

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

GUSTAVO MANCINI

Caracterização de candidato a Material de Referência Certificado para cachaça não adoçada

São Carlos

2017

GUSTAVO MANCINI

Caracterização de candidato a Material de Referencia Certificado para cachaça não adoçada

Versão Corrigida

Monografia apresentada no instituto de química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção da aprovação na disciplina de monografia.

Área de concentração: química analítica

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

São Carlos

2017

Agradecimentos

Agradeço aos docentes Igor Renato B. Olivares e Vitor Hugo Policés Pacces , Éder Tadeu Gomes Cavalheiro, Eny Maria Viera, Stanislau Bogusz Junior que aceitaram fazer parte da banca ou como titulares ou como suplentes

Como a Nicole Mendes e todo o grupo de qualidade pelo suporte na pesquisa

A minha família.

RESUMO.

Este trabalho apresenta o estudo de caracterização e estimativa de incerteza para um candidato a material de referência certificado (MRC) de cachaça utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (GC-FID), que consiste na primeira entre as 4 etapas de produção de um MRC. O MRC de cachaça não adoçada apresenta os analitos metanol, 2-butanol, acetato de etila, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, furfural, acetaldeído os quais foram avaliados com base nos requisitos da ABNT ISO guia serie 30. A importância deste trabalho é destacada devido aos compostos tóxicos que estão presentes na cachaça e devem ser controlados, desta maneira é necessário um MRC que possa ser utilizado como controle de qualidade dos ensaios, sendo uma obrigatoriedade em laboratórios acreditados em sistemas de gestão da qualidade conforme requisitos da ISO/IEC 17025, portanto tendo esta pesquisa uma vital importância para a área de qualidade e metrologia química.

Palavras chave : Material de referência certificado, cachaça, qualidade, metrologia.

ABSTRACT

This work presents the study of characterisation and estimation of uncertainty for a candidate for certified reference material (MRC) of cachaça using gas chromatography with flame-ionisation detection (GC-FID), which consists of the first between the 4 stages of Production of a MRC. The non-sweetened cachaça MRC introduces the analytes methanol, 2-butane, Ethyl Acetate, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butane, 3-methyl-1-butane, Furfuraldehyde, acetaldehyde which were evaluated based on the requirements of ABNT ISO guide Serie 30. The importance of this work is highlighted because of the toxic compounds that are present in the cachaça and must be controlled, in this way a MRC that can be used as a quality control of the tests, and is mandatory in laboratories accredited in Quality Management Systems according to ISO/IEC 17025 requirements, so having this research a vital importance for the area of quality and chemical metrology.

Keywords : Certified Reference Material, Cachaça, Quality, Metrology.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Conceitos importantes e observações importantes.....	6
1.2 Objetivos.....	9
2 DESENVOLVIMENTO	9
2.1 Padrões usados no preparo do MRC	10
2.2 Equipamentos usados no preparo do MRC	11
2.3 Verificação dos equipamentos	11
2.4 Verificação da balança analítica	11
2.5 Verificação das micropipetas	12
2.5.1 Medidas do erro sistemático.....	12
2.5.2 Medidas do erro aleatório.....	12
2.5.2.1 Medidas do CV (desvio padrão relativo) com 10 medidas para cada micropipeta.....	13
2.5.2.2 Incerteza das micropipetas considerando incerteza do tipo A com 10 medidas.....	13
2.5.3 Incerteza expandida.....	13
2.6 Limpeza, manutenção e verificação do GC- FID	13
2.7 Caracterização qualitativa da matriz de cachaça	13
2.8 Curva de calibração do GC-FID	16
2.9 Analise do método GC-FID.....	21
2.10 Quantificação dos contaminantes na cachaça.....	22
2.11 Fortificação da cachaça (preparação do MRC).....	23
2.12 Analise do MRC.....	24
2.13 Estimativa de incerteza.....	24
2.13.1 Incerteza relacionada a curva de calibração.....	26
2.13.2 Incerteza da caracterização.....	28
2.14 Certificação do MRC	28
3 CONCLUSÃO.....	28
4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Esta monografia tem por objetivo apresentar a caracterização de um candidato a material de referência certificado (MRC) para cachaça não adoçada. Essa caracterização é uma das etapas na produção de material de referência certificado, que é usado em laboratórios que apresentam sistemas de gestão da qualidade em conformidade com os requisitos da norma ISO/IEC 17025¹. Os materiais de referência certificados são de grande importância para a metrologia, uma vez que é necessário padrões para obter confiabilidade nos resultados analíticos, sendo o caso da cachaça, resultados para o controle de falsificações.

Para a caracterização é necessário a adoção de normas internacionais como ISO 17034² e ISO GUIA 35³, que apresentam os requisitos de gestão da qualidade e testes estatísticos para caracterização.

Destaca-se que a área de qualidade onde o MRC de cachaça é aplicado vem crescendo nos últimos anos, com grande quantidade de empresas com laboratórios que aplicam sistemas de gestão da qualidade em conformidade com requisitos da ISO/IEC 17025. Este crescimento se deve principalmente na necessidade de não apenas produzir bebidas destiladas, mas fazer produtos com qualidade comprovada e monitorada, sendo que, no caso da cachaça não adoçada são monitorados parâmetros como os álcoois superiores, (o metanol que é fruto da degradação da pectina um polissacarídeo), o acetaldeído, o furfural e o acetato de etila.

A escolha da cachaça não adoçada para produção do MRC, se fez pela importância da indústria de bebidas, uma vez que a cachaça vem ganhando um grande valor de mercado e com grande participação no PIB brasileiro, e nas exportações, como para Alemanha, Paraguai, Itália, Uruguai, Estados Unidos entre outros países, sendo que na maioria destes países existem exigências de qualidade para a importação de produtos, contando com limites rigorosos, destacando mais uma vez a importância do uso de um MRC.

1.1 Conceitos e observações importantes

A principal norma aplicada no trabalho será a ISO GUIA 35. Esta norma divide a produção do MRC em 4 etapas principais, sendo que antes destas etapas são considerados o planejamento dos experimentos necessários para a produção do MRC e o estudo de viabilidade para produção do MRC.

A primeira etapa consiste na caracterização do MRC por meio de um valor de propriedade além da estimativa de incerteza referente a esta propriedade. A segunda etapa consiste no estudo de homogeneidade do MRC, a terceira etapa é o estudo de estabilidade do MRC, e por último, a estimativa de incerteza total do MRC. O estudo de caracterização da cachaça será dividido nas seguintes sub-etapas, caracterização para a cachaça não adoçada, análise qualitativa dos analitos em questão, obtenção da curva de calibração analítica para os analitos, quantificação do branco (cachaça não adoçada), fortificação do branco, análise do MRC, avaliação da incerteza.

Toda a parte analítica será feita com um GC-FID, que é uma técnica de cromatografia gasosa, considerada a técnica padrão para análise da cachaça. O aparelho (GC-FID) consiste em uma coluna cromatográfica acoplada um detector de ionização por chama, sendo que a coluna separa os analitos por interações cinéticas de partição para o modelo utilizado na caracterização do MRC, e de temperatura, para que os analitos sejam encaminhados ao detector que é um eletrodo, onde são queimados os compostos presentes na amostra afim de obter a produção de íons que são detectados por um sensor que transforma em corrente iônica, onde pequenos sinais são amplificados e passados para o registrador, os quais são tratados por um computador passando a informação a fim de obtenção de um resultado final.

Destaca-se que a norma ISO/IEC 17025 é a norma mais aplicada para padronizar as atividades de um laboratório nos aspectos de confiabilidade das análises, e de exigências governamentais, já que órgão como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), ANA (Agência Nacional de Águas), exigem que suas análises sejam feitas em laboratórios acreditados na ISO/IEC 17025. Esta norma se divide em duas partes, os requisitos técnicos relacionados à atividade analítica e os requisitos na parte administrativa que consiste basicamente os requisitos da ISO 9001⁴. Especula-se que existam no mundo cerca de 45.000 laboratórios acreditados na norma ISO/IEC 17025. Destes 36.500 são laboratórios de análise e 8.500 de calibração.

Dentre os testes estatísticos aplicados neste trabalho o teste de Dixon (Equação 01) consiste em um teste para determinação de pontos fora da curva para o caso com confiabilidade de 95%, sendo que para 5 resultados o valor crítico é de 0,71, desta maneira se o teste der acima de 0,71 o valor é considerado um outlier. O desvio padrão relativo e o desvio padrão, também são equações importantes para determinar a variabilidade em um conjunto de resultados (Equação 02 e 03).

$$\text{Equação 1 : } Q = \frac{|X_q - X_p|}{F} \quad (1)$$

Na qual:

Q é o valor do teste

X_q é o valor questionável

X_p é o valor mais próximo do valor questionável

F é a variação total entre todos os dados

Equação 2 (desvio padrão relativo):

$$CV(\%) = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \quad (2)$$

Equação 3 (desvio padrão):

$$s = \sqrt[2]{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

\bar{x} é a media dos valores

n é numero de replicatas

s é o desvio padrão

O coeficiente de determinação consiste no R^2 que apresenta um critério para linearidade segundo⁵, sendo que acima de 0,9801 é considerado adequado.

As incertezas são classificadas em 2 tipos pela ISO GUM⁶, as incertezas do tipo A e do tipo B. As incertezas do tipo A consistem em incertezas relacionadas aos desvios padrão obtidos experimentalmente, e as do tipo B obtidas por informações dos equipamentos e reagentes. O método de soma das incertezas do tipo A e do tipo B consiste em uma raiz da soma quadrática dos valores de incerteza individuais, outras operações de incerteza podem ser obtidas no apêndice 9 do livro Skoog,West, Holler,Crouch (fundamentos de química analítica 8 ed)⁷.

As concentrações limites da cachaça não adoçada para os contaminantes estão presente na instrução normativa numero 13 do MAPA⁸. Segundo esta instrução os contaminantes voláteis na cachaça não adoçada não podem passar de 650mg/100 ml de álcool anidro e não ser inferior a 200mg/100 ml de álcool anidro, o teor alcoólico deve ser 38% v/v a 48% v/v.

A alcoolimetria consiste na análise da densidade do líquido para determinar o volume de álcool em solução água-álcool, que deve ser consultada em tabela considerando a temperatura de 20 graus célsius.

Este trabalho teve um grande foco na qualidade, que segundo Juran⁹ pode ser definido como (adequação ao uso), que esta relacionado à relação entre a necessidade e expectativa do cliente. No caso de laboratórios de ensaio a qualidade esta relacionada a confiabilidade de um resultado, podendo ser alcançada de algumas maneiras, como por exemplo com a ferramenta AQAC¹⁰, que se fundamenta pelos conceitos abaixo:

1. Validação do método: avalia se um método é adequado ao uso a que se pretende.
2. Estimativa da incerteza: avalia o nível de confiança de um resultado podendo utilizar os dados obtidos na etapa de validação.
3. Controle de qualidade: monitora continuamente o método bem como a qualidade dos resultados dos ensaios obtidos a cada batelada. Ao se analisar uma amostra com quantidade conhecida de analito (um Material de Referência por exemplo), é possível avaliar a exatidão de uma medida e, a longo prazo, a precisão intermediária que é um parâmetro da validação utilizado no cálculo da incerteza.

A cachaça não adoçada consiste na cachaça com teor açúcar menor que 6g/L, presente na resolução numero 13 do MAPA, como a definição de cachaça.

1.2 Objetivos

Caracterização e estimativa de incerteza para um candidato a material de referência certificado (MRC) de cachaça para os analitos: metanol, 2-butanol, acetato de etila, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, furfural, acetaldeído, utilizando cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (GC-FID).

2 DESENVOLVIMENTO

Neste trabalho foi usado a técnica de GC-FID, que consiste em uma técnica de separação cromatográfica gasosa acoplada a um detector por ionização por chama.

Foram retiradas 6 alíquotas da bebida (cachaça não adoçada, marca 51 Pirassununga) para obter a quantidade de álcoois superiores e outros compostos listado na Tabela 1:

Tabela 1- Principais contaminantes voláteis em cachaça não adoçada

Principais contaminantes voláteis
Acetaldeído
Acetato de etila
Metanol
2-butanol
1-propanol
2-metil-1-propanol
1-butanol
3-metil-1-butanol
Furfural

Depois de obter as concentrações destes compostos na cachaça, esta será fortificada com os álcoois superiores e outros compostos em concentrações próximas aos limites máximos permitidos pela legislação do ministério da agricultura.

A curva de calibração analítica foi preparada em matriz alcoólica de 42,9% de álcool v/v com a adição dos padrões em concentrações conhecidas por gravimetria que diminui a incerteza da preparação, já que a balança apresenta grau de resolução maior que as micropipetas.

Para produção do material de referência certificado foi usado método gravimétrico.

Para garantir resultados corretos da balança foi usado massas certificadas para determinar a incerteza afim de aplicá-la a incerteza total do MRC.

2.1 Padrões usados no preparo do MRC e suas purezas certificadas

- Acetaldeído da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- Acetato de etila da marca Sigma- Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- Metanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,9\%$;
- 1-propanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 1-butanol da marca Vetec com pureza $\geq 99,4\%$;
- 2-butanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 2-metil-1-propanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 3-metil-1-butanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 98,5\%$;
- Furfural da marca Sigma-Aldrich com pureza de 99%;
- Acetonitrila da marca Merck com pureza $\geq 99,9\%$;
- 1-pentanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99\%$;

- Etanol da marca J.T Baker com pureza $\geq 99,7\%$;

2.2 Equipamentos usados no preparo do MRC e suas características

Características do equipamento cromatográfico GC-FID : Cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama da marca Shimadzu, modelo GC-17A equipado com coluna capilar DB-WAX de 30 metros, com 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 μm da marca J&W Scientific

- Balança analítica modelo TE214S da marca Sartorius Mechatronics;
- Micropipeta com volume variável de 0,5 a 10 μl da marca Eppendorf;
- Micropipeta com volume variável de 10 a 100 μl da marca Eppendorf;
- Micropipeta com volume variável de 100 a 1000 μl da marca Eppendorf;

2.3 Verificação dos equipamentos

A verificação dos equipamentos foi feita no intuito de determinar se havia variação dos instrumentos de medidas, com a balança e as micropipetas.

2.4 Verificação da balança analítica

A balança analítica foi analisada, usados os corpos de massa padrão E2 com os valores de 10mg, 100 mg e 10g medindo 10 análises para cada corpo de massa padrão.

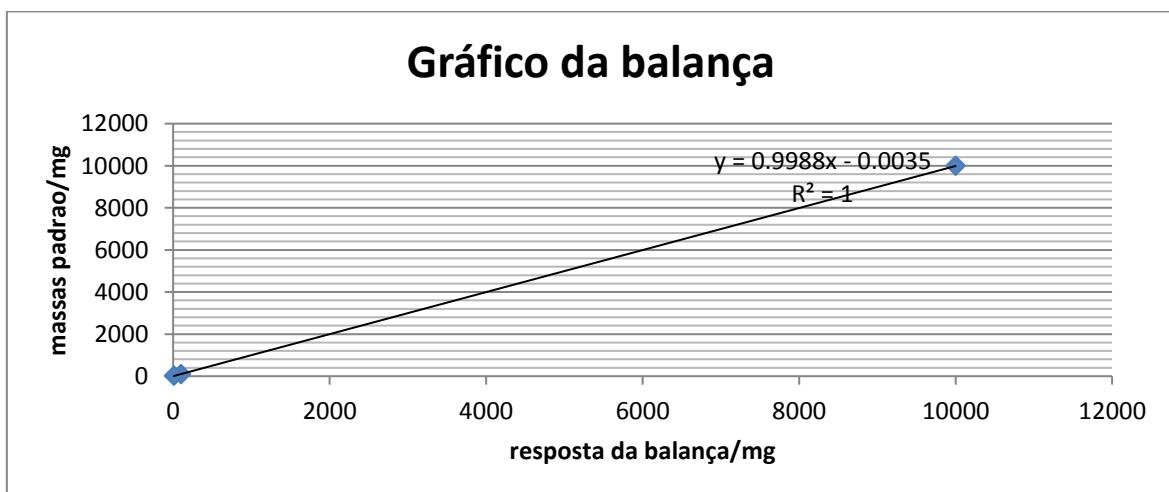


Figura 1-Gráfico das medidas da massa padrão com especificação de precisão E2 para obtenção da linearidade da balança

Como pode ser observado, a balança que foi usada tem um coeficiente de determinação de 1 o que mostra que ela esta calibrada e tem uma ótima linearidade. Considerando que as massas de padrão foram pesadas ao redor de 10 mg, foi usado corpo de massa padrão E2 que apresentam incerteza 0,6% do peso para essas medidas.

- Desvio padrão para 10 mg : 0,1159 mg
- Desvio padrão relativo de 10 mg : 1,159%
- Media 9,97 mg com um erro sistemático de 0,03 mg em porcentagem 0,3%
- Estimativa de incerteza foi de 0,1398 mg, obtido pela somatória da incerteza da precisão da balança + incerteza da excentricidade do prato + incerteza do corpo de massa padrão + incerteza do desvio padrão das medidas da balança.

O valor que foi obtido ficou acima da especificação da balança, por isso considera como incerteza 1,398% ou seja, 0,1398 mg que é acima do valor que o fabricante da balança informa, com estes dados é possível saber que com os dados medidos a balança esta operando normalmente, já que ficou próximo do que o fabricante indica, já que tem anos de uso a balança, e com uma precisão alta, linearidade ótima e desvio padrão muito baixo.

2.5 Verificações das micropipetas

As micropipetas foram verificadas pela pipetagem de volumes em um béquer e posterior registro de seu peso obtendo os dados abaixo:

2.5.1 Medidas do erro sistemático

O erro sistemático esta relacionado com a exatidão.

Densidade da água $0,9982071\text{g mL}^{-1}$ a 20 graus, foram feitas 10 medidas para cada micropipeta.

$$10 \text{ uL} = 0,09982 \text{ teórico}$$

$$100 \text{ uL} = 0,09982 \text{ teórico}$$

$$1000 \text{ uL} = 0,9982 \text{ teórico}$$

$$10 \text{ uL} = 0,09766 \text{ medido}$$

$$100 \text{ uL} = 0,09886 \text{ medido}$$

$$1000 \text{ uL} = 0,9902 \text{ medido}$$

$$97,836\% = 9,7836 \text{ uL}$$

$$99,038\% = 99,038 \text{ uL}$$

$$99,20\% = 992 \text{ uL}$$

2.5.2 Medidas do erro aleatório

2.5.2.1 Medidas do CV (desvio padrão relativo) com 10 medidas para cada micropipeta

10 ul = 1,068%

100 ul = 2,1448%

1000ul = 0,2523%

2.5.2.2 Incerteza das micropipetas considerando incerteza do tipo A com 10 medidas

A incerteza do tipo A é calculada pelo desvio padrão/ \sqrt{n} numero de replicatas no caso 10 os valores abaixo descrevem a incerteza em porcentagem para as 3 micropipetas:

10 ul = 0,3377%

100 ul = 0,6782%

1000 ul = 0,07978%

2.5.3 Incerteza expandida

A Incerteza expandida é a incerteza padrão multiplicado por um valor de K onde K=2 com um porcentagem de 95,4% obtida no livro do Skoog.

10 ul = 0,6754%

100ul= 1,3464%

1000ul = 0,15956%

2.6 Limpeza, manutenção e verificação do GC- FID

O GC-FID foi limpo com solução de álcool de limpeza grau HPLC. Foi trocado o septo e foi determinado com solução de álcool se havia ruído no sistema devido a contaminantes, mas não foi visto qualquer ruído significante indicando que a limpeza foi bem feita e que o equipamento está em bom estado.

2.7 Caracterização qualitativa da matriz de cachaça

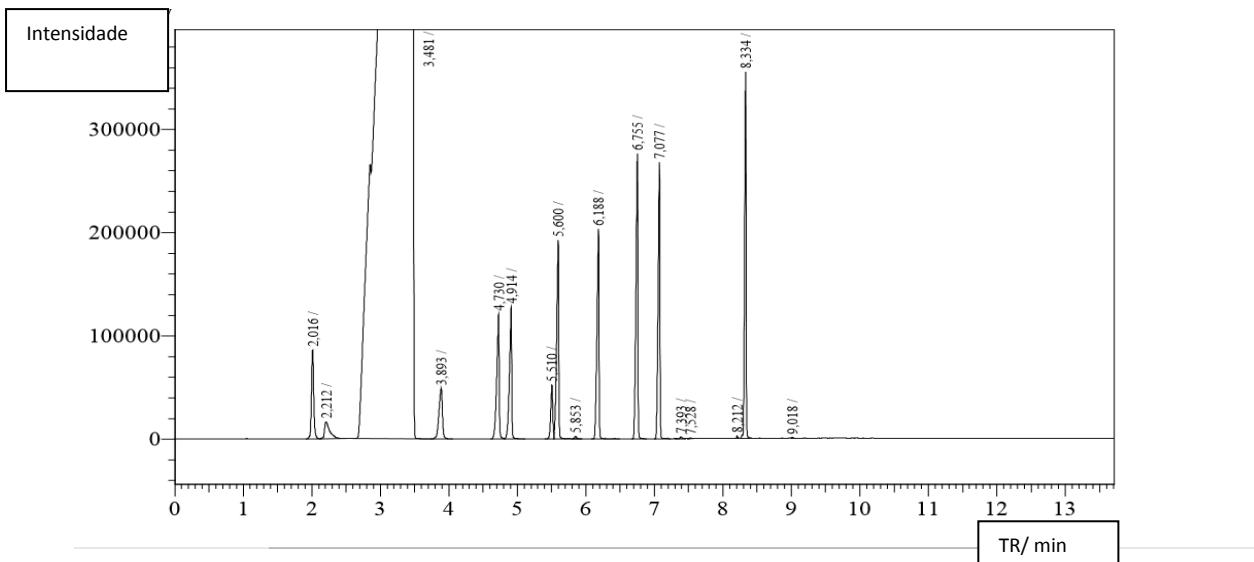
A caracterização qualitativa da matriz de cachaça não adoçada consiste na preparação de 11 soluções contendo os padrões na concentração de aproximadamente 25 mg/ml de etanol anidro, para posterior injeção no GC-FID e obtenção do tempo de retenção relativo. Com uma mistura de todos os contaminantes na concentração de 12,5mg/ml de etanol anidro, pode se obter o cromatograma (Figura 2) onde se obtém os tempos de retenção de cada composto. As soluções foram feitas em temperatura de 20 graus célsius para minimizar a volatilidade dos reagentes, as condições cromatográficas são: fluxo de injeção 1,84 mL min⁻¹, temperatura 35 graus na coluna por 4 minutos e depois rampa de aquecimento de 35 °C min⁻¹ até 200 graus Célsius mantendo a temperatura em 200 graus Célsius até o fim da corrida cromatográfica. O tempo total da corrida foi de 13,7 min, a temperatura do detector foi constante em 200 graus Célsius, sendo injetado 1ul aproximadamente com razão de slit 1:30, o fluxo total 61 ml min⁻¹, pressão de 120 kPa para o gás de araste. A Tabela 2 apresenta os resultados do tempo de retenção dos compostos é um cromatograma da amostra multi-padrão:

Tabela 2- Compostos padrão e seus tempos de retenção

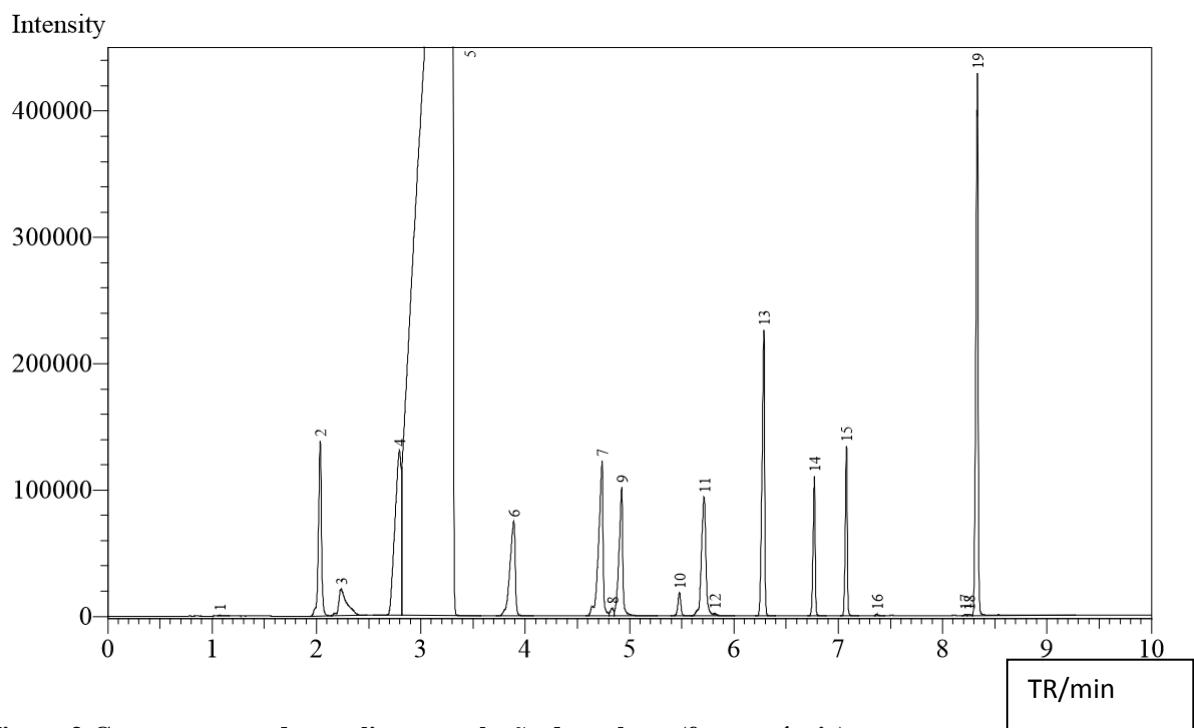
Padrão	Tempo de retenção em minutos
Acetaldeido	1,07
Acetato de etila	2,016
Metanol	2,212
Acetonitrila	3,893
2-butanol	4,73
1-propanol	4,9314
2-metil-1-propanol	5,600
1-butanol	6,188
3-metil-1-butanol	6,755
1-pentanol	7,077
Furfural	8,334

Nota: A acetonitrila e o 1-pentanol são padrões internos, e por eles se obtém o tempo de retenção relativo dos padrões acima.

Como pode ser observado foi possível obter todos os tempos de retenção para os padrões usados e seus tempos de retenção relativos.



Depois foi verificado se a matriz altera o tempo de retenção usando a cachaça como solvente em vez do álcool sobe as mesmas condições cromatográficas de temperatura de preparo das soluções, não sendo observado diferenças significativas no tempo de retenção relativo dos compostos analisados (Figura 03).



- 1- Acetaldeído
- 2- Acetato de etila

- 3- Metanol
- 4- Fico duplicado de etanol
- 5- Pico de etanol
- 6- Padrão interno (acetonitrila)
- 7- 2-butanol
- 8- 1-propanol
- 9- 1-propanol
- 10- Impureza
- 11- 2-metil-1-propanol
- 12- 2-metil-1-propanol
- 13- 1-butanol
- 14- 3-metil-1-butanol
- 15- 1-pentanol
- 16- Impureza
- 17- Pico falso
- 18- Furfural
- 19- Furfural

2.8 Curva de calibração analítica do GC-FID

Com os tempos de retenção obtidos foi obtida uma curva com as concentrações onde foi usado uma solução aproximadamente 42,9% de álcool etílico *v/v* em água para simular a matriz da cachaça. Essa solução foi feita no laboratório com água ultrapura e etanol 99,7% de pureza, sendo pesado 1000ul de solução para determinar a densidade para posterior determinação exata do teor alcoólico usando a tabela de alcoolimetria da ANVISA. A faixa de concentrações da curva de calibração foi de aproximadamente: 10 a 125 mg/ 100 ml de álcool anidro para metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-butanol, 1-butanol, de 20 a 260mg/100ml de etanol anidro para o acetato de etila, de 8 a 105 mg/100ml de álcool anidro para acetaldeído e de 3 a 30 mg/100ml de álcool anidro para o furfural. Foram feitas 5 análises para cada nível de concentração e posterior avaliação do método. Foi feita a correção do volume injetado por uso de padrões internos como acetonitrila e 1-pentanol em concentrações próximas de 50 mg/100 ml de solução, os gráficos abaixo mostram a linearidade das curvas obtidas. Os valores aberrantes foram analisados pelo teste de Dixon, a área foi corrigida pelo padrão interno 1-pentanol já que esse padrão está mais distante do pico

do etanol, melhorando a precisão da curva de calibração analítica. Foi feita análise do branco (solução 42,9% v/v de etanol em água) para determinar se havia qualquer contaminante na água usada, não sendo constatada nenhuma contaminação.

As análises de alcoolimetria foram feitas em quintuplicada por densidade usando a balança e uma micropipeta de 1000ul, onde foi usada uma tabela de densidade da ANVISA para determinação do teor alcoólico em %v/v, a tabela da ANVISA pode ser obtida no link abaixo:

(http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/arquivos/cp38_2010_anexos/alcoome_tria.pdf)¹¹

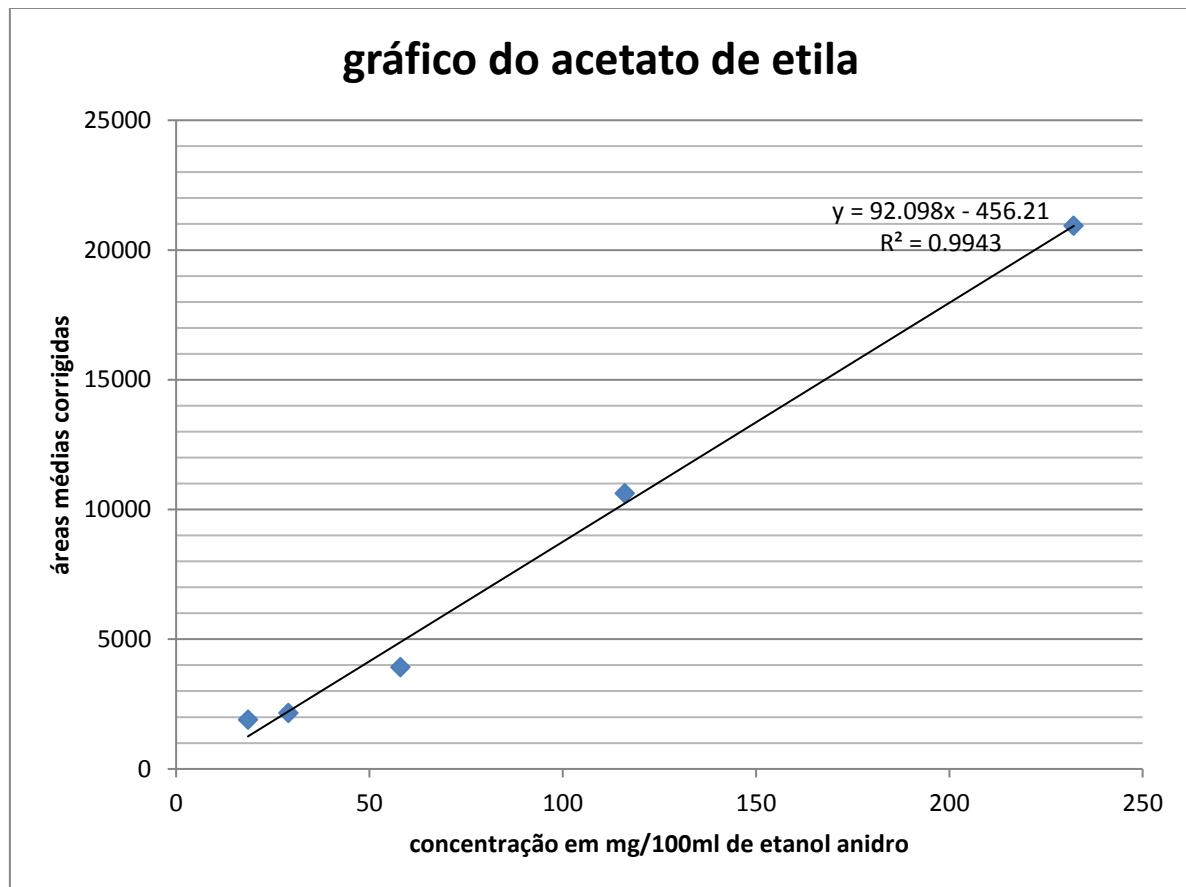


Figura 4- Gráfico das áreas médias corrigidas pelos padrões internos para o acetato de etila pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

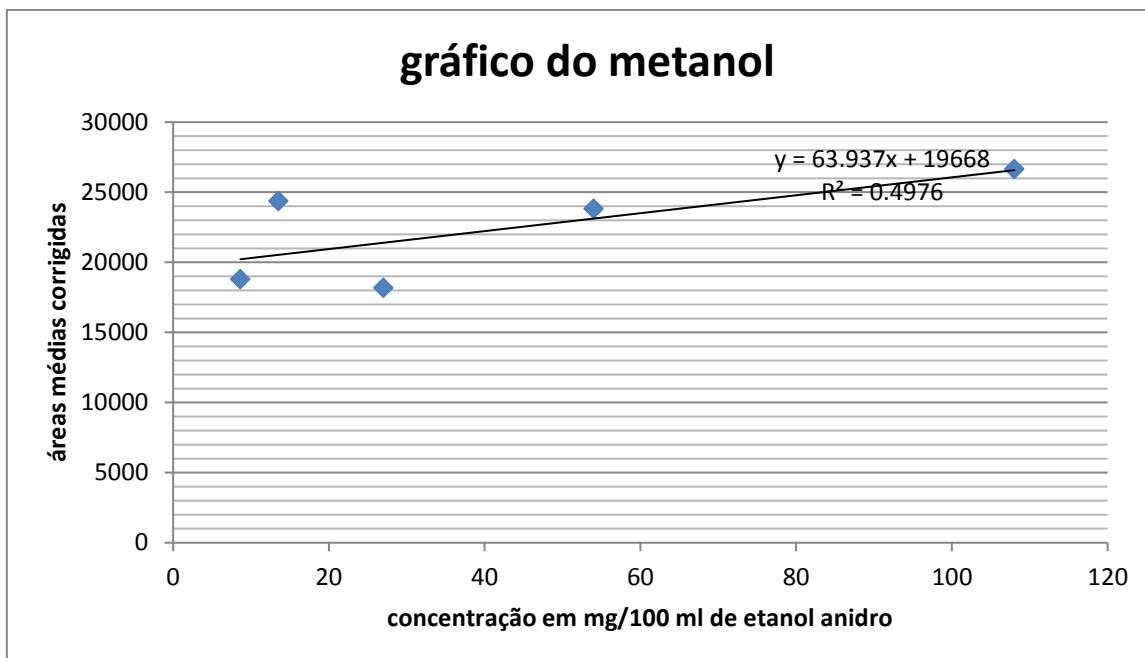


Figura 5- Gráfico das áreas médias corrigidas pelos padrões internos para o metanol pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

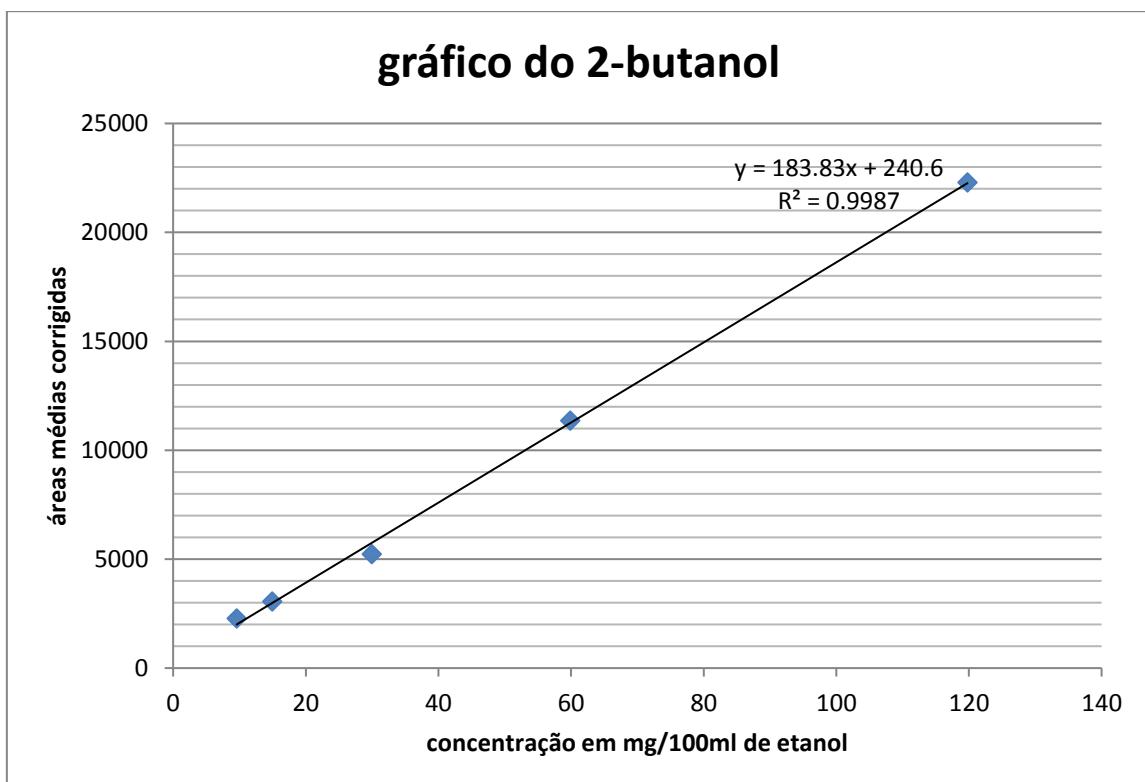


Figura 6- Gráfico das áreas médias corrigidas pelos padrões internos para o 2-butanol pela concentração em mg/100 ml de etanol.

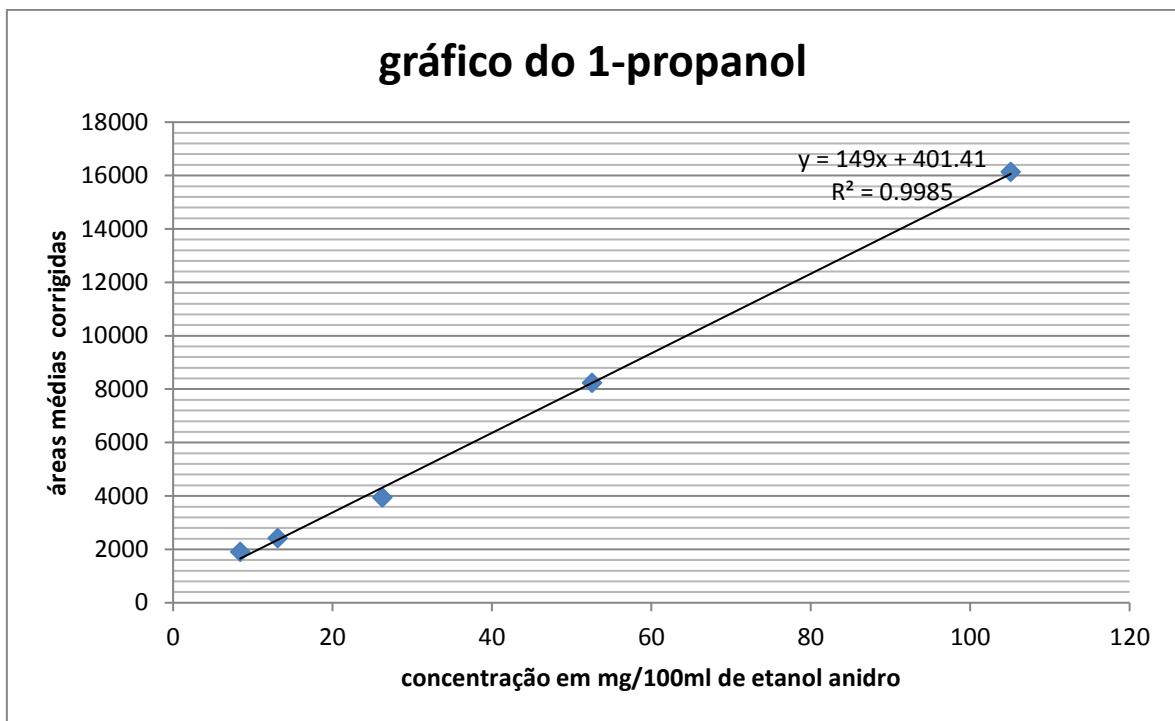


Figura 7- Gráfico das áreas médias corrigidas pelos padrões internos para o 1-propanol pela concentração em mg/100 ml de etanol.

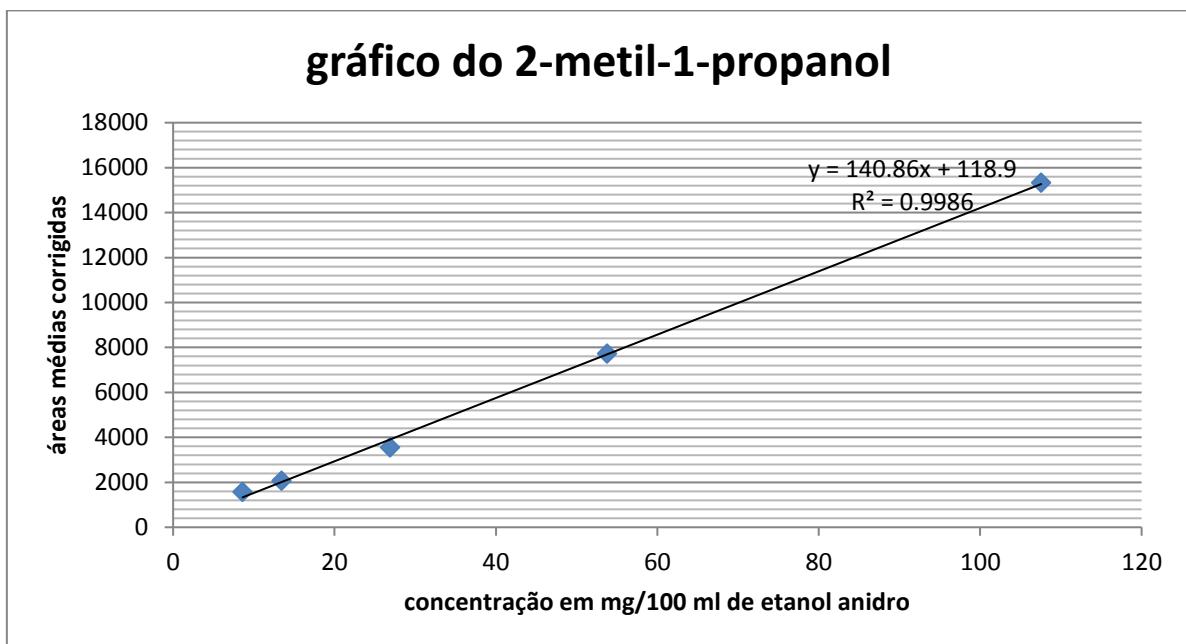


Figura 8- Gráfico das áreas médias corrigida pelos padrões internos para o 2-metil-1-propanol pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

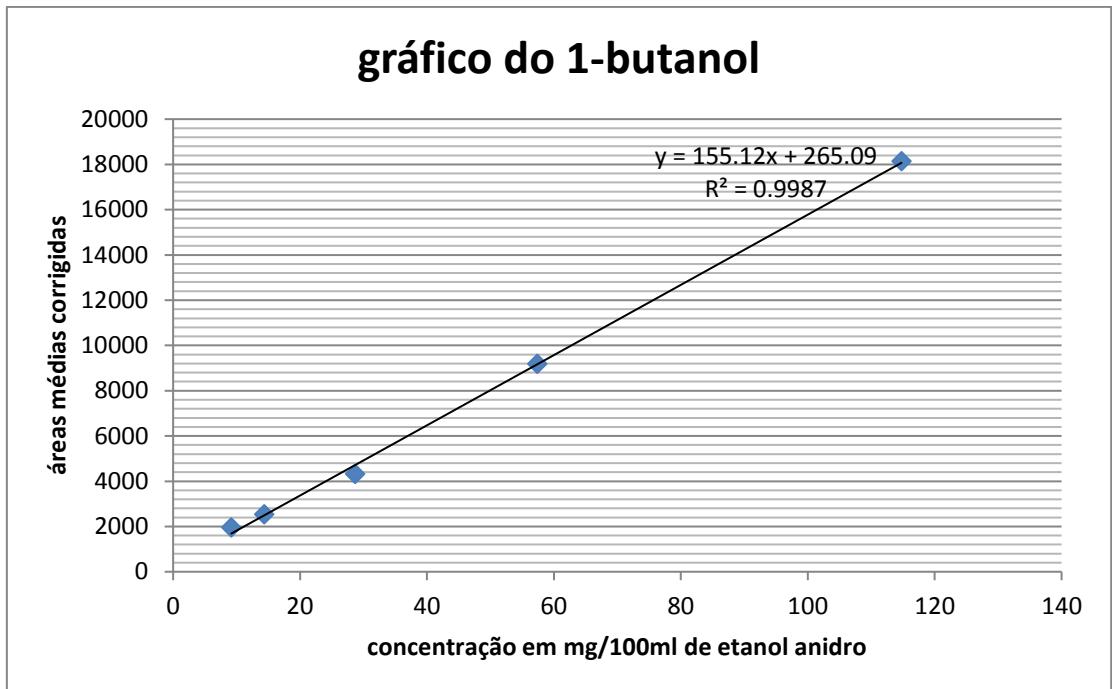


Figura 9- Gráfico das áreas médias corrigida pelos padrões internos para o 1-butanol pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

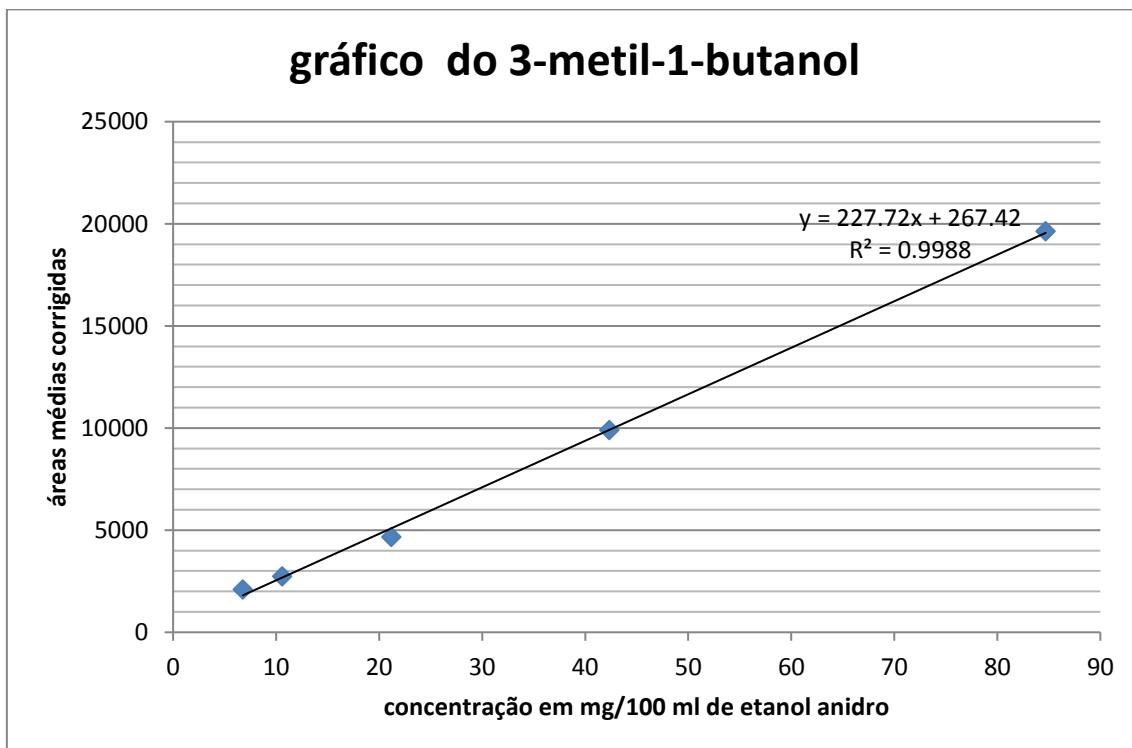


Figura 10- Gráfico das áreas médias corrigida pelos padrões internos para o 3-metil-1-butanol pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

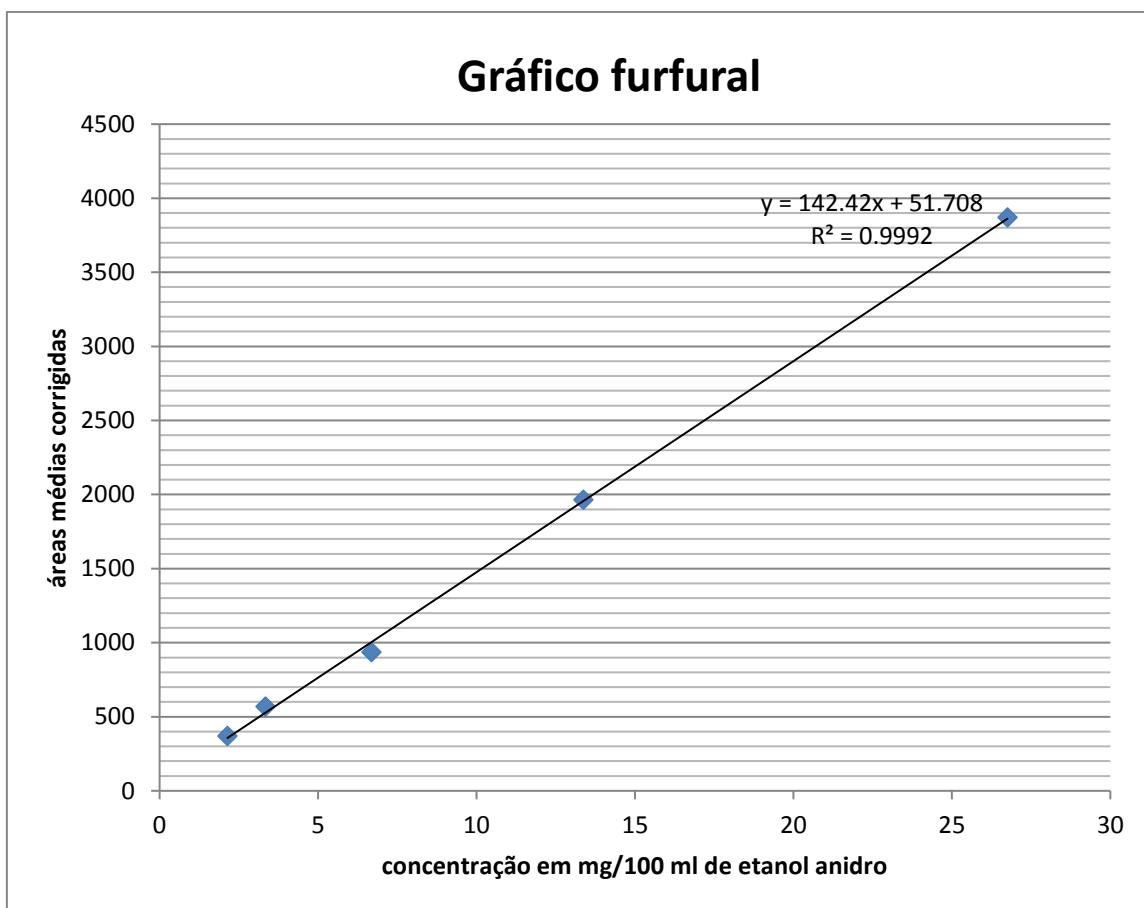


Figura 11- Gráfico das áreas médias corrigida pelos padrões internos para furfural pela concentração em mg/100 ml de etanol anidro.

As curvas de calibração analíticas para cada analito estão presentes nas Figuras 4 a 11, onde o eixo y = área corrigida, X = concentração do analito na unidade da legislação (mg/100 ml de etanol anidro), (a) é o coeficiente angular e (b) é o termo que acompanha o x nas equações, e o (b) é o linear, as equações estão nos gráficos, e é descrita abaixo:

$$y = aX + b \quad (4)$$

2.9 Analise do método GC-FID

O método foi analisado pela linearidade na faixa de concentrações de trabalho onde o critério aceito foi para valores maiores que 0,99 para o R^2 . A tabela abaixo apresentam os valores de coeficiente de determinação para cada contaminante na cachaça.

Tabela 3- Padrões e os valores dos R² obtido das curvas de calibração

Padrões	Valor de R ²
Acetaldeído	Não foi possível determinar
Acetato de etila	0,9943
Metanol	0,4976
Acetonitrila	Não há necessidade
2-butanol	0,9987
1-propanol	0,9985
2-metil-1-propanol	0,9986
1-butanol	0,9987
3-metil-1-butanol	0,9988
1-pentanol	Não há necessidade
Furfural	0,9992

Como pode ser visto os valores dos R² se encontram acima de 0,99 para a maioria dos analitos, o que indica que o método é valido para a produção de um MRC segundo a norma ISO GUIA 35. O metanol apresentou valor de linearidade abaixo, as linearidades foram mantidas até 1250 mg/100 ml de etanol anidro tanto para cachaça como para a solução 42,9% de álcool V/V, não foi possível determinar para o acetaldeído por que o pico cromatográfico ficou com sinal muito baixo para análise, o método usado na análise consiste na regressão linear que apresenta a formula:

$$\text{Área corrigida} = Ax + b + E \quad (5)$$

$$R^2 = \frac{SQR}{SQT} = 1 - \frac{SQE}{SQT} = \frac{\widehat{\beta}_1 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) Y_i}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2},$$

Figura 12- fórmula da determinação do R² (fonte portal action)¹

2.10 Quantificação dos contaminantes na cachaça

Para determinação dos contaminantes foram usadas as curvas de calibração para quantificação dos reagentes pela equação: área do pico corrigido pelos padrões = aX + b + E onde X= concentração dos reagentes por 100ml de álcool etílico anidro que é a unidade da legislação, (a) é o coeficiente angular da reta, e (b) é o linear, e (E) é o parâmetro aleatoriedade das análises. Os resultados abaixo refletem na tabela 4, o que foi observado nas análises, os dados foram tratados também com o teste de Dixon para pontos fora de curva e os volumes corrigidos pela concentração do 1-pentanol, pelos mesmos motivos da parte 2.8:

Tabela 4- Contaminantes pela concentração na unidade da legislação

Contaminante	Valor de concentração em mg/100ml de álcool etílico anidro (unidade da legislação)
Acetaldeído	Não foi detectado
Acetato de etila	27,71
Metanol	Não houve linearidade
2-butanol	Não foi detectado
1-propanol	71,02
2-metil-1-propanol	66,64
1-butanol	Não foi detectado
3-metil-1-butanol	151,21
Furfural	Não foi detectado

Pode ser visto pela soma dos álcoois superiores que foi obtida uma concentração de 288,87mg/100 ml de etanol anidro, abaixo dos limites da legislação, da mesma maneira que a concentração do furfural e do acetato de etila, caracterizando a garrafa de 51 (Pirassununga) como cachaça não adoçada.

2.11 Fortificação da cachaça (preparação do MRC)

Com as concentrações iniciais da cachaça medida, uma amostra de cachaça foi fortificado para obter concentrações próximas dos limites máximos da legislação e diminuição da incerteza, os valores que estão presentes na tabela abaixo descrevem os limites da legislação para cachaça não adoçada:

Tabela 5- Valores de contaminantes limites máximos para a cachaça não adoçada

Contaminante	Concentração limite superior da legislação em mg/ 100 ml de álcool anidro (unidade da legislação)
Acetaldeído	30
Acetato de etila	200
Metanol	20
2-butanol	Somatória de 360
1-propanol	
2-metil-1-propanol	
1-butanol	
3-metil-1-butanol	
Furfural	5

2.12 Analise do MRC

As concentrações medias das 6 analises apóis a fortificação estão na Tabela 6. As análises foram feitas por GC-FID a temperatura de 20 graus célsius com as mesmas condições cromatográficas usadas na curva de calibração em um período de 2 dias. Os resultados foram tratados para corrigir o volume de injeção com o padrão interno 1-pentanol, os dados foram tratados por teste de pontos fora da curva no caso por teste de Dixon.

Tabela 6- Concentrações do MRC para cachaça não adoçada em unidade da legislação (valor de propriedade do MRC para cada analito)

Analitos	Concentração em mg/ 100 ml de etanol anidro (unidade da legislação)
Acetaldeído	Não foi possível analisar
Acetato de etila	316,77
Metanol	Não apresentou linearidade
Acetonitrila	Padrão interno
2-butanol	60,11
1-propanol	74,62
2-metil-1-propanol	73,36
1-butanol	172,42
3-metil-1-butanol	159,36
1-pentanol	Padrão interno
Furfural	10,24

Na solução de cachaça não adoçada a ser fortificado foi feita a analise de alcoolimetria descrita no Tópico 2.9, a fim de obter o teor alcoólico para determinar a concentração exata dos analitos, depois foi fortificado os analitos de interesse para obter as concentrações próximas da legislação.

2.13 Estimativa de incerteza

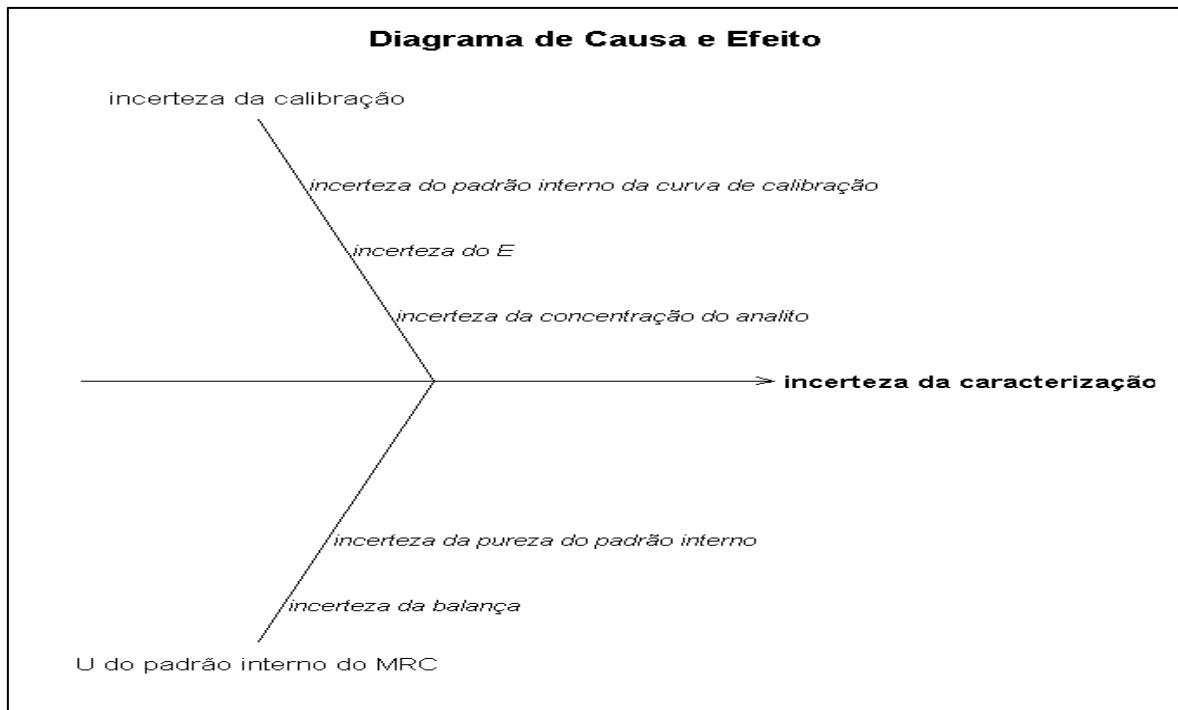


Figura 13- Diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa) para as incertezas da caracterização do MRC (fonte própria).

Para obter as incertezas para cada analito, foram usadas ferramentas como o manual de propagação de incerteza [Eurachem]¹² apresentadas no diagrama de Ishikawa (Figura 13). As incertezas relacionadas para balança já foram calculadas já que tanto a balança como as micropipetas tem seus erros e incertezas avaliados na verificação previamente realizada, sendo destacadas na tabela 7 abaixo:

Tabela 7- Objetos e suas incertezas

Objetos quantificados a incerteza	Incerteza
Balança analítica	0,1398 mg
Micropipeta 1000ul	0,07978%
Micropipeta 100 ul	0,6782%
Micropipeta 10 ul	0,3377%

As incertezas relacionadas á pureza dos reagentes se baseiam numa distribuição retangular sendo assim divididas por $\sqrt{3}$ para obtenção da incerteza padrão. A tabela abaixo mostra a incerteza dos reagentes padrões usados:

Tabela 8- Padrões e suas incertezas de pureza

Padrões	Incerteza da pureza dos reagentes considerando distribuição retangular /%
Acetato de etila	0,28867
Acetonitrila	0,057734
2-butanol	0,28867
1-propanol	0,28867
2-metil-1-propanol	0,28867
1-butanol	0,346404
3-metil-1-butanol	0,86601
1-pentanol	0,57735
Furfural	0,57735

2.13.1 Incerteza relacionada a curva de calibração

A incerteza do padrão interno é a incerteza da balança 0,1398 mg, foi somada a incerteza da pureza do padrão interno, o que resultou em uma media de 6,1055% de incerteza para a curva no uso do padrão interno.

As estimativas de incerteza da concentração do analito pode ser obtido considerando a incerteza da massa do analito + incerteza da pureza dos reagentes + incerteza do volume + incerteza da alcoolimetria.

A incerteza da alcoolimetria foi estima em 1,2% usando a tabela da ANVISA, e o valor de incerteza da micropipeta de 1000 ul.

A incerteza da diluição media para a curva analítica foi estimada como 0,3815% usando o valor da incerteza da micropipeta de 1000ul.

A incertezas da pesagem dos analitos podem ser determinadas pela incerteza da balança dividida pela massa do analito.

A incerteza do valor de E é classificada como incerteza do tipo A onde o valor do desvio padrão / $\sqrt{\text{numero de replicatas}}$. O E usado é o mais próximo da concentração da análise do MRC.

A incerteza da curva de calibração analítica é determinada como a incerteza da concentração + incerteza do padrão interno + a incerteza do termo E.

Tabela 9- Incertezas para cada analito

Analitos	U da massa adicionada/%	U da Concentração /%	U do E/%	U total da curva de calibração/%
Acetato de etila	1,4996	1,9580	1,427	6,569
Furufural	12,7222	12,7841	1,551	14,252
Acetonitrila	Padrão interno	Padrão interno	Padrão interno	Padrão interno
2-butanol	2,8676	3,1318	0,8421	6,9173
1-propanol	3,2639	3,4983	1,1913	7,1368
2-metil-1-propanol	3,1904	3,4298	0,9378	7,0654
1-butanol	2,9946	3,2485	0,1404	6,9173
3-metil-1-butanol	4,0871	4,2766	0,1111	7,4551
1-pentanol	Padrão interno	Padrão interno	Padrão interno	Padrão interno

Nota: U é a incerteza para todas as Tabelas e Figuras.

A incerteza da caracterização do MRC é a incerteza da curva de calibração analítica + incerteza do padrão interno da solução do MRC que é 2,85%.

Tabela 10- Tipo de incerteza para diversas etapas de caracterização do MRC para cachaça não adoçada

Materiais e reagentes	Tipo de incerteza segundo a GUM
Balança	A
Micopipetas	A
Padrões	B
GC-FID	A
Etanol	B

Tabela 11- Incertezas de caracterização, as expandidas e os fatores multiplicadores

Analitos	U da caracterização/%	Fator multiplicação	K de	Incerteza expandida/%
Acetato de etila	7,1606	2,5		17,90
2-butanol	7,47781	2,5		18,69
1-propanol	7,68482	2,5		19,21
2-metil-1-propanol	7,61855	2,5		19,05
1-butanol	7,48141	2,5		18,70
3-metil-1-butanol	7,97195	2,5		19,93
Furfural	14,5341	2,5		36,34

Nota: o uso do fator K=2,5 para todos vem de uma recomendação da norma ABNT ISO GUIA 35 de um fator de multiplicação que garanta pelo menos 95% de probabilidade de retratar a realidade de uma população.

2.13.2 Incerteza da caracterização

As incertezas de caracterização estão na Tabela 11, e as expandidas na Tabela 11. As equações abaixo descrevem de onde vem as incertezas que estão nas tabelas acima.

Área corrigida= $aX + b + E$

Área corrigida= (área de padrão fixa/área de padrão medida na analise). Área do pico do analito.

As incertezas referentes ao (a) e (b) são desprezíveis, as incertezas do E que é o termo de aleatoriedade e determinado como incerteza do tipo A que consiste no desvio padrão das análises/ $\sqrt{5}$, sendo a incerteza do X e da concentração presente na tabela 9, a incerteza da área corrigida foi considerada como a incerteza do padrão interno.

2.14 Certificação do MRC

Para certificar da caracterização do MRC para a cachaça não adoçada usando um método único é necessário à estimativa do valor presente na Tabela 6. Esta é uma estimativa de incerteza na unidade do SI, sendo o valor do R^2 importante para garantir um método com propriedades metrológicas adequadas. Com esses resultados é possível confirmar a parte de caracterização para produção do MRC para cachaça não adoçada, com adequadas informações de rastreabilidade.

3 CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível a caracterização do MRC para cachaça não adoçada. Como resultado tem-se que na caracterização qualitativa foi possível determinar todos os tempos de retenção em matriz de cachaça não adoçada presentes na tabela 2, observando que a matriz não forneceu efeito significante na análise qualitativa da cachaça não adoçada. Na caracterização quantitativa do MRC as concentrações foram estimadas pelo método único sendo apresentados na tabela 6. Não foi possível a análise do acetaldeído por que o pico cromatográfico ficou com sinal muito baixo para análise e do metanol alguns picos

duplicaram não sendo possível sua quantificação. As estimativas de incerteza foram obtidas para os 7 compostos restantes, indicando a viabilidade para dar continuidade na produção de um MRC específico para cachaça não adoçada visando o monitoramento adequado de contaminantes neste produto de grande interesse comercial.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025:** Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

2 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS (ABNT). **NBR ISO 17034:** Requisitos gerais para competência de produtores de material de referência. ABNT, 2017.

3 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS (ABNT). **NBR ISO guia 35:** Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. ABNT, 2012.

4 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS (ABNT). **NBR ISO 9001:** Sistemas de gestão da qualidade- Requisitos. Rio de janeiro: ABNT, 2000.

5 Olivares, Igor R. B., Pinhel, Maria F. M., Moser, Priscila. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Defesa Agropecuária; Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial; Divisão de Ensaios Químicos, 2015.

6 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Guia para expressão da certeza e medição GUM** disponível em <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/gum_final.pdf> aceso: em novembro de 2017.

7 SKOOG, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. **Fundamentos de química analítica.** Norte Americana: Cengage learing, 2006.

8 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Resolução normativa 13** disponível em <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=76202>> aceso: em novembro de 2017.

9 JURAN, J. M. **Juran's Quality Handbook.** 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1999.

10 OLIVARES, I. R. B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios.** Campinas: Átomo, 2015.

11 Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) **ANEXO 8 - ALCOOMETRIA** disponível em <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeabrasileira/arquivos/cp38_2010_anexos/alcoometria.pdf> aceso : em novembro de 2017.

12 ELISON S. L. R; Rosslein M; Wilians A. **Guia EURACHEM/CITAC : determinando a incerteza na medição analítica.** Brasil, 2002.

Referencia de imagens

- 1- <http://www.portalaction.com.br/analise-de-regressao/16-coeficiente-de-determinacao>