativos essenciais à obtenção de resultados fiáveis e ao prolongamento do tempo de vida do aparelho (prevenção de avarias). No Anexo A, apresentam-se alguns desses procedimentos operativos:

- ligar o aparelho;
- purga do aparelho;
- limpeza do aparelho antes de o desligar;
- limpeza da coluna.

## **4. Condições operatórias**

### **a) Procedimento de derivatização**

A reacção de derivatização realizou-se adicionando 250  $\mu\text{L}$  de amostra diluída a 50  $\mu\text{L}$  de solução reagente 9-X (0,02 mol/L). Posteriormente adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de uma solução de HCl (1,5 mol/L). Após 15 minutos de reacção foi efectuada a análise.

Este procedimento foi efectuado automaticamente através do injector automático.

## b) Detecção e análise cromatográfica

Na detecção, os comprimentos de onda seleccionados foram 233 nm para a excitação e 600 nm para a emissão, a voltagem foi 1 e a constante de tempo foi 3.

A eluição e separação dos componentes presentes nas amostras e soluções padrão foram efectuadas recorrendo a um gradiente binário que se descreve na tabela 2.

A fase móvel A foi constituída pela solução aquosa de acetato de sódio e a fase B por acetonitrilo, como descrito no ponto 2.

**Tabela 2** – Gradiente binário utilizado na análise do CE por HPLC.

Tempo (minutos)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fluxo (mL/min)
8	55	45	0,45
0,1	55	45	0,45
18	50	50	0,45
1	0	100	0,8
7	0	100	0,45
2	55	45	0,45
1	55	45	0,45

## 5. Eliminação/tratamento dos resíduos tóxicos

Os resíduos resultantes das determinações de carbamato de etilo, foram colocados num contentor rotulado RESTOS DE CARBAMATO DE ETILO, para posterior encaminhamento adequado.

Todas as soluções e material foram cuidadosamente manuseados, sob ventilação e com luvas e todo o material proveniente das determinações foi lavado em ultra-sons a quente, 3 vezes, durante períodos de 15 minutos, com renovação da água de lavagem. Posteriormente foram passados 2 vezes por água destilada e por álcool a 96% (v/v) e colocados a secar na estufa.

## v) Resultados e Discussão

Para este estudo foram seleccionados dois Vinhos do Porto, denominados por VP1 e por VP2, e duas aguardentes vnicas, denominadas por AD1 e por AD2. Esta escolha foi feita com base no conhecimento prévio do teor de CE existente em cada uma.

## Tempo de retenção e interferências

Analisando o cromatograma da figura 1, que corresponde a um branco de reacção, verificamos que existem vários picos cromatográficos. Os picos correspondentes aos 2,5 min, 4,2 min e 9,1 min são devidos à presença em excesso de 9-xantidrol e ocorrem em todas as análises. Além destes 3 picos, observam-se, também, outros 3 picos entre os 5,5 min e os 7,3 min, que não estão associados ao composto em estudo, podendo ser devidos a contaminações, ao eluente ou por outro motivo que não foi estudado.

O pico do CE sai aproximadamente aos 7,6 min.

Nas figuras 1, 2, 3, 4 e 5 estão representados os cromatogramas de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 20% e das 4 amostras analisadas.

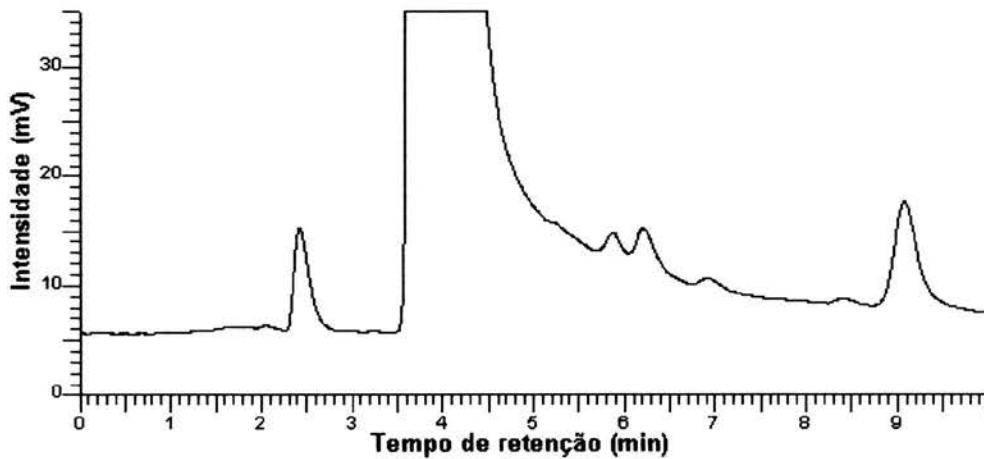


Figura 1 – Cromatograma de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 20%.

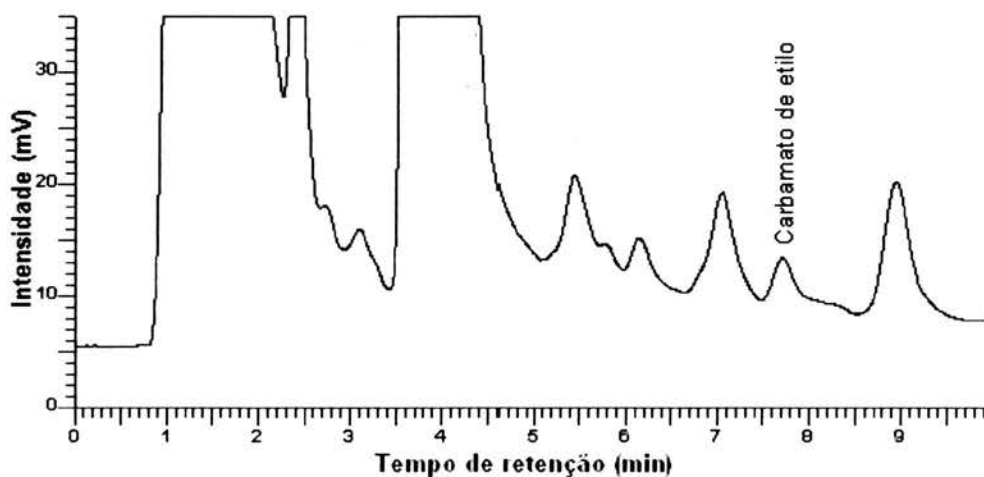


Figura 2 – Cromatograma da amostra de Vinho do Porto VP1.

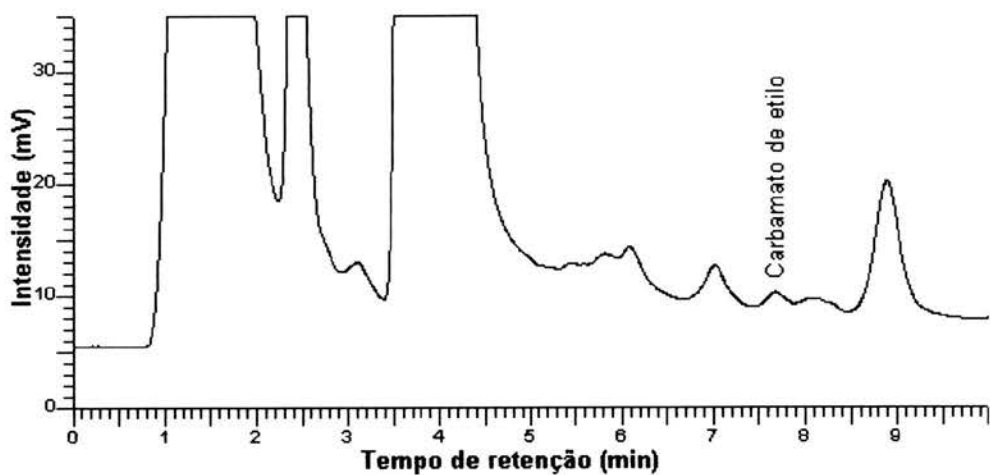


Figura 3 – Cromatograma da amostra de Vinho do Porto VP2.

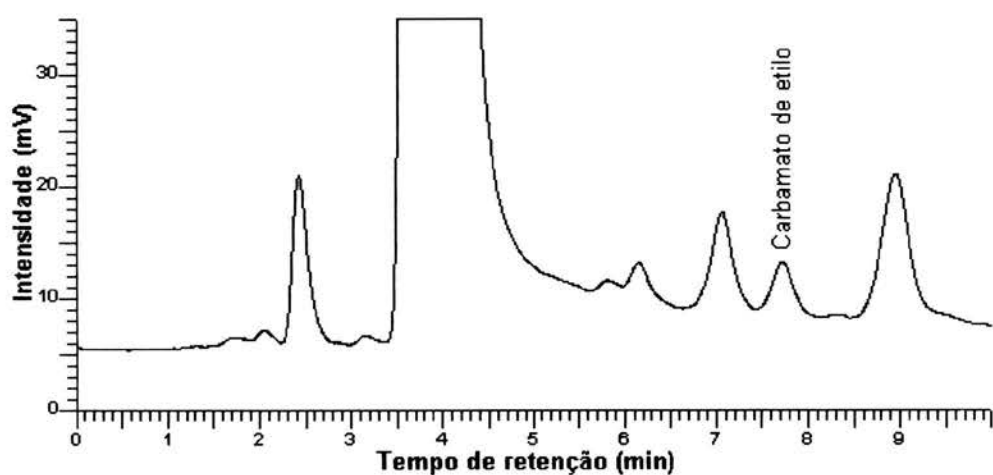


Figura 4 – Cromatograma da amostra de aguardente AD1.

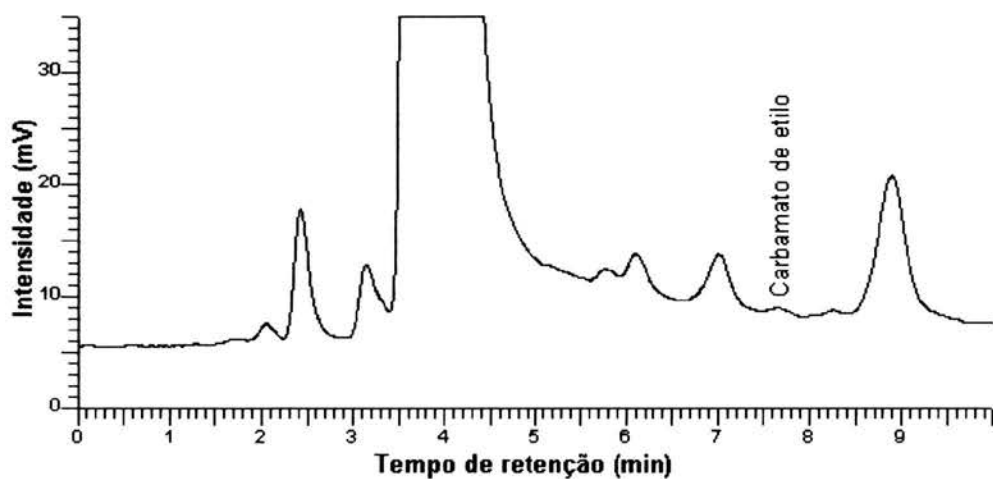
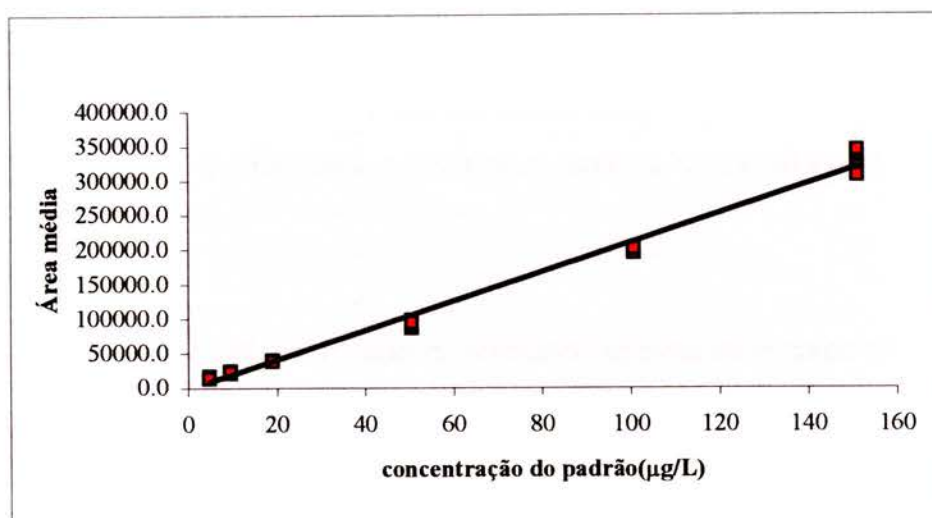


Figura 5 – Cromatograma da amostra de aguardente AD2.

## Linearidade

O estudo da linearidade foi efectuado através de várias curvas de calibração com soluções padrão de CE. As concentrações das soluções padrões foram decididas com base na gama de concentrações normalmente encontradas nas bebidas alcoólicas e nos limites máximos recomendados (ver tabela 1), ou seja, entre 4 e 150  $\mu\text{g/L}$ . Na figura 6 encontra-se representada uma das curvas de calibração.



**Figura 6** – Curva de calibração obtida através dos padrões de CE de 4,72; 9,44; 18,87; 50,33; 100,65 e 150,98  $\mu\text{g/L}$ .

Na gama de concentrações utilizada, os valores médios de 6 determinações (na maioria dos casos) (Anexo B) obtidos para a curva de calibração foram os seguintes:

declive: 2122.10

ordenada na origem: -1760.47

coeficiente de correlação quadrático: 0.991

As áreas cromatográficas obtidas (A), respectiva média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) encontram-se no Anexo B.

## Limites de detecção e quantificação

A partir da curva de calibração calcularam-se os limites de detecção (L.D.) e de quantificação (L.Q.). Estes limites foram, respectivamente, iguais a 17,47 e 58,24  $\mu\text{g/L}$ .

Na figura 7 está representado o cromatograma de uma solução padrão de CE com 50,33  $\mu\text{g/L}$ .

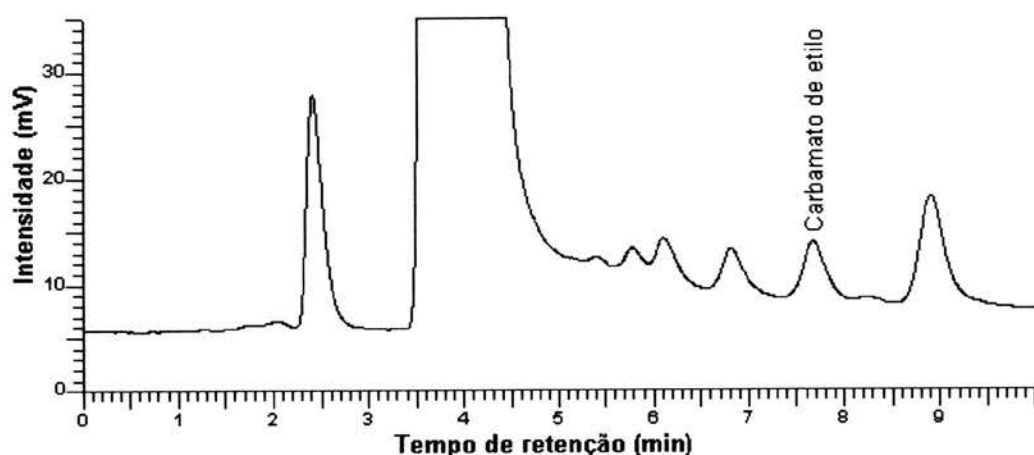


Figura 7 – Cromatograma de uma solução padrão de CE com 50,33 µg/L.

### **Precisão**

O estudo da precisão do método foi efectuado através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia (Anexo C). Para o cálculo da repetibilidade foram efectuadas 6 determinações dos padrões de CE com concentrações 4,72, 50,33 e 150,98 µg/L, no mesmo dia e para o da precisão intermédia foram efectuadas 2 determinações dos mesmos padrões, em dias diferentes. Os resultados apresentados na tabela 3 estão em termos de coeficiente de variação (CV), ou seja, a razão entre o desvio padrão (SD) e a média ( $\bar{x}$ ).

Tabela 3 – Estudo da precisão do método relativamente à determinação do CE, para as soluções padrão.

Concentração da solução padrão (µg/L)	Repetibilidade (%)*	Precisão Intermédia (%)**
4,72	7,45	13,12
50,33	4,45	6,23
150,98	4,15	13,25

\*resultados de 6 determinações de cada um dos padrões.

\*\*resultados de 2 determinações de cada um dos padrões em 9 dias diferentes.

Nas metodologias analíticas em que existe a necessidade de efectuar uma reacção de derivatização, aceitam-se valores de repetibilidade até cerca de 30%. Tendo isto em conta, podemos concluir que o método tem uma boa repetibilidade.



Relativamente às amostras, efectuaram-se, igualmente, ensaios de repetibilidade e precisão intermédia (Anexo D).

Para o cálculo da repetibilidade foram efectuadas 6 determinações de cada uma das amostras referidas anteriormente e para o da precisão intermédia foram efectuadas 2 determinações das mesmas amostras, em dias diferentes. Os resultados apresentados na tabela 4 estão em termos de coeficiente de variação (CV).

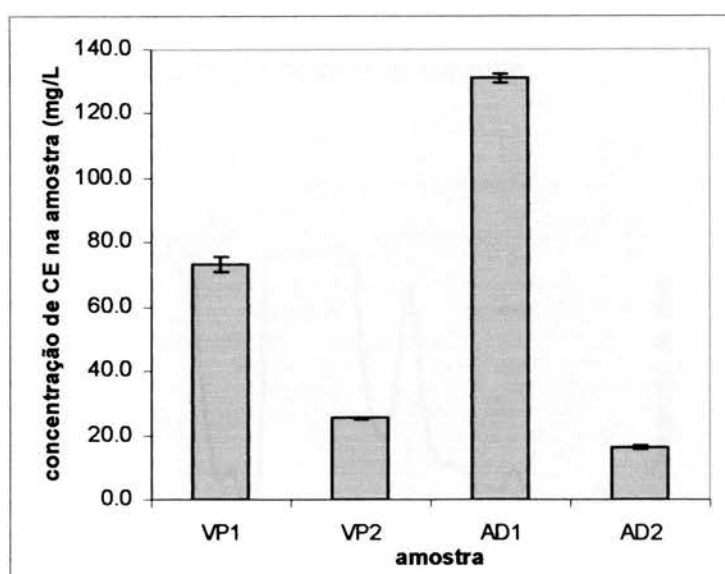
**Tabela 4** – Estudo da precisão do método relativamente à determinação do CE, para as amostras.

Amostra	Repetibilidade (%)*	Precisão Intermédia (%)**
VP1	6,40	3,04
VP2	2,94	2,05
AD1	3,53	1,11
AD2	8,58	4,19

\*resultados de 6 determinações de cada um dos padrões.

\*\*resultados de 2 determinações de cada um dos padrões em dias diferentes.

Na figura 8 estão representados os resultados referentes ao estudo da determinação de CE nas 4 amostras analisadas com o respectivo desvio padrão associado.



**Figura 8** – Teor médio de CE encontrado nas amostras analisadas.

Como se pode confirmar pela figura 8, os resultados obtidos foram bastante fiáveis dado que o desvio padrão associado a cada uma das amostras foi bastante baixo.



## Exactidão

A exactidão da metodologia foi avaliada pelo método de adição de padrão (Anexo E). Os ensaios foram realizados com as 4 amostras referidas anteriormente. Efectuaram-se as análises de cada uma das amostras em duplicado e em seguida adicionou-se a cada uma das amostras um padrão com concentração próxima da da amostra, na proporção 1:1, e fez-se a análise em triplicado. O resumo dos resultados obtidos encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Recuperação do CE nas diferentes amostras analisadas por HPLC com detector de fluorescência.

Amostra	CE adicionado ( $\mu\text{g/L}$ )	CE recuperado ( $\mu\text{g/L}$ )*	Recuperação (%)**
VP1	18,87	21,06	94,72
VP2	9,44	9,20	107,54
AD1	18,87	24,33	85,35
AD2	4,72	4,82	113,58

\* valor médio obtido de todos os ensaios realizados para cada uma das amostras.

\*\* valor médio das recuperações obtidas para cada uma das amostras.

Nas figuras 9, 10, 11 e 12 estão representados cromatogramas obtidos nos ensaios de recuperação para cada uma das amostras analisadas.

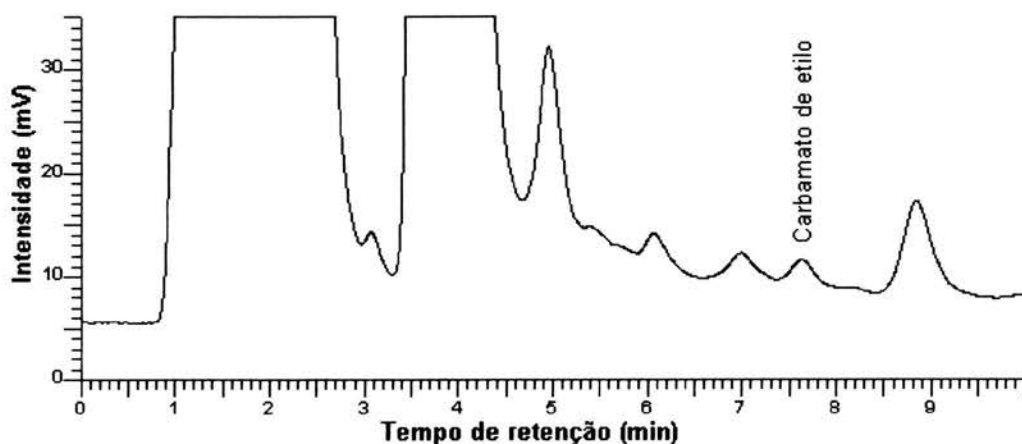


Figura 9 – Cromatograma da amostra VP1 com adição de solução padrão de CE com concentração 18,87  $\mu\text{g/L}$ .

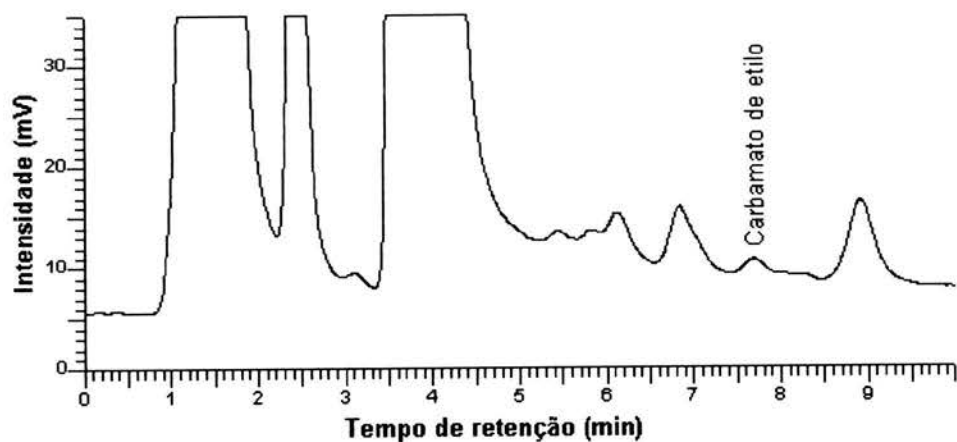


Figura 10 – Cromatograma da amostra VP2 com adição de solução padrão de CE com concentração 9,44 µg/L.

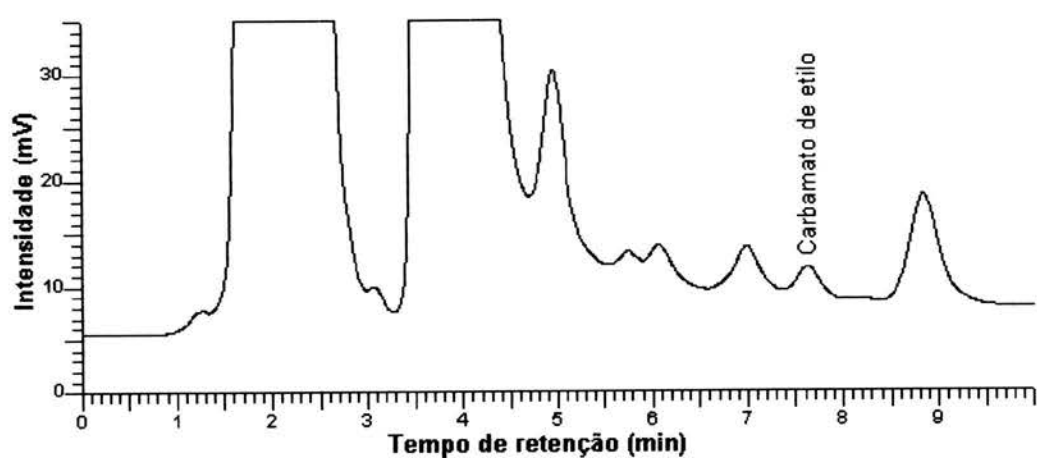


Figura 11 – Cromatograma da amostra AD1 com adição de solução padrão de CE com concentração 18,87 µg/L.

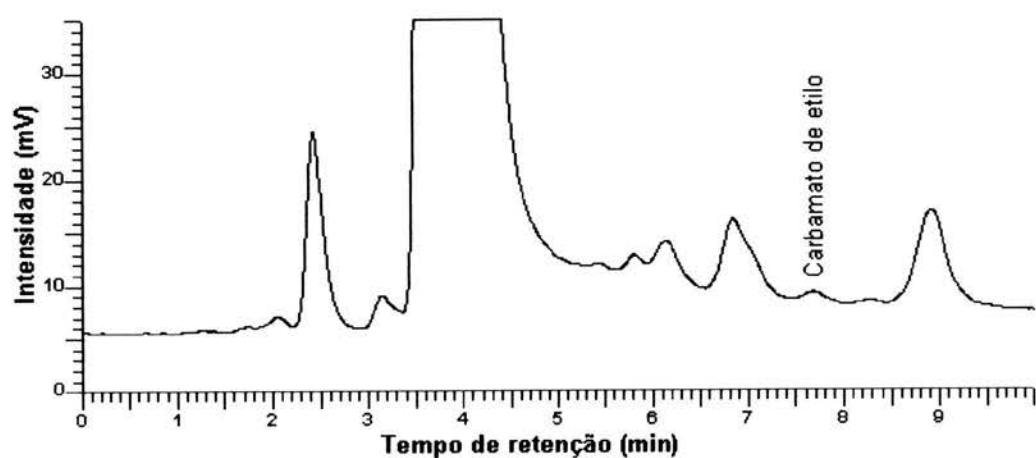
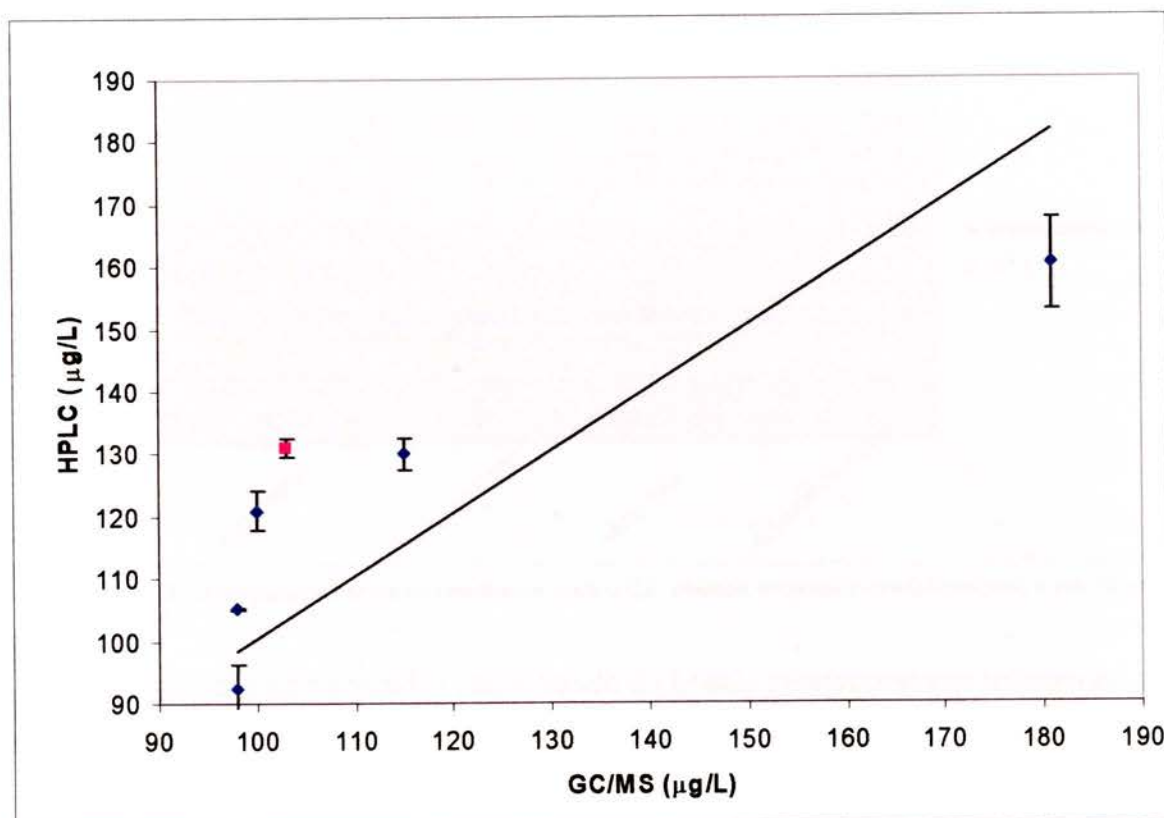


Figura 12 – Cromatograma da amostra AD2 com adição de solução padrão de CE com concentração 4,72 µg/L.

Efectuou-se, ainda, para um conjunto de 6 amostras, entre as quais a AD1, a comparação entre os resultados obtidos pelo método em estudo e por GC/MS. Os ensaios efectuados pelo método de GC/MS foram realizados no IVDP, sendo este um método acreditado.

Os valores utilizados para a construção deste gráfico podem ser consultados no Anexo F.



**Figura 13** – Comparação entre os resultados obtidos na análise do CE em amostras de aguardente vínica por HPLC e por GC/MS.

Verifica-se, em média, um erro relativo dos resultados de  $14,3 \pm 8,2\%$ . O ponto a cor de rosa devia ser desprezado pois é o que apresenta maior afastamento.

De forma a retirar conclusões fiáveis destes resultados, sugere-se que de futuro:

- os resultados obtidos por GC/MS sejam associados a uma incerteza. Por exemplo, se o erro associado aos resultados de GC/MS for de 10%, então, um valor de 100 está contido no intervalo [90;110], o que incluiu os valores de HPLC.
- se possa obter um conjunto mais alargado de ensaios comparativos.

No decorrer do estágio teve-se acesso ao relatório de um ensaio interlaboratorial de CE em que o IVDP participou e cujas amostras analisadas ainda existiam. Analisaram-se novamente essas amostras e os resultados estão representados na figura 14. Os dados utilizados para a sua construção estão no Anexo F.

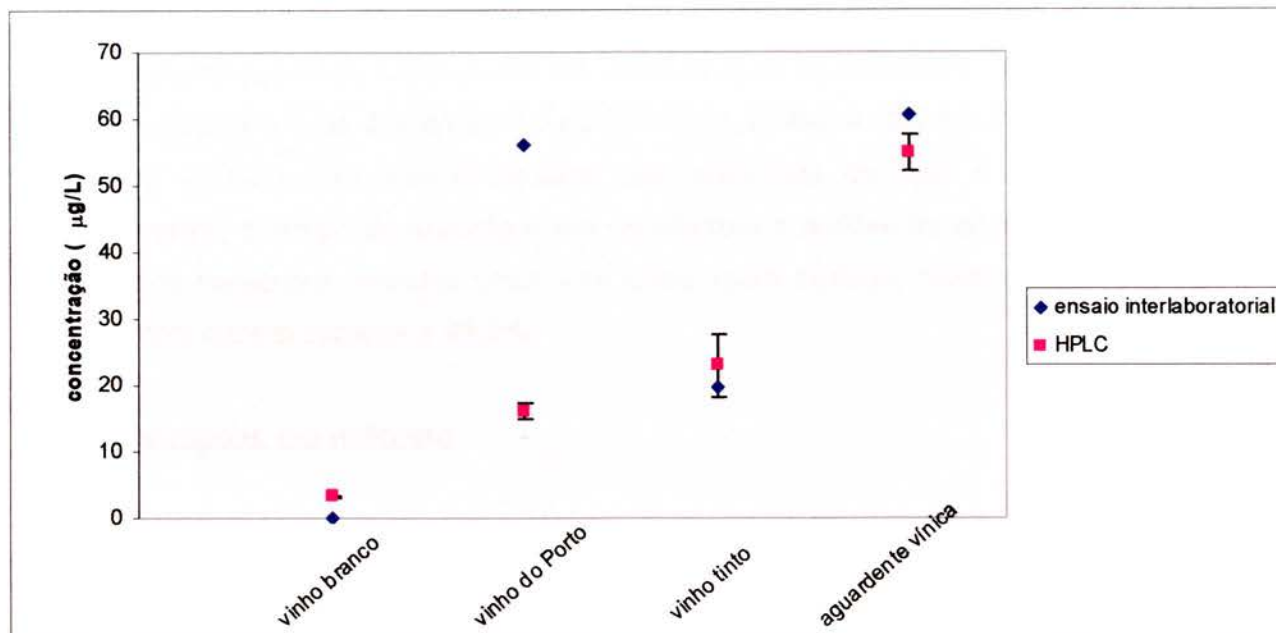


Figura 14 – Comparação entre os resultados para o CE, obtidos no ensaio interlaboratorial e por HPLC.

Os resultados apresentados como sendo do ensaio interlaboratorial referem-se aos valores médios das análises efectuadas a cada uma das amostras nos diferentes laboratórios que cooperaram neste ensaio.

Não foi obtida a incerteza global associada aos resultados, embora se possa considerar que a fonte de incerteza mais significativa é a percentagem de recuperação.

De acordo com as normas EURACHEM, a incerteza global obtém-se multiplicando a incerteza calculada por um factor de cobertura (normalmente admitido como 2).

Assim sendo, considerando os resultados da tabela 5, para o vinho do Porto, a incerteza admitida é de 6,1% e para a aguardente é de 14,1%.

Este número reduzido de valores não permite tirar conclusões significativas.

# Determinação de ureia nos vinhos

## i) Metodologia de trabalho

A metodologia aplicada à determinação de ureia em vinhos, assim como os reagentes, o equipamento e o procedimento experimental foram idênticos aos utilizados para a determinação do CE (descrita em Determinação de carbamato de etilo em vinhos). Apenas existiram duas diferenças: no equipamento, a coluna utilizada foi uma HYPERSIL AA-ODS 200x2.1 mm Hewlett-Packard com partículas de 5 $\mu$ m e no procedimento experimental, o tempo de reacção antes de efectuar a análise foi apenas de 5 minutos. Além dos reagentes referidos utilizou-se Ureia (para biologia molecular) da Riedel-de Haën, com pureza superior a 99,5%.

## ii) Princípios do método

O método utilizado para a determinação da ureia nos vinhos foi baseado no método de determinação do CE em vinhos por HPLC, e consiste na realização de uma reacção de derivatização e posterior análise. Esta reacção realizou-se através da adição a 500  $\mu$ L de amostra diluída de 100  $\mu$ L de solução reagente 9-X (0,02 mol/L). Posteriormente adiciona-se 50  $\mu$ L de uma solução de HCl (1,5 mol/L). Após 5 minutos de reacção efectua-se a análise cromatográfica.

É de referir que a adição dos reagentes para as reacções de derivatização dos ensaios de ureia foram manuais.

## iii) Procedimento Experimental

### Amostras

#### **Preparação das amostras**

Os brancos consistiram numa solução de etanol a 70%, denominada solução hidroalcoólica a 70%.

Todas as amostras foram diluídas com água ultrapura ou com uma solução de etanol de concentração tal, que no final a solução resultante tivesse um teor de etanol de 70% (v/v), de modo a normalizar o seu teor alcoólico. As amostra de aguardente vínica foram

diluídas 4 vezes (1:3) (v/v) com água ultrapura e as de vinhos licorosos foram diluídas 3 vezes (1:2) (v/v) com solução hidroalcoólica a 70%.

As soluções padrão foram preparadas em solução hidroalcoólica a 70%, por diluição de uma solução mãe de concentração aproximada de 106,96 mg/L em etanol a 20%.

## **2. Preparação das soluções padrão de ureia**

### **Solução-mãe**

Esta solução não foi preparada para este estudo, já estava preparada. Consistia numa solução de ureia de concentração aproximadamente 106,96 mg/L em etanol a 20%.

### **Solução 1**

Efectuou-se a diluição da solução-mãe, na proporção 1:2, com etanol absoluto (99,8%). Esta solução ficou com uma concentração aproximada de 35,6 mg/L em etanol a 70%.

### **Soluções Padrão**

Da solução 1 retiraram-se 3,34 mL, 2 mL, 1 mL, 340 µL, 170 µL e 60 µL para balões volumétricos de 10 mL. Perfizeram-se os volumes com solução hidroalcoólica a 70% (v/v) e homogeneizaram-se. Calcularam-se as concentrações efectivas das soluções em ureia.

As soluções 1, 2 e padrão após a sua preparação foram hermeticamente fechadas e guardadas no frigorífico.

## **2. Análise cromatográfica**

A eluição e separação dos componentes presentes nas amostras e nas soluções padrão de ureia foram efectuadas recorrendo a um gradiente binário, que se descreve na tabela 6. As fases móveis eram as mesmas utilizadas na análise de CE por HPLC (ver Procedimento experimental – CE)

**Tabela 6** – Gradiente binário utilizado na análise da ureia por HPLC.

<b>Tempo (minutos)</b>	0.5	0.1	12.0	1.0	7.0	2.0	1.0
<b>% Fase móvel A</b>	80.0	80.0	50.0	0.0	0.0	80.0	80.0
<b>% Fase móvel B</b>	20.0	20.0	50.0	100.0	100.0	20.0	20.0
<b>Fluxo (mL/min)</b>	0.45	0.45	0.45	0.45	0.80	0.45	0.45



#### iv) Resultados e Discussão

Por observação da figura 14, podemos verificar a existência de um pico aos 6,8 minutos. Apesar da existência deste pico ser atribuída à presença em excesso do reagente 9-xantidrol, é considerado um pico interferente, pois interfere com o pico correspondente à ureia. Assim, o objectivo inicial deste trabalho foi eliminar este pico.

#### Optimização do tempo da reacção de derivatização

Dado que o objectivo deste trabalho foi a partir do método da determinação do CE desenvolver um novo método para a determinação da ureia, partiu-se das condições iniciais consideradas para o CE. Começou-se por estudar o tempo necessário para a reacção de derivatização. Fizeram-se ensaios com brancos de reacção de solução hidroalcoólica a 20% para tempos de reacção 5 e 45 minutos para cada uma das amostras (Anexo G). Na tabela 7 apresenta-se o resumo dos resultados desses ensaios.

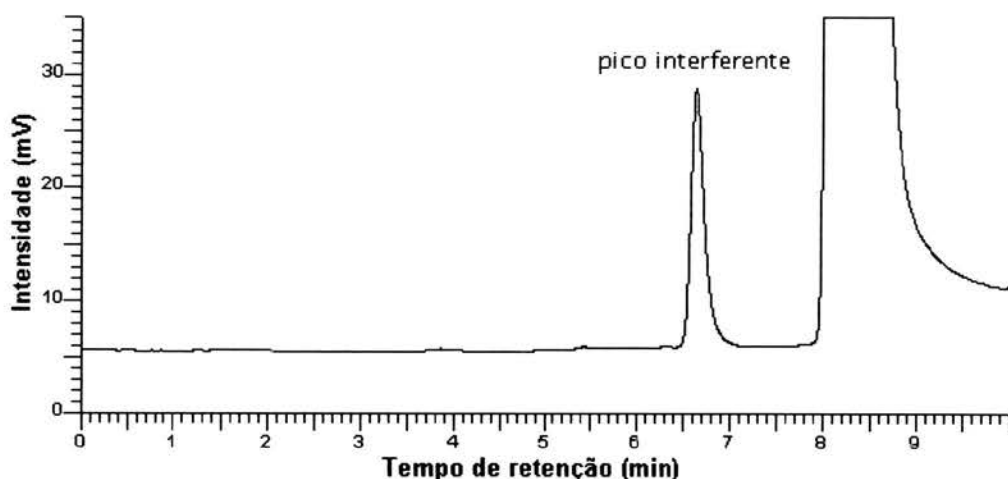
**Tabela 7** – Valores das áreas obtidas para os ensaios com tempos de reacção de derivatização 5 e 45 minutos.

	Tempo de reacção de derivatização	
	5 minutos	45 minutos
$\bar{x}$	264311,53	213868,34
SD	330634,44	196923,97
CV (%)	125,09	92,08

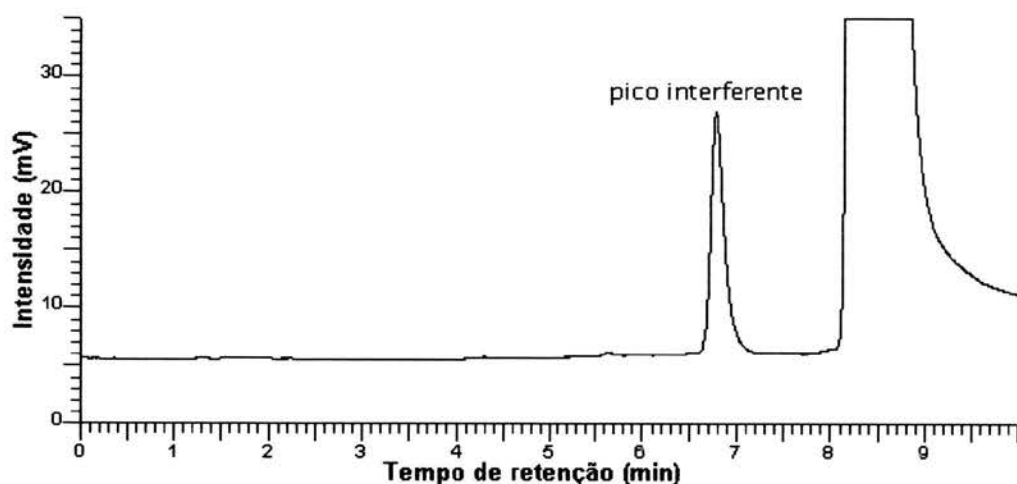
\* foram realizados 15 ensaios para cada um dos tempos de reacção considerados.

Podemos constatar que não existe uma diferença muito grande entre as áreas obtidas para cada um dos tempos considerados, de onde se conclui que não existe necessidade de esperar 45 minutos para se efectuar a análise, tendo-se assim optado por considerar para os ensaios posteriores o tempo de reacção de derivatização de 5 minutos.

Nas figuras 14 e 15 estão representados cromatogramas de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 20% para os tempos de reacção de derivatização, respectivamente, de 5 e de 45 minutos.



**Figura 15** – Cromatograma de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 20%, com tempo de reacção de derivatização de 5 minutos.



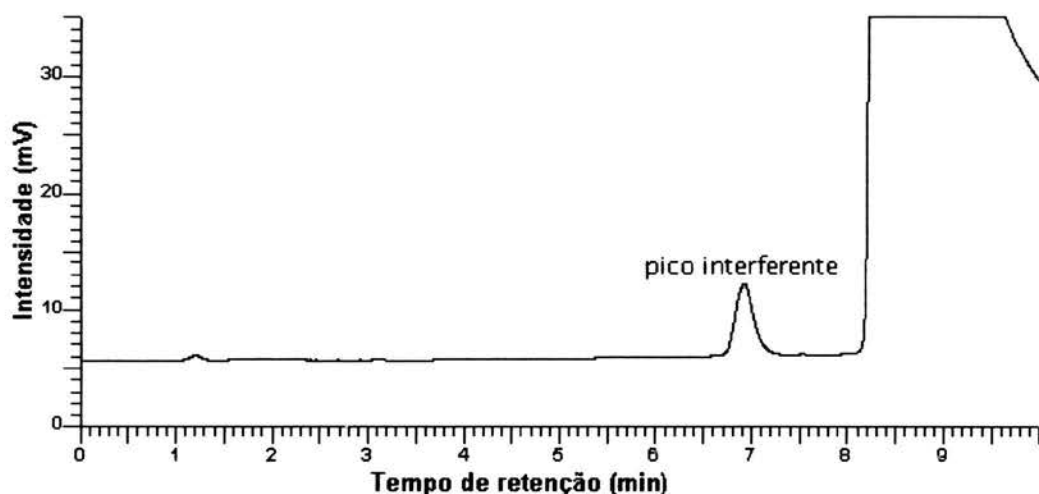
**Figura 16** – Cromatograma de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 20%, com tempo de reacção de derivatização de 45 minutos.

### **Tempo de retenção**

Analisando o cromatograma da figura 15, que corresponde a um branco de reacção, verificamos que existem 2 picos cromatográficos (um dos quais referido anteriormente). Esses picos (6,7 e 8,5 min) são devidos à presença em excesso de 9-Xantidrol e ocorrem em todas as análises, como já foi referido atrás em relação aos brancos de reacção dos ensaios de CE. Note-se que, agora saem em tempos diferentes porque o gradiente binário foi alterado.



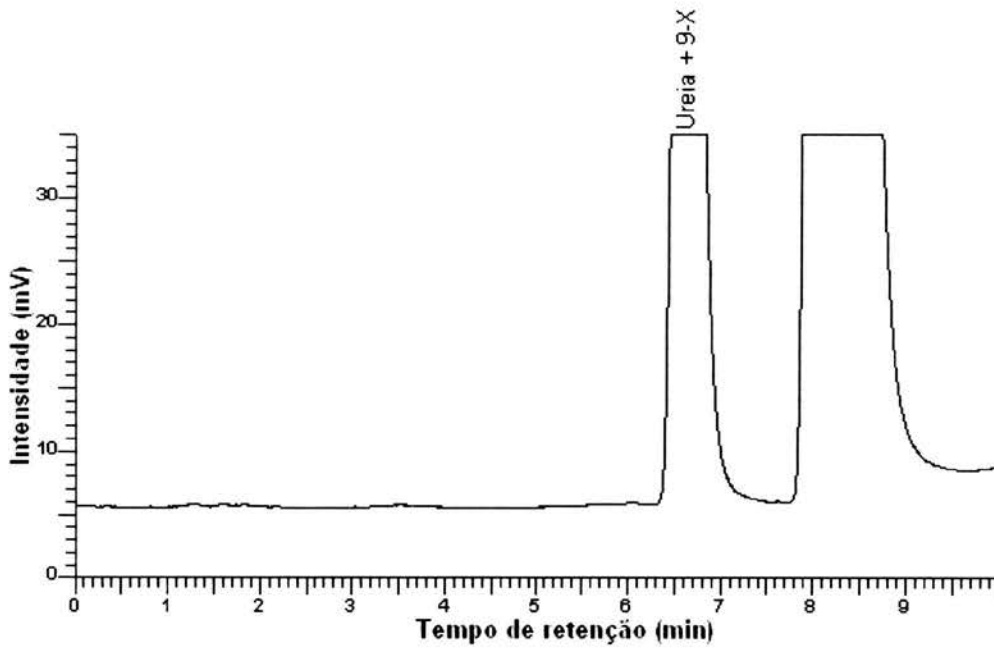
Posteriormente fizeram-se ensaios com solução hidroalcoólica a 70% e verificou-se que com o aumento da percentagem de etanol, o pico correspondente aos 6,7 min diminuiu. Isso pode-se verificar através da comparação entre as figuras 15 e 17.



**Figura 17** – Cromatograma de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 70%.

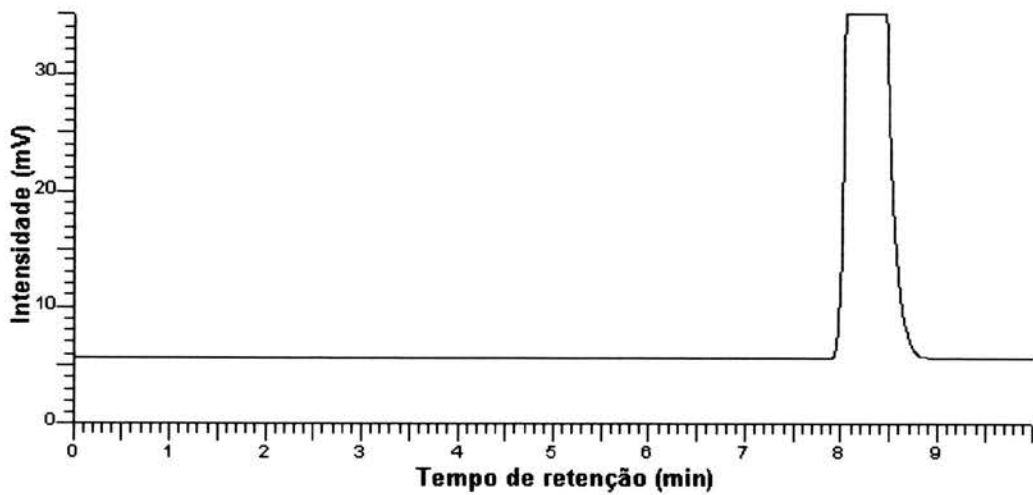
Neste ponto do trabalho já tinham sido efectuadas duas alterações em relação ao método do CE – o tempo de reacção de derivatização (passou de 15 para 5 minutos) e o branco (passou de solução hidroalcoólica a 20% para a 70%).

Efectuou-se a análise de uma solução padrão nestas condições e verificou-se, como já tinha sido referido anteriormente, que o pico correspondente à ureia saía ao mesmo tempo que um dos picos do 9-Xantidrol, como se verifica na figura 18.



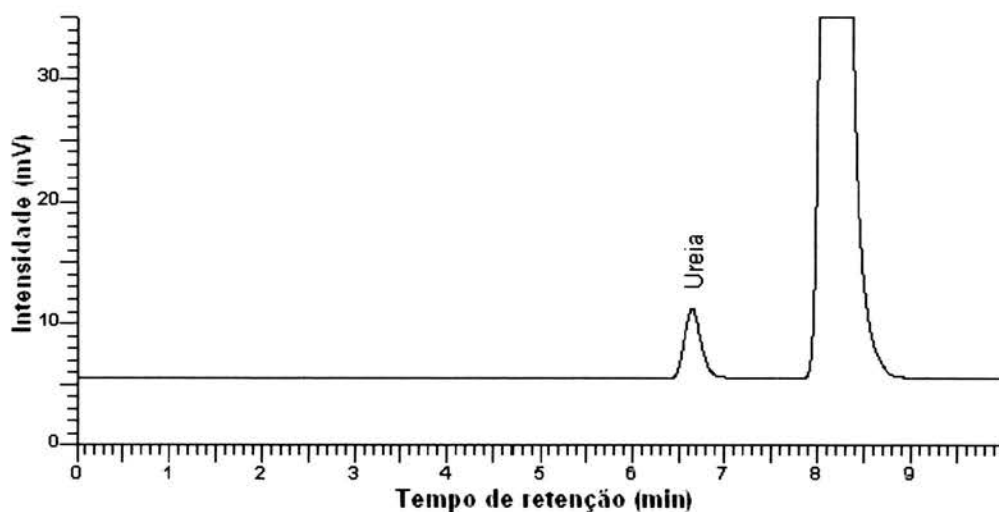
**Figura 18** – Cromatograma de uma solução padrão de ureia com 3,56 mg/L.

Dado que esta situação não era favorável para a identificação e quantificação da ureia, alterou-se a voltagem do detector de modo a tentar eliminar o pico do 9-Xantidrol aos 6,7 minutos. A voltagem era 1 e alterou-se para 3, de modo a diminuir a sensibilidade do detector e efectuou-se a análise de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 70%, representado na figura 19.



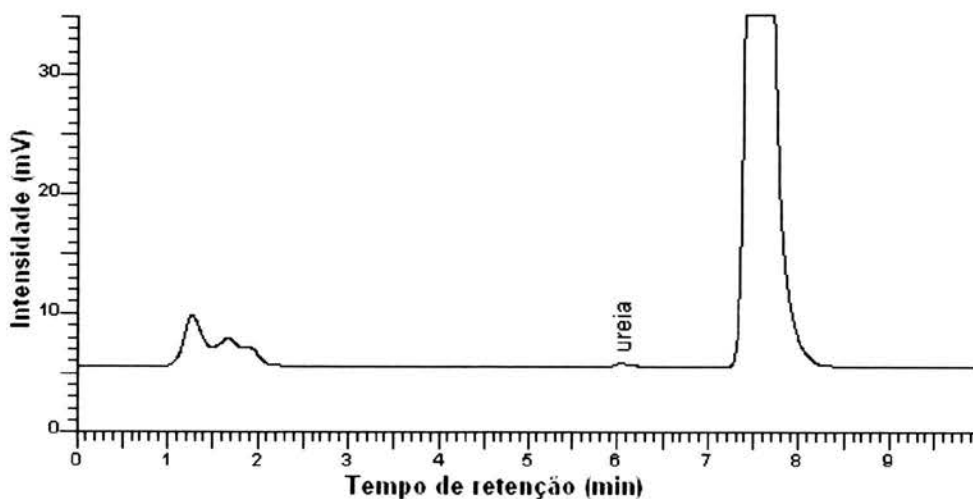
**Figura 19** – Cromatograma de um branco de reacção de solução hidroalcoólica a 70%, com o detector em voltagem 3.

Comparando os cromatogramas das figuras 17 e 19, verifica-se que se conseguiu eliminar o pico. Novamente, agora com a voltagem do detector em 3, fez-se a análise da solução padrão de ureia com 3,56 mg/L.



**Figura 20** – Cromatograma da solução padrão de ureia com 3,56 mg/L, com voltagem do detector 3.

Nas figuras 21 e 22, estão representados cromatogramas referentes às amostras analisadas – VP2 e VP2653.



**Figura 21** – Cromatograma da amostra de aguardente VP2.

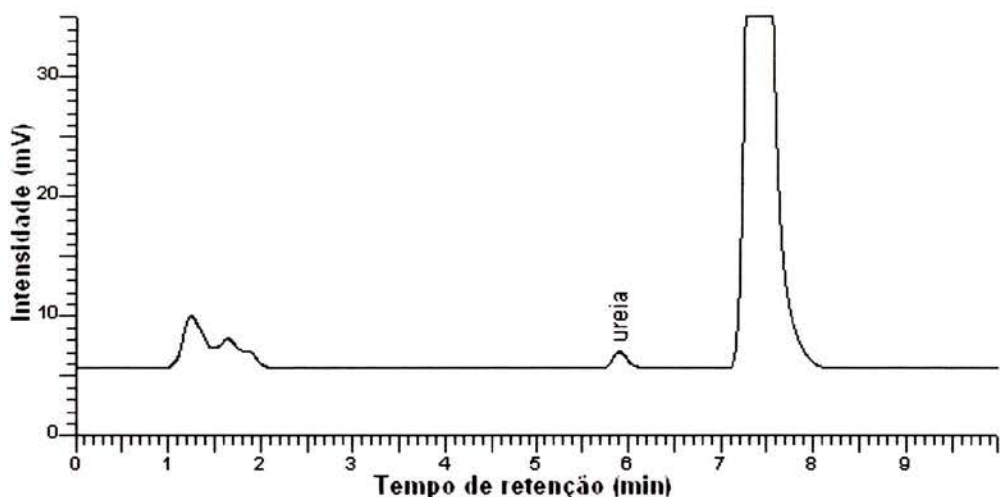


Figura 22 – Cromatograma da amostra de aguardente VP2653.

Com as condições de detecção optimizadas procedeu-se aos ensaios de validação.

### Linearidade

O estudo da linearidade foi efectuado através de várias curvas de calibração com soluções padrão de ureia. As concentrações das soluções padrões foram decididas com base nos limites máximos recomendados (ver Ureia – Controlo de qualidade – limites legais), ou seja, até cerca de 5 mg/L. Na figura 23, encontra-se representada uma das curvas de calibração.

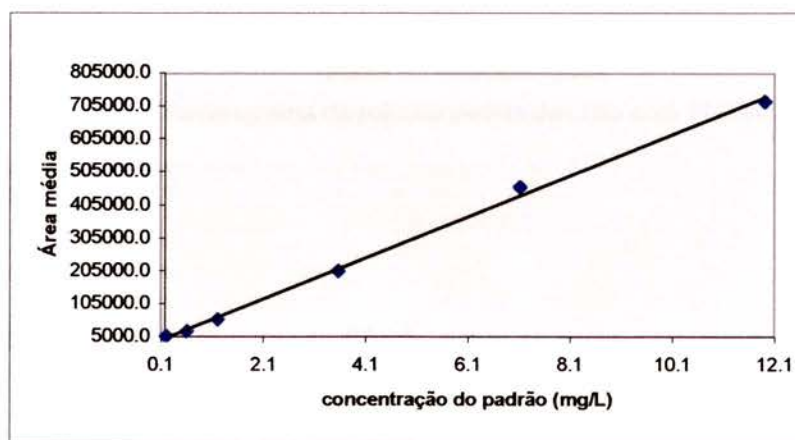


Figura 23 – Curva de calibração obtida para soluções padrão na gama de concentrações dos 0,21 mg/L aos 11,9 mg/L.

Na gama de concentrações utilizada, os valores médios (de 2 determinações, ver Anexo H) obtidos para a curva de calibração foram os seguintes:

declive: 21726,33

ordenada na origem: -10755,89

coeficiente de correlação quadrático: 0,996

As áreas cromatográficas obtidas (A), respectiva média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) encontram-se no Anexo H.

### **Limites de quantificação e de detecção**

A partir da curva de calibração calcularam-se os limites de detecção (L.D.) e de quantificação (L.Q.). Estes limites foram, respectivamente, iguais a 0,99 e 3,30 mg/L.

Na figura 24 está representado o cromatograma de uma solução padrão de CE com 11,9 mg/L.

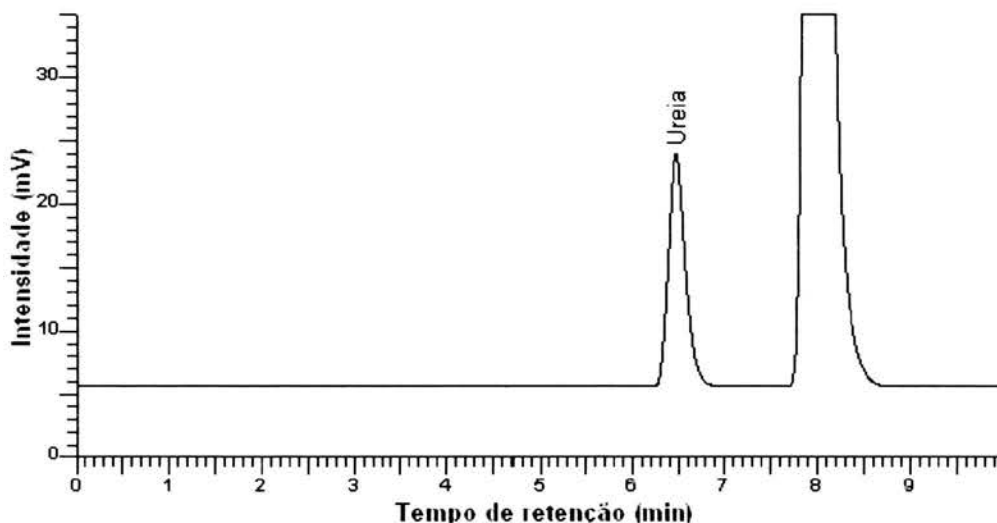


Figura 24 – Cromatograma da solução padrão de ureia com 11,9 mg/L.

### **Precisão**

O estudo da precisão do método foi efectuado através de ensaios de repetibilidade e de precisão intermédia (Anexo I). Para o cálculo da repetibilidade foram efectuadas 6 determinações dos padrões de ureia com concentrações 0,60, 3,56 e 11,90 mg/L, no mesmo dia e para os da precisão intermédia foram efectuadas 2 determinações dos mesmos padrões, em dias diferentes. Os resultados apresentados na tabela 8 estão em termos de coeficiente de variação (CV).

**Tabela 8** – Estudo da precisão do método relativamente à determinação da ureia, para as soluções padrão.

Concentração da solução padrão (mg/L)	Repetibilidade (%)*	Precisão Intermédia (%)**
0,60	1,06	0,32
3,56	2,55	0,80
11,90	1,36	0,85

\*resultados de 6 determinações de cada um dos padrões.

\*\*resultados de 3 determinações de cada um dos padrões em 3 dias diferentes.

## **Exactidão**

A exactidão da metodologia foi avaliada pelo método de adição de padrão (Anexo J). Apenas se realizaram ensaios com duas amostras – VP2 e VP2635, por motivos de falta de tempo para concluir os ensaios. Efectuou-se a análise da amostra em duplicado e em seguida adicionou-se um padrão com concentração próxima da amostra, na proporção 1:1, e fez-se a análise em triplicado. O resumo dos resultados obtidos encontram-se na tabela

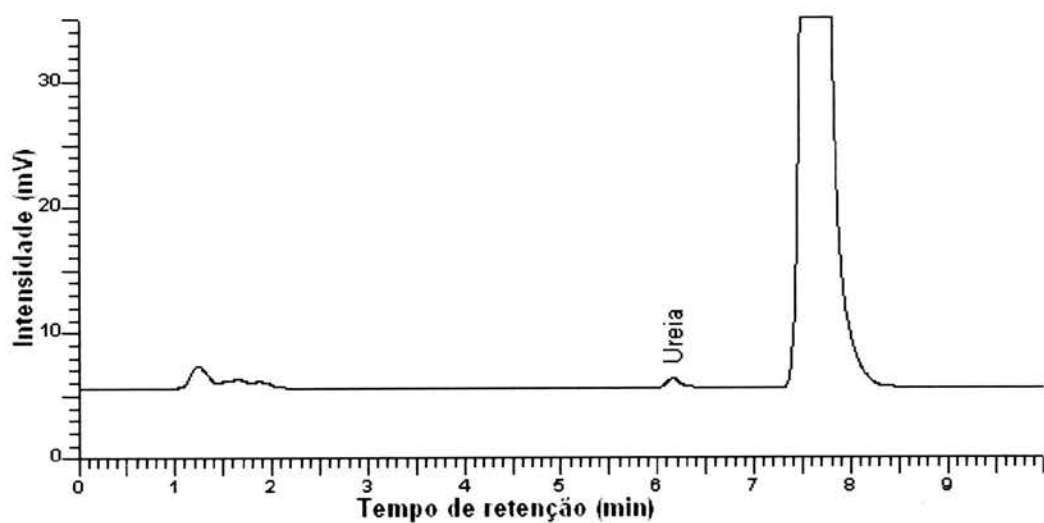
**Tabela 9** – Recuperação da ureia na amostra analisada por HPLC com detector de fluorescência.

Amostra	ureia adicionada (mg/L)	ureia recuperada (mg/L)*	Recuperação (%)**
VP2	0,60	0,74	141,39
VP2635	1,21	1,16	98,64

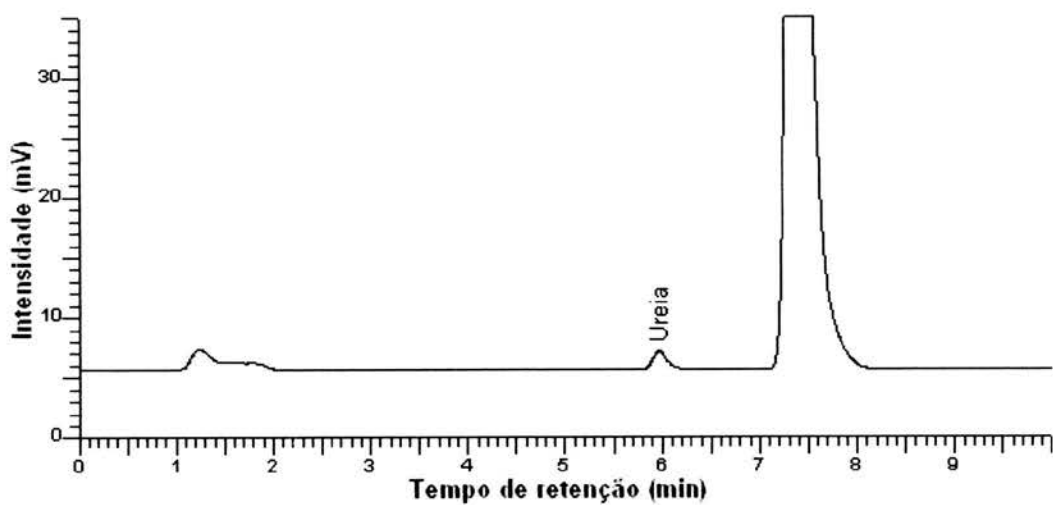
\* valor médio obtido de todos os ensaios realizados para cada uma das amostras.

\*\* valor médio das recuperações obtidas para cada uma das amostras.

Nas figuras 25 e 26 estão representados cromatogramas obtidos nos ensaios de recuperação de cada uma das amostras analisadas.



**Figura 25** – Cromatograma da amostra VP2 com adição de solução padrão de ureia com concentração 0,60 mg/L.



**Figura 26** – Cromatograma da amostra VP2653 com adição de solução padrão de ureia com concentração 1,21 mg/L.

## Conclusões

Foi possível validar o método para o carbamato de etilo, com as seguintes características:

- gama de linearidade: [4,72; 150,98] µg/L
- limite de detecção: 17,47 µg/L
- limite de quantificação: 58,24 µg/L
- precisão intermédia: 36,96±4,0 (expressa em CV%, 18 determinações para cada um dos padrões considerados)
- exactidão média: 100,30±12,7 (expressa em % de recuperação, 17 determinações)

É necessário rever os limites de detecção e de quantificação, pois os obtidos são bastante elevados. É, também, conveniente, estudar os picos que ocorrem nos brancos de reacção dos ensaios de CE dos quais se desconhece a origem e a que compostos correspondem.

Foi possível otimizar o método da ureia, tendo-se obtido os seguintes resultados:

- tempo de reacção: 5 minutos;
- as amostras analisadas têm um teor em etanol de 70%.;
- as proporções (%) dos eluentes utilizadas foram 80:20 (acetato de sódio:acetonitrilo).

Realizaram-se ensaios preliminares de validação do método que apresenta as seguintes características:

- gama de linearidade: [0,21; 11,90] mg/L
- limite de detecção: 0,99 mg/L
- limite de quantificação: 3,30 mg/L
- precisão intermédia: 44,56±0,3 (expressa em CV%, 10 determinações para cada um dos padrões considerados)
- exactidão média: 120,02±30,0 (expressa em % de recuperação, 4 determinações)

Em relação a este método é, ainda, necessário efectuar mais ensaios a nível de precisão intermédia e exactidão para que se possa tirar conclusões em relação à fiabilidade do método.



As principais vantagens deste método são:

- o tempo de preparação das amostras ser relativamente rápido;
- o uso de um detector de fluorescência, que apenas detecta compostos fluorescentes, não sendo necessário proceder à extracção prévia das amostras;
- não existir a necessidade de manusear produtos perigosos.

## Bibliografia

1. Francis P. S.; Lewis S. W.; Lim K. F. **2002**. Analytical methodology for the determination of urea: current practice and future trends. *Trends in analytical chemistry* 21(5): 389-400.
2. U. S. Food and Drug Administration. **1997**. Ethyl carbamate preventative action manual.  
In:[http://google.fda.gov/search?client=FDA&site=FDA&restrict=&oe=&lr=&proxystylesh eet=FDA&output=xml\\_no\\_dtd&getfields=\\*&q=ethyl+carbamate](http://google.fda.gov/search?client=FDA&site=FDA&restrict=&oe=&lr=&proxystylesh eet=FDA&output=xml_no_dtd&getfields=*&q=ethyl+carbamate), 13 Fevereiro, 2004, 15.00h.
3. Canas, B. J.; Joe, F. L.; Jr; Diachenko G. W.; Burns G. **1994**. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study. *Journal of AOAC International* 77(6): 1530-1536.
4. <http://www.ivv.min-agricultura.pt/regulamentacao/files/limites/canada.html>, 25 Maio, 2004, 15:30
5. <http://www.mtas.es/insh/ipsnsnspn/nspn0314.htm>, 15 Junho, 2004, 10:00
6. Ingledew, W. M.; Magnus, C. A.; Patterson, J. R. **1987**. Yeast foods and ethyl carbamate formation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (4): 332-335.
7. Ribeiro, P. A. F. H., Tese de doutoramento "Compostos Aminados Vestigiais em Vinhos do Alentejo", FEUP, 2001
8. Ishida, Y.; Fujita, T.; Asai, K. **1981**. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 204: 143-148.
9. Ough C. S.; Stevens D.; Sendovski T.; Huang Z.; An D. **1990**. Factors contributing to urea formation in commercially fermented wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (1): 68-73.
10. Stevens D. F.; Ough C. S. **1993**. Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (3): 309-312.
11. Ough C. S.; Crowell E. A.; Gutlove B. R. **1988**. Carbamyl compound reactions with ethanol. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (3): 239-242.
12. Monteiro F. F.; Trousdale E.; Bisson L. F. **1989**. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vitic.* 40 (1): 1-8.

13. Bertrand, A.; Triquet-Pissard, R. **1986**. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin. Observations sur son origine. *Vigne Vin* 20(2) : 133-136.
14. Ough C. S.; Crowell E. A.; Mooney L. A. **1988**. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3): 243-249.
15. Monteiro F. F.; Bisson L. F. **1991**. Amino acid utilization and urea formation during vinification fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (3): 199-208.
16. An, D.; Ough, C. S. **1993**. Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (1): 35-40.
17. Ough, C. S.; Huang, Z.; An, D.; Stevens, D. **1991**. Amino acid uptake by four commercial yeasts to two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1): 26-40.
18. Monteiro F. F.; Bisson L. F. **1992**. Nitrogen supplementation of grape juice. II. Effects on amino acid and urea release following fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (1): 11-17.
19. Ferreira, M. A.; Fernandes, J. O. **1992**. The application of an improved GC-MS procedure to investigate ethyl carbamate behaviour during the production of Madeira wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (4): 339-343.
20. Kodama S.; Suzuki T.; Fujinawa S.; Teja P.; Yotsuzuka F. **1994**. Urea contribution to ethyl carbamate formation in commercial wines during storage. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 (1): 17-24.
21. Tegmo-Larsson, I.-M.; Henick-Kling, T. **1990**. The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4): 269-272.
22. Pilone, G. J.; Clayton, M. J.; van Duivenboden, R. J. **1991**. Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *Am. J. Enol. Vitic.* 42: 153-157.
23. Liu, S. -Q.; Pritchard, G. G.; Hardman, M. J.; Pilone, G. J. **1994**. Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(2): 235-242.

24. de Orduña, R. M.; Liu, S. -Q.; Patchett, M. L.; Pilone, G. J. **2000**. Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *J. Appl. Microbiol.* 89:547-552.
25. Fujinawa S.; Burns G.; Teja P. **1990**. Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 41 (4): 350-354.
26. Fujinawa S.; Kodama S.; Todoroki H.; Suzuki T. **1992**. Trace urea determination in red wine and its degradation rate by acid urease. *Am. J. Enol. Vitic.* 43 (4): 362-366.
27. Dyer, R. H.; **1994**. Determination of ethyl carbamate (urethane) in alcoholic beverages using capillary gas chromatography with thermal energy analyzer detection: collaborative study. *Journal of AOAC International* 77(1): 64-67.
28. Uthurry, C. A.; Varela, F.; Colomo, B.; Lepe, J. A. S.; Lombarero, J.; Garcia del Hierro, J. R.; **2004**. Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*
29. <http://sargentwelch.com/pdf/msds/sch94727.pdf>, 26 Julho, 2004, 17:00
30. [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), 26 Julho, 2004, 12:00
31. Henschke P. A; Ough C. S. **1991**. Urea accumulation in fermenting grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(4): 317-321.
32. Mauricio, J. C.; Millán, M. C.; Moreno, J.; Ortega, J. M.; **1995**. Changes in the urea concentration during controlled wine aging by two "flor" veil-forming yeasts. *Biotechnology Letters* 17(4): 401-406.

# ANEXOS

**Anexo A** – Procedimentos operativos do HPLC.

**Anexo B** – Estudo da curva de calibração do CE para as soluções padrão consideradas e da repetibilidade das soluções padrão com concentrações 4,72, 50,33 e 150,98 µg/L.

**Anexo C** – Estudo da precisão intermédia do CE (soluções padrão com concentrações 4,72, 50,33 e 150,98 µg/L).

**Anexo D** – Estudo da repetibilidade e da precisão intermédia nas amostras consideradas.

**Anexo E** – Estudo da recuperação do CE adicionado às amostras, sob a forma de solução padrão, consideradas para este estudo.

**Anexo F** – Resultados das análises de CE realizadas no ensaio interlaboratorial e por HPLC e das análises efectuadas a um conjunto de 6 aguardentes, por GC/MS e por HPLC.

**Anexo G** – Estudo dos ensaios realizados com solução hidroalcoólica a 20%, para os tempos de reacção 5 e 45 minutos.

**Anexo H** – Estudo da curva de calibração da ureia para as soluções padrão consideradas.

**Anexo I** – Estudo da repetibilidade das soluções padrão de ureia com concentrações 0,60, 3,56 e 11,90 mg/L e da precisão intermédia da ureia (soluções padrão com concentrações 0,60, 3,56 e 11,90 mg/L).

**Anexo J** – Estudo da recuperação da ureia adicionada às amostras, sob a forma de solução padrão, consideradas para este estudo.

## ANEXO A

Procedimentos operativos do HPLC:

### Ligar o aparelho

1. Ligar o computador e a impressora;
2. Ligar os vários módulos que constituem o aparelho;
3. No computador, abrir o *software TCNav* ;
4. Introduzir a *password*;
5. No *software*, *Run* → *Take control*;
6. Trocar o frasco de água ultrapura pelo de eluente (Acetato de Sódio);
7. Efectuar a purga do aparelho, para o Acetato de Sódio  
No aparelho abrir a porta do módulo Pump, abrir a válvula e introduzir a seringa.  
No computador, Hands on → Purge  
Clicar em "flow" e digitar 2;  
Clicar em %A e digitar 100, manter até encher 4 ml na seringa;  
Clicar em "flow" e digitar 5;  
Clicar em %A e digitar 100, manter até encher 4 ml na seringa;  
Clicar Stop, tirar a seringa, despejar o seu conteúdo para o frasco de restos e fechar a purga.
8. No computador, *Run* → *Take control* → *HPLC system* → *OK*;

### Limpeza do aparelho, antes de o desligar

1. No programa: *Run* → *Release Control*;
2. Substituir o frasco de eluente por um com água ultrapura;
3. No aparelho: *Purge*  
Flow: 2 % A: 100%, manter até encher 4 ml na seringa;  
Flow: 5 % A: 100%, manter até encher mais 4 ml na seringa.
4. Clicar Stop;
5. Clicar Pump;  
Flow: 0.4 %A: 55% %B: 45%
6. Manter flow: 0.4 e diminuir lentamente o fluxo de A até 0 (100% B);
7. Clicar *STRT* no aparelho (quando estiver a passar 100% B, aumentar o fluxo para 0.8 durante uns minutos);
8. Clicar Stop;
9. Desligar o aparelho (On/Off).

## Limpeza da coluna

1. No programa: *Instrument* → *Pump*  
flow (mL/min): (new) 0.2  
Solvent composition:   %A (AcetNa): 0%  
                                  %B (ACN): 100%
2. Clicar *Set values* → OK

## ANEXO B

Estudo da curva de calibração do CE para as soluções padrão consideradas e da repetibilidade das soluções padrão com concentrações 4,72, 50,33 e 150,98 µg/L.

Solução padrão de CE (µg/L)	4,72	9,44	18,87	50,33	100,65	150,98
<b>A (uVxsec)</b>	16107,38	20490,40	39891,76	86969,40	196159,63	317982,82
	16048,00	24024,98	38839,88	98202,34	194567,43	306614,48
	15286,40	23772,36	38848,67	90979,97	199676,88	328315,19
	17344,40	22883,48	38301,80	97400,26	202094,44	334163,20
	16964,60			93709,83		338563,78
	14045,04			94161,68		342744,31
$\bar{x}$ (uVxsec)	15965,97	22792,81	38970,53	93570,58	196801,31	328063,96
SD	1189,61	1611,11	665,28	4165,94	2614,47	13599,50
CV (%)	7,45	7,07	1,71	4,45	1,33	4,15
<b>b</b>						-1760,47
<b>a</b>						2122,10
<b>Curva de calibração</b>						Y = 2122,10x - 1760,47
<b>R<sup>2</sup></b>						0,9914
L.D. (µg/L)						17,47
L.Q. (µg/L)						58,24



## ANEXO C

Estudo da precisão intermédia do CE (soluções padrão com concentrações 4,72, 50,33 e 150,98  $\mu\text{g/L}$ ).

Concentração das soluções padrão de CE ( $\mu\text{g/L}$ )	4,72	50,33	150,98
09-06-04	5,51	42,57	154,27
11-06-04	6,12	42,19	142,24
23-06-04	6,24	45,21	181,69
25-06-04	4,51	39,61	160,12
29-06-04	6,50	45,02	187,77
05-07-04	4,85	41,85	179,38
06-07-04	4,66	45,05	150,63
12-07-04	5,95	40,10	141,19
14-07-04	5,66	38,74	132,60
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	5,56	42,22	159,45
SD	0,73	2,63	21,12
CV (%)	13,12	6,23	13,25
Número de injeções	18	18	18

## ANEXO D

Estudo da repetibilidade nas amostras consideradas.

Amostra	VP1	VP2	AD1	AD2
<b>x (µg/L)</b>	67,58	32,44	129,76	10,28
	74,34	32,22	133,67	11,61
	78,42	30,73	133,31	14,85
	78,48	31,90	134,82	10,96
	81,70	31,37	130,20	14,41
	77,11	30,04	142,86	13,09
$\bar{x}$ (µg/L)	76,27	31,45	134,10	10,95
<b>SD</b>	4,88	0,92	4,73	0,94
<b>CV (%)</b>	6,40	2,94	3,53	8,58

Estudo da precisão intermédia nas amostras consideradas.

Amostra	VP1	VP2	AD1	AD2
	76,27	31,45	134,10	17,47
	105,72	20,97	137,04	13,08
	75,41	29,67	142,49	19,51
	63,23	21,38	132,36	13,78
	66,13	23,43	109,03	22,03
	53,32	24,98	-	10,95
	$\bar{x}$ (µg/L)	73,35	25,31	131,00
<b>SD</b>	2,23	0,52	1,46	0,68
<b>CV (%)</b>	3,04	2,05	1,11	4,19
<b>Número de injeções</b>	16	16	14	18

## ANEXO E

Estudo da recuperação do CE adicionado às amostras, sob a forma de solução padrão, consideradas para este estudo.

### VP1

	Concentração de CE inicial ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração da solução de padrão de CE adicionado ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração de CE final ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
24-06-04	17,62	18,87	27,28	102,41
29-06-04	12,57	18,87	22,26	102,69
05-07-04	10,54	18,87	18,51	84,48
06-07-04	11,02	18,87	20,89	104,61
08-07-04	8,89	18,87	16,38	79,39
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				94,72
SD				11,83
CV (%)				12,49
n				14
Máximo				104,61
Mínimo				79,39

### VP2

	Concentração de CE inicial ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração da solução de padrão de CE adicionado ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração de CE final ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
24-06-04	3,49	9,44	8,61	108,38
29-06-04	4,95	9,44	10,29	113,26
06-07-04	3,56	9,44	7,94	85,47
08-07-04	3,91	9,44	9,97	123,04
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				107,54
SD				15,92
CV (%)				14,81
n				12
Máximo				123,04
Mínimo				85,47

## AD1

	Concentração de CE inicial ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração da solução de padrão de CE adicionado ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração de CE final ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
24-06-04	17,13	18,87	24,34	76,47
29-06-04	17,81	18,87	27,39	101,47
06-07-04	16,54	18,87	24,83	87,78
08-07-04	13,63	18,87	20,77	75,67
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				85,35
SD				12,09
CV (%)				14,17
n				12
Máximo				101,47
Mínimo				75,67

## AD2

	Concentração de CE inicial ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração da solução padrão de CE adicionado ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração de CE final ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação (%)
24-06-04	1,63	4,72	3,43	76,20
29-06-04	2,44	4,72	5,31	121,72
06-07-04	1,72	4,72	4,48	116,64
08-07-04	2,75	4,72	6,05	139,77
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				113,58
SD				26,83
CV (%)				23,62
n				12
Máximo				139,77
Mínimo				76,20

## ANEXO F

Resultados das análises efectuadas a um conjunto de 6 aguardentes, por GC/MS e por HPLC.

<b>Amostra</b>	<b>GC/MS</b>	<b>HPLC</b>
<b>2514</b>	98,0	92,28
<b>2515</b>	98,0	105,12
<b>2374</b>	100,0	120,90
<b>2375</b>	103,0	130,37
<b>AD1</b>	115,0	131,00
<b>2559</b>	181,0	160,30

Resultados das análises de CE realizadas no ensaio interlaboratorial e por HPLC.

<b>Amostra</b>	<b>Ensaio interlaboratorial</b>	<b>HPLC</b>
<b>vinho branco</b>	Não detectado	3,21
<b>vinho tinto</b>	56,0	16,14
<b>vinho do Porto</b>	19,6	22,97
<b>aguardente</b>	60,7	54,91

## ANEXO G

Estudo dos ensaios realizados com solução hidroalcoólica a 20%, para os tempos de reacção 5 e 45 minutos.

Ensaio	Áreas (uVxsec)	
	Tempo de reacção de derivatização	
	5 minutos	45 minutos
A	261079,73	228021,40
B	234693,00	218539,20
C	233501,52	208658,36
D	231782,99	200277,80
E	229676,90	216777,65
F	117243,46	108018,66
G	92719,85	89706,40
H	95360,96	90518,75
I	146642,30	135558,00
J	135134,80	122077,80
K	183388,28	171375,60
L	246126,40	236033,53
M	187977,80	167605,60
N	128179,33	114186,00
O	1441165,60	900670,40
$\bar{x}$ (uVxsec)	264311,53	213868,34
SD	330634,44	196923,97
CV (%)	125,09	92,08

## ANEXO H

Estudo da curva de calibração da ureia para as soluções padrão consideradas.

Solução padrão de ureia (mg/L)	0,21	0,60	1,21	3,56	7,12	11,90	
A (uVxsec)	718,80 914,00	5464,40 5125,20	10918,80 11748,80	64066,40 60682,20	125460,40 137362,40	248640,00 258763,40	
$\bar{x}$ (uVxsec)	816,40	5294,80	11333,80	62374,30	136411,40	253701,70	
SD	138,03	239,85	586,90	2392,99	1344,92	7158,32	
CV (%)	16,91	4,53	5,18	3,84	0,99	2,82	
b							-10755,89
a							21726,33
Curva de calibração							Y = 21726,33 - 10755,89
R <sup>2</sup>							0,9957
L.D. (µg/L)							0,99
L.Q. (µg/L)							3,30

## ANEXO I

Estudo da repetibilidade das soluções padrão de ureia com concentrações 0,60, 3,56 e 11,90 mg/L.

x (µg/L)	Concentração da solução padrão de ureia (mg/L)		
	0,60	3,56	11,90
26-07-04	0,72	3,44	11,01
	0,71	3,50	10,95
	0,70	3,54	10,92
	0,72	3,58	11,18
	0,71	3,66	11,16
	0,70	3,67	10,78
$\bar{x}$ (µg/L)	0,71	3,57	11,00
SD	0,01	0,09	0,15
CV (%)	1,06	2,55	1,36

Estudo da precisão intermédia da ureia (soluções padrão com concentrações 0,60, 3,56 e 11,90 mg/L).

Concentração das soluções padrão de ureia (mg/L)	0,60	3,56	11,90
	0,71	3,57	11,63
	0,81	3,75	11,00
	0,84	3,93	11,23
$\bar{x}$ (µg/L)	0,79	3,75	11,9
SD	0,0	0,03	0,10
CV (%)	0,32	0,80	0,85
Número de injeções	10	10	10



## ANEXO J

Estudo da recuperação da ureia adicionada às amostras, sob a forma de solução padrão, consideradas para este estudo.

### VP2

	Concentração de ureia inicial (mg/L)	Concentração da solução de padrão de ureia adicionada (mg/L)	Concentração de ureia final (mg/L)	Recuperação (%)
28-07-04	0,32	0,60	0,72	133,59
29-07-04	0,30	0,60	0,75	149,18
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				141,39
SD				11,02
CV (%)				7,79
n				6
Máximo				149,18
Mínimo				133,59

### VP2653

	Concentração de ureia inicial (mg/L)	Concentração da solução de padrão de ureia adicionada (mg/L)	Concentração de ureia final (mg/L)	Recuperação (%)
29-07-04	0,53	1,21	1,18	107,42
30-07-04	0,60	1,21	1,14	89,86
$\bar{x}$ ( $\mu\text{g/L}$ )				98,64
SD				14,53
CV (%)				14,73
n				6
Máximo				107,42
Mínimo				89,86





FACULDADE DE ENGENHARIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000091335