

Mestrado Integrado em Engenharia Química

*Validação do método de análise de
2,4,6-Tricloroanisol*

Tese de Mestrado

de

Fátima Eduarda Oliveira Santos

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em

Amorim & Irmãos, S.A.



Orientador na FEUP: Professora Margarida Bastos

Orientador na Amorim & Irmãos: Doutor Miguel Cabral



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

julho de 2016

Agradecimentos

Existem várias pessoas a quem devo agradecer, não só pelo apoio durante este estágio, mas ao longo de todo o percurso académico.

Ao Dr. Miguel Cabral, orientador empresarial, pela disponibilidade e incentivo ao longo de todas as etapas da tese desenvolvida.

À professora Margarida Bastos, orientadora académica, pela ajuda e recetividade em todo o trabalho realizado.

Às engenheiras Ana Malheiro e Eliana Reis por toda a disponibilidade e auxílio, em especial por todo o conhecimento que me transmitiram relacionado com cromatografia em fase gasosa, e pelo acompanhamento ao longo de toda a validação de métodos efetuada. Às analistas Patrícia Oliveira e Salomé Reis por sempre se demonstrarem disponíveis para me esclarecerem qualquer dúvida, desde o primeiro dia. Um obrigado especial às quatro pela paciência, e pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram diariamente. E obrigada também a Glória Espinheira por toda a simpatia e boa disposição.

À Dra. Isabel Roseira pelo acompanhamento, ajuda e disponibilidade ao longo de todo o estágio.

Ao Dr. Paulo Lopes por toda a ajuda e recetividade, em relação aos testes estatísticos efetuados na presente tese e à preparação para a defesa deste trabalho.

Ao professor Fernando Martins pela disponibilidade e ajuda no esclarecimento de dúvidas relacionadas com estatística.

A todas as pessoas com quem fui contactando diariamente na Portocork, e que sempre me receberam com simpatia. Agradeço também aos meus colegas de faculdade por todo o companheirismo ao longo destes cinco anos, à Joana Ferreira pela ajuda nas formatações desta tese, e ao meu namorado Ruben Pereira pela ajuda nas traduções para inglês.

Obviamente também não poderia deixar de agradecer aos meus pais Manuel Santos e Madalena Soares, ao meu irmão Xavier Santos e ao meu namorado Ruben Pereira, cujo apoio e incentivo ao longo de todo o curso me permitiram enfrentar estes cinco anos académicos com responsabilidade e ambição, e motivaram-me a lutar sempre pelos meus objetivos pessoais e profissionais.

Este trabalho foi financiado pelos projetos POCI-01-0145-FEDER-006939 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia - LEPABE e NORTE-01-0145-FEDER-000005 - LEPABE-2-ECO-INNOVATION, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 - Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P.

Resumo

Uma auditoria externa realizada ao laboratório de Investigação e Desenvolvimento da Amorim&Irmãos em 2015 detetou não conformidades relacionadas com o método de análise e quantificação de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) por cromatografia gasosa com deteção por captura de eletrões com microextração em fase sólida. Como consequência foi desenvolvida a tese *Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria* (Duarte, 2016), a qual permitiu a obtenção de métodos de análise mais precisos e exatos que o existente na rotina do laboratório. A presente tese constitui a continuação da tese referida anteriormente, possuindo como objetivos a validação de métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol, a comparação destes métodos com o método de referência, e a definição de ações de correção e/ou melhoria para as não conformidades detetadas.

Assim, foram estudados dois métodos para a análise de 2,4,6-tricloroanisol. O primeiro denomina-se método Gama Intermédia, e possui uma reta de calibração com concentrações entre 0,5 ng/L e 11,0 ng/L, e o padrão interno de 2,3,6-tricloroanisol de 11,0 ng/L. Este método foi rejeitado devido à existência de resultados com dispersões significativas nos testes comparativos. O segundo método intitula-se Gama Baixa, e apresenta uma reta de calibração de 0,5 ng/L a 5,5 ng/L. Estudou-se a implementação deste método com três concentrações diferentes de padrão interno de 2,3,6-tricloroanisol, 0,5 ng/L, 10,0 ng/L e 20,0 ng/L, e efetuou-se a validação do método segundo a ISO 8466:1 e o Guia RELACRE 13. Para tal avaliou-se a linearidade das retas de calibração pelo teste de Mandel e a análise de resíduos, verificou-se se o ajuste da gama de trabalho era adequado pelo teste de homogeneidade de variâncias, e determinaram-se os limiares estatísticos e reais. Posteriormente realizaram-se ensaios de recuperação para avaliar a exatidão do novo método, fizeram-se testes de robustez para analisar a resposta do método face à presença de variações nas suas condições operatórias e efetuaram-se testes comparativos entre o método em estudo e o método de referência. Perante os resultados obtidos selecionou-se uma concentração de 20,0 ng/L para o padrão interno do método Gama Baixa.

Para além das não conformidades detetadas no método analítico, foi também realizado o levantamento de todas as outras não conformidades e definidas ações de correção e/ou melhoria através de um plano de ações, definindo para cada uma delas o prazo e o(s) responsável(is).

Com a implementação de um método mais exato e preciso no laboratório de I&D, bem como a correção das restantes não-conformidades detetadas, pretendeu-se melhorar significativamente a garantia da qualidade dos resultados obtidos no método de análise de TCA em macerações de produtos de cortiça.

Palavras-chave: TCA, validação de métodos, GC-ECD, SPME, não conformidades

Abstract

An external audit done to the Investigation and Development laboratory of Amorim&Irmãos in 2015 detected unconformities related to the analytical method of analysis and quantification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in gas chromatography with electron capture detector with solid phase microextraction. The consequence of that was the thesis *Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria* (Duarte, 2016), allowing the achievement of analytical methods more precise and accurate than the ones used in laboratory. The present thesis is a continuation of that thesis, and the objectives are the validation of the analytical methods for 2,4,6-trichloroanisole, the comparison of these methods with the reference one and the definition of corrective and/or improvement actions for the unconformities detected.

Thus, there were two analytical methods studied. The first one is called Intermediate Range method and has a calibration curve with concentrations between 0.5 ng/L and 11.0 ng/L with an internal standard of 2,3,6-trichloroanisole equal to 11.0 ng/L. This method was rejected due to bad results in comparison tests. The second one is called Low Range method, which has a calibration curve with concentrations between 0.5 ng/L and 5.5 ng/L. The implementation of this method was studied with three different internal standards concentrations of 2,3,6-trichloroanisole, 5.5 ng/L, 10.0 ng/L and 20.0 ng/L, and the method validation was done according to ISO 8466:1 and 13 RELACRE Guide. For the implementation, a series of tests were done: the linearity of the calibration curves were evaluated by the Mandel test and the residuals analysis; the work range adjustment was verified by the homogeneity of variance test; the statistical and real thresholds were determined; the recovery assays to evaluate the accuracy of the new method, a robustness test was made to analyse the response of the method due to variations in the operative conditions; and comparison tests were carried between the method under study and the reference one. Towards the results it was selected the internal standard to use in the future of the Low Range method, this being the 20.0 ng/L.

As to the unconformities detected in the external audit, it was defined the corrective and/or improvement actions across the action plan, and it was defined the deadline and the responsible(s) for each action.

With the implementation of a more precise and accurate method in the I&D laboratory, and the correction of the unconformities, it was intended to significantly improve the quality assurance of the results of the analysis of 2,4,6-trichloroanisole in the maceration of cork products.

Keywords: TCA, method validation, GC-ECD, SPME, unconformities

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Índice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introdução | 1 |
| 1.1 | Apresentação da Empresa..... | 1 |
| 1.2 | A singularidade da cortiça e o inimigo 2,4,6-tricloroanisol (TCA) | 2 |
| 1.2.1 | Estrutura da cortiça | 2 |
| 1.2.2 | As características únicas da cortiça..... | 3 |
| 1.2.3 | Aplicações da cortiça pela Amorim & Irmãos | 4 |
| 1.2.4 | O inimigo 2,4,6-tricloroanisol..... | 5 |
| 1.3 | Objetivos do trabalho..... | 6 |
| 1.4 | Contributos do Trabalho | 6 |
| 1.5 | Organização da Tese..... | 7 |
| | | |
| 2 | Contexto e Estado da Arte..... | 8 |
| 2.1 | Controlo de Qualidade na Amorim & Irmãos..... | 8 |
| 2.2 | Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria | 9 |
| 2.2.1 | Construção e validação de retas de calibração | 9 |
| 2.2.2 | Otimização de parâmetros | 10 |
| 2.3 | Análise de não conformidades | 11 |
| | | |
| 3 | Validação de métodos internos de ensaio | 14 |
| 3.1 | Avaliação Indireta..... | 14 |
| 3.1.1 | Gama de trabalho..... | 14 |
| 3.1.2 | Linearidade..... | 15 |
| 3.1.3 | Límites Analíticos..... | 16 |
| 3.1.4 | Sensibilidade..... | 17 |
| 3.1.5 | Precisão e incerteza associada | 17 |
| 3.1.6 | Exatidão | 18 |
| 3.1.7 | Robustez | 18 |
| 3.2 | Avaliação Direta..... | 19 |
| 3.2.1 | Teste <i>t</i> das médias..... | 20 |
| 3.2.2 | Teste <i>t</i> das diferenças (amostras emparelhadas) | 21 |
| 3.2.3 | Teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4 Descrição Técnica | 22 |
| 4.1 Validação de métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol | 22 |
| 4.1.1 Materiais, reagentes e equipamentos | 22 |
| 4.1.2. Preparação de soluções-padrão | 23 |
| 4.1.3 Quantificação de TCA por SPME-GC-ECD | 25 |
| 4.1.4 Testes de Robustez / Testes de <i>Youden</i> | 27 |
| 4.2 Comparação de métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol com método de Referência | 28 |
| 4.2.1 Materiais, reagentes e equipamento | 28 |
| 4.2.2 Metodologia | 28 |
| | |
| 5 Resultados e Discussão | 29 |
| 5.1 Método Gama Intermédia | 29 |
| 5.1.1 Validação do método Gama Intermédia para análise de 2,4,6-tricloroanisol | 29 |
| 5.1.2 Comparação do método Gama Intermédia com método de Referência | 30 |
| 5.2 Método Gama Baixa | 32 |
| 5.2.1 Validação do método Gama Baixa para análise de 2,4,6-tricloroanisol | 32 |
| 5.2.2 Comparação do método Gama Baixa com método de Referência | 38 |
| 5.3 Correção de não conformidades | 42 |
| | |
| 6 Conclusões | 45 |
| 6.1 Objetivos Realizados | 46 |
| 6.2 Outros Trabalhos Realizados | 46 |
| 6.3 Limitações e Trabalho Futuro | 47 |
| 6.4 Apreciação final | 47 |
| | |
| Referências | 48 |
| Anexo I Retas de Calibração | 51 |
| Anexo II Plano de Ações | 52 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Presença mundial da Amorim & Irmãos e respetiva localização geográfica (Amorim&Irmãos-a)..... | 1 |
| Figura 2 - Célula de cortiça: (a) corte transversal ou radial; (b) corte tangencial (Silva <i>et al</i> , 2010)..... | 2 |
| Figura 3 - Algumas aplicações da cortiça: (a) artesanato/ <i>design</i> ; (b) pavimentos; (c) bolas de <i>baseball</i> e volantes de <i>badminton</i> ; (d) calçado (Amorim&Irmãos-c)..... | 5 |
| Figura 4 - Rolhas produzidas pela Amorim & Irmãos: (a) natural; (b) <i>Aquamark</i> ; (c) <i>Helix</i> ; (d) <i>Top Series</i> ; (e) <i>Spark</i> ; (f) <i>Twin Top</i> ; (g) <i>Neutrocork</i> ; (h) <i>Advantec</i> ; (i) aglomerada (Amorim&Irmãos-f)..... | 5 |
| Figura 5 - Estrutura química do TCA. | 5 |
| Figura 6 - Equipamento de quantificação de TCA por SPME-GC-ECD. | 26 |
| Figura 7 - (a) Período de incubação da amostra em SPME; (b) Dessorção do TCA da fibra SPME para o injetor do GC-ECD..... | 26 |
| Figura 8 - Representação gráfica do teste de regressão linear para a globalidade dos resultados obtidos para o método GI. | 31 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Retas de calibração estudadas (Duarte, 2016). | 9 |
| Tabela 2 - Fatores, valores nominais e variações dos testes de robustez. | 27 |
| Tabela 3 - Combinação de valores nominais e variações para testes de robustez. | 27 |
| Tabela 4 - Parâmetros das retas de calibração com o método GI | 29 |
| Tabela 5 - Parâmetros de validação das retas de calibração com o método GI para diferentes GC-ECD. | 29 |
| Tabela 6 - Resultados do teste de regressão linear entre métodos GI e REF | 30 |
| Tabela 7 - Resultados do teste <i>t</i> das diferenças entre métodos GI e REF para diferentes GC-ECD. | 31 |
| Tabela 8 - Parâmetros das retas de calibração com o método GB | 32 |
| Tabela 9 - Parâmetros de validação das retas de calibração com o método GB com PI | 33 |
| Tabela 10 - Resultados dos testes de robustez com variação inferior para método GB com PI de 5,5 ng/L. | 34 |
| Tabela 11 - Resultados dos testes de robustez com variação superior para método GB com PI de 5,5 ng/L. | 34 |
| Tabela 12 - Resultados dos testes de robustez com variação inferior para método GB com PI de 20,0 ng/L. | 35 |
| Tabela 13 - Resultados dos testes de robustez com variação superior para método GB com PI de 20,0 ng/L. | 35 |
| Tabela 14 - Resultados dos testes de recuperação efetuados com o método GB para diferentes GC-ECD. | 38 |
| Tabela 15 - Resultados do teste de regressão linear entre métodos GB e REF | 39 |
| Tabela 16 - Resultados do teste <i>t</i> das diferenças entre métodos GB 5,5 ng/L e REF..... | 39 |
| Tabela 17- Resultados do teste <i>t</i> das diferenças entre métodos GB 10,0 ng/L e REF para diferentes GC-ECD. | 40 |
| Tabela 18 - Resultados do teste <i>t</i> das diferenças entre métodos GB 20,0 ng/L e REF para diferentes GC-ECD. | 40 |
| | |
| Tabela A.1 - Volume de TCA adicionado e concentrações corrigidas para método GI..... | 51 |
| Tabela A.2 - Volume de TCA adicionado e concentrações corrigidas para método GB. | 51 |
| Tabela A.3 - Plano de ações elaborado em resposta às não conformidades. | 52 |

Notação e Glossário

| | |
|----------------------|--|
| b | ordenada na origem |
| C_{inicial} | concentração inicial: ng/L |
| C_{final} | concentração após fortificação: ng/L |
| \bar{D} | média aritmética das diferenças (teste t das diferenças) |
| DS^2 | diferença entre variâncias (teste de Mandel) |
| e | sensibilidade |
| F | teste F de Snedcor/Fisher |
| F_{exp} | teste F de Snedcor/Fisher experimental |
| m | declive |
| n | número de fatores (robustez) |
| N | número de replicados ou amostras |
| N_a | número de amostras para cada método (teste t das diferenças) |
| N_L | número de níveis de concentração |
| PG | valor de teste (homogeneidade de variâncias) |
| R_i | fator (robustez): ng/L |
| $RE_i(1)$ | concentração de analito para ensaios com valores nominais (robustez): ng/L |
| $RE_i(-1)$ | concentração de analito para ensaios com variação (robustez): ng/L |
| s_b | desvio-padrão associado à ordenada na origem das retas de calibração |
| s_d | desvio-padrão associado à média aritmética das diferenças (teste t das diferenças) |
| s_i | desvio-padrão |
| s_t^2 | variância |
| s_m | desvio-padrão associado ao declive das retas de calibração |
| $s_{1y/x}$ | desvio-padrão residual da função de calibração linear |
| $s_{2y/x}$ | desvio-padrão residual da função de calibração não linear |
| t | teste t de Student |
| t_{exp} | teste t de Student experimental |
| t_{tab} | teste t de Student tabelado |
| VT | valor de teste (teste de Mandel) |
| \bar{x} | média |
| \bar{y} | média de área TCA/área PI |
| $y_{i,1}$ | área TCA/área PI |
| Z | metade do número de ensaios (robustez) |

Letra grega

| | |
|---------------|--|
| α | alfa (parâmetro de testes de hipóteses correspondente ao intervalo de confiança considerado) |
| $\bar{\mu}_i$ | média (testes comparativos) |
| σ_i | desvio-padrão (testes comparativos) |

Índice

| | |
|--------|--|
| i, j | índice ou contador representativo de uma amostra |
|--------|--|

Lista de Siglas

| | |
|--------------------|--|
| A&I | Amorim & Irmãos |
| CIPR | Código Internacional de Práticas Rolheiras |
| CQC | <i>Cork Quality Council</i> /Conselho para a Qualidade da Cortiça |
| CV | Coeficiente de Variação |
| D ₅ TCA | 2,4,6-tricloroanisol deuterado |
| ECD | <i>Electron Capture Detector</i> /Detetor de Captura de Eletrões |
| ESA | <i>European Space Agency</i> /Agência Espacial Europeia |
| EUA | Estados Unidos da América |
| GA | Método Gama Alta |
| GB | Método Gama Baixa |
| GC | Cromatografia em fase gasosa |
| GI | Método Gama Intermédia |
| GL | Graus de liberdade |
| H ₀ | Hipótese nula |
| H ₁ | Hipótese não nula |
| I&D | Investigação & Desenvolvimento |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| Máx | Concentração máxima de TCA |
| Min | Concentração mínima de TCA |
| MRC | Materiais de Referência Certificados |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> /Espectrometria de Massa |
| NASA | <i>National Aeronautics and Space Administration</i> /Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço |
| PC | Padrão de Controlo |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PI | Padrão Interno |
| r | Coeficiente de correlação |
| REC | Percentagem de recuperação |
| REF | Método de Referência |
| SPME | <i>Solid Phase Microextraction</i> /Microextração em fase sólida |
| t _{ab} | Tempo de abertura/fecho das válvulas em modo <i>split/splitless</i> |
| t _{exp} | Tempo de exposição da fibra no <i>headspace</i> |
| TCA | 2,4,6-Tricloroanisol |
| 2,3,6-TCA | 2,3,6-tricloroanisol |

1 Introdução

1.1 Apresentação da Empresa

A Amorim & Irmãos (A&I) é líder na indústria da cortiça há 150 anos, sendo a maior empresa mundial de produtos de cortiça, e a mais internacional de todas as empresas portuguesas. A sua origem remonta a uma pequena fábrica de rolhas criada em 1870 em Vila Nova de Gaia, com o objetivo de produzir rolhas para vedar os vinhos de exportação, principalmente o Vinho do Porto. A proximidade com os produtores de vinho contribuiu para a dinamização do negócio. Atualmente, 4 gerações depois, encontra-se presente em todos os continentes e vende para mais de 15 mil clientes ativos em 82 países, incluindo os principais países produtores de vinho e os principais mercados vinícolas, como França, Itália, Espanha, Austrália, Estados Unidos da América (EUA), Argentina e Chile (Figura 1). É constituída por 30 unidades industriais, 83 empresas e 248 principais agentes (Amorim&Irmãos-a), apresentando uma produção média anual de rolhas de 4,2 mil milhões de unidades, isto é, 35 % da quota do mercado global da cortiça (Amorim&Irmãos-b).

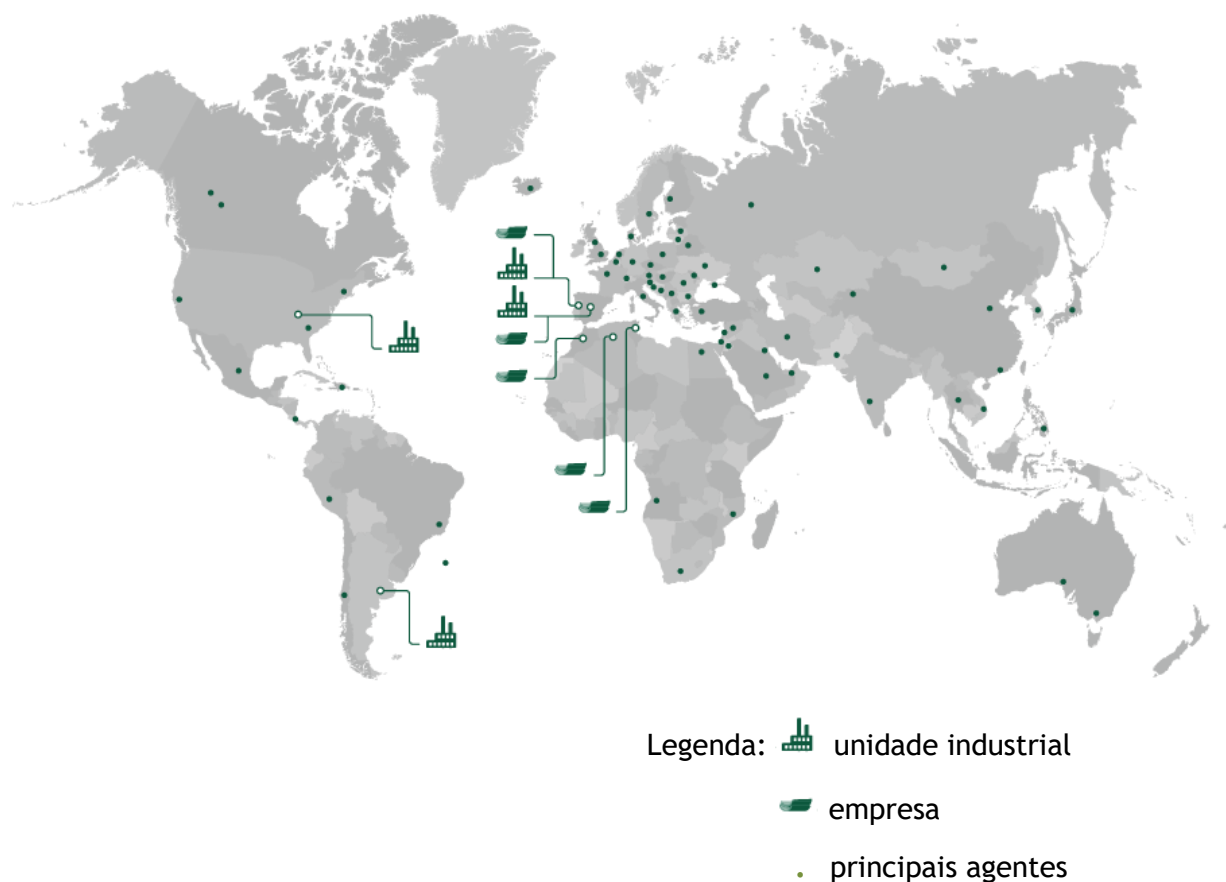


Figura 1 - Presença mundial da Amorim & Irmãos e respetiva localização geográfica (Amorim&Irmãos-a).

No final da década de 90, a produção de derivados de cortiça e o crescimento acentuado da indústria vinícola mundial, potenciou o investimento em Investigação e Desenvolvimento (I&D) da A&I. O objetivo era reforçar as políticas e competências de inovação e controlo de qualidade. Atualmente são investidos 7,5 milhões de euros em I&D por ano (Amorim&Irmãos-b).

A A&I assume-se também como líder no desenvolvimento sustentável, constituindo a primeira empresa do setor a publicar um relatório de sustentabilidade em 2007, e inaugurando em 2009 a primeira unidade industrial de reciclagem de rolhas de cortiça.

1.2 A singularidade da cortiça e o inimigo 2,4,6-tricloroanisol (TCA)

A cortiça é a casca do sobreiro (*Quercus suber* L.), e constitui uma matéria-prima com propriedades únicas e enorme potencial.

De cada tonelada de pranchas de cortiça é possível produzir 66 700 rolhas. Anualmente produzem-se 12 mil milhões de rolhas em todo o mundo (Amorim&Irmãos-b).

1.2.1 Estrutura da cortiça

A cortiça apresenta uma estrutura alveolar, sem espaços vazios entre células adjacentes. No seu interior possui um gás semelhante ao ar, que representa 80 a 90% do volume de uma rolha de cortiça. As suas células assemelham-se a prismas retangulares, dispostos em colunas paralelas à direção radial da árvore (Figura 2a). Cortes tangenciais mostram uma estrutura semelhante a uma parede de tijolos (Figura 2b) (Fortes *et al.*, 2004).



Figura 2 - Célula de cortiça: (a) corte transversal ou radial; (b) corte tangencial (Silva, 2010).

A cortiça é constituída por elementos estruturais e não-estruturais. Nos componentes estruturais incluem-se:

- a suberina, principal componente das paredes celulares da cortiça. Trata-se de um biopolímero lipídico formado por ácidos gordos, álcoois gordos e glicerol, sendo responsável pela baixa permeabilidade e pelas propriedades mecânicas da cortiça.
- a lenhina, polímero aromático que constitui o segundo componente estrutural mais importante das paredes celulares da cortiça, providenciando o suporte para os restantes componentes (Pereira, 2007).
- os polissacarídeos, compostos por celulose e hemicelulose (Fortes *et al.*, 2004). Em associação com a lenhina, são os responsáveis pela estrutura de suporte das paredes das células de cortiça.

Como componentes não-estruturais referem-se:

- os extratáveis (ceras e compostos fenólicos), que constituem compostos de baixa massa molecular. São obtidos diretamente da cortiça, por extração com solventes orgânicos e posteriores operações de separação e purificação. As ceras, em conjunto com a suberina, são responsáveis pela impermeabilização das paredes das células de cortiça (Gil, 1993).
- os inorgânicos, que caracterizam o resíduo da combustão natural da cortiça, sendo o cálcio o elemento mais significativo (Fortes *et al.*, 2004).

1.2.2 As características únicas da cortiça

A estrutura da cortiça permite-lhe adquirir características únicas que potenciam as suas qualidades como vedante.

- Leveza: a cortiça é leve ao ponto de flutuar, já que possui uma massa volúmica inferior à da água, $0,16 \text{ g/cm}^3$.
- Flexibilidade/compressibilidade: a cortiça apresenta memória elástica devido ao facto de 90 % do volume das suas células ser ocupado por um gás semelhante ao ar. Esta mistura gasosa possibilita a compressão da cortiça até metade da sua largura, e descompressão posterior, o que permite recuperar a forma inicial da rolha. Quando é comprimida num dos lados, não aumenta de volume no lado oposto. Tal característica permite à cortiça adaptar-se a variações de temperatura e pressão, sem pôr em causa a sua capacidade enquanto vedante.
- Impermeabilidade: devido à presença de suberina e ceróides, compostos de baixa polaridade, a cortiça é praticamente impermeável a líquidos polares e a gases.

- Imputrescibilidade: a cortiça é bastante resistente à humidade, o que lhe permite envelhecer sem se deteriorar.
- Isolamento: a cortiça apresenta uma baixa condutividade térmica e sonora, o que a torna um excelente isolante térmico e acústico. Tal ocorre devido ao facto de os elementos gasosos da cortiça se encontrarem fechados em compartimentos impermeáveis, e isolados entre eles por um material resistente à humidade.
- Biodegradável, reciclável e renovável: as rolhas são um produto 100 % natural, são biodegradáveis, e se forem descartadas depois de usadas não poluem o ambiente. Porém, são totalmente recicláveis e reutilizáveis (Silva *et al.*, 2005). Assim, embora a cortiça reciclada não seja usada novamente para produção de rolhas, pode ser aplicada em materiais de revestimento e isolamento, bem como em produtos tão diversos como bolas de ténis, raquetes de *badminton*, e componentes de automóveis e aviões (Amorim&Irmãos-c).
- Combustão lenta: devido à lenta combustão da cortiça, os sobreiros são mais resistentes ao fogo do que as outras árvores, o que os tornam um retardador natural do fogo, formando uma barreira natural contra os incêndios.
- Formação de compostos antioxidantes e anticancerígenos: a rolha da cortiça em contacto com o vinho liberta compostos antioxidantes, (Silva *et al.*, 2005) tendo esse efeito sido estudado, assim como o efeito anti-inflamatório e anticancerígeno da cortiça (Castola *et al.*, 2005).

1.2.3 Aplicações da cortiça pela Amorim & Irmãos

O investimento em I&D permitiu à A&I aproveitar o potencial da cortiça, não se restringindo apenas às rolhas. As inovadoras aplicações (Figura 3) incluem a cortiça em pavimentos e revestimentos, nos componentes para interiores de autocarros, comboios e aviões, em bolas de *baseball* e em pranchas de *surf*, em peças de arte e *design*, em peças de joalharia, vestuário e calçado, em absorventes de óleo e solventes orgânicos (Amorim&Irmãos-c). Também pode ser aplicada na construção de pontes e auto-estradas, preenchendo os espaços das juntas de dilatação, uma vez que absorve vibrações e expansões decorrentes do calor, e contrações dos materiais de construção, o que permite que as estruturas se movam sem se danificarem (Amorim&Irmãos-d). Adicionalmente, também é incorporada nas pás das turbinas eólicas (Amorim&Irmãos-e).

Desde 1980 que a A&I colabora com a indústria aeroespacial, sendo que a *National Aeronautics and Space Administration*/Administração Nacional da Aeronáutica e Espaço (NASA) e a *European Space Agency*/Agência Espacial Europeia (ESA) incorporam a cortiça em escudos térmicos e placas de revestimento das naves espaciais (Amorim&Irmãos-c).

A cortiça encontra-se também em teste para equipamentos de proteção pessoal, resultante da sua capacidade de resistência ao choque (CorkSTfluidics, 2016).

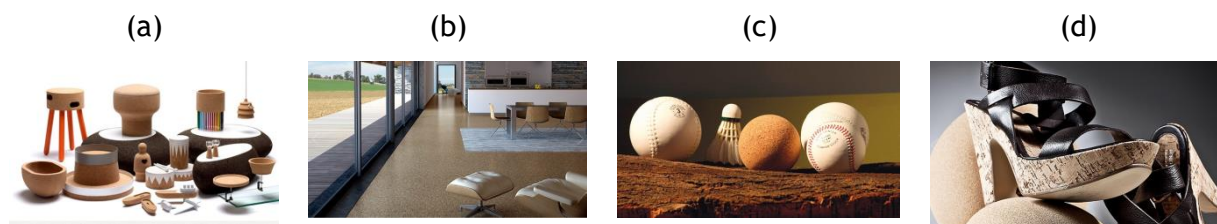


Figura 3 - Algumas aplicações da cortiça: (a) artesanato/*design*; (b) pavimentos; (c) bolas de *baseball* e volantes de *badminton*; (d) calçado (Amorim&Irmãos-c).

É de salientar que o pó da cortiça pode ser utilizado na cogeração de energia elétrica. Aliás, a A&I satisfaz 60 % das suas necessidades energéticas com recurso ao pó de cortiça (biomassa) (Amorim&Irmãos-e).

Apesar de todas as aplicações inovadoras que a A&I tem desenvolvido para a cortiça, as rolhas continuam a constituir o principal aproveitamento desta matéria-prima, adaptando este produto a cada tipo de vinho e segmento de mercado vinícola (Figura 4).

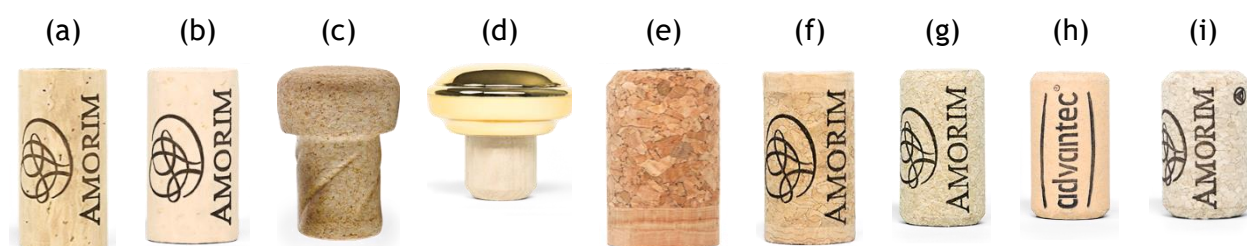


Figura 4 - Rolhas produzidas pela Amorim & Irmãos: (a) natural; (b) *Aquamark*; (c) *Helix*; (d) *Top Series*; (e) *Spark*; (f) *Twin Top*; (g) *Neutrocork*; (h) *Advantec*; (i) aglomerada (Amorim&Irmãos-f).

1.2.4 O inimigo 2,4,6-tricloroanisol

O principal desafio colocado à indústria corticeira tem sido vencer o TCA, o principal responsável pelo odor a mofo no vinho (Figura 5).

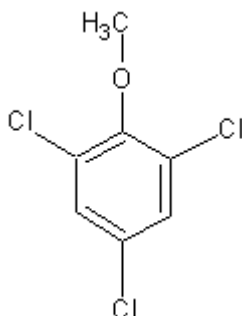


Figura 5 - Estrutura química do TCA.

Este composto é exógeno ao vinho, à madeira e à rolha de cortiça. No entanto, caso esteja presente na atmosfera e entrar em contato com rolhas de cortiça é facilmente adsorvido. Por outro lado, se a cortiça estiver contaminada com clorofenóis (os principais precursores de TCA), este pode formar-se diretamente, por interação dos clorofenóis com microrganismos, nomeadamente fungos (APCOR).

A formação de clorofenóis ocorre desde que uma substância que contenha fenol entre em contacto com uma fonte de cloro. Logo, se uma rolha de cortiça for lavada com cloro, este facto potencia o aparecimento de clorofenóis. Por esta razão, há mais de 15 anos que o uso de cloro, ou de meios contendo este composto, são proibidos em todas as fases do processo produtivo de rolhas, inclusive no processo de lavagem. O Código Internacional de Práticas Rolheiras (CIPR), onde estão definidas as regras práticas de trabalho destinadas à indústria da cortiça e setor rolheiro, expressa claramente essa proibição. Alternativamente, a lavagem das rolhas de cortiça realiza-se com peróxido de hidrogénio (H₂O₂), que permite a sua desinfeção e branqueamento.

1.3 Objetivos do trabalho

Com o desenvolvimento deste trabalho pretende-se efetuar:

- ✓ Validação dos métodos de análise de TCA previamente desenvolvidos (Duarte, 2016) no laboratório de I&D
- ✓ Implementação dos métodos de análise de TCA na rotina do laboratório comparando com o método de referência
- ✓ Correção das não conformidades detetadas na auditoria realizada por AIM em julho e agosto de 2015 aos procedimentos analíticos de TCA em curso nas diferentes unidades industriais da A&I

1.4 Contributos do Trabalho

Decorrente das melhorias introduzidas no processo produtivo e do rigoroso controlo implementado, a A&I fornece atualmente aos seus clientes rolhas com a garantia de que a probabilidade de estas apresentarem TCA seja mínima. No entanto, como resultado de uma auditoria externa realizada em 2015 verificou-se que o laboratório de I&D da A&I, bem como as diferentes unidades industriais não cumpriam todos os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025:2005 (Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração). Assim, tornou-se necessário a elaboração de um plano de ações corretivas e de melhoria, de modo a retificar as não conformidades detetadas, razão pela qual foi apresentada a tese

Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria (Duarte, 2016). Esta tese permitiu o desenvolvimento de métodos para quantificação de TCA, com exatidão e precisão superiores ao do método atualmente em vigor no I&D.

A presente tese, realizada entre 15 de fevereiro e 15 de julho de 2016, tem como objetivo continuar o trabalho realizado por Duarte e col., consolidando os estudos sobre a adaptação dos métodos existentes e corrigindo as restantes não conformidades detetadas na auditoria acima referida.

1.5 Organização da Tese

Com este trabalho pretende-se abordar os problemas associados à contaminação por TCA das rolhas de cortiça produzidas pela A&I, assim como a validação e implementação dos métodos de análise desenvolvidos no I&D para detetar e quantificar este contaminante.

Assim, a presente tese dividiu-se em 6 capítulos:

- ✓ Capítulo 1, *Introdução*, em que se apresenta a empresa onde se realizou o estágio, as características principais da cortiça e do contaminante TCA, bem como o enquadramento desta tese com as atividades da A&I.
- ✓ Capítulo 2, *Contexto e Estado de Arte*, onde se apresentam os métodos cromatográficos desenvolvidos na tese anterior (Duarte, 2016), bem como as não conformidades detetadas na auditoria.
- ✓ Capítulo 3, *Validação de Métodos Internos de Ensaio*, em que se caracterizam os testes realizados para validação e implementação dos métodos de análise em estudo.
- ✓ Capítulo 4, *Descrição Técnica*, em que se indicam as atividades realizadas ao longo do estágio.
- ✓ Capítulo 5, *Resultados e Discussão*, em que se apresentam e discutem os resultados obtidos.
- ✓ Capítulo 6, *Conclusões*, em que se verifica se os objetivos foram cumpridos, as limitações e o trabalho a desenvolver no futuro, e uma apreciação global do trabalho efetuado.

2 Contexto e Estado da Arte

Nos anos 90 a cortiça foi considerada a principal fonte de TCA (e de outros contaminantes) nos vinhos engarrafados, razão pela qual se desenvolveram vedantes artificiais. Estes, competindo nos mercados diretamente com as rolhas de cortiça, fizeram com que as corticeiras (incluindo a A&I) melhorassem a produção e controlo das rolhas de cortiça, e apostassem fortemente na inovação, de modo a desenvolverem estratégias de combate ao TCA. Estas medidas atuam em três áreas: prevenção, descontaminação e controlo de TCA. A prevenção pretende prevenir a formação de TCA em todas as fases de produção das rolhas, desde a extração da cortiça até ao cliente final, enquanto a descontaminação tem o objetivo de eliminar o TCA e outros compostos voláteis nos diferentes produtos de cortiça usados na produção de rolhas. Por fim, o controlo de qualidade pode ser realizado por análises cromatográficas e sensoriais (APCOR).

2.1 Controlo de Qualidade na Amorim & Irmãos

Com o objetivo de minimizar os problemas inerentes à presença de TCA, a A&I cumpre padrões rígidos em termos de controlo de qualidade, tal como a metodologia usada pelo *Cork Quality Council/Conselho* para a Qualidade da Cortiça (CQC) dos EUA e pelo Laboratório ETS na Califórnia.

Estas entidades desenvolveram um projeto com equipamentos complexos e com elevada sensibilidade para quantificar TCA, através da combinação de microextração em fase sólida (SPME) com cromatografia em fase gasosa (GC), sendo a deteção feita por espetrometria de massa (MS) ou por outros sistemas de deteção igualmente sensíveis, como a deteção por captura de eletrões (ECD). Este método permite eliminar a possibilidade de falsos positivos e de falsos negativos em análises sensoriais, fornecendo informações quantitativas de contaminação de TCA em rolhas de cortiça de forma precisa, em quantidades próximas do limiar de deteção humano. Em 2015, o CQC realizou 30 000 análises, cujos resultados mostraram uma redução de 95 % nos níveis de TCA em relação a 2002 e, ainda, que 91 % das amostras possuem TCA abaixo de 1 ng/L (APCOR).

2.2 Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria

Em 2015, o laboratório de I&D foi sujeito a uma auditoria externa, que avaliou o método de determinação de TCA em cortiça por cromatografia em fase gasosa, com base em entrevistas ao pessoal afeto ao laboratório, às unidades industriais e a análise documental. A tese *Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria* (Duarte, 2016) constituiu uma consequência dessa auditoria, e apresentava dois objetivos principais, sendo o primeiro a construção e validação de retas de calibração de acordo com a ISO 8466 (*Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*) e o segundo objetivo a otimização de parâmetros para uma análise mais precisa e exata do método.

2.2.1 Construção e validação de retas de calibração

O método atualmente em vigor no I&D, o método de referência (REF), possui 6 níveis de concentração:

0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 ng/L

Sendo o padrão interno (PI) 2,3,6-tricloroanisol (2,3,6-TCA) igual a 20,0 ng/L.

Como os valores críticos para aceitação/rejeição de lotes encontram-se entre 0,5 ng/L e 2,0 ng/L, a distribuição dos níveis de concentração do método REF encontra-se bem ajustada. No entanto, os diferentes pontos da reta não são equidistantes, pelo que na realidade ela funciona como se só possuísse 3 pontos, um que engloba os 4 primeiros níveis de concentração, o ponto 10,0 ng/L e o ponto 20,0 ng/L. Por essa razão, na tese acima referida foram desenvolvidas 3 retas de calibração, todas elas com os pontos equidistantes e um PI correspondente, permitindo obter resultados exatos e precisos, no que constitui a base para os métodos de Gama Baixa (GB), Gama Intermédia (GI) e Gama Alta (GA) (Tabela 1).

Tabela 1 - Retas de calibração estudadas (Duarte, 2016).

| Método | Gama de trabalho (ng/L) | PI (ng/L) |
|----------------------|---|-----------|
| Gama Baixa (GB) | 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 | 5,5 |
| Gama Intermédia (GI) | 0,5; 2,0; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5; 11,0 | 11,0 |
| Gama Alta (GA) | 0,5; 6,0; 11,5; 17,0; 22,5; 28,0 | 28,0 |

2.2.2 Otimização de parâmetros

De modo a alcançar uma análise mais precisa e exata, Duarte (2016) utilizou um cromatógrafo com detetor de captura de elétrons para testar os seguintes parâmetros:

- Influência do tempo de exposição da fibra no *headspace* (t_{exp});
- Alteração dos tempos de abertura/fecho das válvulas em modo *split/splitless* (t_{ab});
- Programas de temperatura.

Tempo de exposição da fibra no *headspace* do frasco de cromatografia

O t_{exp} possui efeito no tempo de extração de TCA. Este parâmetro foi avaliado para 8, 16 e 24 minutos, verificando-se que com o aumento do tempo, aumenta a área dos picos de analito e de PI, já que o tempo para o TCA ser adsorvido na fibra é maior. Os resultados melhoraram com o aumento de t_{exp} . No entanto, tal implicaria que o tempo de análise de cada amostra aumentasse substancialmente, o que reduziria para um terço o número de amostras diárias analisadas no I&D. Logo, todos os métodos foram validados com t_{exp} igual a 8 minutos.

Alteração dos tempos de abertura/fecho das válvulas em modo *split/splitless*

Para o t_{ab} testou-se tempos de 1, 2, 3 e 4 minutos. Para t_{ab} igual a 1 ou 2 minutos verificou-se que a área de TCA e PI aumentaram, enquanto para t_{ab} igual a 3 e 4 minutos as mesmas áreas diminuíram, devido à dispersão de TCA e PI no sistema de injeção. Assim, adotou-se um t_{ab} de 2 minutos para todos os métodos.

Programas de temperatura

No método REF, a rampa de temperatura usada inicia-se em 90 °C, e aumenta gradualmente 15 °C/min até 265 °C. A nova rampa testada iniciava-se em 50 °C durante 4 minutos, subia 40 °C/min até 90 °C e, por fim, voltava a subir 25 °C/min até 265 °C. A nova rampa aumentava a relação sinal-ruído na linha de base e, conseqüentemente, diminuía a qualidade visual dos picos, razão pela qual a rampa foi rejeitada.

2.3 Análise de não conformidades

A auditoria externa realizada em 2015 ao laboratório de I&D revelou a existência de não conformidades. Estas irregularidades estavam relacionadas não apenas com o método, mas também com outros aspetos inerentes às atividades do laboratório diretamente ligadas à análise de TCA. O objetivo passou por corrigir todas as não conformidades detetadas, as quais foram analisadas individualmente, de forma a identificar a sua origem, definir as ações corretivas, e os prazos e responsáveis pela sua implementação.

O relatório da auditoria externa refere as não conformidades detetadas por secções indexadas aos pontos da norma NP EN ISO/IEC 17025: controlo de documentos, controlo de registos, controlo de trabalho não-conforme, pessoal, instalações e condições ambientais, métodos de ensaio, calibração e validação de métodos, estimativa da incerteza da medição, equipamento, rastreabilidade de medições, amostragem, manuseamento de itens a ensaiar ou calibrar e garantir a qualidade dos resultados de ensaio e de calibração. No presente sub-capítulo apresentam-se não conformidades que não estão diretamente relacionadas com o método de ensaio, sendo referida a importância da sua correção, uma vez que irão contribuir de forma positiva para a melhoria da qualidade dos resultados analíticos.

- **Lavagem e reutilização de material descartável, nomeadamente pontas das macropipetas**

Tradicionalmente as pontas das macropipetas eram autoclavadas e secas em estufa, e descartadas ao fim de um ano, caso não existissem danos visíveis antes dessa data. No entanto, este procedimento suscitava dúvidas quanto à aptidão para serem reutilizadas como material volumétrico, já que com as lavagens sucessivas poderia ocorrer deformação das pontas e, conseqüentemente, estas já não mediriam o volume de amostra pretendido: 10 mL.

- **Inexistência de controlo efetivo do teor alcoólico das macerações em várias unidades industriais**

No I&D existe um alcoolímetro para medição do teor alcoólico das soluções, não se encontrando o mesmo calibrado. No entanto, a fragilidade deste equipamento justificou a procura de uma metodologia adequada, barata e expedita para a medição do teor alcoólico, tanto no I&D como nas diferentes unidades industriais.

Esta medida é essencial, uma vez que o problema reside no facto de várias unidades industriais não controlarem o teor alcoólico das suas macerações, o que

pode ter um impacto negativo nos resultados das amostras enviadas para o I&D. Assim, para além de consciencializar as unidades industriais sobre a importância do controlo do teor alcoólico, também se espera implementar nas mesmas o equipamento que será adotado em definitivo pelo I&D.

- **Existência de macerações em várias unidades industriais fora do intervalo de tempo estipulado para as mesmas (16 h a 72 h)**

O prazo estipulado para uma maceração é de 24 ± 2 h (ISO 20752), período necessário para o TCA extraível migrar da superfície da rolha para a solução. Um estudo interno realizado no I&D em 2004 definiu que o prazo de maceração poderia estar compreendido ente 16 h e 72 h. Contudo, a auditoria constatou que as conclusões do referido estudo mostravam o contrário, pelo que foi assinalada esta não conformidade.

- **Não existe rastreabilidade da preparação de padrões (da solução-mãe da calibração e solução-mãe de PI)**

Os padrões utilizados como padrões de controlo (PC) possuíam a mesma origem dos padrões utilizados nas retas de calibração, o que não permitia despistar erros sistemáticos. Assim, caso existisse algum problema ou contaminação no lote das soluções-mãe não era possível detetá-lo, já que ambos os padrões (PC e PI) possuíam a mesma origem.

- **O laboratório não possuía Materiais de Referência Certificados (MRC)**

Os MRC apresentam, para cada parâmetro, um dado valor de concentração e uma incerteza associada. Estes materiais permitem avaliar a exatidão do método, ao comparar o valor obtido na análise de um MRC com o seu valor certificado. Se o valor obtido não se encontrar no intervalo definido para o valor certificado, a solução reside em analisar as causas desse desvio, e eliminá-las ou aceitá-las. Os critérios de aceitação para os resultados dos MRC dependem do rigor definido por cada laboratório (Guia RELACRE 13, 2000).

- **Os PC eram colocados em cartas de controlo de médias móveis**

Este tipo de cartas de controlo utiliza a média \bar{x} e o desvio-padrão s de todos os padrões da mesma concentração no cálculo dos seus limites, sendo que a presença de PC fora do intervalo definido para os limites de controlo implica a repetição de todas as amostras do ciclo de análise do cromatógrafo em questão.

$$\text{Limites de aviso} = \bar{x} \pm 2s \quad (1)$$

$$\text{Limites de controlo} = \bar{x} \pm 3s \quad (2)$$

Ao usar este tipo de cartas de controlo, os limites calculados com base nos valores obtidos nos PC eram latos. Também foi verificada a ausência de análise de tendências, bem como ações a implementar no caso de ocorrerem desvios em relação aos limites definidos nas cartas de controlo.

- **O laboratório não usava nenhum branco da fibra de SPME entre injeções**

Esta medida é importante, uma vez que permite confirmar que o analito de uma dada injeção foi eliminado antes de se realizar a injeção posterior.

- **Não existiam limites de aceitação para as variações de áreas do PI**

Em todas as amostras preparadas pipeta-se 100 µL de PI. Logo, a área do PI em cada cromatógrafo deve-se manter constante, devendo existir um limite definido até ao qual esta pode variar.

- **Inexistência de registos que permitissem rastrear as tarefas executadas no laboratório**

Esta não conformidade decorreu do facto de o laboratório não ter conseguido evidenciar a data de preparação do PI utilizado na penúltima calibração efetuada. Tal foi constatado para outras soluções que também foram preparadas no I&D, bem como para situações de trabalho não-conforme.

- **Por incompatibilidade de *software*, os computadores dos cromatógrafos gasosos não se encontravam ligados à internet, e não tinham instalados anti-vírus.**

Devido à ausência de internet nestes computadores, todos os meses são efetuadas cópias de segurança dos registos primários existentes nos computadores dos cromatógrafos gasosos. No entanto, o laboratório não conseguiu garantir que os discos móveis usados nestes computadores estavam isentos de vírus.

Face às não conformidades acima descritas, o laboratório procedeu a uma análise exaustiva das mesmas, de forma a poder-lhes responder implementando as medidas corretivas adequadas.

3 Validação de métodos internos de ensaio

Validar um método analítico é demonstrar que, para uma dada finalidade, o mesmo pode ser usado com segurança, precisão e exatidão (CDER, 1994). No âmbito da presente tese foram usados como referência dois documentos: a primeira parte da ISO 8466, *Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics (Part 1, Statistical evaluation of the linear calibration function)*, que descreve os passos necessários para avaliar uma função de calibração linear; e o Guia RELACRE 13, *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*, que possui o objetivo de uniformizar os critérios usados por laboratórios químicos para validar os seus métodos internos de ensaio, de forma direta e indireta.

3.1 Avaliação Indireta

O método em estudo aplica-se a análises quantitativas. Assim, para a sua validação torna-se necessário avaliar um conjunto de parâmetros, como a gama de trabalho, a linearidade, os limiares analíticos (de deteção *LD* e de quantificação *LQ*), a sensibilidade, a precisão, a exatidão, a robustez e a incerteza associada aos resultados (USP 1225, 2008), permitindo fazer uma avaliação indireta do processo de validação.

3.1.1 Gama de trabalho

A seleção da gama de trabalho depende de três fatores: i) objetivo prático da calibração (devendo a concentração das amostras mais frequentes se encontrar no centro da gama de trabalho); ii) viabilidade técnica, já que os valores medidos devem correlacionar-se linearmente com as concentrações, o que requer que os valores medidos próximos do *LD* devem distinguir-se dos brancos do método (assim, o limite inferior da gama de trabalho deve ser igual ou superior ao *LD* do método); iii) as variâncias dos extremos da reta devem ser independentes da concentração, o que se verifica pelo teste da homogeneidade de variâncias.

O teste definido na ISO 8466-1 para avaliar a gama de trabalho é o teste da homogeneidade de variâncias. Este consiste em preparar dez replicados dos limites inferior e superior da gama de trabalho em condições de precisão intermédia, isto é, variando pelo menos uma das condições experimentais. Em seguida determinam-se as

variâncias s_1^2 e s_2^2 para os extremos inferior e superior da reta, respetivamente, pela equação (3).

$$s_1^2 \text{ ou } s_2^2 = \frac{\sum_{i=1}^{10} (y_{i,1} - \bar{y})^2}{N-1} \quad (3)$$

Sendo $y_{i,1}$ o valor de $\frac{\text{Área TCA}}{\text{Área PI}}$ para cada replicado, \bar{y} a média, e N o número de réplicas.

O valor de teste PG calcula-se por:

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ se } s_1^2 > s_2^2 \text{ ou } PG = \frac{s_2^2}{s_1^2} \text{ se } s_2^2 > s_1^2 \quad (4)$$

De seguida compara-se PG com o valor correspondente da distribuição F de Snedecor/Fisher, para $(N-1)$ graus de liberdade, que depende do número de níveis de concentração e do nível de confiança:

- ✓ Se $PG \leq F$, a diferença entre as variâncias não é significativa, e a gama de trabalho está bem ajustada;
- × Se $PG > F$, a diferença entre as variâncias é significativa, e a gama de trabalho deve ser reduzida.

3.1.2 Linearidade

O teste mais simples para avaliar a linearidade é representando graficamente o sinal medido em função da concentração, e analisando o coeficiente de correlação (r), tendo este de ser superior a 0,995.

O teste recomendado na ISO 8466-1 para a linearidade é o teste de Mandel. Este teste usa os dados obtidos da calibração para calcular uma função de calibração linear, bem como uma função de calibração não linear. Em seguida determina a diferença entre as variâncias (DS^2) das duas funções, sendo $s_{1y/x}$ o desvio-padrão residual da função de calibração linear, $s_{2y/x}$ o desvio-padrão residual da função de calibração não-linear, e N_L o número de níveis de concentração.

$$DS^2 = (N_L - 2)s_{1y/x}^2 - (N_L - 3)s_{2y/x}^2 \quad (5)$$

Em que:

$$s_{1y/x}^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_L} [y_i - (a + bx_i)]^2}{N_L - 2}} \quad (6)$$

$$s_{2y/x}^2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_L} [y_i - (a + bx_i + cx_i^2)]^2}{N_L - 3}} \quad (7)$$

Em seguida calcula-se o valor de teste VT e compara-se este com o valor correspondente da distribuição F de Snedecor/Fisher, para $(N_L - 3)$ graus de liberdade:

$$VT = \frac{DS^2}{s_{2y/x}^2} \quad (8)$$

- ✓ Se $VT \leq F$, a função de calibração é linear;
- × Se $VT > F$, a gama de trabalho deve ser reduzida o máximo possível para se usar uma função de calibração linear ou, em alternativa, aplica-se uma função de calibração não-linear.

O teste de Mandel pode ser complementado pela análise de resíduos, que analisa a relação entre o sinal de analito medido e o sinal de analito obtido por ajuste linear, para cada nível de concentração.

$$Resíduo = \frac{(sinal_{medido} - sinal_{estimado})}{sinal_{estimado}} \times 100 \quad (9)$$

Para comprovar a linearidade a soma dos resíduos deve ser próxima de zero (FDA, 1996).

3.1.3 Limiares Analíticos

O LD corresponde à menor quantidade de analito que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato. Por outro lado, o LQ corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar a presença de analito, com uma dada precisão e exatidão. Na prática trata-se do menor padrão de concentração da reta de calibração. Estatisticamente os limiares podem ser determinados pelas equações seguintes, sendo s o desvio-padrão de dez replicados do padrão de menor concentração da reta, em condições de precisão intermédia (Guia RELACRE 13, 2000).

$$LD = 3,0 \times s \quad (10)$$

$$LQ = 3,0 \times LD \quad (11)$$

Os valores obtidos estatisticamente para os limiares têm de ser confirmados experimentalmente. Para tal analisam-se dez replicados para o *LQ* estatístico, em precisão intermédia, e determina-se a sua média \bar{x} e desvio-padrão *s*. Posteriormente calcula-se o coeficiente de variação (*CV*) pela equação (12). Se este for inferior a 10% confirma-se o valor do *LQ*. Caso contrário aumenta-se ou diminui-se o valor de *LQ* estatístico e repete-se esta análise até se obter *CV* inferior a 10 % (IPAC, 2011).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \quad (12)$$

3.1.4 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade do método para discriminar pequenas variações de concentração de analito, correspondendo à derivada de primeira ordem nessa gama de concentração. Em casos de funções de calibração lineares, a sensibilidade é igual ao declive da reta e, portanto, constante em toda a gama de trabalho. Um método é mais sensível quanto maior for o seu declive (Guia RELACRE 13, 2000).

3.1.5 Precisão e incerteza associada

A precisão de um método é dada pelo grau de proximidade entre resultados, referentes à mesma amostra. Este parâmetro pode ser avaliado pela repetibilidade, por precisão intermédia e por reprodutibilidade.

A repetibilidade exprime a precisão de um método quando sujeito a condições idênticas, isto é, análises à mesma amostra em condições estáveis, que incluem mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, num curto intervalo de tempo.

Quando se varia um dos fatores enumerados anteriormente obtém-se condições de precisão intermédia, enquanto uma avaliação da reprodutibilidade dos resultados implica a variação de vários destes fatores. Nos ensaios realizados nesta tese não se usaram condições de reprodutibilidade, já que esta resulta de ensaios interlaboratoriais (Guia RELACRE 13, 2000).

A incerteza permite caracterizar a dispersão dos resultados. Recomenda-se que seja calculada em condições de precisão intermédia (e não em condições de repetibilidade), uma vez que permite avaliar o desempenho do método quando sujeito a variações de parâmetros experimentais, que são normalmente mantidos constantes durante o mesmo dia de trabalho (IPAC, 2007). Assim, esta incerteza é dada pelo desvio-padrão dos replicados de determinada amostra/padrão, em

condições de precisão intermédia (Miller, 2005). Para N replicados, com média \bar{x} e desvio-padrão s , o resultado final será dado por:

$$\text{Resultado final} = \bar{x} \pm s \quad (13)$$

3.1.6 Exatidão

A exatidão corresponde ao grau de proximidade entre o resultado obtido e o resultado esperado/real. Em muitas situações o resultado esperado, ou seja, o valor exato, não é conhecido. Nestes casos pode-se avaliar a exatidão por ensaios de recuperação, fortificando a amostra com uma solução padrão de analito de concentração conhecida, e determinando a concentração da amostra antes (C_{inicial}) e após a fortificação (C_{final}). A percentagem de recuperação (REC) calcula-se pela equação (14).

$$REC (\%) = \frac{C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}}}{C_{\text{adicionada}}} \times 100 \quad (14)$$

Para o método ser considerado exato, REC deve ser próxima de 100 %.

3.1.7 Robustez

A robustez traduz-se pela sensibilidade de um método a perturbações, ou seja, mede a capacidade do método de permanecer inalterado face a modificações pequenas, mas deliberadas, dos seus parâmetros (FDA, 1996).

Para avaliar a robustez de um método pode-se aplicar o teste de Youden, que permite verificar a influência das variáveis nos resultados finais. Assim, seleciona-se um dado número de fatores a variar (normalmente sete), e definem-se vários ensaios (normalmente oito), sendo o primeiro ensaio constituído pelos valores nominais, e os restantes por combinações entre os valores nominais e as variações. Cada ensaio deve ser constituído por dez replicados.

O tratamento dos resultados é efetuado para cada fator R_i , sendo $RE_i(1)$ a concentração de analito para ensaios com valores nominais, $RE_i(-1)$ a concentração de analito para ensaios com variação, e Z o valor correspondente a metade do número de ensaios (Guia RELACRE 13, 2000).

$$R_i = \frac{\sum RE_i(1) - \sum RE_i(-1)}{Z} \quad (15)$$

Quanto maior for R_i (em módulo), maior a influência que o fator possui nos resultados finais. Se o teste de Youden for realizado para variações superiores aos valores nominais, um valor positivo para R_i significa que o aumento de dado fator faz aumentar a concentração de analito. No entanto, se R_i for negativo, o aumento desse fator provoca uma diminuição na concentração de analito (César *et al.*, 2009).

O tratamento de resultados também pode ser realizado estatisticamente, calculando os limites de confiança para cada fator, em que t é o valor do teste t de Student com $(n-2)$ graus de liberdade e para um intervalo de confiança de 95 %, s é o desvio-padrão de ΣR_i , e n é o número de fatores analisados.

$$\text{Limite de confiança para } R_i = R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right) \quad (16)$$

Estatisticamente, um dado fator R_i tem um efeito significativo nos resultados se o seu intervalo de confiança não contiver o valor zero (Guia RELACRE 13, 2000).

3.2 Avaliação Direta

A avaliação direta permite conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, podendo esta ser avaliada através de MRC, de ensaios interlaboratoriais e de testes comparativos (Guia RELACRE 13, 2000). A abordagem selecionada consistiu na realização de testes comparativos, comparando os resultados obtidos através do método em estudo com os resultados correspondentes de um método de referência que, neste caso, constitui o método atualmente em vigor no I&D para quantificação de TCA (método REF). O objetivo foi estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos e, assim, comparar a exatidão do método desenvolvido em relação ao método REF.

No Guia RELACRE 13 definem-se três métodos estatísticos para tratar os resultados dos testes comparativos:

- Teste de hipótese: teste t das médias;
- Teste de hipótese: teste t das diferenças (amostras emparelhadas);
- Teste de regressão linear entre os dois métodos.

Os testes de hipóteses são usados para avaliar as diferentes gamas de trabalho em que se divide a gama de trabalho total, enquanto o terceiro teste usa-se para avaliar a totalidade da gama de trabalho.

3.2.1 Teste t das médias

O teste t das médias aplica-se a replicados da mesma amostra, não implicando que o número de amostras seja igual para os dois métodos, uma vez que o estudo da proximidade dos resultados é efetuado em torno da média dos valores.

Tanto para este teste como para o teste t das diferenças considera-se:

- H_0 (hipótese nula): a diferença entre as médias dos dois métodos é igual a zero;
- H_1 (hipótese não nula): a diferença entre as médias dos dois métodos é diferente de zero.

Após se obterem os resultados para os ensaios efetuados, determinam-se as médias ($\bar{\mu}_1$ e $\bar{\mu}_2$) e desvios-padrão (s_1 e s_2) para os dois métodos (Poirier, 1995). Em seguida efetua-se uma análise às variâncias (F_{exp}) para verificar se existem ou não diferenças significativas entre as variâncias dos dois métodos, de forma análoga à equação (4) aplicada no teste da homogeneidade de variâncias. O valor F_{exp} obtido é comparado com o valor F da distribuição F de Snedecor/Fisher, para (N_1-1) graus de liberdade.

Quando $F_{exp} < F$:

$$t_{exp} = \frac{(\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2)}{S \sqrt{\left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}\right)}} \quad (17)$$

Sendo:

$$S^2 = \frac{(N_1-1)s_1^2 + (N_2-1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \quad (18)$$

Por fim compara-se t_{exp} com o t tabelado (t_{tab}). Os métodos estatisticamente não apresentam desvios significativos se $|t_{exp}| \leq t_{tab}$.

Porém, se $F_{exp} > F$:

$$t_{exp} = \frac{(\bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)}} \quad (19)$$

A comparação com o t_{tab} é efetuada para um dado intervalo de confiança, e um número de graus de liberdade (GL) definido por:

$$GL = \frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{\frac{(s_1^2/N_1)^2}{N_1+1} + \frac{(s_2^2/N_2)^2}{N_2+1}} - 2 \quad (20)$$

Os métodos estatisticamente não apresentam desvios significativos se $|t_{exp}| \leq t_{tab}$.

3.2.2 Teste t das diferenças (amostras emparelhadas)

No teste t das diferenças o número de amostras tem obrigatoriamente de ser igual nos dois métodos, porque este teste realiza-se em torno das diferenças dos resultados obtidos pelos dois métodos, para cada amostra analisada. Neste teste também se verifica que os métodos não apresentam estatisticamente desvios significativos se $|t_{exp}| \leq t_{tab}$, para (N_a-1) graus de liberdade. Calcula-se t_{exp} pela equação (21) sendo \bar{D} a média aritmética das diferenças entre os valores obtidos pelos dois métodos para a mesma amostra, N_a o número de amostras ensaiadas para cada método, e S_d o desvio-padrão associado à média das diferenças (Ross, 2010).

$$t_{exp} = \frac{\bar{D}}{S_d} \sqrt{N_a} \quad (21)$$

3.2.3 Teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio

A concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos obtém-se representando graficamente um método em função do outro, sendo que o método mais preciso se coloca no eixo das abcissas, porque se considera que os erros associados ao eixo das abcissas são desprezáveis em relação aos erros associados ao eixo das ordenadas. Assim, em primeiro lugar, deve-se comparar as precisões dos dois métodos pela análise de variâncias (teste F). Estatisticamente considera-se que os métodos não apresentam diferenças significativas se Método 1 = Método 2. Para tal, as condições seguintes devem ser verificadas simultaneamente:

- ✓ Intervalo de confiança associado à ordenada na origem b ($b \pm s_b \times t$) conter o valor zero, sendo s_b o desvio-padrão da ordenada na origem, e t o valor tabelado para um dado nível de confiança e (N_a-2) graus de liberdade, sendo N_a o número de amostras ensaiadas.
- ✓ Intervalo de confiança associado ao declive m ($m \pm s_m \times t$) conter o valor um, sendo s_m o desvio-padrão do declive.

Como critério interno aceita-se uma variação de até 10 % para m . Ou seja, o seu intervalo de confiança deve incluir valores entre 0,9 e 1,1. Considerando a mesma variação para b , o limite de confiança deste deve-se encontrar entre -0,1 e 0,1.

4 Descrição Técnica

Neste capítulo descreve-se todo o trabalho desenvolvido ao longo do estágio, sendo este trabalho a continuação da tese realizada anteriormente (Duarte, 2016).

4.1 Validação de métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol

Em primeiro lugar avaliaram-se os métodos de ensaio referidos em 2.2.1, tendo-se validado os métodos GI e GB de acordo com a ISO 8466-1:1996 e o Guia RELACRE 13. Para tal cumpriram-se os critérios definidos para os testes relacionados com a reta de calibração (teste de homogeneidade de variâncias, teste de Mandel e análise de resíduos), determinaram-se os limiares analíticos (estatísticos e reais), e realizaram-se testes de robustez e ensaios de recuperação.

Para definir a concentração de PI das retas de calibração usou-se o critério interno do I&D, que considera que a concentração de PI deve ser igual à concentração do último padrão da reta (Amorim&Irmãos-g). Assim, para o método GI usou-se um PI de 11,0 ng/L. Já para o método GB estudou-se a sua implementação com PI de 5,5 ng/L, 10,0 ng/L e 20 ng/L.

4.1.1 Materiais, reagentes e equipamentos

Materiais

- Frascos de cromatografia de 20 mL (*vials*), *ILC*
- Frascos de 60 mL
- Cápsulas de 20 mm com septo de silicone, *ILC*
- Fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, *Supelco*
- Coluna apolar ZB-5 MS (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 25 µm e espessura de 25 µm) com fase estacionária de difenilpolidimetilsiloxano, *Restek*
- Macropipeta de 10 mL, *Socorex*
- Micropipeta de 200 µL, *Gilson, Pipetman*
- Pontas para macropipetas de 10 mL, *ILC*
- Pontas para micropipetas de 200 µL, *Gilson*
- Balão volumétrico 100 ± 0,1 mL
- Balão volumétrico 2000 ± 0,6 mL

- Proveta 250 ± 1,0 mL
- Proveta 500 ± 5,0 mL
- Balões volumétricos de 500 ± 50 mL
- Papel de alumínio

Reagentes

- Álcool etílico 96% (v/v)
- Água desionizada
- 2,4,6-Tricloroanisol (TCA), *Sigma Aldrich*
- 2,3,6-Tricloroanisol (2,3,6-TCA), *Sigma Aldrich*
- 2,4,6-Tricloroanisol deuterado (D5 TCA), *Sigma Aldrich*
- Hélio (*He*), gás de arraste, B50, 200 bar, pureza de 99,999%, *Air Liquid*
- Azoto (*N*₂), gás de limpeza, B50, 200 bar, pureza de 99,999%, *Air Liquid*
- Cloreto de sódio

Equipamento

- Balança analítica *Kern*, modelo ABS120-4
- Cromatógrafos gasosos, modelo CP3800 *Varian*, com auto-analisador *Combipal*, e detetor de captura de eletrões (GC-ECD)
- Cromatógrafo gasoso, modelo 450, com auto-analisador *Combipal CTC Analytics* e detetor de captura de eletrões (GC-ECD)
- Cromatógrafos gasosos, modelo *Scion 436GC* com auto-analisador *Bruker* e detetor de captura de eletrões (GC-ECD)
- Cromatógrafo gasoso *Shimadzu*, modelo QP 2010 *Plus*, com auto-analisador *Gerstel MPS2*, e detetor de espectroscopia de massa (GC-MS)

O auto-analisador dos cromatógrafos gasosos utiliza o *software Cycle Composer PAL 1*, os ECD's usam o *software Compass CDS* e o MS usa o *software GC MS Solution Shimadzu*.

4.1.2. Preparação de soluções-padrão

Preparação de Padrões Internos

Os PI não se encontram presentes nas amostras de rotina que entram diariamente no I&D, pelo que funcionam como uma referência na determinação da

quantidade de TCA presente em cada uma dessas amostras, devendo possuir características idênticas ao analito. No entanto, devem deter alguma propriedade que os diferencie do TCA, de modo aos dois compostos apresentarem tempos de retenção diferentes. Como a coluna cromatográfica é apolar, a eluição geralmente ocorre por ordem crescente dos pontos de ebulição.

Caso se utilize o detetor ECD recorre-se ao 2,3,6-TCA, uma vez que este composto e o TCA possuem eletronegatividades diferentes (devido ao facto de possuírem um grupo cloro em posições desiguais). No detetor MS ocorre ionização da molécula, seguida da análise das massas de iões produzidos. O cromatograma resultante é dado pela abundância relativa dos fragmentos em função da razão entre a massa e a carga destes (m/z) (Niessen, 2001). Por essa razão, o detetor MS utiliza, em alternativa ao 2,3,6-TCA, o D₅ TCA como PI.

Os PI preparam-se diariamente a partir de uma solução de 2,3,6-TCA ou de D₅ TCA de 100 µg/L. Estas soluções são armazenadas no frigorífico a 4°C e substituídas a cada 4 meses (Amorim&Irmãos-g).

Para o método GI usou-se um PI de 11,0 ng/L, enquanto para o método GB utilizaram-se PI com concentrações diferentes, nomeadamente de 5,5 ng/L, 10,0 ng/L e 20,0 ng/L. Assim, para o método GI foram pipetados 1,1 mL da solução de 2,3,6-TCA de 100 µg/L, e para o método GB foram pipetados 0,55 mL, 1,0 mL e 2,0 mL da solução acima referida. Seguidamente foi completado o volume até 100 mL com álcool etílico 96% (v/v).

No caso do método REF utiliza-se um PI de 20,0 ng/L (uma das concentrações de PI adotadas para o método GB). Como existem nove cromatógrafos com detetor ECD no laboratório, e apenas um com o detetor MS, a quantidade necessária de PI de 2,3,6-TCA é bastante superior à de PI de D₅ TCA. Assim, no caso do 2,3,6-TCA pipeta-se 5 mL desta solução, e dilui-se com álcool etílico 96% (v/v) até perfazer um volume de 250 mL. Para o D₅ TCA pipeta-se 2 mL e dilui-se num balão de 100 mL com álcool etílico 96% (v/v). Deste modo, em ambos os casos obtém-se um PI com concentração igual a 20,0 ng/L.

Preparação dos Padrões da Retas de Calibração

A ISO 8466-1 recomenda que a reta de calibração possua pelo menos cinco níveis de concentração, com pontos equidistantes, e cada nível constituído por três replicados, exceto os extremos, os quais necessitam de dez replicados devido ao teste de homogeneidade de variâncias. Este teste deve ser realizado em condições de

precisão intermédia, tendo-se variado o operador e/ou o dia de preparação dos replicados.

Cada padrão possui cerca de 2 g de cloreto de sódio, 10 mL de solução hidroalcoólica 12% (v/v), 100 µL de PI e um dado volume de TCA para obter a concentração desejada (Anexo I).

A presença de cloreto de sódio (*NaCl*) provoca a diminuição da solubilidade do TCA na solução. Consequentemente, como o TCA é volátil desloca-se para o *headspace*, ficando disponível para ser adsorvido à fibra, permitindo a sua microextração em fase sólida (Silva, 2007).

Para concentrações entre 0,5 e 2,0 ng/L usa-se uma solução de TCA de 100 ng/L, enquanto para as restantes utiliza-se uma solução de TCA de 1 µg/L (Amorim&Irmãos-g).

As concentrações definidas para as retas de calibração dizem respeito ao volume total existente nos tubos de cromatografia (10 mL + respetivo volume de TCA). No entanto, é necessário conhecer a concentração respetiva para 10 mL (concentração corrigida), que se introduz no *software* do cromatógrafo, utilizando para tal relações de proporcionalidade direta. Estas concentrações corrigidas, assim como o volume de analito que é necessário adicionar para todos os padrões da reta, tanto para o método GB como para o método GI, apresentam-se no Anexo I.

Preparação de Padrões de Controlo

Quando se preparam os padrões das retas de calibração é necessário preparar também três PC, que permitem confirmar a veracidade dos resultados. O seu procedimento de preparação é análogo ao dos padrões das retas. Usam-se três PC: dois deles possuem concentração igual aos extremos da reta, enquanto o terceiro PC corresponde a um padrão situado no centro da gama de trabalho, tendo sido definido que este seria de 2,0 ng/L (Amorim&Irmãos-g). Como estes padrões têm uma concentração conhecida permitem confirmar a veracidade do método e dos resultados.

4.1.3 Quantificação de TCA por SPME-GC-ECD

Em primeiro lugar colocam-se os frascos de cromatografia no suporte do auto-analisador do cromatógrafo e preenche-se no *software* respetivo a sequência de amostras a ser analisada (Figura 6).



Figura 6 - Equipamento de quantificação de TCA por SPME-GC-ECD.

Em seguida, o braço robótico do auto-analisador coloca a amostra no incubador para ser submetida a um pré-aquecimento durante dois minutos (Figura 7a) (Amorim&Irmãos-g). Com este período de incubação o TCA volatiliza e desloca-se para o *headspace* devido à ação do calor, da agitação e do *NaCl*. Posteriormente, a fibra SPME é exposta no *headspace* do tubo durante 8 minutos a 50 °C com agitação.

Após ocorrer a adsorção do TCA já volatilizado, a fibra SPME é introduzida no injetor, que se encontra a 270 °C, permanecendo nesse local durante 4 minutos, em modo *splitless*, sendo fechada a válvula ao fim de 2 minutos (Amorim&Irmãos-g). Devido à temperatura elevada do injetor ocorre a dessorção de todos os voláteis, incluindo o TCA (Figura 7b).

O gás de arraste (*He*) arrasta a amostra ao longo da coluna cromatográfica, até ao detetor.



Figura 7 - (a) Período de incubação da amostra em SPME; (b) Dessorção do TCA da fibra SPME para o injetor do GC-ECD.

Conhecendo previamente o tempo de retenção dos compostos de interesse (TCA e PI) é possível identificar os picos correspondentes no cromatograma. A reta de calibração é obtida representando graficamente a razão das áreas de TCA e PI, em

função da razão das concentrações de TCA e PI, usando a média dos valores dos triplicados de cada nível de concentração. Uma vez definida a reta de calibração, a integração dos picos de TCA e do PI permitem obter a área correspondente a cada um deles e, conseqüentemente, a concentração de TCA que a amostra possui pela equação da reta de calibração.

4.1.4 Testes de Robustez / Testes de Youden

Realizaram-se testes de robustez para o método GB com PI de 5,5 ng/L e de 20,0 ng/L, tendo-se efetuado variações superiores e inferiores aos valores nominais (Tabela 2).

Na Tabela 3 apresentam-se as combinações dos fatores para cada ensaio.

Tabela 2 - Fatores, valores nominais e variações dos testes de robustez.

| Fator | Nominal | | Variação inferior | | Variação superior |
|-----------------------------|------------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|
| | Quantidade de NaCl (g) | A | ± 2 | a | 1 |
| Volume macerado (mL) | B | 10 | b | 9,8 | 10,2 |
| Volume PI (µL) | C | 100 | c | 95 | 105 |
| Teor alcoólico (%) | D | 12 | d | 11 | 13 |
| Diferentes operadores | E | | e | | |
| Temperatura do injetor (°C) | F | 270 | f | 250 | 290 |
| Data diferente de análise | G | | g | | |

Tabela 3 - Combinação de valores nominais e variações para testes de robustez.

| Fator | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A ou a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B ou b | B | B | b | b | B | B | b | b |
| C ou c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D ou d | D | D | d | d | d | d | D | D |
| E ou e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F ou F | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G ou g | G | g | g | G | g | G | G | g |

4.2 Comparação de métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol com método de Referência

Os métodos GI e GB foram sujeitos a testes comparativos com o método REF.

4.2.1 Materiais, reagentes e equipamento

Ver 5.1.1.

4.2.2 Metodologia

O objetivo da comparação de métodos foi estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos métodos REF e GB/GI, para comparar a exatidão do método desenvolvido (método GB/GI) em relação ao método usado por rotina no I&D (método REF). Para tal efetuaram-se análises das mesmas amostras pelos dois métodos. No caso do método GB com PI de 20,0 ng/L, a comparação foi facilitada pelo facto de o PI usado no método REF ser também de 20,0 ng/L. Assim, neste caso, apenas se reprocessou os resultados das amostras diárias já analisadas pelo método REF.

A análise estatística dos resultados foi efetuada pelo teste *t* das diferenças e pelo teste de regressão linear entre os dois métodos, sendo o primeiro usado para avaliar as diferentes gamas em que se divide a gama de trabalho total, e o segundo aplicado para avaliar a totalidade da gama de trabalho (Guia RELACRE 13, 2000). O teste *t* das médias não foi aplicado, uma vez que se efetuou apenas um replicado de cada amostra para ser analisado por cada um dos métodos. No caso do método GI a gama de trabalho dividiu-se em <0,5 ng/L; 0,5-2,0 ng/L; 2,0-5,5 ng/L e 5,5-11,0 ng/L, de modo às concentrações críticas de aceitação/rejeição de lotes apresentarem menores intervalos de concentração. Já para o método GB dividiu-se a gama de trabalho em <0,5 ng/L; 0,5-2,0 ng/L; 2,0-3,5 ng/L e 3,5-5,5 ng/L. Como a reta de calibração deste método é mais curta, os intervalos de concentração definidos são mais homogéneos.

Na presente tese recorreu-se ao *software Minitab* para efetuar os cálculos relativos aos testes comparativos.

Como resultado do teste *t* das diferenças obtém-se o *valor-p*, dado pela equação (22), e que indica o nível de significância em relação a um dado alfa (α). Neste teste considerou-se um nível de significância de 95 %, sendo α igual a 0,05.

$$\text{valor-p} = \frac{1}{\sqrt{n-1} \times B\left(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\right)} \int_{-t}^t \left(1 + \frac{x^2}{n-1}\right)^{-\frac{n}{2}} dx \quad (22)$$

Quanto mais próximo de zero se encontrar o *valor-p*, maior a probabilidade de significância (Elliot *et al.*, 2006). Se o *valor-p* for superior a α não se pode rejeitar H_0 que, neste caso, significa que os métodos são estatisticamente idênticos.

5 Resultados e Discussão

No presente capítulo apresentam-se os resultados dos dois métodos estudados, o método GI e o método GB, assim como as ações de correção e/ou melhoria implementadas/planeadas para corrigir as não conformidades detetadas na auditoria. Neste capítulo sempre que for referido GC-ECD, na verdade estará a ser indicada toda a metodologia inerente, SPME-GC-ECD.

5.1 Método Gama Intermédia

5.1.1 Validação do método Gama Intermédia para análise de 2,4,6-tricloroanisol

Na Tabela 4 indicam-se os valores para os declives (m), ordenadas na origem (b), coeficientes de correlação (r) e sensibilidades (e) das retas de calibração obtidas nos vários GC-ECD. Como as retas são lineares, a sensibilidade é igual ao declive. Na Tabela 5 apresentam-se os parâmetros de validação das retas, encontrando-se com asterisco aqueles que não cumprem as especificações definidas no Capítulo 3.

Tabela 4 - Parâmetros das retas de calibração com o método GI para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | $m=e$ | b | r |
|--------|-------|-------|--------|
| 1 | 2,70 | 0,00 | 0,9999 |
| 3 | 1,99 | 0,01 | 0,9999 |
| 6 | 2,61 | -0,09 | 0,9998 |
| 7 | 2,39 | 0,07 | 0,9989 |
| 8 | 2,44 | 0,45 | 0,9998 |

Tabela 5 - Parâmetros de validação das retas de calibração com o método GI para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Gama de trabalho | | Linearidade | | Limiões analíticos | | | | |
|--------|-----------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------|----------------|----------------------------------|----------------|
| | $(PG \leq F_{(n-1); 99\%})$ | | Teste de Mandel | | Análise de Resíduos* | Testes estatísticos | | Valores reais ($CV \leq 10\%$) | |
| | PG | $F_{n-1=9; 99\%}$ | VT | $F_{1, n-3, 95\%}$ | | LQ (ng/L) | LD (ng/L) | LQ (ng/L) | LD (ng/L) |
| 1 | 4,04 | | 6,30 | | 3,44 | 0,5 | 0,2 | | |
| 3 | 5,96* | | 0,72 | | 0,67 | 0,9 | 0,3 | | |
| 6 | 4,75 | 5,35 | 0,52 | 6,61 | 73,77* | 0,9 | 0,3 | 0,5 | 0,2 |
| 7 | 5,88* | | 0,01 | | -0,56 | 0,8 | 0,3 | | |
| 8 | 6,88* | | 3,99 | | 1,15 | 0,9 | 0,3 | | |

*Critério interno: $-5 \leq \sum \text{resíduos} \leq 5$

Dos GC-ECD analisados, a gama de trabalho estava bem ajustada (teste de homogeneidade de variâncias) apenas nos GC-ECD 1 e 6, pelo que nos restantes GC-ECD esta teria de ser reduzida ou, em alternativa, ser utilizada uma função de calibração não-linear. Quanto à linearidade, verificou-se que todos os GC-ECD cumpriam o teste de Mandel, e apenas o GC-ECD6 não cumpria o critério interno definido para o somatório dos resíduos (Tabela 5). No entanto, como o teste de Mandel constitui o teste recomendado pela ISO 8466-1 para avaliar a linearidade, e este teste cumpriu em todos os GC-ECD, consideraram-se todas as retas apresentadas como lineares.

Com o método REF, o I&D obtém como *LD* e *LQ* os valores 0,2 ng/L e 0,5 ng/L, respetivamente, sendo estes os valores para os limiares que se espera obter com o novo método. Pelos testes estatísticos apresentados em 3.2., os limiares para o método GI são superiores aos do método atual. Na prática, os limiares podem apresentar valores inferiores, caso dez replicados em precisão intermédia apresentem $CV \leq 10\%$. Assim, realizou-se essa análise para os valores estatísticos obtidos e para os valores reais pretendidos. Como em ambos os casos o *CV* foi inferior a 10 %, conclui-se que os *LD* e *LQ* são iguais a 0,2 ng/L e 0,5 ng/L, respetivamente, em todos os GC-ECD.

5.1.2 Comparação do método Gama Intermédia com método de Referência

Após a validação das retas de calibração com o método GI, prosseguiu-se com testes comparativos entre este método e o método REF. O teste da regressão linear apresenta-se na Tabela 6, encontrando-se com asterisco os parâmetros que não cumprem os critérios definidos em 3.2.3. As retas resultantes deste teste apresentam declive positivo, com inclinação de cerca de 45°. Um exemplo da representação gráfica obtida para o teste de regressão linear encontra-se na Figura 8.

Tabela 6 - Resultados do teste de regressão linear entre métodos GI e REF para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | N.º amostras (para cada método) | Teste de Regressão Linear | | |
|--------|---------------------------------------|---------------------------|-------------|----------|
| | | <i>m</i> | <i>b</i> | <i>r</i> |
| 1 | 94 | 0,86±0,08 | -0,44±0,12* | 0,9813 |
| 3 | 36 | 1,05±0,09 | 0,19±0,09 | 0,9723 |
| 7 | 119 | 0,72±0,07* | 0,29±0,11* | 0,9690 |
| 8 | 92 | 1,29±0,09* | -0,37±0,07* | 0,9829 |
| Global | 341 | 0,95±0,10 | 0,11±0,11 | 0,9281 |

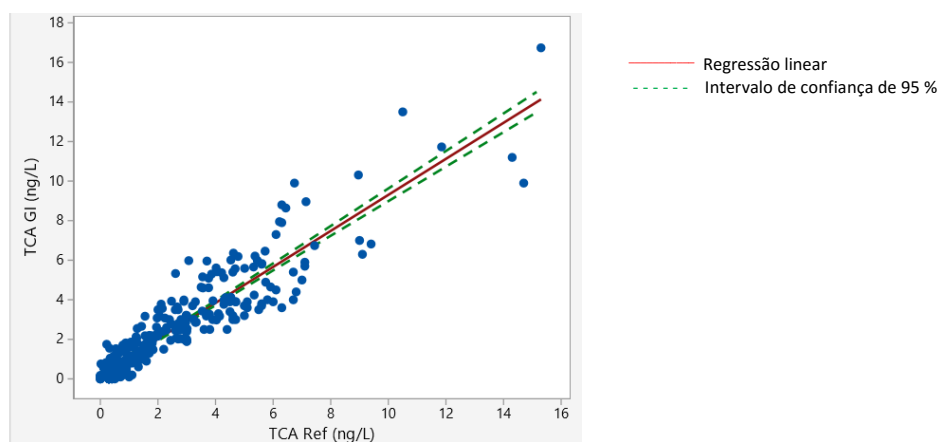


Figura 8 - Representação gráfica do teste de regressão linear para a globalidade dos resultados obtidos para o método GI (*Minitab*).

O teste de hipótese encontra-se na Tabela 7, estando a negrito as gamas de trabalho que confirmam H_0 . Apresentam-se também na tabela referida as médias, os desvios-padrão, e a concentração de TCA mínima (Min) e máxima (Máx) para cada gama de trabalho de cada GC-ECD.

Tabela 7 - Resultados* do teste t das diferenças entre métodos GI e REF para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Gama (ng/L) | N | Método REF (ng/L) | | | | Método GI (ng/L) | | | | p |
|--------|-------------|-----|-------------------|-----------------|-----|------|------------------|----------------|-----|-------|---------------|
| | | | \bar{x}_{REF} | \bar{s}_{REF} | Min | Máx | \bar{x}_{GI} | \bar{s}_{GI} | Min | Máx | |
| 1 | <0,5 | 36 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 0,7 | 0,3 | 0,2 | 1,8 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 17 | 1,0 | 0,4 | 0,5 | 1,6 | 1,8 | 0,6 | 0,9 | 3,2 | <0,0001 |
| | 2,0-5,0 | 27 | 3,3 | 0,9 | 2,0 | 4,8 | 4,7 | 1,1 | 2,6 | 6,4 | <0,0001 |
| | 5,0-11,0 | 13 | 6,6 | 1,6 | 5,0 | 10,5 | 7,8 | 2,4 | 5,6 | >11,0 | 0,0021 |
| 3 | 0,5-2,0 | 25 | 0,9 | 0,3 | 0,5 | 1,8 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 1,5 | <0,0001 |
| | 2,0-5,0 | 8 | 3,2 | 0,8 | 2,4 | 4,5 | 2,8 | 0,9 | 2,0 | 4,1 | 0,0292 |
| 7 | <0,5 | 22 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,0 | 0,8 | 0,0007 |
| | 0,5-2,0 | 27 | 1,1 | 0,4 | 0,5 | 1,8 | 1,2 | 0,5 | 0,5 | 2,2 | 0,5138 |
| | 2,0-5,0 | 44 | 3,5 | 0,8 | 2,0 | 4,7 | 2,9 | 0,7 | 1,5 | 5,4 | <0,0001 |
| | 5,0-11,0 | 23 | 6,4 | 1,3 | 5,0 | 9,4 | 4,6 | 1,1 | 3,2 | 7,0 | <0,0001 |
| 8 | <0,5 | 37 | 0,3 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,7 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 41 | 1,0 | 0,4 | 0,5 | 1,8 | 0,8 | 0,6 | 0,0 | 2,2 | 0,0003 |
| | 2,0-5,0 | 11 | 2,6 | 0,5 | 1,7 | 3,3 | 3,2 | 0,5 | 2,2 | 3,9 | 0,0009 |
| Global | <0,5 | 98 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,0 | 1,8 | 0,0006 |
| | 0,5-2,0 | 110 | 1,0 | 0,4 | 0,5 | 1,8 | 1,0 | 0,6 | 0,0 | 3,2 | 0,7012 |
| | 2,0-5,0 | 90 | 3,3 | 0,9 | 1,7 | 4,8 | 3,5 | 1,2 | 1,5 | 6,4 | 0,1297 |
| | 5,0-11,0 | 40 | 6,4 | 1,3 | 5,0 | 10,5 | 5,9 | 2,2 | 3,2 | >11,0 | 0,0796 |

*N - número de amostras para cada método; \bar{x}_i - média para método i ; s_i - desvio-padrão para método i ; p - valor- p (teste t das diferenças).

Pelo teste da regressão linear, apenas o GC-ECD3 cumpre o critério interno associado à ordenada na origem. Quanto ao critério interno associado ao declive, este cumpre-se nos GC-ECD 1 e 3. Já para o teste de hipótese nenhum dos GC-ECD apresenta semelhanças estatísticas entre os métodos, para todas as gamas de trabalho. Globalmente, estas diferenças acabam por ser anuladas, razão pela qual os critérios associados aos parâmetros da reta são cumpridos (teste da regressão linear), e H_0 é confirmada para todas as gamas, exceto para <0,5 ng/L (teste de hipótese). Uma vez que as diferenças entre o método em estudo e o método REF são significativas, e como a gama de trabalho não se encontra bem ajustada para a maioria dos GC-ECD, decidiu-se interromper os ensaios com este método, e iniciou-se a implementação do método GB nos diferentes GC-ECD.

5.2 Método Gama Baixa

Inicialmente implementou-se este método com PI de 5,5 ng/L, uma vez que esta concentração corresponde à concentração do último ponto da reta de calibração. No entanto, estudou-se a possibilidade de utilizar outras concentrações de PI para este método, tendo este sido testado com PI de 10,0 ng/L e de 20,0 ng/L.

5.2.1 Validação do método Gama Baixa para análise de 2,4,6-tricloroanisol

Retas de calibração e limiares analíticos

Na Tabela 8 apresentam-se os parâmetros associados às retas de calibração para os vários GC-ECD existentes no I&D, para as três concentrações de PI estudadas. Os critérios de validação destas retas encontram-se na Tabela 9, estando com asterisco os parâmetros que não cumprem as especificações definidas no Capítulo 3.

Tabela 8 - Parâmetros das retas de calibração com o método GB para diferentes GC-ECD.

| PI (ng/L) | GC-ECD | $m=e$ | b | r | |
|-----------|--------|-------|-------|--------|--------|
| 5,5 | 1 | 1,10 | -0,03 | 0,9999 | |
| | 3 | 2,86 | -0,09 | 1,0000 | |
| | 4 | 0,23 | 0,14 | 0,9998 | |
| | 6 | 2,16 | -0,15 | 0,9999 | |
| | 7 | 1,32 | 0,16 | 0,9999 | |
| | 8 | 5,25 | 1,37 | 1,0000 | |
| | 9 | 2,01 | -0,07 | 0,9991 | |
| | 10,0 | 3 | 1,09 | 0,12 | 0,9999 |
| | 20,0 | 1 | 1,54 | -0,02 | 0,9999 |
| 3 | | 1,64 | 0,00 | 0,9999 | |
| 4 | | 0,63 | 0,02 | 0,9989 | |
| 6 | | 1,87 | -0,02 | 0,9999 | |
| 7 | | 1,47 | 0,00 | 0,9999 | |
| 8 | | 2,02 | 0,15 | 1,0000 | |
| 9 | | 0,68 | 0,03 | 0,9999 | |

Tabela 9 - Parâmetros de validação das retas de calibração com o método GB com PI de 5,5 ng/L para diferentes GC-ECD.

| PI (ng/L) | GC - ECD | Gama de trabalho | | Linearidade | | | Limiares analíticos | | | |
|--------------|----------------|-----------------------------|------------------|---|--------------------|----------------------|---------------------|--------------|------------------------|--------------|
| | | $(PG \leq F_{(n-1); 99\%})$ | | Teste de Mandel $(VT \leq F_{1, n-3, 95\%})$ | | Análise de Resíduos* | Testes estatísticos | | Valores reais (CV≤10%) | |
| | | PG | $F_{n-1=9;99\%}$ | VT | $F_{1,n-3=8,95\%}$ | | LQ (ng/L) | LD (ng/L) | LQ (ng/L) | LD (ng/L) |
| 5,5 | 1 | 1,23 | | 2,02 | | 5,19 | 0,3 | 0,1 | | |
| | 3 | 1,14 | | 3,70 | | 4,12 | 0,4 | 0,1 | | |
| | 4 | 3,03 | | 5,20 | | 0,17 | 0,5 | 0,2 | | |
| | 6 | 3,75 | 5,35 | 0,45 | 5,32 | 12,49* | 0,4 | 0,1 | 0,5 | 0,2 |
| | 7 | 0,95 | | 0,00 | | -0,57 | 0,6 | 0,2 | | |
| | 8 | 3,84 | | 0,38 | | 0,16 | 0,4 | 0,1 | | |
| | 9 | 3,45 | | 0,32 | | 1,02 | 0,3 | 0,1 | | |
| 10,0 | 3 | 2,63 | 5,35 | 4,48 | 5,32 | -2,46 | 0,7 | 0,2 | 0,5 | 0,2 |
| 20,0 | 1 | 1,11 | | 0,28 | | 2,24 | 0,5 | 0,2 | | |
| | 3 | 4,49 | | 0,42 | | 3,39 | 0,5 | 0,2 | | |
| | 4 | 0,02 | | 2,37 | | -5,46 | 0,4 | 0,1 | | |
| | 6 | 2,66 | 5,35 | 5,09 | 5,32 | 3,78 | 0,2 | 0,1 | 0,5 | 0,2 |
| | 7 | 2,52 | | 0,02 | | -1,55 | 0,2 | 0,1 | | |
| | 8 | 3,05 | | 2,01 | | 0,22 | 0,4 | 0,1 | | |
| | 9 | 1,99 | | 1,02 | | 0,43 | 0,5 | 0,2 | | |

*Critério interno: $-5 \leq \sum \text{resíduos} \leq 5$

Para todos os PI testados, as retas de calibração do método GB cumprem o teste de homogeneidade de variâncias e o teste de Mandel. No entanto, a reta do GC-ECD6 com PI de 5,5 ng/L não apresenta o somatório dos resíduos próximo do zero, pela mesma razão apresentada para o GC-ECD6 com método GI. Mas consideram-se as retas lineares porque estas satisfazem o teste recomendado pela ISO 8466-1 (Teste de Mandel). O GC-ECD1 com PI de 5,5 ng/L e o GC-ECD4 com PI de 20,0 ng/L possuem o somatório dos resíduos próximo do critério interno, razão pela qual se aceitou os resultados. Para os valores reais dos limiares analíticos procedeu-se como mencionado em 5.1.1. Apesar dos valores estatísticos serem superiores ou inferiores aos valores pretendidos (Tabela 9), foi possível comprovar que LD é 0,2 ng/L e LQ é 0,5 ng/L.

Testes de Robustez / Testes de Youden

Nas Tabelas 10 a 13 apresentam-se os resultados deste teste, com o valor do efeito que cada fator possui no método, bem como os fatores com efeito significativo de acordo com o limite de confiança (encontrando-se estes com asterisco).

Tabela 10 - Resultados dos testes de robustez com variação inferior para método GB com PI de 5,5 ng/L.

| Fator | GC-ECD1 | | GC-ECD3 | | GC-ECD7 | | GC-ECD8 | |
|----------------------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ |
| A-NaCl (g) | 0,3 | -0,3 a 0,9 | -0,1 | -0,2 a 0,0 | -0,1 | -0,4 a 0,2 | -0,6 | -1,0 a -0,1* |
| B-Macerado (mL) | 0,7 | 0,1 a 1,3* | 0,0 | -0,1 a 0,1 | 0,1 | -0,2 a 0,4 | 0,3 | -0,2 a 0,8 |
| C-PI (µL) | -0,5 | -1,1 a 0,0* | 0,0 | -0,1 a 0,1 | -0,3 | -0,6 a 0,0 | -0,2 | -0,7 a 0,3 |
| D-Teor alcoólico (%) | 0,1 | -1,1 a 0,1 | 0,1 | 0,0 a 0,2* | 0,4 | 0,1 a 0,7* | 0,1 | -0,4 a 0,6 |
| E-Operador | 0,0 | -0,4 a 0,7 | 0,1 | -0,1 a 0,2 | -0,1 | -0,3 a 0,3 | 0,3 | -0,2 a 0,7 |
| F-T(°C) do injetor | 0,1 | -0,5 a 0,7 | 0,0 | -0,1 a 0,1 | -0,1 | -0,4 a 0,2 | 0,2 | -0,6 a 0,4 |
| G-Análise (dias) | 0,1 | -0,5 a 0,7 | -0,1 | -0,2 a 0,0 | 0,1 | -0,2 a 0,4 | 0,6 | 0,1 a 1,1* |

Tabela 11 - Resultados dos testes de robustez com variação superior para método GB com PI de 5,5 ng/L.

| Fator | GC-ECD1 | | GC-ECD3 | | GC-ECD7 | | GC-ECD8 | |
|----------------------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ |
| A-NaCl (g) | -0,2 | -1,9 a 1,5 | 0,1 | -0,1 a 0,3 | -0,1 | -0,5 a 0,3 | 0,1 | -0,3 a 0,4 |
| B-Macerado (mL) | 0,0 | -1,7 a 1,7 | 0,0 | -0,2 a 0,3 | 0,0 | -0,4 a 0,4 | 0,0 | -0,4 a 0,3 |
| C-PI (µL) | -0,1 | -1,8 a 1,6 | 0,1 | -0,2 a 0,3 | 0,4 | 0,0 a 0,8 | 0,0 | -0,4 a 0,3 |
| D-Teor alcoólico (%) | 2,0 | 0,3 a 3,7* | 0,1 | -0,2 a 0,3 | -0,2 | -0,6 a 0,2 | -1,2 | -1,5 a -0,9* |
| E-Operador | 0,4 | -1,3 a 2,0 | 0,3 | 0,0 a 0,5* | 0,5 | 0,1 a 0,9* | 0,4 | 0,1 a 0,7* |
| F-T(°C) do injetor | 0,0 | -1,6 a 1,7 | 0,2 | -0,1 a 0,4 | -0,3 | -0,7 a 0,1 | -0,3 | -0,6 a 0,0 |
| G-Análise (dias) | -0,2 | -1,8 a 1,5 | -0,1 | -0,3 a 0,1 | -0,1 | -0,5 a 0,3 | 0,0 | -0,3 a 0,3 |

Tabela 12 - Resultados dos testes de robustez com variação inferior para método GB com PI de 20,0 ng/L.

| Fator | GC-ECD1 | | GC-ECD3 | | GC-ECD6 | | GC-ECD7 | | GC-ECD8 | | GC-ECD9 | |
|----------------------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ |
| A-NaCl (g) | -0,3 | -0,8 a 0,3 | -0,4 | -0,6 a -0,1* | 0,0 | -0,2 a 0,2 | 0,4 | 0,0 a 0,7 | -0,7 | -1,0 a -0,3* | -0,7 | -1,7 a 0,4 |
| B-Macerado (mL) | 0,0 | -0,6 a 0,6 | -0,2 | -0,5 a 0,1 | -0,1 | -0,2 a 0,1 | 0,3 | -0,1 a 0,7 | -0,2 | -0,5 a 0,2 | 1,2 | 0,2 a 2,3* |
| C-PI (µL) | 0,0 | -0,6 a 0,6 | -0,2 | -0,5 a 0,1 | -0,1 | -0,3 a 0,1 | -0,4 | -0,7 a 0,0 | -0,1 | -0,4 a 0,3 | -1,1 | -2,1 a 0,0* |
| D-Teor alcoólico (%) | 0,3 | -0,3 a 0,8 | 0,2 | -0,1 a 0,5 | 0,2 | 0,0 a 0,3 | 0,3 | -0,1 a 0,6 | 0,2 | -0,1 a 0,6 | -0,3 | -1,3 a 0,8 |
| E-Operador | 0,0 | -0,6 a 0,6 | 0,3 | 0,1 a 0,6* | 0,2 | 0,0 a 0,4* | -0,1 | -0,5 a 0,3 | -0,1 | -0,4 a 0,3 | 0,8 | -0,2 a 1,8 |
| F-T(°C) injetor | -0,2 | -0,8 a 0,4 | -0,1 | -0,3 a 0,2 | 0,0 | -0,1 a 0,2 | -0,3 | -0,7 a 0,0 | -0,3 | -0,7 a 0,0 | -0,9 | -1,9 a 0,2 |
| G-Análise (dias) | 0,7 | 0,1 a 1,3* | -0,4 | -0,7 a -0,1* | 0,1 | -0,1 a 0,2 | 0,5 | 0,1 a 0,8* | 0,4 | 0,1 a 0,7* | -0,6 | -1,7 a 0,4 |

Tabela 13 - Resultados dos testes de robustez com variação superior para método GB com PI de 20,0 ng/L.

| Fator | GC-ECD1 | | GC-ECD3 | | GC-ECD6 | | GC-ECD7 | | GC-ECD8 | | GC-ECD9 | |
|----------------------|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|
| | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ | Efeito (ng/L) | $R_i \pm t\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)$ |
| A-NaCl (g) | -0,1 | -0,4 a 0,2 | 0,2 | 0,0 a 0,4* | -0,1 | -1,1 a 0,8 | 0,2 | 0,0 a 0,4* | -0,3 | -1,3 a 0,7 | -0,8 | -2,9 a 1,2 |
| B-Macerado (mL) | -0,1 | -0,4 a 0,2 | -0,1 | -0,3 a 0,1 | 0,3 | -0,6 a 1,3 | 0,1 | 0,0 a 0,3 | 0,1 | -0,9 a 1,1 | 0,4 | -1,7 a 2,4 |
| C-PI (µL) | 0,1 | -0,2 a 0,4 | 0,1 | -0,1 a 0,2 | 0,2 | -0,8 a 1,1 | 0,0 | -0,2 a 0,2 | 0,2 | -0,8 a 1,2 | 0,4 | -1,6 a 2,5 |
| D-Teor alcoólico (%) | 0,3 | 0,1 a 0,6* | -0,6 | -0,8 a -0,4* | -0,6 | -1,6 a 0,3 | -0,3 | -0,5 a -0,1* | -2,3 | -3,3 a -1,3* | -6,4 | -8,4 a -4,3* |
| E-Operador | 0,1 | -0,2 a 0,4 | 0,0 | -0,2 a 0,2 | 1,12 | 0,2 a 2,1* | -0,2 | -0,4 a 0,0 | 0,6 | -0,4 a 1,6 | -0,4 | -2,5 a 1,6 |
| F-T(°C) injetor | 0,1 | -0,2 a 0,4 | 0,2 | 0,0 a 0,4 | -0,6 | -1,6 a 0,3 | -0,1 | -0,3 a 0,2 | -0,5 | -1,5 a 0,5 | 2,4 | 0,4 a 4,5* |
| G-Análise (dias) | 0,0 | -0,3 a 0,3 | 0,2 | 0,0 a 0,4 | 0,4 | -0,6 a 1,3 | 0,1 | -0,1 a 0,3 | 0,1 | -0,9 a 1,1 | -0,4 | -2,4 a 1,7 |

As Tabelas 10 a 13 mostram que não existe uma tendência clara dos fatores que podem afetar os resultados, dependendo dessa influência do GC-ECD que se está a utilizar e da concentração de PI.

O teor alcoólico é um fator crucial porque com o seu aumento, aumenta a solubilidade do TCA e do PI na fase líquida, dificultando a volatilização dos mesmos. Adicionalmente, a quantidade de etanol existente no *headspace* também será maior, o que competirá com o TCA pela adsorção na fibra SPME. Este comportamento foi verificado nos testes de robustez realizados, independentemente do PI utilizado. Para variações superiores do teor alcoólico (13 %) verificou-se uma tendência geral para uma diminuição da concentração de TCA, variando na maioria dos GC-ECD entre -0,2 ng/L e -6,4 ng/L.

Os volumes de macerado e de PI constituem erros experimentais que irão continuamente afetar os resultados. Estes fatores são mais significativos para o PI de menor concentração.

O *NaCl* tem influência para variações inferiores, uma vez que ao diminuir a sua quantidade poderá não ocorrer a saturação da fase líquida, o que dificulta a volatilização do TCA e a sua deslocação para o *headspace* do frasco de cromatografia (fase de vapor). A sua presença em excesso não deveria apresentar alterações nos resultados, uma vez que a função do *NaCl* é saturar a solução, e tal acontece desde que a sua massa seja de, pelo menos, 2 g. No entanto, para os GC-ECD 3 e 7 com PI de 20,0 ng/L verifica-se que a presença de 3 g deste composto possui uma influência significativa na concentração de TCA. Tal pode ser justificado pela presença de impurezas no *NaCl*, nomeadamente halogéneos, que podem interferir com o GC-ECD.

A influência do operador verifica-se em alguns GC-ECD, o que permite realçar a sensibilidade do método.

Nos ensaios de robustez realizados prepararam-se os frascos de cromatografia no mesmo dia e analisaram-se os mesmos em dias diferentes. Logo, não é possível concluir se a variação nas concentrações de TCA devido ao tempo de análise é resultante da possível evaporação de TCA e/ou PI, ou à possibilidade do *NaCl* se dissolver em maior quantidade. Assim, torna-se importante realizar estudos para avaliar estas possibilidades, bem como a influência de retirar amostras do frigorífico a 4 °C e proceder à sua imediata pré-incubação a 50 °C (que se verifica diariamente no I&D quando amostras preparadas são analisadas apenas no dia seguinte).

Por fim, a temperatura do injetor só foi significativa em um GC-ECD, pelo que neste equipamento se deve evitar, no futuro, aumentar a temperatura do injetor acima dos 270 °C.

Nos ensaios realizados para variações inferiores verifica-se que os fatores críticos são o *NaCl* e o tempo de análise, para as duas concentrações de PI analisadas. A influência do *NaCl* pode ser justificada pela presença de impurezas, e pelo facto do dispensador presente no I&D para medição da massa de *NaCl* não constituir uma metodologia rigorosa. Um estudo interno concluiu que, recorrendo a este equipamento, os tubos de cromatografia podem conter entre 1,5 g e 2,5 g de *NaCl*. Adicionalmente também não é garantido que as 32 aberturas do suporte dos tubos possuam a mesma massa de *NaCl*. Logo, é importante para o I&D considerar a utilização de um *NaCl* com uma menor percentagem de impurezas, e o desenvolvimento de uma metodologia para medir *NaCl* de uma forma mais precisa, sem comprometer o tempo dispensado para esta tarefa.

Quanto ao tempo de análise, é imperativo avaliar qual dos factos mencionados acima constituem a razão da influência deste fator na concentração de TCA, já que é inevitável nas atividades diárias do I&D preparar amostras que serão analisadas apenas no dia seguinte.

Como o método GB com PI de 5,5 ng/L possui uma menor concentração de PI apresenta uma maior sensibilidade, o que se verifica pela maior influência do volume de macerado e de PI.

Para variações superiores verifica-se que o fator crítico é o teor alcoólico, já que diminui a área de PI, aumentando a concentração de TCA. Esta influência é mais intensa no método GB com PI de 20,0 ng/L. No entanto, como o método GB com PI de 5,5 ng/L é afetado por vários fatores a influência do PI pode acabar por não ser tão notória. É de realçar que no GC-ECD1 a influência do teor alcoólico é o oposto do esperado, devendo ser analisada a razão para esta incoerência.

No GC-ECD9 a influência dos diversos fatores na concentração de TCA é muito mais elevada que nos restantes GC-ECD, o que permite concluir que o problema reside no cromatógrafo. Uma justificação pode ser o facto de este equipamento possuir o detetor mais antigo de todos os GC-ECD presentes no I&D.

Ensaio de recuperação

Para os ensaios de recuperação mediu-se a concentração de TCA inicial, e a concentração do TCA após fortificação, usando triplicados em ambos os casos. A concentração de fortificante usada foi de 1 ng/L. Na Tabela 14 indicam-se os resultados obtidos com o valor médio dos três ensaios.

Tabela 14 - Resultados dos testes de recuperação* efetuados com o método GB para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Método GB 5,5 ng/L | | | Método GB 20 ng/L | | |
|--------|----------------------|--------------------|---------|----------------------|--------------------|---------|
| | [TCA] inicial (ng/L) | [TCA] final (ng/L) | REC (%) | [TCA] inicial (ng/L) | [TCA] final (ng/L) | REC (%) |
| 1 | 2,86 | 3,81 | 95 | 3,27 | 4,17 | 90 |
| 3 | 1,24 | 2,11 | 87 | 2,47 | 3,42 | 95 |
| 4 | 0,27 | 1,23 | 95 | 0,08 | 0,93 | 85 |
| 6 | 2,67 | 3,57 | 90 | 2,37 | 3,30 | 93 |
| 7 | 1,09 | 2,08 | 99 | 2,37 | 3,31 | 93 |
| 8 | 1,28 | 2,16 | 89 | 3,36 | 4,27 | 91 |
| 9 | 2,67 | 3,01 | 94 | 3,00 | 3,94 | 94 |

*Critério interno: $85 \leq REC(\%) \leq 115$

Foram obtidas REC (%) entre 85 % e 115 % em todos os ensaios de recuperação efetuados. Logo, o método GB é considerado exato, independentemente da concentração de PI utilizada.

5.2.2 Comparação do método Gama Baixa com método de Referência

Após a validação das retas de calibração com o método GB, prosseguiu-se com testes comparativos entre este método e o método REF. Os parâmetros do teste de regressão linear para as variações do método de GB usando PI de diferentes concentrações encontram-se na Tabela 15, estando com asterisco os parâmetros que não cumprem os critérios definidos em 3.2.3.

Os resultados do teste de hipótese apresentam-se nas Tabelas 16 a 18, sendo que a negrito se realçam as gamas de trabalho que confirmam H_0 , ou seja, que asseguram que os métodos são idênticos.

Tabela 15 - Resultados do teste de regressão linear entre métodos GB e REF para diferentes GC-ECD.

| PI (ng/L) | GC-ECD | N.º amostras (para cada método) | Teste de Regressão Linear | | |
|-----------|--------|------------------------------------|---------------------------|-------------|----------|
| | | | <i>m</i> | <i>b</i> | <i>r</i> |
| 5,5 | 1 | 30 | 1,70±0,07* | -0,23±0,18 | 0,9768 |
| | 3 | 30 | 0,69±0,05* | -0,48±0,07* | 0,9718 |
| | 7 | 60 | 0,79±0,05* | -0,15±0,08 | 0,9883 |
| | 8 | 21 | 0,75±0,07* | -0,91±0,14* | 0,9720 |
| | Global | 141 | 0,89±0,07 | 0,10±0,14 | 0,8794 |
| 10,0 | 3 | 26 | 1,96±1,47 | -0,07±0,32 | 0,9499 |
| 20,0 | 1 | 48 | 0,85±0,05 | -0,01±0,04 | 0,9969 |
| | 3 | 105 | 0,91±0,03 | -0,12±0,03 | 0,9972 |
| | 6 | 50 | 1,09±0,07 | 0,06±0,07 | 0,9874 |
| | 8 | 50 | 1,12±0,02 | -0,11±0,03 | 0,9985 |
| | Global | 253 | 0,95±0,03 | 0,00±0,04 | 0,9778 |

Tabela 16 - Resultados* do teste *t* das diferenças entre métodos GB 5,5 ng/L e REF para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Gama (ng/L) | N | Método REF (ng/L) | | | | Método GB 5,5 (ng/L) | | | | <i>p</i> |
|--------|----------------|----|-------------------|-----------------|-----|-----|----------------------|----------------|-----|------|---------------|
| | | | \bar{x}_{REF} | \bar{s}_{REF} | Min | Máx | \bar{x}_{GB} | \bar{s}_{GB} | Min | Máx | |
| 1 | 0,5-2,0 | 12 | 0,8 | 0,4 | 0,5 | 1,9 | 1,1 | 0,7 | 0,6 | 2,9 | 0,0021 |
| | 2,0-3,5 | 11 | 2,6 | 0,4 | 2,1 | 3,2 | 4,2 | 0,9 | 3,2 | >5,5 | <0,0001 |
| 3 | <0,5 | 10 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 1,0 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 14 | 1,1 | 0,5 | 0,5 | 1,9 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 1,8 | 0,8383 |
| 6 | <0,5 | 11 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,5 | 0,0 | 0,4 | 0,5 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 20 | 1,3 | 0,4 | 0,5 | 1,9 | 1,2 | 0,4 | 0,6 | 2,0 | 0,0007 |
| | 2,0-3,5 | 16 | 2,7 | 0,5 | 2,0 | 3,3 | 2,2 | 0,5 | 2,0 | 3,3 | <0,0001 |
| | 3,5-5,5 | 10 | 4,2 | 0,4 | 3,8 | 4,8 | 3,6 | 0,4 | 3,0 | 4,2 | 0,0003 |
| 8 | 0,5-2,0 | 7 | 1,1 | 0,5 | 0,5 | 1,8 | 1,8 | 0,5 | 1,1 | 2,5 | <0,0001 |
| | 2,0-3,5 | 7 | 2,6 | 0,4 | 2,2 | 3,5 | 2,7 | 0,4 | 2,2 | 3,5 | 0,6314 |
| Global | <0,5 | 26 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 0,3 | 1,0 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 53 | 1,1 | 0,5 | 0,5 | 1,9 | 1,2 | 0,5 | 0,5 | 2,9 | 0,0223 |
| | 2,0-3,5 | 39 | 2,6 | 0,4 | 2,0 | 3,5 | 2,8 | 1,0 | 2,0 | >5,5 | 0,1169 |

*N - número de amostras para cada método; \bar{x}_i - média para método *i*; s_i - desvio-padrão para método *i*; *p*- valor-*p* (teste *t* das diferenças).

Tabela 17 - Resultados* do teste *t* das diferenças entre métodos GB 10,0 ng/L e REF para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Gama (ng/L) | N | Método REF (ng/L) | | | | Método GB 10,0 (ng/L) | | | | p |
|--------|-------------|----|-------------------|-----------------|-----|-----|-----------------------|----------------|-----|-----|---------------|
| | | | \bar{x}_{REF} | \bar{s}_{REF} | Min | Máx | \bar{x}_{GB} | \bar{s}_{GB} | Min | Máx | |
| 3 | <0,5 | 14 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,0 | 0,6 | 0,2009 |
| | 0,5-2,0 | 8 | 1,5 | 0,2 | 1,3 | 1,9 | 2,9 | 0,3 | 1,6 | 5,1 | 0,0205 |

*N - número de amostras para cada método; \bar{x}_i - média para método *i*; s_i - desvio-padrão para método *i*; *p*- valor-*p* (teste *t* das diferenças).

Tabela 18 - Resultados* do teste *t* das diferenças entre métodos GB 20,0 ng/L e REF para diferentes GC-ECD.

| GC-ECD | Gama (ng/L) | N | Método REF (ng/L) | | | | Método GB 20,0 (ng/L) | | | | p |
|--------|-------------|-----|-------------------|-----------------|-----|-----|-----------------------|----------------|-----|------|---------------|
| | | | \bar{x}_{REF} | \bar{s}_{REF} | Min | Máx | \bar{x}_{GB} | \bar{s}_{GB} | Min | Máx | |
| 1 | <0,5 | 9 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,8 | 0,8337 |
| | 0,5-2,0 | 22 | 1,1 | 0,4 | 0,5 | 2,0 | 1,3 | 0,5 | 0,8 | 2,6 | <0,0001 |
| | 2,0-3,5 | 9 | 2,3 | 0,3 | 2,0 | 3,0 | 2,7 | 0,3 | 2,4 | 3,3 | <0,0001 |
| | 3,5-5,5 | 9 | 5,3 | 0,8 | 3,7 | 5,5 | 5,3 | 0,8 | 4,2 | >5,5 | <0,0001 |
| 3 | <0,5 | 21 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,3 | 0,2 | 0,1 | 0,7 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 47 | 1,1 | 0,4 | 0,5 | 1,9 | 1,3 | 0,5 | 0,6 | 2,2 | 0,0055 |
| | 2,0-3,5 | 18 | 2,4 | 0,5 | 2,0 | 3,4 | 2,8 | 0,5 | 2,4 | 3,8 | 0,0172 |
| | 3,5-5,5 | 15 | 4,3 | 0,6 | 3,6 | 5,4 | 4,8 | 0,8 | 3,8 | >5,5 | 0,0772 |
| 6 | <0,5 | 10 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,3 | 0,5 | 0,3434 |
| | 0,5-2,0 | 20 | 0,8 | 0,2 | 0,5 | 1,7 | 0,8 | 0,2 | 0,4 | 1,2 | 0,0002 |
| | 2,0-3,5 | 11 | 2,4 | 0,4 | 2,0 | 3,3 | 2,0 | 0,4 | 1,6 | 2,7 | <0,0001 |
| | 3,5-5,5 | 9 | 4,3 | 0,6 | 3,5 | 5,4 | 3,9 | 0,6 | 3,1 | 5,1 | 0,0002 |
| 8 | <0,5 | 10 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,0013 |
| | 0,5-2,0 | 20 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 1,9 | 1,1 | 0,4 | 0,6 | 1,8 | 0,1625 |
| | 2,0-3,5 | 13 | 2,4 | 0,4 | 2,0 | 3,1 | 2,3 | 0,4 | 1,8 | 3,0 | <0,0001 |
| | 3,5-5,5 | 7 | 4,1 | 0,5 | 3,5 | 4,6 | 3,7 | 0,5 | 3,2 | 4,5 | <0,0001 |
| Global | <0,5 | 50 | 0,3 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,8 | <0,0001 |
| | 0,5-2,0 | 109 | 1,1 | 0,2 | 0,5 | 2,0 | 1,2 | 0,5 | 0,4 | 2,6 | <0,0001 |
| | 2,0-3,5 | 51 | 2,4 | 0,4 | 2,0 | 3,4 | 2,5 | 0,5 | 1,6 | 3,8 | 0,0700 |
| | 3,5-5,5 | 46 | 4,3 | 0,6 | 3,5 | 5,5 | 4,4 | 0,9 | 3,1 | >5,5 | 0,1382 |

*N - número de amostras para cada método; \bar{x}_i - média para método *i*; s_i - desvio-padrão para método *i*; *p*- valor-*p* (teste *t* das diferenças).

Pelo teste da regressão linear verifica-se que para o método GB com PI de 5,5 ng/L nenhum dos GC-ECD cumpre os dois critérios internos. Para PI igual a 20,0 ng/L, os critérios internos são cumpridos para todos os GC-ECD, assim como para o GC-ECD analisado com PI de 10,0 ng/L.

Pelo teste de hipótese verifica-se que nenhum dos GC-ECD apresenta semelhanças estatísticas entre os métodos, para todas as gamas de trabalho. Assim, de acordo com os testes estatísticos realizados, os métodos GB e REF apresentam diferenças na quantificação de TCA, independentemente da concentração de PI.

Inicialmente usou-se um GC-ECD para comparar o método GB com as diferentes concentrações de PI. Para tal efetuaram-se retas de calibração e testes comparativos. De acordo com os resultados decidiu-se descartar o PI de 10,0 ng/L porque apresentava melhorias no teste da regressão linear, mas não no teste *t* das diferenças. Assim, prosseguiu-se com a validação do método GB com o PI de 5,5 ng/L porque era a concentração definida como critério interno, e com o PI de 20,0 ng/L, uma vez que era a concentração que conduzia a melhores resultados.

Após se terminar a validação do método GB com as duas concentrações de PI selecionadas comparam-se os resultados obtidos. Avaliando a gama total de trabalho, apenas com PI de 20,0 ng/L se cumprem todos os critérios internos. Em relação às diferentes gamas consideradas (<0,5; 0,5-2,0; 2,0-3,5; 3,5-5,5 ng/L), o teste de hipótese apresenta um maior número de resultados que cumprem a H_0 com o PI de 20,0 ng/L. Aliás, tal pode ser verificado pelos valores das concentrações médias, mínimas e máximas de TCA obtidas para ambos os métodos em estudo, quando comparadas com as obtidas pelo método REF (Tabelas 16 a 18). Globalmente, para os dois PI, as diferenças que existem entre os métodos acabam por ser anuladas, com exceção da gama <0,5 ng/L.

Analisando os testes comparativos efetuados, assim como os ensaios de recuperação e os testes de robustez, conclui-se que o método GB é exato com ambos os PI, mas com o PI de 20,0 ng/L o método é mais robusto, razão pela qual constituiu o método selecionado para implementação futura no I&D. De acordo com os resultados, a variabilidade existente é devido principalmente às características de cada cromatógrafo, e não ao método utilizado. Estes resultados sugerem que se pode colocar amostras de forma indiferenciada nos cromatogramas.

5.3 Correção de não conformidades

Neste sub-capítulo indicam-se as ações de correção e/ou melhoria definidas para as não conformidades apresentadas em 2.3 (IPAC, 2010).

As restantes ações podem ser verificadas pelo plano de ações apresentado no Anexo II.

- **Lavagem e reutilização de material descartável, nomeadamente pontas das macropipetas**

A partir de maio de 2016, as pontas das macropipetas passaram a ser utilizadas apenas uma única vez sendo descartadas em seguida.

- **Inexistência de controlo efetivo do teor alcoólico das macerações em várias unidades industriais**

Uma das alternativas avaliadas foi o refratómetro, um instrumento ótico de utilização simples e com precisão significativa. Este equipamento necessita apenas de uma pequena amostra de solução e, usando a refração da luz ao passar por um prisma, permite obter a percentagem de álcool na solução (PCE). Em junho de 2016 foi obtido um refratómetro para o I&D. No entanto, este estava definido para uma temperatura de 20 °C, não havendo uma correção automática do teor alcoólico face à temperatura real a que era realizada a medição. Por essa razão, o I&D tem em curso a procura de refratómetros alternativos, que permitem fazer aquela correção.

O objetivo desta ação corretiva é avaliar a aplicabilidade deste equipamento e, caso esta seja positiva, obter um refratómetro para cada unidade industrial.

- **Existência de macerações em várias unidades industriais fora do intervalo de tempo estipulado para as mesmas (16h a 72h)**

A ISO 20752 recomenda que o tempo de maceração seja de 24 ± 2 h. Assim, é importante criar uma consciencialização nas diferentes unidades industriais sobre a importância de controlar devidamente o tempo de maceração. Para isso serão implementadas auditorias surpresa às unidades de forma a verificarem se este parâmetro está a ser cumprido.

- **Não existe rastreabilidade da preparação de padrões (solução-mãe para a reta de calibração e solução-mãe para os PC)**

A partir de junho de 2016, o I&D passou a usar lotes diferentes de TCA para a preparação das soluções-mãe necessárias para a preparação dos padrões de calibração e PC.

- **O laboratório não possuía Materiais de Referência Certificados (MRC)**

O I&D contactou as empresas *Sigma Aldrich* e a *LCG Standard*, de modo a verificar se uma delas produzia MRC para TCA diluído em etanol. No mercado apenas existe MRC para TCA diluído em metanol. No entanto, a *LCG Standard* irá produzir especificamente MRC para TCA diluído em etanol, para a A&I. A encomenda já foi efetuada e, após receção do MRC, será elaborado um plano para a sua utilização.

- **Os PC eram colocados em cartas de controlo de médias móveis**

Para o método REF foi adotado o seguinte procedimento para definir os limites das cartas de controlo:

$$\text{Limites} = \text{Concentração teórica do PC} \left(0,5; 2,0 \text{ ou } 20,0 \frac{\text{ng}}{\text{L}} \right) \pm 50 \% \quad (22)$$

Porém, com esta metodologia também se obtém um intervalo alargado para as cartas móveis. O método em estudo para implementação no I&D será mais preciso e exato que o atual. Portanto, o objetivo é avaliar a possibilidade de diminuir os limites das cartas de controlo até 20 % após a implementação do novo método:

$$\text{Limites} = \text{Concentração teórica do PC} \left(0,5; 2,0 \text{ ou } 5,5 \frac{\text{ng}}{\text{L}} \right) \pm 20 \% \quad (23)$$

Quanto à análise de tendências esta será realizada para os primeiros seis meses do ano e, caso não seja possível retirar conclusões, será diminuído este período para três meses ou, em caso que tal se justifique, para um mês.

- **O laboratório não usava nenhum branco da fibra de SPME entre injeções**

Seria impraticável para o I&D colocar um branco da fibra de SPME entre todas as injeções, uma vez que tal implicaria a redução para metade do número de amostras diárias sujeitas a análise.

A solução encontrada foi efetuar este branco no final de cada ciclo, e comparar a área de TCA deste branco (A_{br}), com a área de TCA obtida para o padrão de 0,5 ng/L ($A_{0,5}$) do mesmo ciclo de análise:

- ✓ Se $A_{br} < A_{0,5}$: confirma-se que fibra SPME não possui resíduos de TCA, logo, o ciclo de análise foi bem sucedido
- × Se $A_{br} > A_{0,5}$: todas as amostras analisadas nesse ciclo devem ser repetidas, e a fibra SPME deve ser substituída.

- **Não existiam limites de aceitação para as variações de áreas do PI**

Definiram-se limites para variação das áreas de PI, sendo estes dados por:

$$\text{Média das áreas de PI da reta de calibração} \pm 50\% \quad (24)$$

Os resultados obtidos com esta especificação deverão ser avaliados ao fim de 6 meses para eventualmente proceder à sua revisão.

- **Inexistência de registos que permitissem rastrear as tarefas executadas no laboratório**

Com o objetivo de rastrear todas as etapas relativas à análise de TCA, permitindo dessa forma perceber o que correu mal num determinado resultado que não está conforme, foram elaborados registos para preparação de soluções de TCA e de retas de calibração, para intervenções preventivas e curativas, para taxa de sucesso, para cartas de controlo, para informação relacionada com as macro e micropipetas (nomeadamente as datas da última e próxima calibração), de um manual de preparação de PC discriminando analista e soluções utilizadas, para verificação da conformidade dos resultados dos cromatógrafos em comparação com os resultados exportados para o computador central, do branco da fibra SPME, de anomalias/desvios em relação às condições normais de análise, de ensaios de recuperação, de teor alcoólico e da cota diária das unidades industriais para análise de TCA.

- **Por incompatibilidade de *software*, os computadores dos cromatógrafos não se encontravam ligados à internet, e não tinham instalados anti-vírus.**

As não conformidades relacionadas com proteção de dados a nível informático, e com *back-up* de ficheiros, serão analisadas pela empresa OSI - Organização de Sistemas Informáticos, e as respetivas ações corretivas serão definidas em parceria com esta empresa.

6 Conclusões

Na presente tese validaram-se métodos de análise de 2,4,6-tricloroanisol, realizaram-se testes comparativos entre os métodos estudados e o método em vigor no I&D, para além de se definirem e implementarem ações de correção e/ou melhoria para as não conformidades detetadas na auditoria externa realizada ao I&D em 2015.

O primeiro método estudado foi o método Gama Intermédia, com uma reta de calibração de 0,5 ng/L a 11,0 ng/L e um padrão interno de 2,3,6-tricloroanisol de 11,0 ng/L. As retas de calibração foram validadas segundo a ISO 8466-1 e o Guia RELACRE 13, não tendo sido cumprido o teste da homogeneidade de variâncias na maioria dos GC-ECD. Além disso, os testes comparativos apresentaram diferenças significativas entre este método e o de referência. Por estes motivos iniciou-se a validação do segundo método, o método Gama Baixa, cuja reta de calibração compreende concentrações entre 0,5 ng/L e 5,5 ng/L, analisando-o com padrões internos de 2,3,6-tricloroanisol de 5,5; 10,0 e 20,0 ng/L. Comparando os resultados obtidos com os diferentes padrões num dos GC-ECD disponíveis no I&D, optou-se por descartar o padrão interno de 10,0 ng/L, e procedeu-se à validação e comparação deste método com os restantes padrões internos. Para tal, foram realizados ensaios de recuperação e testes de robustez para complementar os testes associados à reta de calibração e aos testes comparativos. Após esta validação compararam-se os resultados obtidos com os dois padrões internos, e optou-se pelo método que apresentava melhores resultados. Para alguns testes obtiveram-se resultados semelhantes: em todas as retas de calibração se comprovou a sua linearidade pelo teste de Mandel, e o ajuste adequado da gama de trabalho pela homogeneidade de variâncias. Adicionalmente também se certificou que o método é exato pelos testes de recuperação. As diferenças residiram na análise dos resíduos, nos testes comparativos e nos testes de robustez. Em um dos GC-ECD com PI de 5,5 ng/L o somatório dos resíduos não cumpria o critério interno. Quanto aos testes comparativos verificou-se que, para o padrão interno de 20,0 ng/L, o teste da regressão linear (que avalia toda a gama de trabalho) era cumprido em todos os GC-ECD, contrariamente ao padrão interno de 5,5 ng/L. O teste *t* das diferenças (que avalia as diferentes gamas) também indicava maiores semelhanças entre o método em estudo e o método de referência para o padrão interno de maior concentração. Nos testes de robustez verificou-se que alguns fatores afetam significativamente os resultados do método, independentemente do padrão interno escolhido, tais como o

teor alcoólico, o *NaCl* e o tempo de análise. Já os fatores relacionados com a preparação de amostras, como o volume de macerado e o volume de padrão interno, possuem maior influência no padrão de menor concentração.

Após se analisar os resultados de todos os testes realizados concluiu-se que o método Gama Baixa com padrão interno de 20,0 ng/L conduz a resultados mais satisfatórios, uma vez que é mais robusto que o método Gama Baixa com padrão interno de 5,5 ng/L.

Quanto às restantes não conformidades detetadas na auditoria, foi realizado o levantamento das mesmas, e definidas ações de correção e/ou melhoria através de um plano de ações, onde também se definiram os prazos e os responsáveis por cada umas das ações.

Assim, é suposto que depois dos trabalhos realizados nesta tese, a garantia da qualidade dos resultados obtidos no método de análise de TCA em macerações de produtos de cortiça melhora significativamente.

6.1 Objetivos Realizados

Os objetivos definidos para a presente tese relacionavam-se com a validação de métodos de análise para o 2,4,6-tricloroanisol, a comparação desses métodos com o método em vigor no I&D, e a correção das não conformidades detetadas na auditoria. Os dois primeiros objetivos foram cumpridos, culminando na validação do método Gama Baixa, com padrão interno de 20,0 ng/L. O terceiro objetivo encontra-se ainda em realização, porque perante o prazo estabelecido para entrega deste trabalho não foi possível verificar se as ações definidas para o mês de junho se encontravam concluídas.

6.2 Outros Trabalhos Realizados

Para além das atividades relacionadas diretamente com o tema da presente tese, o estágio também contemplou a participação nas atividades diárias do laboratório, nomeadamente na preparação, análise e obtenção dos resultados nas amostras de rotina para análise de TCA em produtos de cortiça. A manutenção dos equipamentos bem como a preparação dos padrões usados no controlo daquelas amostras também foi realizada.

6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Todos os testes apresentados nesta tese foram realizados nos cinco meses definidos para o estágio, contudo foi sempre necessário conciliar a sua realização com o elevado número de amostras diárias analisadas no I&D. Desta forma, foi geralmente usado o espaço disponível nos cromatógrafos, dos fins-de-semana, para a realização da maior parte dos testes deste trabalho. Assim, sempre que acontecia algum problema técnico, nomeadamente paragem dos GC-ECD, fibras SPME partidas, etc., os testes apenas podiam ser repetidos na semana seguinte, o que levou a atrasos consideráveis na realização do trabalho.

Quanto ao trabalho futuro, o passo seguinte será obter um maior número de resultados nos testes comparativos, o que é facilitado pelo facto de o método REF e o método GB possuírem a mesma concentração de PI, 20,0 ng/L, bastando reprocessar os resultados das amostras diárias analisadas pelo I&D nas retas de calibração de cada um dos métodos. Novas análises estatísticas dos dados serão realizadas, diminuindo o intervalo de concentração de cada uma das gamas de trabalho e analisando individualmente os resultados obtidos, de modo a agrupá-los de acordo com a sua comparação com o método de referência. Por fim, após a análise e crítica destes resultados, pretende-se apresentar o método GB às unidades industriais, e definir a melhor estratégia para a sua implementação.

Adicionalmente também serão analisadas as razões para a influência do *NaCl* e do tempo de análise nos testes de robustez. No caso do *NaCl* deve-se avaliar a possibilidade de aquisição de uma marca deste composto com menores impurezas, bem como o desenvolvimento de uma metodologia mais rigorosa, mas expedita, para medição do *NaCl*. Quanto ao tempo de análise é necessário realizar um estudo para verificar se a sua influência é devido à presença de contaminante, ao padrão interno ou à quantidade de *NaCl*.

6.4 Apreciação final

A realização deste trabalho contribuiu para o enriquecimento a nível pessoal e profissional da sua autora. Por um lado, permitiu a aquisição mais profunda de conhecimentos relacionados com cromatografia em fase gasosa, com o funcionamento diário de um laboratório de análises químicas e, ainda, com a aplicação prática de análises estatísticas. Por outro lado, também possibilitou o aumento de autonomia, responsabilidade e análise crítica, assim como persistência perante as adversidades, características importantes para um engenheiro.

Referências

Agronotícias. *Saúde: Rolhas de cortiça têm efeitos anti-cancerígenos e antioxidantes*. Agroportal, 2006. Disponível em: <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2006/03/31f.htm>
Data de consulta: junho 2016.

Amorim & Irmãos-a). *Corticeira Amorim: Presença Mundial*. Disponível em: <http://www.amorim.com/corticeira-amorim/presenca-mundial/> Data de consulta: junho 2016.

Amorim & Irmãos-b). *Unidade Negócios Introdução*. Disponível em: <http://www.amorim.com/unidades-de-negocio/introducao/> Data de consulta: junho 2016.

Amorim & Irmãos-c). *Diversidade de Aplicações*. Disponível em: <http://www.amorim.com/a-cortica/diversidade-de-aplicacoes/> Data de consulta: fevereiro 2016.

Amorim & Irmãos-d). *Porquê Cortiça (Na construção e infra-estruturas)*. Disponível em: <http://www.amorim.com/porque-cortica/Na-Construcao-e-Infra-Estruturas/37/> Data de consulta: junho 2016.

Amorim & Irmãos-e). *Porquê Cortiça (Nos transportes e energia)*. Disponível em: <http://www.amorim.com/porque-cortica/Nos-Transportes-e-Energia/40/> Data de consulta: junho 2016.

Amorim&Irmãos-f). *Produtos: Catálogo*. Disponível em: <http://www.amorimcork.com/pt/products/catalogue/> Data de consulta: junho 2016.

Amorim&Irmãos-g). *Análise Cromatográfica para Quantificação de TCA* (instrução interna para análise de TCA).

APCOR. *Combate ao TCA*. Disponível em: <http://www.apcor.pt/combate-ao-tca-tricloroanisole/> Data de consulta: março 2016.

Castola, V.; Marongiu, B.; Bighelli, A; Floris, C; Casanova, J. *Extractives of cork (Quercus suber L.): chemical composition of dichloromethane and supercritical CO₂ extracts*. Industrial Crops and Product. 21, 65-69, 2005.

CDER (Center for Drug Evaluation and Research). *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>.

César, I.; Pianetti, G. *Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45 (2), 235-240, 2009.

CIPR - Código Internacional das Práticas Rolheiras. Versão 6.03. Celiége - European Cork Federation. Disponível em: http://www.ciencia20.up.pt/attachments/article/577/rec_3_CIPR2011PT.pdf.

CorkSTfluidics. *Cortiça contra impacto*. I9 magazine, 2016. Disponível em: https://upin.up.pt/sites/default/files/i9Mag%235_pag38.pdf Data de consulta: junho 2016.

Duarte, J.P. *Análise crítica do método cromatográfico para quantificação de TCA e soluções para a sua melhoria*. Tese de Mestrado em Engenharia Química, FEUP, Portugal, 2016.

Elliot, A.; Woodward, W. *Statistical Analysis Quick Reference Guidebook*. SAGE Publications, 2006, London, United Kingdom.

FDA. *Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. ICH, 1996. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf>.

Fortes, M.A.; Rosa, M.E.; Pereira, H. *A Cortiça*. 2ª Edição. Instituto Superior Técnico. Lisboa, Portugal, 2004.

Gil, L. *A Química da Cortiça: Ponto da situação*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 50, 20-24, 1993. Disponível em: <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/574/article/3000586/pdf> Data de consulta: junho 2016.

Guia RELACRE 13. *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Fevereiro, 2000. Disponível em: <http://www.relacre.pt/assets/relacreatssets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELA%20CRE%2013.pdf> Data de consulta: abril 2016.

IPAC. *Guia para Acreditação de Laboratórios Químicos*. 2011. Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC002.pdf> Data de consulta: junho 2016.

IPAC. *Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*. 2010. Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC001.pdf>. Data de consulta: abril 2016.

IPAC. *Guia para a Incerteza de Medição em Ensaio Químicos*. 2007. Disponível em: <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC007.pdf> Data de consulta: junho 2016.

ISO 20752. *Cork stoppers - Determination of releasable 2,4,6-trichloroanisol. 2nd edition, 2014*. Data de consulta: junho 2016.

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*. Data de consulta: abril 2016.

Miller, J. N. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6ª edição. Pierson, 2005, Nova Iorque, EUA. Disponível em: <http://197.14.51.10:81/pmb/CHIMIE/0273730428.pdf>.

Mosca, A. Formação: *Validação de Métodos Físico-Químicos*. A.I.M. - Consultoria, Formação, Auditoria. Maio, 2015 (documento interno).

Niessen, W. M. A. *Current Practice of Gas Chromatography - Mass Spectrometry*. Chromatographic Science Series, Volume 86. Nova Iorque, EUA, 2001. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=fX3JCQIBDF0C&printsec=frontcover&dq=chromatography+mass+spectrometry&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKewiRtsbdldDNAhVBuBoKHf_CcKMQ6AEIUDAD#v=onepage&q=chromatography%20mass%20spectrometry&f=false.

PCE. *Medidores*. Disponível em: <http://www.pce-medidores.com.pt/medicoes/refratometros.htm> Data de consulta: junho 2016.

Pereira, H. *Cork: Biology, Production and Uses*. Elsevier, 2007, London, United Kingdom. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=5uiycUoRmFkC&pg=PA2&lpg=PA2&dq=cork+properties&source=bl&ots=QWmcUpGnei&sig=ltFuY22AmdLzbxU2LsUdqwFTTrA&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKewjrlrWw9M_NAhWIQBoKHTFdAZE4ChDoAQggMAA#v=onepage&q=cork%20properties&f=false.

Poirier, D. *Intermediate statistics and econometrics: a comparative approach*. Cambridge University Press, 1995, 1st edition. Cambridge, Inglaterra. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=K52_YvD1YNwC&printsec=frontcover&dq=comparative+test+s+statistical+books&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKewjJsfiks9fNAhVBORQKHZD8CYgQ6AEIjZAC#v=onepage&q&f=false.

Ross, S. *Introductory Statistics*. Elsevier, 2010, 3st edition. Boston, EUA. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=ZKswvkqhygYC&printsec=frontcover&dq=Introductory+Statistics.++ross&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwi0pv6ux9jNAhVDNxQKHeEsBK8Q6AEIHTAA#v=onepage&q=Introductory%20Statistics.%20%20ross&f=false>.

Silva, I.; Rocha, S. M.; Coimbra, M. A. *Análise da composição volátil do sal marinho*. Departamento de Química, Universidade de Aveiro. 2007. Disponível em: <http://sweet.ua.pt/mac/ficheiros/IATP2%20Silva%20et%20al.pdf>.

Silva, M. *Cortiça - Suas características e propriedades*. UTAD, 2010. Disponível em: <http://www.cifap.utad.pt/A%20cortica.pdf>.

Silva, S.P.; Sabino, M.A.; Fernandes, E. M.; Correló, V. M.; Boesel, L. F., Reis, R. L. *Cork: properties, capabilities and applications*. International Materials Reviews, 50 (6), 345-365, 2005. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/4005/1/0105.pdf>.

USP 1225. *Validation of Compendial Procedures*. EUA, 2008. Disponível em: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c1225.pdf> Data de consulta: junho 2016.

Anexo I Retas de Calibração

Tabela A.1 - Volume de TCA adicionado e concentrações corrigidas para método GI.

| Concentração (ng/L) | Volume TCA solução de 100 ng/L (µL) | Volume TCA solução de 1 ppb (µL) | Concentração corrigida (ng/L) |
|---------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 0,5 | 50 | - | 0,498 |
| 2,0 | 200 | - | 1,961 |
| 3,5 | - | 35 | 3,488 |
| 5,0 | - | 50 | 4,975 |
| 6,5 | - | 65 | 6,458 |
| 8,0 | - | 80 | 7,937 |
| 9,5 | - | 95 | 9,411 |
| 11,0 | - | 110 | 10,880 |

Tabela A.2 - Volume de TCA adicionado e concentrações corrigidas para método GB.

| Concentração (ng/L) | Volume TCA solução de 100 ng/L (µL) | Volume TCA solução de 1 ppb (µL) | Concentração corrigida (ng/L) |
|---------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 0,5 | 50 | - | 0,498 |
| 1,0 | 100 | - | 0,990 |
| 1,5 | 150 | - | 1,478 |
| 2,0 | 200 | - | 1,961 |
| 2,5 | - | 25 | 2,494 |
| 3,0 | - | 30 | 2,991 |
| 3,5 | - | 35 | 3,488 |
| 4,0 | - | 40 | 3,984 |
| 4,5 | - | 45 | 4,480 |
| 5,0 | - | 50 | 4,975 |
| 5,5 | - | 55 | 5,470 |

Anexo II Plano de Ações

Tabela A.3 - Plano de ações elaborado em resposta às não conformidades.

| Identificação | | Ação | Prazo | Responsável |
|------------------------------------|----|---|-----------|-------------|
| Controlo de documentos | 1 | alterar prazo de revisão de documentos do I&D para 6 meses (CPRO) ou em alternativa fazer lista em papel com registo das alterações | fim abril | IR |
| | 2 | promover reunião com OSI para avaliar: hipótese de anti-vírus nos discos dos GC's; bloqueio de pastas de folhas de Excel; <i>back up's</i> dos computadores dos GC's; | | MC |
| Controlo de registos | 3 | elaborar folha de registo para preparação do padrão interno | fim abril | AM |
| | 4 | avaliar necessidade de elaborar folhas de registo para situações semelhantes (ex: soluções TCA) | fim abril | AM/ER |
| | 5 | fazer levantamento de todos os registos utilizados no I&D, codificar se necessário e definir tempo mínimo de conservação | fim maio | AM/ER/IR |
| | 6 | criar folha de registo para verificação da conformidade dos resultados dos GC's <i>versus</i> resultados no computador central e incluir o modo de proceder na IT.GR.ID.01 | fim maio | AM/ER/IR |
| | 7 | elaborar IT controlo trabalho não conforme específica para o I&D tendo como base o procedimento geral de tratamento de produto não conforme | fim maio | IR |
| Controlo de trabalho não conforme | 8 | elaborar proposta de metodologia para demonstração da competência técnica do pessoal que executa ensaios e validar resultados no I&D | fim abril | AM/ER |
| Pessoal | 9 | verificar a existência e adequação de: requisitos mínimos para analistas, plano de formação, e avaliação da eficácia das ações de formação ministradas ao pessoal de I&D - ver nos Recursos Humanos | fim maio | IR |
| Instalações e Condições ambientais | 10 | implementar a utilização única das pontas de macropipetas | abril | MC |
| | 11 | implementar sistema de desionização de água com aviso sonoro para troca de resinas iónicas | abril | IR |
| Equipamentos | 12 | avaliar soluções disponíveis para verificar o alcoolímetro | fim maio | IR |
| | 13 | definir as alterações a implementar para medir o teor alcoólico das soluções | fim maio | IR |
| | 14 | fazer o levantamento dos equipamentos que não têm dossier (Ficha equipamento, etc.) e organizar um dossier para cada um | fim junho | AM/ER |
| | 15 | identificar equipamentos não sujeitos a calibração e proceder à revisão das etiquetas | fim junho | AM/ER |

| Identificação | | Ação | Prazo | Responsável |
|---------------------------------|----|---|-----------|-------------|
| Equipamentos | 16 | contactar empresas fornecedoras de MRC para avaliar se existem para TCA em etanol | fim abril | AM/ER |
| | 17 | elaborar plano para realização de estudo sobre a estabilidade de soluções em etanol armazenadas em frio e em congelador (duração: 1 ano) tendo em vista a possível utilização dessas soluções como material de referência interno | fim abril | AM/ER |
| | 18 | completar a metodologia já existente para a calibração dos GC's (definir critério de aceitação) e incluir na IT.GR.ID.01 | fim maio | AM/ER |
| | 19 | adquirir padrões de TCA de origens diferentes (3 padrões) | junho | AM |
| Amostragem | 20 | cliente Souto & Castro passar a informar qual o teor alcoólico das amostras de vinhos para análise | abril | AM/ER |
| Manuseamento de itens a ensaiar | 21 | elaborar folha de registo de anomalias/desvios às condições normais das amostras a analisar | fim abril | AM/ER |
| Garantia da Qualidade | 23 | fazer injeção da fibra (branco) após o padrão de 20 ng/L | fim abril | AM/ER |
| | 24 | passar a fazer análise de tendências nas cartas de controlo - definir metodologia e incluir na IT.GR.ID.02 | fim maio | AM/ER |
| | 25 | estabelecer periodicidade para a realização de ensaios de recuperação (trimestral) e incluir na IT.GR.ID.02 | fim maio | AM/ER |
| | 26 | retirar as retas de calibração não validadas do cálculo da ordenada | semana 16 | AM/ER |
| | 27 | definir diariamente a especificação para os padrões de controlo dos extremos da reta para aceitação de resultados e incluir metodologia na IT.GR.ID.02 | fim maio | AM/ER |
| | 28 | definir critério de aceitação para variações de área do padrão interno e incluir na IT.GR.ID.01 | fim maio | AM/ER |
| | 29 | preparar um documento com todos os critérios associados ao método de análise de TCA, que ficará como anexo à IT repetiva e será afixado no painel de informação existente na sala de preparação de amostras | fim maio | AM/ER |
| | 30 | nos ensaios interlaboratoriais internos passar a fazer os cálculos com um valor convencionado como verdadeiro e incluir esta alteração na IT.GR.ID.02 | fim maio | AM/ER |

| Identificação | | Ação | Prazo | Responsável |
|-----------------------|----|---|-----------|-------------|
| Garantia da Qualidade | 31 | incluir na IT.GR.ID.02 a rastreabilidade do valor convencionado como verdadeiro, prevendo as duas situações: solução etanólica teórica e solução preparada a partir das amostras | fim maio | AM/ER |
| | 32 | em função das alterações propostas em 30 e 31, analisar <i>Z-scores</i> insatisfatórios fazendo uma análise de causas, registrando como trabalho não conforme | fim maio | AM/ER |
| | 33 | os laboratórios participantes com maus resultados, devem ser avisados primeiro por e-mail, ficando o I&D disponível para ajudar na análise dos dados. Incluir esta metodologia na IT.GR.ID.01 | fim maio | AM/ER |
| Método de ensaio | 34 | realizar estudo do método com pontos equidistantes | fim abril | AM/ER/FS |
| | 35 | realizar ensaios de recuperação trimestrais, ensaios de recuperação com padrão interno e criar critério de aceitação | fim abril | AM/ER/FS |
| | 36 | reavaliação do método de análise de TCA em todos os GC's | fim abril | AM/ER/FS |
| | 37 | prever a realização de ensaios de robustez após apuramento do novo método de análise | fim abril | AM/ER/FS |
| | 38 | fazer estudo da estabilidade das soluções-mãe enviadas para a EQ | junho | AM/ER |
| | 39 | fazer análise de tendências das pipetas, dado não se puder fazer a sua verificação | junho | AM/ER |
| | 40 | elaborar plano experimental referente à realização de um estudo com diferentes horas de maceração para ver a estabilidade do TCA ao longo do tempo | fim maio | AM/ER |
| | 41 | reavaliar em termos de análise estatística os resultados da validação do método expedito de TCA para granulados | fim maio | AM/ER |
| | 42 | para cada GC fazer o cálculo manual dos resultados de 1 amostra, para verificação dos cálculos feitos pelo equipamento | junho | AM/ER |

