UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RHAISSA MECCA BONTEMPI

Desenvolvimento de ensaio de proficiência e produção de material de referência de congêneres orgânicos em vodca e cachaça não adoçada

São Carlos

2021

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

RHAISSA MECCA BONTEMPI

Desenvolvimento de ensaio de proficiência e produção de material de referência de congêneres orgânicos em vodca e cachaça não adoçada

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

São Carlos

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Bontempi, Rhaissa Mecca

Desenvolvimento de ensaio de proficiência e produção de material de referência de congêneres orgânicos em vodca e cachaça não adoçada / Rhaissa Mecca Bontempi. — São Carlos, 2021.

159 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

1. Ferramentas da Qualidade. 2. Material de Referência Certificado. 3. Ensaio de proficiência. 4. Controle de Qualidade. 5. Química Analítica. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não atingiria a conclusão sem o envolvimento e apoio de várias pessoas desde antes, durante o processo e na finalização do mesmo. Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por permitir a realização de tantos sonhos. Agradeço aos meus pais Antonio, Estela, meu irmão Rhennan e a todos meus amigos que me acompanharam nas etapas dentro e fora dos estudos. Agradeço meu orientador, o Professor Doutor Igor Renato Bertoni Olivares, por toda sua paciência e empenho para conquistarmos o final dessa etapa. Agradeço também ao Professor Doutor Vitor Hugo Polisel Paces pelas ajudas e boas conversas que tivemos. Agradeço também aos funcionários do Instituto de Química de São Carlos – SP que foram muito prestativos durante essa minha jornada do mestrado e também da graduação. Agradeço também a Simone S. Nakazone da Companhia Müller de Bebidas por nos ceder o apoio necessário para a realização deste mestrado. Agradeço a parceria com o LFDA-MG na etapa de caracterização dos candidatos a MRC. Agradeço a equipe Conflab com a disponibilização e assessoria para o uso do software de Validação/Verificação e do software para cálculo da incerteza. Agradeço aos laboratórios que participaram do ensaio de proficiência. Agradeço também a USP e ao CNPQ e a FAPESP pelos fomentos fornecidos.

“Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratassem!”

(Marie Curie)

RESUMO

A implantação de Sistemas de Gestão de Qualidade em laboratórios se faz necessária devido à exigência do mercado e de diferentes agências reguladoras. Um dos Sistemas de Gestão da Qualidade mais utilizados por diferentes laboratórios é baseado na norma ISO/IEC 17025. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um ensaio de proficiência (EP) para dois materiais (vodca e cachaça não adoçada) juntamente com o desenvolvimento de materiais de referência certificados (MRC) para estas matrizes. Essas bebidas foram escolhidas pois a vodca é alvo constante de falsificações e a cachaça é um produto genuinamente brasileiro, uma vez que o monitoramento da qualidade destas bebidas apresenta interesses comerciais, de saúde pública e de identidade nacional, além de atender uma demanda do MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Como exigência da ISO/IEC 17025, o uso de MRC é uma importante ferramenta na busca da rastreabilidade metrológica. Para a produção dos materiais deste trabalho, seguiu-se as metodologias estabelecidas no ISO Guia 35:2020, e a partir dos estudos de homogeneidade, estabilidade (longo e curto prazo), caracterização por duas técnicas (GC-FID e GC-MS) e estimativa das incertezas associadas a cada etapa e incerteza combinada expandida, foram produzidos os seguintes materiais certificados: para a matriz vodca temos os analitos acetato de etila ($3,47 \pm 0,75$ mg/100 ml de vodca), metanol ($33,05 \pm 7,42$ mg/100 ml de vodca) e 2-metil-1-propanol ($0,67 \pm 0,27$ mg/100 ml de etanol de vodca) e para a matriz cachaça temos metanol ($37,00 \pm 9,14$ mg/100 ml de cachaça), propanol ($33,39 \pm 8,05$ mg/100 ml de cachaça), 2-metil-1-propanol ($17,01 \pm 1,94$ mg/100 ml de cachaça) e 2-metil-1-butanol ($63,98 \pm 18,84$ mg/100 ml de cachaça). O furfural é apresentado com valor indicativo de ($1,24 \pm 0,13$ mg/100 ml de cachaça) para a matriz cachaça podendo ser utilizado para controle interno dos laboratórios. Juntamente com o desenvolvimento destes materiais foi elaborada e lançada uma rodada do Ensaio de Proficiência (EP) de Congêneres Orgânicos em Bebidas Destiladas e Retificadas onde foram avaliados com estatísticas específicas para um número reduzido de participantes.

Palavras-chave: Ferramentas da Qualidade; Controle de Qualidade; Material de Referência Certificado, MRC, Ensaio de proficiência, EP, ISO/IEC17025:2017, ISO Guia 35:2020, ISO 17043:2011, Química Analítica.

ABSTRACT

The implementation of Quality Management Systems in laboratories is necessary due to market demands and different regulatory agencies. One of the most used Quality Management Systems by different laboratories is based on the ISO/IEC 17025 standard. The objective of this work was the development of a proficiency test (PT) for two materials (vodka and unsweetened cachaça) together with the development of certified reference materials (CRM) for these matrices. These drinks were chosen because vodka is a constant target of counterfeits and cachaça is a genuinely Brazilian product, since monitoring the quality of these drinks presents commercial, public health and national identity interests, in addition to meeting a demand from the MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply). As required by ISO/IEC 17025, the use of CRM is an important tool in the pursuit of metrological traceability. For the production of the materials for this work, the methodologies established in ISO Guide 35:2020 were followed, and from studies of homogeneity, stability (long and short term), characterization by two techniques (GC-FID and GC-MS) and estimation of the uncertainties associated with each step and expanded combined uncertainty, the following certified materials were produced: for the vodka matrix we have the analytes ethyl acetate (3.47 ± 0.75 mg/100 ml of vodka), methanol (33.05 ± 7.42 mg/100 ml of vodka) and 2-methyl-1-propanol (0.67 ± 0.27 mg/100 ml of vodka ethanol) and for the cachaça matrix we have methanol (37.00 ± 9.14 mg/100 ml of cachaça), propanol (33.39 ± 8.05 mg/100 ml of cachaça), 2-methyl-1-propanol (17.01 ± 1.94 mg/100 ml of cachaça) and 2-methyl-1-butanol (63.98 ± 18.84 mg/100 ml of cachaça). Furfural is presented with an indicative value of (1.24 ± 0.13 mg/100 ml of cachaça) for the cachaça matrix and can be used for internal control of laboratories. Along with the development of these materials, a round of the Proficiency Test (PT) of Organic Congeners in Distilled and Rectified Drinks was elaborated and launched, where they were evaluated with specific statistics for a small number of participants.

Keywords: Quality Tools; Quality control; Certified Reference Material, CRM, Proficiency testing, PT, ISO 17025:2017, ISO Guide 35:2020, ISO 17043:2011, Analytical chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo AQAC da garantia da qualidade.....	22
Figura 2 – Mecanismo da hidrólise de pectina para a formação de metanol.	32
Figura 3 – Curva de destilação do acetato de etila, concentração por tempo.	34
Figura 4 – Mecanismo de reação da desidratação catalisada por ácido de pentose em furfural.	34
Figura 5 - Curva de destilação do furfural, concentração por tempo.	35
Figura 6 – Estrutura química dos álcoois superiores (propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol).	35
Figura 7 – Fluxograma dos processos para a produção de MR seguindo a ISO Guia 35:2020.	43
Figura 8 – Procedimento para análise quantitativa dos analitos.	46
Figura 9 – Interpolação para estimar a massa desconhecida do analito em estudo.	47
Figura 10 – Comportamento das Incertezas de acordo com a forma de regressão (ponderada e ordinária respectivamente).	50
Figura 11 - Esquematização do ensaio da homogeneidade segundo a ABNT/ISO Guia 35:2020.	55
Figura 12 – Abordagem de Horwitz para o cálculo do desvio padrão do ensaio de proficiência.	67
Figura 13 - Separação cromatográfica obtida após otimização do GC-FID.	72
Figura 14 – Composição das soluções estoque A e B para a construção da curva de calibração.	73
Figura 15 – Construção dos cinco níveis da curva de calibração.	74
Figura 16 - Cromatograma representativo referente à análise da cachaça real.	83
Figura 17 - Cromatograma representativo referente à análise da vodca real.	83
Figura 18 – Apresentação dos 200 frascos de MRC prontos, 100 para a cachaça e 100 para a vodca.	86
Figura 19 – Esquematização da condução do estudo da homogeneidade.	87
Figura 20 - Esquematização do estudo de estabilidade à longo prazo.	89
Figura 21 – Avaliação de tendência do analito acetato de etila no candidato a MRC da cachaça.	90
Figura 22 – Avaliação de tendência do analito metanol no candidato a MRC da cachaça.	91
Figura 23 – Avaliação de tendência do analito propanol no candidato a MRC da cachaça.	91
Figura 24 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-propanol no candidato a MRC da cachaça.	91
Figura 25 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-butanol no candidato a MRC da cachaça.	92
Figura 26 – Avaliação de tendência do analito furfural no candidato a MRC da cachaça.	92
Figura 27 – Avaliação de tendência do analito acetato de etila no candidato a MRC da vodca.	93
Figura 28 – Avaliação de tendência do analito metanol no candidato a MRC da vodca.	93

Figura 29 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-propanol no candidato a MRC da vodca.....	93
Figura 30 – Esquema da condução do estudo de estabilidade a curto prazo.	95
Figura 31 - Cromatograma representativo referente ao candidato a MRC da cachaça por GC-FID.....	97
Figura 32 - Cromatograma representativo referente ao candidato a MRC da vodca por GC-FID.....	97
Figura 33 - Diagrama de Ishikawa para identificar as principais fontes de incerteza relacionadas à caracterização dos candidatos a MRC por GC-FID.	99
Figura 34 – Fontes de contribuição da incerteza do analito Metanol calculadas pelo software.....	100
Figura 35 - Gráfico comparativo entre as fontes de incerteza que compõem a incerteza combinada de uma das etapas de caracterização.....	100
Figura 36 - Comparação das incertezas associadas ao estudo de caracterização do candidato a MRC da cachaça.	105
Figura 37 - Comparação das incertezas associadas ao estudo de caracterização do candidato a MRC da vodca.	106
Figura 38 - Comparativo da contribuição de cada estudo realizado para a incerteza combinada do MRC da cachaça.	109
Figura 39 - Comparativo da contribuição de cada estudo realizado para a incerteza combinada do MRC da vodca.	110
Figura 40. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Metanol.....	113
Figura 41. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Propanol.	114
Figura 42. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 2-metil-1-propanol.	115
Figura 43. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 2-metil-1-butanol.	116
Figura 44. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Furfural.	117
Figura 45. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 Metanol.	118
Figura 46. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 Acetato de Etila..	119
Figura 47. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 2-metil-1-propanol.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Congêneres avaliados pela IN-13/2005 e seus limites estabelecidos pelo MAPA.	31
Tabela 2 - Contaminantes avaliados pela IN-13/2005 e seus limites estabelecidos pelo MAPA.	32
Tabela 3 - Comparação dos limites máximos permitidos pelas legislações brasileira e europeia.	36
Tabela 4 - Critério de aceitação dos parâmetros para a validação do método.....	54
Tabela 5 – Cálculo para ANOVA entre e dentre amostras.	57
Tabela 6 – Avaliação de desempenho do Índice Z.....	67
Tabela 7 - Avaliação de desempenho do Índice En.	68
Tabela 8 – Condições operacionais do cromatógrafo para as análises no GC-FID. .	71
Tabela 9 - Tempos de retenção aproximados dos analitos na condição cromatográfica considerada ideal em solvente 40% etanol.	72
Tabela 10 – Níveis de concentração dos analitos presentes na primeira curva de calibração.	75
Tabela 11 – Resultados dos testes estatísticos para as curvas de calibração por GC-FID para os analitos na primeira curva de calibração.	76
Tabela 12 – Níveis de concentração dos analitos presentes na segunda curva de calibração.	77
Tabela 13 - Resultados dos testes estatísticos para as curvas de calibração por GC-FID para os analitos na segunda curva de calibração.....	78
Tabela 14 - Parâmetros para a validação do método RQA-USP (GC-FID).....	80
Tabela 15 - Resultados da quantificação do <i>background</i> da cachaça.	82
Tabela 16 - Resultados da quantificação do <i>background</i> da vodca.	82
Tabela 17– Resultados do estudo de homogeneidade da cachaça.	87
Tabela 18– Resultados do estudo de homogeneidade da vodca.....	88
Tabela 19- Avaliação de tendências à degradação do candidato a MRC da cachaça.	90
Tabela 20 - Avaliação de tendências à degradação do candidato a MRC da vodca.	92
Tabela 21 – Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira para o candidato a MRC da cachaça.	94
Tabela 22 - Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira para o candidato a MRC da vodca.	94
Tabela 23 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-FID.	98
Tabela 24 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca por GC-FID.	98
Tabela 25 – Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-FID.....	101
Tabela 26 – Condições operacionais do cromatógrafo para as análises no GC-MS.	102
Tabela 27 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-MS.....	103
Tabela 28 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca por GC-MS.....	103

Tabela 29 - Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-MS para candidato da cachaça.	103
Tabela 30 - Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-MS para candidato da vodca.	104
Tabela 31 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça.	104
Tabela 32 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca.	104
Tabela 33 - Incertezas combinadas de caracterização para cada analito avaliado do candidato a MRC da cachaça.	106
Tabela 34 - Incertezas combinadas de caracterização para cada analito avaliado do candidato a MRC da vodca.	107
Tabela 35– Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC da cachaça.	108
Tabela 36 – Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC da vodca.	108
Tabela 37 – Valores certificados para o MRC da cachaça.	111
Tabela 38 – Valores certificados para o MRC da vodca.	111
Tabela 39 - Descrição dos MRC fornecidos para a rodada do EP.	112
Tabela 40. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 metanol.	113
Tabela 41. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 propanol.	114
Tabela 42. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 2-metil-1-propanol.	115
Tabela 43. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 2-metil-1-butanol.	116
Tabela 44. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 furfural.	117
Tabela 45. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 metanol.	118
Tabela 46. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 acetato de etila.	119
Tabela 47. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 2-metil-1-propanol.	120

LISTA DE SÍMBOLOS

tR : tempo de retenção	α : número de grupos
r: coeficiente de correlação	n _i : número de membros no grupo
CV: coeficiente de variação	n ₀ : número total de medições consideradas na ANOVA
$\hat{y}$: resíduos em y	y ₀ : valor inicial da propriedade
SQres: soma dos desvios quadrados	k: fator de expansão
$\bar{y}$: média dos sinais instrumentais	Y _{ij} resultado de uma medição individual
CA: concentração a ser determinada	A _j : erro relacionado à variabilidade dos resultados entre os frascos
b: coeficiente linear	ξ_{ij} : erro aleatório relacionado a medição
a: coeficiente angular	$\bar{Y}$: média das médias
AA: área do analito	α : número de grupos
API: área do padrão interno	n _i : número de membros no grupo
CPI: concentração do padrão interno	MQwb: média quadrática entre as replicatas de um mesmo frasco
G: valor crítico de Grubbs	MQbb: média quadrática entre frascos
$\bar{x}$: média de x	sbb: desvio-padrão entre as unidades
s: desvio-padrão	uest : estabilidade a longo prazo
Q: valor crítico de Dixon	uchar é a incerteza da caracterização combinada
G: valor crítico de Grubbs	ubb: componente da incerteza devido à homogeneidade
LQ: limite de quantificação	n ₀ : número total de medições consideradas na ANOVA
C: Teste de Cochran	$t_{0,95, n-2}$: fator t para uma probabilidade de 95% e graus de liberdade n-2
S ² max: diferença entre dois resultados de um único laboratório	u ² CFID: incerteza relacionada a caracterização GC-FID
ΣS^2 : soma dos intervalos	u ² CMS: incerteza relacionada a caracterização GC-MS
$\bar{y}$: média de y	u ² desv.pad: desvio padrão entre os resultados do GC-FID e do GC-MS
w _i : peso atribuído a regressão.	n _i : número de replicatas
F: Anova Teste F	α : número de técnicas utilizadas
SS: soma dos quadrados	s: desvio-padrão entre as medições
n: número de pontos de calibração	V _{eff} : graus de liberdade efetivos

p : número de medições para
determinação da concentração na
amostra

Y_{ij} : resultado da medição individual

μ : valor médio de todos os frascos
que tiveram exatamente o mesmo
resultado

U : incerteza expandida

$u(x_i)$: incerteza padrão do
laboratório participante

$u(x_{ep})$: incerteza do valor atribuído
 x_{ep}

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Gestão da qualidade e a ISO/IEC 17025	21
1.2	Ensaio intralaboratorial, interlaboratorial e de proficiência no controle da qualidade	23
1.3	Uso de materiais de referência certificados no controle da qualidade	25
1.4	Bebida destilada: cachaça	26
1.5	Bebida destilado-retificada: vodca	28
2	OBJETIVOS	30
3	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	30
3.1	Congêneres e contaminantes estudados	30
3.1.1	Congêneres e contaminantes presentes na cachaça	31
3.1.1.1	Metanol	32
3.1.1.2	Acetato de Etila	33
3.1.1.3	Furfural	34
3.1.1.4	Álcoois superiores	35
3.2	Congêneres e contaminantes presentes na vodca	36
3.3	Cromatografia Gasosa	37
3.3.1	Introdução e princípios básicos	37
3.3.2	Coluna cromatográfica	39
3.3.3	Gás de arraste	39
3.3.4	Injeção da amostra	40
3.3.5	Detectores	40
3.4	Etapas para produção dos candidatos a MRC	42
3.5	Definição dos candidatos a MRC (cachaça e vodca)	43
3.6	Aquisição de Materiais (Amostragem)	44
3.7	Preparo dos candidatos a MRC	44
3.7.1	Análise qualitativa e condições operacionais	45
3.7.2	Análise quantitativa e construção da curva de calibração	46
3.7.3	Uso do padrão interno	46
3.7.4	Tratamento estatístico de outliers	48
3.7.5	Validação do método para a quantificação dos analitos presentes na cachaça e na vodca - Curva de Calibração	49
3.7.6	Validação do método para a quantificação dos analitos presentes na cachaça e na vodca	53

3.8	Estudo da homogeneidade	54
3.9	Estudos de estabilidade	58
3.9.1	Avaliação de Tendências	61
3.10	Caracterização	62
3.11	Cálculo da incerteza expandida do MRC	63
3.12	Elaboração da Ficha de informação do MR e do certificado para MRC e dos respectivos rótulos	65
3.13	Elaboração do Ensaio Interlaboratorial	66
4	DESENVOLVIMENTO	69
4.1	Método RQA-IQSC-USP (GC-FID)	69
4.1.1	Materiais e instrumentos	69
4.1.2	Preparo dos candidatos a MRC	70
4.1.2.1	Análise qualitativa e condições operacionais	70
4.1.2.2	Construção das curvas de calibração	73
4.1.2.3	Avaliação das curvas aplicadas na quantificação dos compostos encontrados naturalmente na cachaça e na vodca	74
4.1.2.4	Avaliação do método RQA-USP (GC-FID)	79
4.1.2.5	Quantificação dos contaminantes naturalmente presentes nas amostras de cachaça e vodca (background)	81
4.1.2.6	Fortificação das amostras de bebidas reais (spiking)	85
4.2	Estudos da Homogeneidade (Método RQA-IQSC-USP)	86
4.3	Estudos da Estabilidade (Método RQA-IQSC-USP)	88
4.3.1	Estabilidade a longo prazo	88
4.3.1.1	Avaliação de tendências à degradação	89
4.3.2	Estabilidade a curto prazo	95
4.4	Caracterização e estimativa das incertezas relacionadas aos candidatos a MRC	96
4.4.1	Método RQA-IQSC-USP (GC-FID)	96
4.4.2	Estimativa das incertezas relacionadas à caracterização dos candidatos a MRC por GC-FID	99
4.4.3	Método LFDA-MG (GC-MS)	101
4.4.3.1	Materiais e instrumentos	101
4.4.3.2	Caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-MS e incerteza associada	102
4.4.4	Designação do valor de propriedade e incerteza da caracterização dos candidatos a MRC	104
4.5	Estimativa da incerteza expandida dos candidatos a MRC	107

4.6	Certificado do MRC	111
4.7	Ensaio de proficiência: realização e resultados	111
5	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXO I – Certificados dos padrões analíticos utilizados na validação do GC-FID	131
	ANEXO II – Resultados estatísticos obtidos pelo software Conflab das curvas de calibração dos analitos em estudo	141
	ANEXO III – Certificados dos padrões analíticos utilizados na validação do GC-MS	148
	ANEXO VI – Certificado dos MRCs produzidos	153
	ANEXO V – Ficha de informação do MR produzido	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gestão da qualidade e a ISO/IEC 17025

Para entender a importância da Gestão de Qualidade e seus conceitos se faz necessário traçar uma trajetória da evolução dos processos de fabricação e comercialização de novos produtos ao longo da história. Nos períodos que antecedem a Revolução Industrial, a produção era majoritariamente artesanal, em que o produtor detinha o controle máximo da produção. Desde a escolha da matéria prima até as relações com o cliente o artesão se tornava responsável pela qualidade de seus produtos (OLIVARES, 2019).

A Revolução Industrial mudou o foco do controle de qualidade, que antes se encontrava no produto e passou a ser no processo, substituindo a customização pela padronização alcançada graças à produção em larga escala, ao qual retirou do trabalhador o controle total da produção através da fragmentação do trabalho (CARVALHO; PALADINI, 2005).

A necessidade do surgimento da inspeção e da metrologia na fabricação mostrou-se como caminho para o desenvolvimento dos conceitos de Gestão de Qualidade. Foi com o fim da Segunda Guerra Mundial (1945), que o Japão devastado passou a se engajar no modelo de alta produtividade Taylorista e a aplicar os fundamentos pesquisados por Deming e Juran alcançando a reestruturação econômica do país, e assim a área de Gestão de Qualidade foi difundida (CORTADA; QUINTELLA, 1994).

Em 1947 ocorreu a união de duas organizações de padronização, a ISA (*International Federation of the National Standardizing Associations*) e a UNSCC (*United Nations Standards Coordinating Committee*), essa união fez surgir a ISO (*International Organization for Standardization*) que se tornou a referência mundial para aplicação do Sistema de Gestão de Qualidade de forma padronizada.

Apesar da série ISO ser aplicada de forma voluntária pelas empresas, esta passou a ser exigência para muitas cadeias produtivas. Além de que no contexto atual do mundo globalizado e de alta competitividade no mercado faz-se extremamente

necessário um Sistema de Gestão de Qualidade, que segundo Juran, é o sistema na qual o produto deve ser produzido para atender as necessidades e expectativas do cliente (JURAN, 1991).

Uma vez que o Sistema de Gestão de Qualidade atua sobre a totalidade de um empreendimento somado pela primordialidade da garantia de resultados confiáveis de um laboratório, a adesão deste sistema para laboratórios se fez essencial. Havendo assim normas próprias para instauração do Sistema de Gestão de Qualidade em laboratórios, como a BPL (Boas Práticas de Laboratório) e a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017a).

Em relação aos requisitos técnicos apresentados na norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017, aqueles que constituem o ciclo AQAC (*Analytical Quality Assurance Cycle*) devem ser ressaltados, sendo eles: validação do método, estimativa da incerteza e controle de qualidade, presentes na Figura 1 abaixo (OLIVARES; LOPES, 2012).

Figura 1 - Ciclo AQAC da garantia da qualidade.

Fonte: OLIVARES (2019).

A validação do método (I), apresentada no item 7.2 da NBR ISO/IEC 17025:2017, avalia se um método é adequado ao uso a que se pretende. A estimativa da incerteza (II), apresentada no item 7.6 NBR ISO/IEC 17025:2017 avalia o nível de confiança de um resultado podendo utilizar os dados obtidos na etapa de validação.

Enquanto o controle de qualidade (III), apresentado no item 7.7 da NBR ISO/IEC 17025:2017, avalia a validade dos resultados obtidos após as etapas de validação e estimativa de incerteza, monitorando o método e fornecendo dados que podem ser incorporados aos de validação.

Podemos ver que no ciclo estão inseridos os campos de ensaios intralaboratorial, interlaboratorial e de proficiência (EP) como mecanismos de controle da qualidade, dos resultados previstos na NBR ISO/IEC 17025:2017. Esses ensaios serão descritos no próximo tópico (OLIVARES, 2019).

1.2 Ensaios intralaboratorial, interlaboratorial e de proficiência no controle da qualidade

Os ensaios intralaboratoriais são comumente aplicados como alternativa mais rápida e por vezes mais baratas que os ensaios de proficiência. Eles são desenvolvidos dentro do próprio laboratório por meio da determinação da repetibilidade em conjunto com as combinações de instrumentos analíticos, analistas, preparo de amostras, condições ambientais entre outras, além de que esses dados podem ajudar a estimar a precisão intermediária (BRASIL, 2014).

Os materiais utilizados em um ensaio intralaboratorial são: amostras brancas, amostras fortificadas, material de referência (MR) ou material de referência certificado (MRC). As amostras brancas servem para identificar se há contaminações no método aplicado, essas amostras não fornecem dados para precisão e nem para exatidão/tendência. As amostras fortificadas são preparadas no próprio laboratório, neste caso há a chance de haver algum erro do analista que preparou a amostra. O ideal para esse tipo de ensaio é a aplicação de materiais de referência e/ou materiais de referência certificados (OLIVARES, 2019).

Já as comparações interlaboratoriais visam a realização e avaliação de medições ou ensaios nos mesmos ou em itens similares por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições predeterminadas. Esse ensaio engloba diferentes laboratórios e pode ser utilizado para diversos fins, como: avaliação de desempenho

para ensaios ou medições, monitoramento de desempenho contínuo, identificação de problemas, exatidão/tendência de uma medição (com uso de um Material de Referência na realização do interlaboratorial), confiança para os clientes, reprodutibilidade, entre outros. Outra característica deste ensaio é a atribuição de valores para materiais de referência e avaliar sua adequação para uso (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011).

O ensaio de proficiência é uma comparação interlaboratorial que tem por objetivo a avaliação do desempenho do participante contra critérios preestabelecidos. De acordo com a “ABNT NBR ISO/IEC 17043 - Avaliação de conformidade - Requisitos gerais para ensaios de proficiência” os ensaios de proficiência não cobrem algumas aplicações, pois a competência do laboratório é assumida para esses casos, como:

- avaliação das características de desempenho de um método - geralmente descrita como estudos interlaboratoriais;
- atribuição de valores para materiais de referência e avaliação de sua adequação para uso em ensaios ou procedimentos de medição específicos e
- embasamento das declarações da equivalência de medições dos Institutos Nacionais de Metrologia e organizações regionais de metrologia associadas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011).

Segundo a “ABNT NBR ISO/IEC 17011 - Avaliação da conformidade - Requisitos para os organismos de acreditação que acreditam organismos de avaliação da conformidade”, a confiança no desempenho do laboratório é vital para o cliente e também para os órgãos reguladores e acreditadores. É exigido pelos órgãos de acreditação que estes observem a participação e o desempenho dos laboratórios nos ensaios interlaboratoriais e/ou proficiência (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2019).

O laboratório que participar de um ensaio interlaboratorial ou de um ensaio de proficiência terá múltiplos benefícios, como por exemplo:

- obterá uma avaliação externa da qualidade de seus resultados de ensaios e calibrações;
- poderá comparar o seu desempenho com o de outros laboratórios semelhantes;
- os dados obtidos ajudam na implementação de ações preventivas para melhoria dos procedimentos e métodos do laboratório e
- o laboratório poderá obter orientação sobre problemas analíticos e nos procedimentos de medição e calibração do fornecedor do ensaio interlaboratorial.

1.3 Uso de materiais de referência certificados no controle da qualidade

Por definição pela ABNT NBR ISO Guia 30:2016, Termos e definições relacionados com materiais de referência temos:

- MR, material de referência é *“um material suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição”* e
- MRC, material de referência certificado é *“um material de referência (MR) caracterizado por um procedimento metrologicamente válido para uma ou mais propriedades especificadas, acompanhado de um certificado que fornece o valor de propriedade especificada, sua incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica”*.

Para a criação de um MRC é necessário planejamento visando verificar a quantidade de material para os estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização. Neste planejamento também têm que levar em consideração o método de medição, a quantidade de MRC que deseja produzir e a quantidade de matéria prima necessária. A descrição de toda avaliação estatística necessária para

preparação de um MRC está no guia ABNT NBR ISO Guia 35:2020 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020).

1.4 Bebida destilada: cachaça

A origem da cachaça é contada ao longo da história do Brasil, apesar dos historiadores não terem um consenso sobre a origem exata de sua criação, acredita-se que a cachaça tenha sido destilada pela primeira vez no litoral do Brasil em meados do século XVI, sendo uma descoberta dos escravos a partir da fermentação de um dos subprodutos do açúcar. Desde então a bebida acompanha a história do país (NOVO, 2011).

No começo, sua produção era maior que o consumo, sendo consumida por sua maioria por pessoas a margem da sociedade da época. Nessa época não havia nenhuma padronização e controle na produção, foi em meados de 1945, com o fim da segunda guerra mundial que o panorama da produção da cachaça começou a perder o caráter familiar e passou a ter a aplicação de tecnologia com o surgimento da indústria (VENTURINI FILHO, 2016).

Em 1996 a cachaça foi regularizada como produto tipicamente brasileiro e a intuito de curiosidade, no dia 24 de outubro de 2017 foi aprovado o projeto de lei n.º 5.428-B, de 2009 que institui o dia 13 de setembro como o Dia Nacional da Cachaça (BRASIL, 2009b).

Atualmente o Brasil conta com cerca de 40 mil produtores de cachaça, sendo que 98% deles correspondem a pequenos e microempresários, o que gera cerca de 600 mil empregos direta e indiretamente, com uma capacidade produtiva de 1,4 bilhões de litros. Com o título de terceiro destilado mais consumido do mundo, a exportação da cachaça gerou um valor de cerca de 13,9 milhões de dólares no ano de 2016 (AGÊNCIA BRASILEIRA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS, 2016).

De acordo com os dados divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio do AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro, no primeiro semestre de 2020 a cachaça foi exportada para 52 países e moveram cerca de US\$ 4.570.033. Se comparado com o primeiro semestre de 2019 que foi de US\$ 6.830.150 houve uma queda de 33,09%, que pode ser justificada com a crise mundial gerada pela pandemia do COVID-19. O principal comprador é a Alemanha com US\$ 757.717 seguida dos Estados Unidos com US\$ 725.365 (BRASIL, 2020).

Com o reconhecimento da cachaça pelo mercado externo, o controle de qualidade da bebida foi impulsionado. Os requisitos de qualidade e os limites máximos da composição química para a cachaça no Brasil estão determinados pela Instrução Normativa nº 13 de 2005, a IN-13/2005 (Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça).

De acordo com a Legislação Brasileira, a IN-13/2005: “a denominação cachaça se refere à aguardente de cana-de-açúcar típica e exclusiva produzida no Brasil, com graduação alcoólica entre 38 e 48% em volume a 20°C. É obtida pela destilação do mosto fermentado da planta, pode conter no máximo 6 gramas de açúcar a cada litro e apresenta características sensoriais únicas. Já a aguardente de cana possui graduação alcoólica de 38 a 54% em volume a 20°C também é obtida da destilação do mosto fermentado da planta e também possui a mesma quantidade de açúcar definida para a cachaça” (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005).

Pode se notar que as definições de ambas se cruzam, e para melhor entendimento pode se afirmar que: *“toda cachaça é aguardente, mas nem toda aguardente é cachaça”*.

Para a fabricação da cachaça é necessário a fermentação alcoólica do mosto da cana-de-açúcar e seguida da destilação do mosto fermentado conhecido como vinho. O vinho tem a composição de aproximadamente 88 a 93% de água e apenas 7 a 12% de etanol. Pode-se detectar baixas concentrações de congêneres como: ácidos, ésteres, furfural, álcool amílico, isoamílico, propílico, butílico, entre outros. Após a destilação do vinho, há a formação de duas frações: flegma que é o destilado em si e a vinhaça que é o resíduo não destilado (VENTURINI FILHO, 2016).

A destilação é executada em colunas e a separação dos componentes secundários é alcançada através da retirada dos vapores em alturas determinadas na coluna de acordo com a natureza destes componentes. Para produzir a cachaça são escolhidas colunas de baixo grau ou colunas de esgotamento, estas colunas geram destilados com teor alcoólico de 35 a 65% de etanol. O nível de graduação alcoólica obtida nos destilados é diretamente proporcional ao número de pratos superpostos, ou seja, quanto maior o número de pratos de uma coluna maior sua capacidade de concentração alcoólica (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Desta maneira evidencia-se a importância e o interesse nacional no controle da qualidade da cachaça produzida, enquanto os materiais de referência certificados podem se apresentar como ferramentas fundamentais de calibração, controle de qualidade, validação de método, atribuição de valores de propriedade e comparações interlaboratoriais (OLIVARES, 2019).

Em 2005 o INMETRO desenvolveu um MRC para a cachaça (CRM 02.1/10.003b) com o intuito de contribuir com os laboratórios que analisam a bebida, porém não está mais disponível, além das concentrações serem distantes dos limites máximos permitidos, e não especificava as concentrações de todos os componentes regulados pela IN-13/2005, reforçando a demanda para o desenvolvimento de um MRC para a cachaça.

1.5 Bebida destilo-retificada: vodca

A vodca é a bebida destilo-retificada mais consumida no mundo, teve sua origem na Polônia e na Rússia por volta do século XIV. No ano de 1894, por meio de um decreto do governo russo, a vodca se tornou monopólio do país, passando assim a ter seu método de produção padronizado e garantindo uma qualidade uniforme para a bebida (VENTURINI FILHO, 2016).

Segundo a lei brasileira nº 8.918 de 14/07/1994 regulamentada pelo Decreto nº 6871 de 04/07/2009, define as bebidas alcoólicas retificadas no capítulo V, e a seção 1 descreve a vodca como: *“vodca, ‘vodka’ ou ‘wodka’ é a bebida com graduação*

alcoólica de 36 a 54% em volume, a 20°C, obtida de álcool etílico potável de origem agrícola, ou de destilados alcoólicos simples de origem agrícola retificados, seguidos ou não de filtração por meio de carvão ativo (...) e adicionada de açúcares até 2 gramas por litro.”(BRASIL, 2009a)

A vodca em 2018 encontrou-se em quinto lugar como a bebida mais consumida no Brasil, foram consumidos cerca de 60,6 mil litros. No mundo cerca de 3 milhões de litros foram consumidos em 2017. O país que mais consome é a Rússia seguida dos EUA e Polônia (LAPORTA, 2018).

O processo para a fabricação da vodca inicia-se pela fermentação de produtos de origem agrícola podendo ser de natureza açucarada ou amilácea¹ para a formação do álcool etílico potável que posteriormente é destilado. Durante a destilação, há uma possível perda de álcool por evaporação e para evitar isso faz-se o enriquecimento desses vapores com sucessivas vaporizações e condensações, para isso utiliza-se uma coluna de retificação. Essa coluna além de aumentar a concentração alcoólica também purifica o destilado. A coluna de retificação consiste em uma torre com pratos internos seriados, onde os vapores sobem por meio desses pratos e ao mesmo tempo os líquidos descem. E por fim filtradas em carvão ativado afim de se retirar impurezas e qualquer sabor e odor residual (VENTURINI FILHO, 2016).

A vodca é um produto alvo de falsificações, em virtude do alto valor agregado às marcas importadas e seu consumo popularizado no Brasil. Em estudo realizado pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo foram testadas amostras de diversas bebidas alcoólicas e a vodca foi uma das que possuem maior número de falsificações no mercado. (NAGATO et al., 2001) Como não há inspeção na fabricação de um produto falsificado, os contaminantes e congêneres supracitados podem estar em concentrações acima dos limites determinados pela IN-13/2005 (CORRÊA, 2019).

De forma a apresentar risco à saúde dos consumidores, a falsificação pode ser monitorada a partir da análise da concentração desses analitos, tornando assim necessária a produção de um Material de Referência Certificado para esta matriz (GARONCE, 2018).

¹ Vegetais fontes de amido (carboidratos). O amido pode ser extraído das partes amiláceas de cereais como ex: arroz, trigo, aveia, milho, e raízes como mandioca ou tubérculos como batata e batata doce.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi o desenvolvimento de um ensaio de proficiência (EP) para dois materiais (vodca e cachaça não adoçada) juntamente com o desenvolvimento de materiais de referência certificados (MRCs) para estes. Com base neste objetivo principal, têm-se os seguintes objetivos específicos:

- i. Desenvolver e aplicar os estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização, baseados na ISO GUIA 35:2020, visando a produção de MRC para a matriz cachaça e vodca.
- ii. Desenvolver e aplicar um ensaio interlaboratorial visando utilizar os resultados para a etapa de caracterização dos MRCs bem como realizar a avaliação de desempenho dos laboratórios participantes por um Ensaio de Proficiência para congêneres orgânicos comumente presentes em bebidas alcoólicas destiladas ou retificadas e
- iii. Distribuir os MRCs produzidos aos laboratórios do LFDA (Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária) e a entidades associadas à ABRABE (Associação Brasileira de Analistas de Bebidas) a fim de realizar o controle interno da qualidade para essas bebidas.

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Congêneres e contaminantes estudados

Com exceção do etanol e da água, as demais substâncias presentes na cachaça são classificadas em congêneres ou contaminantes. Congêneres se formam naturalmente durante o processo de fabricação sendo derivados do mesmo grupo dos compostos iniciais do processo e são responsáveis pelo aroma e sabor da bebida. Já os contaminantes vêm de fonte externa do processo, como por exemplo do alambique

em que o produto foi armazenado ou até mesmo da matéria-prima utilizada (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005; NYKÄNEN, 1986).

3.1.1 Congêneres e contaminantes presentes na cachaça

A Tabela 1 apresenta os congêneres e seus limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a cachaça (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005).

Tabela 1 - Congêneres avaliados pela IN-13/2005 e seus limites estabelecidos pelo MAPA.

Congêneres	Limite (concentração máxima permitida expressa em mg/100 mL de álcool anidro)	
	Mínimo	Máximo
Acidez volátil em ácido acético	-	150
Ésteres, em acetato de etila	-	200
Aldeídos, em acetaldeído	-	30
Carbamato de etila	-	150
Furfural + Hidroximetilfurfural	-	5
Álcoois superiores*	-	360
Congêneres**	200	650

*Álcoois superiores = soma dos álcoois isobutilico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol). **Congêneres = (Acidez Volátil + Ésteres + Aldeídos + (Furfural + Hidroximetilfurfural) + Álcoois Superiores). Fonte: Adaptado de Brasil (2005).

A Tabela 2 apresenta os contaminantes orgânicos e inorgânicos e seus limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para a cachaça (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005).

Tabela 2 - Contaminantes avaliados pela IN-13/2005 e seus limites estabelecidos pelo MAPA.

Contaminantes	Limite (concentração máxima permitida)	
	Unidade	Máximo
Álcool metílico (metanol)	mg/100 mL de álcool anidro	20
Álcool sec-butílico (2-butanol)	mg/100 mL de álcool anidro	10
Álcool n-butílico (1-butanol)	mg/100 mL de álcool anidro	3
Acroleína (2-propenal)	mg/100 mL de álcool anidro	5
Cobre	µg/100 mL de bebida	5
Arsênio	µg/100 mL de bebida	200
Chumbo	µg/100 mL de bebida	100

Fonte: Adaptado de Brasil (2005).

O controle desses componentes se faz necessário para assegurar a saúde do consumidor, uma vez que em concentrações elevadas podem ser tóxicas para o ser humano.

3.1.1.1 Metanol

Os subprodutos do processo de fermentação e/ou de destilação são: metanol, carbamato de etila, 1-butanol e 2-butanol, referem-se aos compostos secundários com toxicidade prejudicial à saúde. Temos como exemplo o metanol, que em altas doses pode causar morte por acidulose grave (BARCELOS et al., 2007).

O metanol é produzido a partir da hidrólise da pectina presente naturalmente na cana de açúcar, como ilustrado na Figura 2. Há casos de intoxicação seguida de morte em cachaças clandestinas no estado da Bahia, em 1989, e 4 casos fatais entre dezembro de 1992 a janeiro de 1993, na região do ABC, na Grande São Paulo (CARUSO; NAGATO; ALABURDA, 2010).

Figura 2 – Mecanismo da hidrólise de pectina para a formação de metanol.

Fonte: Adaptado de OHIMAIN, 2015.

O metanol tem seu principal efeito tóxico no sistema nervoso, diretamente nos nervos ópticos e na retina. Essa decorrência sobre os olhos é concedida a neurite óptica, prosseguindo para atrofia do nervo óptico. O metanol possui lenta eliminação pelo organismo e com efeito cumulativo. Em pequenas exposições os sintomas podem ser fraqueza, náuseas, dores de cabeça, fadiga, turvação da vista, fotofobia, conjuntivite e na pele pode ocasionar aspecto seco e quebradiço (PEREIRA; ANDRADE, 1998).

Estudos mostram que o teor de aldeídos totais e metanol é maior em alambiques de cobre. Já para os ésteres e álcoois superiores são mais presentes em alambiques de aço inox. A formação dos aldeídos no alambique de cobre é favorecida por conta da reação de desidrogenação dos álcoois a aldeídos. Temos que o material do alambique influencia nos teores totais de cada função orgânica. Essas diferenças influem na qualidade sensorial da bebida (NASCIMENTO et al., 1998a).

3.1.1.2 Acetato de Etila

Os ésteres como acetato de etila e butanoato de etila, são formados na fermentação alcoólica por meio da reação entre o ácido acético e o etanol. O acetato de etila é o principal éster da cachaça com cerca de 70% do total de ésteres presentes. O acetato de etila em pequenas quantidades traz para a bebida um aroma agradável de frutas, e em grandes quantidades pode conferir à bebida um sabor indesejável e enjoativo (NASCIMENTO; CARDOSO; FRANCO, 2009).

A quantidade de acetato de etila pode aumentar ao longo do tempo por mecanismo de oxidação da bebida. Por possuir um ponto de ebulição considerado baixo, aproximadamente 77°C, ele é logo destilado na fase inicial do processo, sendo encontrado em maiores concentrações na fração “cabeça” e no início da fração “coração” (LEAUTE, 1990). Como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Curva de destilação do acetato de etila, concentração por tempo.

Fonte: Adaptado de LEAUTE, 1990.

3.1.1.3 Furfural

O furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) são os principais produtos da degradação de monossacarídeos em altas temperaturas e pH ácido. A desidratação de pentoses em furfural envolve a formação irreversível de enodiol intermediários. (DUNLOP, 1948) O mecanismo de reação está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismo de reação da desidratação catalisada por ácido de pentose em furfural.

Fonte: Adaptado de CHEN, 2013.

O furfural possui um alto ponto de ebulição de aproximadamente 162°C e é extremamente solúvel em meio aquoso. Por conta de seu alto ponto de ebulição ele começa sua destilação no meio da fração “coração” e vai até a fração “cauda”, tendo sua concentração alta nesses pontos (LEAUTE, 1990). Como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Curva de destilação do furfural, concentração por tempo.

Fonte: Adaptado de LEAUTE,1990.

O furfural tem valor estabelecido de toxicidade em seres humanos, esse valor é designado como IDLH, isto é, "*Immediately Dangerous to Life or Health Air Concentration*" sendo estabelecido um valor de 100,00 ppm. O contato prolongado ou repetitivo com o furfural pode ser o causador de dermatites, irritação da mucosa e trato respiratório, além de afetar o sistema nervoso central (THE NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, 2014).

3.1.1.4 Álcoois superiores

Como dito anteriormente os álcoois superiores são considerados a soma dos álcoois isobutilico (2-metil-propanol), isoamílicos (2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol) e n-propílico (1-propanol). Sendo esses três utilizados neste projeto (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2005). As estruturas estão representadas na Figura 6 abaixo.

Figura 6 – Estrutura química dos álcoois superiores (propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol).

Fonte: Adaptado de PubChem", 2021.

A formação dos álcoois superiores tem relação com as leveduras utilizadas na fermentação, e as quantidades desses álcoois produzidas variam de acordo com: as condições do processo de fermentação, tempo de fermentação, o gênero e a espécie da cepa, temperatura e o teor alcoólico final do vinho (SOUZA et al., 2009).

3.2 Congêneres e contaminantes presentes na vodca

A Portaria nº 63, de 23 de abril de 2008 dispõe sobre os requisitos de qualidade e os limites máximos da composição química de bebida destilado-retificadas como a vodca no Brasil. A concentração máxima de álcool metílico é 20 mg/100 mL de álcool anidro, cobre (Cu) 5 mg/100 mL de álcool anidro, chumbo (Pb) 2 mg /100 mL de álcool anidro e o coeficiente de congêneres não deverá ser superior a 50 mg/100 mL de álcool anidro (BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2012; BRASIL, 2008).

A União Europeia possui seus próprios níveis máximos para vários resíduos químicos em vodca, como acetato de etila (1,3 mg/100 mL de álcool anidro), acetaldeído (0,5 mg/100 mL de álcool anidro), metanol (10 mg/100 mL de álcool anidro) e 2-metil-1-propanol (0,5 mg/100 mL de álcool anidro). A comparação pode ser visualizada na Tabela 3 (EUROPEAN PARLIAMENT, 2008).

Tabela 3 - Comparação dos limites máximos permitidos pelas legislações brasileira e europeia.

Componentes	Limite (concentração máxima permitida expressa em mg/100 mL de álcool anidro)	
	Brasil	Europa
Metanol	20	10
Acetato de Etila	-	1,3
2-metil-1-propanol	-	0,5
Acetaldeído	-	0,5

Fonte: Autoria própria.

Por ser tratar de uma bebida destilada e retificada, a vodca é classificada como não congênica. O uso das colunas de retificação proporciona altas concentrações

de etanol e baixos níveis de congêneres. O aparato de destilo-retificação é composto por várias colunas de destilação sequenciais, o etanol do vinho é então concentrado e purificado à medida que passa pelas colunas de destilação, purificação e retificação (ALCARDE, 2010).

Há dois estudos relatando o estudo do acetato de etila em vodca e são internacionais. Estes dois artigos não detectaram a presença significativa de acetato de etila em amostras de vodca produzidas em seus países (LACHENMEIER et al., 2009a, 2009b).

Foram estudados neste trabalho o contaminante metanol e os congêneres acetato de etila e 2-metil-1-propanol descritos nos tópicos 3.1.1.1, 3.1.1.2 e 3.1.1.4 acima.

3.3 Cromatografia Gasosa

3.3.1 Introdução e princípios básicos

O primeiro trabalho publicado sobre cromatografia gasosa veio em 1952 com Martin e James e com esse trabalho ganharam neste mesmo ano o prêmio Nobel de química. No trabalho eles descreveram a separação de ácidos graxos livres por cromatografia de partição utilizando nitrogênio gasoso como fase móvel e uma mistura de silicone e ácido esteárico como fase estacionária (JAMES; MARTIN, 1952).

Em 1957, Marcel J. E. Golay propôs substituir a coluna empacotada por colunas capilares e com isso houve uma diminuição significativa do diâmetro, aproximadamente dez vezes menor. Essas mudanças proporcionaram a cromatografia gasosa aumento na eficiência da separação e diminuição do tempo de análise (LANÇAS, 2017).

Os processos de separação da cromatografia gasosa são de natureza física onde temos a amostra entre duas fases, uma fase estacionária e outra fase gasosa móvel. Ao considerar a natureza da fase estacionária, poderá ser classificada como

cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS) (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

O gás de arraste flui continuamente pela fase estacionária, dessa forma o analito irá se distribuir de acordo com sua natureza entre as duas fases. O analito que ficar menos tempo retido na fase estacionária irá ser quantificado primeiro em menor tempo que o analito que ficar mais retido na fase estacionária. Quando o gás de arraste sai da coluna ele gera a linha de base no cromatograma e os analitos saem como picos (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

O tempo de retenção (t_R) é referente ao tempo que o analito percorre toda a coluna desde sua injeção até a formação total do pico. Vários fatores influenciam no t_R das substâncias tais como: características do soluto, da fase líquida, do fluxo do gás e a temperatura da coluna. Nas mesmas condições de operação, os picos sairão nos mesmos t_R , entretanto qualquer alteração nessas condições mudará a posição do pico máximo e consequente alteração do t_R (GROB; BARRY, 2004).

A largura dos picos se dá em função do tempo de eluição dos analitos, isto é, quando mais o analito demorar para sair da coluna mais largo ele será. E quando o analito sair rápido da coluna os picos serão estreitos e, portanto, mais eficiente será a separação e mais fácil sua quantificação (LANÇAS, 2017).

No GC podemos realizar dois tipos de análises, a qualitativa e a quantitativa. A análise qualitativa verifica o que está presente na amostra, podendo ser realizada pelos tempos de retenção, por métodos gráficos, ou o uso de equipamentos auxiliares. A análise quantitativa verifica-se o quanto tem de analito na amostra. O procedimento para realização da análise quantitativa segue alguns passos: amostragem, preparo da amostra, análise cromatográfica, integração dos picos e cálculos para encontrar a concentração dos analitos (LANÇAS, 2017).

3.3.2 Coluna cromatográfica

A eficiência das colunas cromatográficas é observada através do número de pratos teóricos (N) que pertencem a ela. Quanto maior for a quantidade de pratos maior será a eficiência da coluna, e conseqüentemente melhor separação dos analitos. Para a escolha da coluna ideal devemos conhecer bem a natureza dos nossos analitos, como: estrutura química, faixa de ebulição, polaridade e outros. O primeiro item para a escolha da fase líquida é a polaridade, onde “semelhante dissolve semelhante”, assim, quanto mais semelhante for a fase líquida da amostra mais eficaz será a separação (GROB; BARRY, 2004).

Outro fator importante para a escolha da coluna é a faixa de temperatura que a fase líquida suporta antes de ser modificada. Tem que levar em consideração a faixa de ebulição dos analitos e se a coluna suporta esse método. No mercado há diversas colunas com diversas faixas de temperatura e polaridade (MCNAIR; MILLER; SNOW, 2019).

Neste trabalho foi utilizado uma coluna gás-líquido (CGL), onde o princípio básico de separação dá-se pelo coeficiente de partição relacionado a fase líquida. A seletividade depende das interações entre o analito e a fase líquida (estacionária), essa interação é conhecida como forças coesivas de Van der Waals. E a coluna foi do tipo Carbowaxes para separar moléculas muito polares (LANÇAS, 2017).

3.3.3 Gás de arraste

O gás de arraste é a fase móvel da cromatografia gasosa e sua atribuição é de “arrastar” o analito da injeção atravessando a coluna até chegar ao detector. Um gás de arraste ideal deve apresentar algumas propriedades:

- Não deve interagir com a amostra nem com a fase estacionária;
- Possuir preço baixo e

- Ser compatível com o detector utilizado (GROB; BARRY, 2004).

3.3.4 Injeção da amostra

Ao inserir a amostra no injetor, devemos levar em consideração sua natureza e assim escolher as melhores condições do injetor, que são: volume de amostra, temperatura do injetor, e tipo de injeção. No caso de amostras de natureza líquida, a temperatura do injetor deve ser acima da temperatura de ebulição do analito mais volátil. Os líquidos possuem alto coeficiente de expansão quando vaporizados, esta característica faz com que pequenos volumes de amostras maximizam a resolução do sistema (LANÇAS, 2017).

Há dois modos de injeção da amostra na coluna capilar, o modo *split* (com divisão) e o modo *splitless* (sem divisão). O modo *split* é utilizado quando o volume injetado é grande e ele sofre divisão em duas partes por evaporação onde a menor parte é efetivamente injetada na coluna. Já o modo *splitless* é utilizado para soluções diluídas onde não há interesse em analisar o solvente. Este último modo pode ocasionar alguns problemas como alargamento da banda do analito e o efeito solvente onde há o alongamento da cauda do solvente (GROB; BARRY, 2004).

3.3.5 Detectores

O detector é a última parte da corrida cromatográfica, ele se conecta com o final da coluna e sua temperatura tem que ser suficiente para não deixar a amostra e/ou a fase líquida se condensar podendo provocar assim o alargamento dos picos. Há vários tipos de detectores disponíveis atualmente, eles podem ser classificados de acordo com:

- Integrais ou diferenciais;
- Massa ou concentração e

- Universal, seletivos ou específicos.

Detector por ionização de chama (DIC ou FID), seu princípio básico de funcionamento está relacionado com a condutividade elétrica de um gás sendo diretamente proporcional a quantidade de partículas transportadas por ele. Isto é, ele coleta os íons gerados durante a combustão da amostra na chama de hidrogênio (GROB; BARRY, 2004).

O FID é indicado para analisar compostos orgânicos a níveis de traço, sendo inapropriados para compostos inorgânicos que não entram em combustão. Exemplos de compostos que não são analisados pelo FID: O_2 , N_2 , NO , N_2O , CO , CO_2 , CS_2 , H_2S , SO_2 e H_2O . As vantagens são:

- Alta sensibilidade para compostos orgânicos;
- Resistente a mudanças bruscas de temperatura e
- Melhor desempenho comparado a outros detectores.

Algumas desvantagens são:

- Detector destrutivo;
- Precisa de 3 fontes de gases;
- Eletrômetro caro;
- Não analisa compostos inorgânicos voláteis nem em solução aquosa e
- Átomos eletronegativos no analito podem diminuir a sensibilidade de detecção (GROB; BARRY, 2004).

O detector MS ou “massas fragmenta cada pico eluído da coluna cromatográfica, onde cada analito se divide em vários íons, esses íons são separados pelo analisador (mais comumente se é utilizado um quadrupolo) por meio de um campo elétrico. O campo elétrico pode ser variado ocasionando em uma varredura de massas. O elétron então separado pelo analisador, chega a uma multiplicadora de elétrons e então os

picos são gerados em função da massa/carga (m/z) de cada fragmento. As vantagens são:

- Grande seletividade e
- Fornecem informações estruturais dos compostos.

Algumas desvantagens são:

- Custo elevado;
- Exige maior treinamento do operador e
- Isômeros apresentam mesmo espectro de massas o que dificulta a diferenciação (LANÇAS, 2017).

3.4 Etapas para produção dos candidatos á MRC

O preparo foi baseado na ABNT ISO GUIA 35:2020, que define os princípios gerais e estatísticos para certificação de um material de referência e na ABNT ISO GUIA 17034:2017 que determina os requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Devem ser seguidas algumas etapas para a produção do candidato a MRC:

1. Levantamento de Demandas e Definição do MRC a ser produzido;
2. Aquisição do material (amostragem);
3. Preparo do candidato a MRC;
4. Estudo de homogeneidade;
5. Estudo de estabilidade;
6. Caracterização;
7. Atribuição de valor e estimativa da incerteza expandida do MRC produzido e

8. Elaboração do relatório de certificação.

O fluxograma abaixo (Figura 7) ilustra todo o processo.

Figura 7 – Fluxograma dos processos para a produção de MR seguindo a ISO Guia 35:2020.

Fonte: Autoria própria.

3.5 Levantamento de Demandas e Definição dos candidatos a MRC (cachaça e vodca)

O levantamento de demanda foi pensado em parceria com o LFDA-SP localizado em Jundiaí onde foi constatada a necessidade de MRC para a avaliação dos congêneres/contaminantes nas matrizes cachaça e vodca uma vez que essas análises são rotineiras nesta unidade federal.

Este projeto propõe a produção de dois materiais de referência, um para a cachaça não adoçada e outro para a vodca. Para o MRC da cachaça foram utilizados

os seguintes analitos: metanol, acetato de etila, 2-metil-1-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol e furfural. Para o MRC da vodca foram utilizados os seguintes analitos: metanol, acetato de etila e 2-metil-1-propanol. Os analitos foram escolhidos de acordo com a legislação de cada bebida e de acordo com a disponibilidade de recursos.

3.6 Aquisição de Materiais (Amostragem)

Nesta etapa de coleta do material inicial deve-se avaliar a quantidade necessária para a execução das etapas seguintes do projeto, considerando o número esperado de amostras de MRC a serem produzidas e a quantidade de amostras empregadas no estudo de homogeneidade, estudo de estabilidade e caracterização, tudo em relação a quantidade de recursos disponíveis. Foi levado em consideração a quantidade necessária para cada análise por GC-FID com injeção de aproximadamente 1µL sendo que a quantidade produzida foi acondicionada em frascos de 1 mL, o que proporciona aproximadamente 1000 análises para cada MR aos laboratórios.

3.7 Preparo dos candidatos a MRC

Para a preparação do candidato a MRC será utilizada a técnica de fortificação (*spiking*), ao qual será adicionada à matriz (cachaça ou vodca) quantidades conhecidas dos analitos de interesse até que resultem em concentrações próximas aos máximos permitidos pelas legislações. Para qualificar e quantificar os analitos presentes nas amostras, será necessário otimizar a separação cromatográfica, construir as curvas de calibração e avaliá-las estatisticamente.

3.7.1 Análise qualitativa e condições operacionais

Nesta etapa é necessário conhecer a natureza dos analitos estudados e como se comportam na corrida cromatográfica. O objetivo da otimização das condições cromatográficas é atingir uma separação com boa resolução entre os picos em um tempo mínimo de análise.

No caso da cromatografia gasosa a identificação dos analitos é feita através do tempo de retenção (t_R) e comparação com padrões. Essa identificação pode ser feita através da comparação de cromatogramas, um com a amostra contendo todos os analitos e outro com apenas um analito a ser identificado, porém deve-se tomar cuidado pois vários analitos podem possuir o mesmo tempo de retenção (LANÇAS, 2017).

O tempo de retenção pode se alterar com a alteração das condições cromatográficas, por isso é importante adequar uma condição que seja mais favorável, com a melhor resolução e separação e com menor tempo para todas as corridas do trabalho.

Pode também ser utilizada a técnica de *spiking*, onde utiliza-se a amostra “natural” onde todos os analitos estão presentes e dopa-se a amostra com o analito que se deseja conhecer, e onde o pico que aumentar é o pico desse analito (GROB; BARRY, 2004).

Avaliou-se a seletividade para estudar se os componentes que estão presentes naturalmente na matriz (efeito matriz) interferem na medição, para isso deve-se realizar ensaios com amostras com e sem analitos e conseguir avaliar se há interferência. Dessa maneira, com a comparação dos tempos de retenção e do formato dos picos para cada analito, e entre o uso de solventes ou das bebidas brutas foi avaliado o efeito de matriz. A fim de identificar a ordem de eluição dos analitos, a partir do tempo de retenção, os mesmos serão analisados individualmente.

3.7.2 *Análise quantitativa e construção da curva de calibração*

Para a análise quantitativa de um analito são necessários alguns passos, estes englobam desde a amostragem até a finalização pelos cálculos. A Figura 8 ilustra quais são os passos que se deve seguir.

Figura 8 – Procedimento para análise quantitativa dos analitos.

Fonte: Autoria própria.

Na amostragem deve-se separar uma pequena porção de toda o material que seja suficientemente representativo do todo. Dependendo da matriz da amostra será necessário algum procedimento de preparo como, trituração, filtração, concentração, dissolução entre outros. Na análise cromatográfica tem que se verificar todos os fatores que possam interferir na análise. A integração dos picos é feita através do próprio software do equipamento. Para finalizar a etapa de quantificação, é necessário calcular a precisão, exatidão/tendência, desvio padrão e desvio padrão relativo, entre outros, que serão discutidos posteriormente.

3.7.3 *Uso do padrão interno*

Em virtude das técnicas empregadas e da necessidade de quantificação dos analitos torna-se fundamental a correlação das respostas obtidas pelas técnicas e as

concentrações dos analitos de interesse. Para isso se fará uso do método do padrão interno, no qual se adiciona uma substância ausente na matriz, com tempo de retenção próximo aos analitos e boa resolução entre os mesmos.

O uso do padrão interno (pi) é adicionar uma quantidade conhecida de elemento de referência nos padrões e na amostra para auxiliar na quantificação dos analitos em estudo. O pi não pode interferir na análise e ter pico com boa resolução. Assim utiliza-se a razão entre a resposta de cada analito e a resposta do padrão interno e a razão entre as concentrações dos mesmos para estabelecer as correlações das curvas de calibração. Desta maneira, é possível corrigir erros aleatórios e sistemáticos durante a separação cromatográfica, melhorando a repetibilidade do método. As soluções que serão empregadas na construção da curva de calibração serão preparadas pelo método gravimétrico (EMERY, 1967).

Na prática a área obtida pelo analito (A_a) é dividida pela área obtida pelo PI ($A_{p.i.}$) e plotada no gráfico contra a massa da amostra (m_a) dividida pela massa do PI ($m_{p.i.}$) na expressão (1). Pela interpolação do gráfico (Figura 9).

$$C_A = \frac{\left(\frac{A_A}{A_{PI}} - b\right)}{a} \times C_{PI} \quad (1)$$

Onde: C_A é a concentração a ser determinada; b é o intercepto com o eixo y (coeficiente linear); a é o coeficiente angular; A_A é a área do analito; A_{PI} é a área do padrão interno e C_{PI} é a concentração do padrão interno utilizada.

Figura 9 – Interpolação para estimar a massa desconhecida do analito em estudo.

Fonte: LANÇAS, 2017.

3.7.4 Tratamento estatístico de outliers

Um *outlier* ou como conhecido popularmente como um “resultado aberrante” é um resultado ou mais que se diferencia dos demais, na maioria dos casos esse erro é atribuído aos analistas. Manter esses valores pode comprometer a exatidão/tendência e precisão do método e por isso devem ser avaliados com cuidado. Há algumas ferramentas que são utilizadas para verificar quais valores são ou não são *outliers*.

Para o tratamento de *outliers* tem-se o teste de Grubbs, este teste compara o desvio do valor suspeito da média das amostras com o desvio padrão da amostra. O valor suspeito é considerado o valor que está mais longe da média, este teste pressume que a população tem uma distribuição normal (MILLER; MILLER, 2010).

$$G = \frac{|\text{valor suspeito} - \bar{x}|}{s} \quad (2)$$

O valor crítico para comparar o G calculado para P=0,05 está tabelado. Se o valor calculado for maior que o crítico, o valor suspeito é rejeitado.

Há também o teste de Dixon, ou teste-Q, onde o cálculo é mais simples. Para pequenas amostras (entre 3 e 7), o teste avalia uma medição suspeita, comparando a diferença entre ela e a medição do valor mais próximo a ele. Já para amostras maiores de 8 para cima, o teste se modifica um pouco (MILLER; MILLER, 2010).

$$Q = \frac{|\text{valor suspeito} - \text{valor mais próximo}|}{|\text{valor mais distante} - \text{valor suspeito}|} \quad (3)$$

O valor crítico para comparar o Q calculado para P=0,05 está tabelado. Se o valor calculado for maior que o crítico, o valor suspeito é rejeitado.

3.7.5 Validação do método para a quantificação dos analitos presentes na cachaça e na vodca - Curva de Calibração

As curvas foram validadas pelo Software de Validação/Verificação Conflab®, este é baseado em diferentes guias, como por exemplo, o guia de estimativa de incerteza Eurachem/Citac (BROOKMAN; MANN, 2021; CONFLAB, 2018a).

Os parâmetros avaliadores da curva são definidos pelo “Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e Insumos” do MAPA de 2015 (BRASIL, 2015). Os critérios utilizados na validação são:

- Limite de quantificação (LQ): significa a menor concentração que o analito pode ser quantificado e pode ser estimada de diversas maneiras como:
 - Se a curva apresentar ruído o LQ pode ser estimado pela concentração do analito que for 10 vezes maior que o sinal da linha de base;
 - O LQ também pode ser estimado como 10 vezes o desvio padrão da concentração da amostra branca, neste caso o método deve ter exatidão/tendência e precisão estimados para o LQ e
 - Menor concentração da curva de calibração representadas nas equações 4 e 5. (CHALK; MCEWEN, 2017; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2018)

$$LOQ = \bar{X} + k \times s \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{a} \quad (5)$$

Fonte: (CHALK; MCEWEN, 2017; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2018).

- Faixa de trabalho: Corresponde do maior ao menor nível de concentração onde o analito pode ser quantificado; (MILLER; MILLER, 2010)

- Linearidade: é a capacidade do método analítico em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em uma determinada faixa de concentração e para sua avaliação deve-se construir uma curva de calibração com no mínimo triplicata e calcular o coeficiente de correlação (r) e os resíduos para cada ponto.
- Avaliação da Homocedasticidade (Teste de Cochran): Avalia a homogeneidade (ou não) das variâncias dos resultados experimentais entre os diferentes níveis de concentração através do teste de Cochran ver expressão (6).

$$C = \frac{S_{y_{i,max}}^2}{\sum_{i=1}^p S_{y_i}^2} \quad (6)$$

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010).

Pode ser uma forma de se basear qual dos modelos será seguido, optando pelo estudo dos parâmetros de acordo com a Regressão dos Mínimos Quadrados Ordinários (onde todos os pontos possuem o mesmo peso para a determinação da respectiva equação) ou de acordo com a Regressão dos Mínimos Quadrados Ponderados (onde cada ponto possui um peso diferenciado de acordo com a variância das replicatas para cada nível de concentração, podendo afetar a estimativa de incerteza em diferentes faixas de concentração da curva) (Figura 10). (MILLER; MILLER, 2010)

Figura 10 – Comportamento das Incertezas de acordo com a forma de regressão (ponderada e ordinária respectivamente).

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010).

Exemplo de como as diferentes regressões afetam a incerteza da medição: Considere a concentração e sua incerteza calculada na regressão ponderada: $1,23 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ e $8,01 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ e na regressão ordinária $1,20 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$ e $8,09 \pm 0,63 \mu\text{g/mL}$, vemos que, neste caso, a regressão ponderação reduz em 5 vezes a incerteza na concentração mais baixa quando comparada a regressão ordinária.

- Equação da reta: demonstra matematicamente como as concentrações e as respostas obtidas pela análise se relacionam. Esta relação está vinculada ao estudo da Regressão dos Mínimos Quadrados Ordinários e Regressão dos Mínimos Quadrados Ponderados. Ver equações 7 e 8. (MILLER; MILLER, 2010)

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

$$a_w = \frac{\sum_{i=1}^n (w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w)}{\sum_{i=1}^n (w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \quad (8)$$

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010).

- Coeficiente de Correlação (r): é um indicador do grau de correlação entre as duas variáveis, tem a ordinária (expressão 9) e a ponderada (expressão 10); (THOMPSON; LOWTHIAN, 2011)

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (9)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \times \sum_{i=1}^n w_i x_i y_i - \sum_{i=1}^n w_i x_i \times \sum_{i=1}^n w_i y_i}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n w_i \times \sum_{i=1}^n w_i x_i^2 - (\sum_{i=1}^n w_i x_i)^2] \times [\sum_{i=1}^n w_i \times \sum_{i=1}^n w_i y_i^2 - (\sum_{i=1}^n w_i y_i)^2]}} \quad (10)$$

Fonte: (THOMPSON; LOWTHIAN, 2011).

- ANOVA de fator único – Teste F (F calculado): testa se realmente há variação significativa da resposta do método em decorrência da variação da concentração. Há o cálculo para ordinária (expressão 11) e ponderada (expressão 12); (MILLER; MILLER, 2010)

$$F = \frac{SS_{regr}/1}{SS_{resid}/n-2} \quad (11)$$

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n w_i x (y - \bar{y})^2 / 1}{\sum_{i=1}^n w_i x (y_i - y)^2 / n - 2} \quad (12)$$

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010).

- Maior desvio: é a diferença percentual entre o valor teórico e o recalculado pelo valor obtido experimentalmente utilizando a equação da reta, ver expressão (13); (MILLER; MILLER, 2010)

$$\text{Desvio (\%)} = \left(\frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor teórico}} - 1 \right) \times 100 \quad (13)$$

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010)

- Maior resíduo: avalia o desvio do valor obtido experimentalmente com relação ao valor obtido através da equação que define a regressão linear, ver expressão (14); (MILLER; MILLER, 2010)

$$res_{abs} = \bar{y}_i - y \quad (14)$$

Fonte: (MILLER; MILLER, 2010).

- Incerteza do centro da curva: a incerteza referente a curva de calibração é calculada considerando uma dada concentração, uma vez que a incerteza ao longo da curva pode sofrer variação; há dois cálculos: incerteza regressão ordinária (15) e incerteza regressão ponderada (16). (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

$$\text{Incerteza} = \frac{s}{x_i} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \cdot c_j)]^2}{n-2}} \quad (15)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2$$

$$\frac{S^2}{b_1^2} \cdot \left(\frac{1}{\sum w_i} + \frac{(x_{pred} - \bar{x})^2}{(\sum (w_i x_i^2) - (\sum w_i x_i)^2 / \sum w_i)} \right)$$

$$S^2 = \frac{\sum w_i (y_i - y_{\hat{i}})^2}{(n - 2)}$$
(16)

Fonte: (ELLISON; WILLIAMS, 2012)

3.7.6 Validação do método para a quantificação dos analitos presentes na cachaça e na vodca

O estudo experimental da validação tem como objetivo demonstrar que o procedimento analítico é apropriado ao seu objetivo e que contribua com a confiabilidade de seus resultados. A validação deve ser avaliada com os procedimentos da rotina dos laboratórios. Um ponto de suma importância é a garantia da confiabilidade dos resultados que é atingida pela rastreabilidade metrológica, e esta é alcançada por meio da ferramenta da qualidade “Ciclo AQAC - Ciclo de Garantia da Qualidade Analítica” apresentado na Figura 01.

Antes de avaliar qualquer parâmetro, a seletividade tem que ser assegurada pois ela determina os analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. A seletividade pode ser determinada experimentalmente ou por dados na literatura. (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, 2016)

Em acordo com o “Manual de Garantia da Qualidade Analítica Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos” do Ministério da Agricultura, o critério de aceitação dos parâmetros para a validação do método estão presentes na Tabela 4. (BRASIL, 2015) Os cálculos da validação do método foram efetuados pelo software de validação ConfLab® Validação/Verificação. (CONFLAB, 2018a)

Tabela 4 - Critério de aceitação dos parâmetros para a validação do método.

Parâmetro	Critério de Aceitação
Linearidade	$r \geq 0,99$
Precisão (repetibilidade)	$CV \leq 20\%$
Exatidão/Tendência	$\leq 20\%$
Precisão Intermediária	$CV \leq 20\%$

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2015).

- Linearidade: é a habilidade do método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras em uma dada faixa de concentração, são avaliados com a curva de calibração e deve ser superior ou igual a 0,99;
- Precisão (repetibilidade): é definido como o grau de coerência entre os resultados obtidos nas mesmas condições de operação, isto é, mesmo analista, mesmo equipamento, etc., no menor tempo possível e possuir coeficiente de variação CV menor ou igual a 20%;
- Exatidão/Tendência²: Segundo Vocabulário Internacional de Metrologia – VIM: “Grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro dum mensurando” (INMETRO, 2012) e
- Precisão intermediária: parecido com a precisão (repetibilidade) só que alterando as condições operacionais, como: dias diferentes, analistas diferentes, aparelhos diferentes, etc. devem possuir coeficiente de variação CV menor ou igual a 20%. (MAPA, 2011)

3.8 Estudo da homogeneidade

Com os candidatos a MRCs produzidos em lote de frascos, o estudo da homogeneidade é aplicado para indicar possíveis variações na composição do material que podem ocorrer no processo de preparação. O estudo utiliza da avaliação

² Segundo o documento DOQ-Cgcre-8 09 do Inmetro diz por meio de nota que: “a exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência”.

estatística para observar possíveis dispersões nas unidades avaliadas para a determinação da variância entre e dentro do frasco e esta utilizada no cálculo da incerteza associada a heterogeneidade. Por se tratar de uma propriedade fundamental de um MRC a ABNT NBR ISO 17034:2017 exige essa avaliação (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017b).

Como visto anteriormente, a avaliação da homogeneidade de um MRC é um requisito de suma importância, e este estudo inclui uma variância “entre frascos” (*between bottles*) pelo qual se incorpora a heterogeneidade dos mensurados, e uma variância “dentro de frascos” (*within bottles*) onde se abrange a incerteza da medição, transformação e sub amostragem. Para a norma ABNT/ISO Guia 35:2020, essa abordagem seria a ideal e por isso foi representada na Figura 11.

Figura 11 - Esquematização do ensaio da homogeneidade segundo a ABNT/ISO Guia 35:2020.

Fonte: Autoria própria.

Para estudo de homogeneidade para propriedades quantitativas é necessária uma avaliação da incerteza com no mínimo 9 graus de liberdade, isto é, de no mínimo 10 frascos escolhidos do mesmo lote produzido. A amostragem utilizada foi a aleatória estratificada onde que por meio de uma ferramenta “*Random Org.*”(HAAHR M., 2021) gerador de números aleatórios de 1 a 100 para cada candidato a MRC produzido. Essa amostragem garante que as unidades escolhidas para o estudo de homogeneidade sejam distribuídas uniformemente por todo o lote e evita algum efeito cíclico no processamento. Para se obter uma melhor estimativa de valores do estudo de homogeneidade é importante realizar todas as medições sob condições de repetibilidade.

Os desvios-padrão dentro e entre os frascos é calculado com a análise de variância ANOVA de fator único e os *outliers* pelo teste de Grubbs. Na ANOVA a característica comum (fator ou tratamento) que no caso é a concentração de cada analito na amostra é a variável independente e a resposta de cada análise é a variável dependente. O desvio padrão entre frascos é definida pela ISO Guia 35:2020 onde o cálculo é baseado na variância entre frascos e dentro dos frascos. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020). A expressão (17) representa o modelo básico para a realização do estudo de homogeneidade.

A ANOVA usa “testes F”³ para testar estatisticamente a igualdade entre as médias, ou seja, é uma razão de duas variâncias. Variâncias são medida de dispersão, ou até que ponto os dados estão dispersos em relação à sua média e são o quadrado do desvio padrão (MILLER; MILLER, 2010).

$$Y_{ij} = \mu + A_j + \varepsilon_{ij} \quad (17)$$

Onde i são os frascos e j as medições; Y_{ij} é o resultado da medição individual e μ é o valor médio de todos os frascos que tiveram exatamente o mesmo resultado. A_j é o erro relacionado à variabilidade dos resultados entre os frascos e ε_{ij} é o erro aleatório relacionado a medição (variância da repetibilidade). A_i e ε_{ij} são variáveis mutualmente independentes e frequentemente assumidas como normalmente distribuídas com $\mu=0$ e variância σ^2 .

Os desvios entre as medições obtidos através da análise em variâncias expressos por termos de somas dos quadrados.

$$SQ_{TOTAL} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad (18)$$

Onde:

$$\bar{Y} = \frac{1}{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i}} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij} \quad (19)$$

3 A estatística F tem distribuição F de Fisher-Snedecor com k-1 e n-k graus de liberdade, onde k é o número de grupos e n é o número de observações.

Sendo, $\bar{Y}$ a média das médias, α é o número de grupos, n_i é o número de membros no grupo. A soma dos quadrados total pode ser separada em duas equações.

$$SQwb = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \text{ (dentro)} \quad (20)$$

$$SQbb = \sum_{i=1}^a n_i (Y - \bar{Y})^2 \text{ (entre)} \quad (21)$$

Os graus de liberdade para cada caso estão definidos na Tabela 5.

Tabela 5 – Cálculo para ANOVA entre e dentre amostras.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios
Entre amostras (<i>between-samples</i>)	SQ_{bb}	$\alpha - 1$	MQ_{bb}
Dentre amostras (<i>within-samples</i>)	SQ_{wb}	$\sum_{i=1}^a n_i - a$	MQ_{wb}
Total	SQ_{total}	$\sum_{i=1}^a n_i - 1$	MQ_{total}

Fonte: Adaptado de MILLER; MILLER, 2010.

Os quadrados médios podem ser expressos usando termos de variância:

$$MQwb = s^2 \quad (22)$$

$$MQbb = s^2 + n_0 s_A^2 \quad (23)$$

Onde n_0 é igual a n caso não faltem dados. MQ_{wb} é referente a repetibilidade da medição e MQ_{bb} é referente a estimativa da variância da variabilidade natural de medição mais a variância entre os grupos. O cálculo da média quadrática entre frascos (MQ_{bb}) e da média quadrática entre as replicatas de um mesmo frasco (MQ_{wb}) são fornecidas pela tabela ANOVA e o número de medições de cada frasco (n_0). Neste caso o desvio-padrão entre os frascos (s_{bb} – *between bottles*) é expresso como:

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MQbb - MQwb}{n_0}} \quad (24)$$

O cálculo da incerteza padrão relativa à homogeneidade (u_{hom} ou u_{bb}) pela expressão (25): indicada no Anexo C da ISO Guia 35:2020.

$$u_{hom} = \left(\sqrt{\frac{MQ_{wb}}{n_0}} \right) \times \left(\sqrt[4]{\frac{2}{vMQ_{wb}}} \right) \quad (25)$$

Onde, vMQ_{wb} são os graus de liberdade de MQ_{wb} (MQ_{dentre}).

3.9 Estudos de estabilidade

O estudo da estabilidade é empregado para avaliar a incerteza de medição associada à estabilidade do material de referência depois de produzido e para determinar as condições ótimas de armazenamento e transporte. É conveniente que um MRC seja estável ao uso pretendido para que o valor atribuído seja o mesmo ao longo do período de validade do certificado. A degradação age de formas diferentes nos materiais, alguns podem apresentar degradação linear por longos períodos, outros rápidas mudanças catalíticas ou menos previsíveis depois de um certo período ou podem mudar rapidamente logo após o processamento e depois permanecer estáveis por longos períodos. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

Segundo a ABNT NBR ISO 17034:2017 o produtor de MRC deve:

- Avaliar a estabilidade de todas as propriedades relevantes sob condições de armazenamento bem como a embalagem;
- Avaliar a estabilidade de todas as propriedades relevantes sob condições de transporte;
- Orientar o usuário como armazenar e utilizar o MRC;
- Monitorar a estabilidade dos MRC a longo prazo e verificar se há taxa de mudança;

- Se a estabilidade não puder ser assegurada, deve-se considerar a incerteza declarada para provável mudança de valor e
- Avaliar os possíveis efeitos na estabilidade do material caso o uso repetido de uma mesma unidade seja permitido. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017b)

Há dois tipos de instabilidade/estabilidade a serem estudados, a “estabilidade a longo prazo”, relacionada ao tempo de armazenamento do material, e a “estabilidade a curto prazo”, relacionada às condições de transporte deles. Em ambas avaliações devem-se levar em consideração alguns pontos:

- Considerar todas as propriedades físicas, químicas e biológicas que possam interferir na estabilidade do MR;
- Revisar a estabilidade dos materiais na literatura;
- Planejar experimentos em tempo real ou acelerados e
- Testar diferentes formas de armazenamento incluindo o recipiente e estabilização ou preservação. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

Os estudos da estabilidade podem ser feitos através dos estudos clássico ou isócrono considerando as condições de medição, estudos em tempo real ou acelerado considerando as condições e tratamento aplicados e estudos a curto e longo prazo (estabilidade no transporte e no armazenamento).

No modelo clássico, os recipientes são deixados ao mesmo tempo e nas mesmas condições e avaliados no transcorrer do tempo para cada faixa de temperatura, este modo pode levar a uma incerteza relativamente elevada. No modelo isócrono, os recipientes permanecem nas temperaturas de referência por período de tempo, do maior para o menor, e são analisados todos ao mesmo tempo, reduzindo assim a dispersão dos pontos e proporcionando uma incerteza relativa menor pois há condições de repetibilidade, espera-se que essas condições levem a uma melhora da precisão de medição aumentando a eficácia do estudo de estabilidade. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

Em relação a duração dos estudos, a estabilidade em tempo real estuda as condições de armazenamento e transporte ao longo de um período, semana/mês/ano, neste modo há a vantagem de manter as mesmas condições em que o material será submetido em transporte e armazenamento. Já na estabilidade acelerada, o material é submetido a condições extremas a fim de acelerar o processo de degradação do material e estimar por meio de regressão a taxa de degradação, neste modo há a vantagem de ser rápido, porém em condições diferentes pode mudar. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

A classificação por objeto de estudo separa a estabilidade em curto prazo e em longo prazo. Estabilidade de curto prazo verifica a estabilidade do material sob as condições de transporte esperadas, como temperatura e tempo. Para o estudo a longo prazo, condições de armazenamento são estudadas a fim de o material manter as condições originais, normalmente um estudo desse leva de 12 a mais meses ou menos em estudos acelerados, e após a certificação do material este deve ser monitorado para continua verificação das propriedades. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

Foi escolhido o estudo isócrono simples com uma condição de armazenamento e uma condição de referência, este estudo isócrono possui vantagens possui as seguintes vantagens: que todas as medições são realizadas em um curto período de tempo em condições de repetibilidade e proporciona a melhor precisão disponível e realizar as medições ao mesmo tempo reduz custos e simplifica o planejamento de recursos laboratoriais.

Os dados obtidos de estabilidade são em função do tempo (meses), e deve-se observar se há ou não a presença de tendências, caso haja tendências deve-se adotar as seguintes ações:

- O valor da propriedade para o qual a degradação foi observada não pode ser certificado;
- O período de validade do valor certificado deve ser reduzido, com base na previsão do modelo, para assegurar que a mudança no valor não seja tecnicamente significativa;

- A extensão esperada da degradação durante o período de validade pretendido é estimada, convertida em uma incerteza-padrão e incluída na incerteza do valor atribuído, juntamente com a incerteza da degradação esperada e
- O valor certificado e sua incerteza são dados em função do tempo, refletindo a tendência estimada e sua incerteza (exige um modelo de degradação bem estabelecido). (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

3.9.1 Avaliação de Tendências

Essa avaliação foi feita a partir da média da quintuplicata da concentração de cada mês, com isso, foi obtido um gráfico de regressão linear da concentração pelo tempo decorrido. Para estimar o coeficiente angular (α) da reta, multiplicou-se o desvio padrão associado ao coeficiente angular (s_a) por um fator “t” associado a probabilidade de 95% e com graus de liberdade “n-2”, onde n é o número de meses utilizados nos testes.

$$|a| < t_{0,95,n-2} \cdot s_a \quad (26)$$

Com coeficiente angular calculado, é possível estimar a incerteza associada a estabilidade a longo prazo (u_{est}), para o período de 12 meses. Esse período é o tempo em que o candidato a MRC poderá ser armazenado.

$$u_{est} = s_a \cdot t \quad (27)$$

De acordo com a presença ou ausência de tendências os cálculos da incerteza variam. As possíveis fontes de incertezas presentes na estabilidade de longo prazo são: repetibilidade da medição, a variabilidade entre as corridas e a heterogeneidade entre as unidades. As incertezas dos estudos de estabilidade de curta e longa duração serão estimadas pela análise de regressão dos dados obtidos esta prática é estabelecida pela ABNT ISO Guia 35:2020. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

3.10 Caracterização

Dentre os modelos possíveis para a caracterização de um candidato a MRC há: caracterização por um único método, caracterização por dois ou mais métodos ou por uma rede de laboratórios competentes. No presente trabalho foi utilizado a caracterização de um mensurando utilizando dois ou mais métodos com exatidão/tendência demonstrada, em um ou mais laboratórios competentes para os dois candidatos a MRC. Para que este modelo seja adequado os resultados dos procedimentos de medição e/ou laboratórios envolvidos aos quais determinam o mesmo mensurando seus resultados tem que ser rastreáveis ao mesmo sistema de unidades. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2020)

A ABNT NBR ISO 17034 exige do produtor que o produtor de MR forneça evidências da rastreabilidade metrológica do valor que foi certificado. A rastreabilidade é atingida se os valores combinados forneçam estimativas válidas do valor do mensurando dentro da incerteza pretendida e os resultados forem rastreáveis a uma referência superior, como exemplo o Sistema Internacional de Unidades (SI) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017b).

A atribuição do valor de propriedade é por meio de cálculos estatísticos entre os valores dos métodos utilizados na caracterização através da média entre eles. Uma das estimativas da incerteza, será calculada pelo software Conflab® Incerteza (CONFLAB, 2018b) ao qual permite utilizar os dados da validação, e escolher qual fonte de incerteza se aplica ao método de ensaio proposto. Cada fonte de incerteza será inserida no diagrama de Ishikawa e todos os resultados são apresentados em diagrama de Pareto bem como a incerteza expandida. A outra incerteza será enviado pelo laboratório que caracterizou por outro método junto com os certificados dos padrões utilizados na curva de calibração.

Foram efetuadas múltiplas medições para caracterizar os candidatos a MRC por meio de duas técnicas afim de que a componente de incerteza fosse reduzida. Para o cálculo da incerteza relacionada a caracterização (u_{char}), esta foi obtida a partir da combinação das incerteza-padrão obtidas em cada técnica utilizada e da incerteza do desvio-padrão entre os métodos utilizando-se a expressão abaixo.

$$u_{char} = \sqrt{u_{CFID}^2 + u_{CMS}^2 + u_{desv,pad}^2} \quad (28)$$

Onde:

u_{char} é a incerteza da caracterização combinada;

u_{CFID}^2 é a incerteza relacionada a caracterização GC-FID

u_{CMS}^2 é a incerteza relacionada a caracterização GC-MS

$u_{desv,pad}^2$ é o desvio padrão entre os resultados do GC-FID e do GC-MS.

O desvio padrão entre os resultados é calculado por ANOVA de fator único entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. Como o número de replicatas utilizadas no cálculo da média foi diferente para cada uma, foi primeiro calculado o n_0 pela da expressão.

$$n_0 = \frac{1}{a-1} \left[\sum_{i=1}^a n_i - \frac{\sum_{i=1}^a n_i^2}{\sum_{i=1}^a n_i} \right] \quad (29)$$

Onde:

n_i é o número de replicatas;

a é o número de técnicas utilizadas.

3.11 Cálculo da incerteza expandida do MRC

A incerteza de um resultado é composta por diversas fontes que podem ser avaliadas separadamente e posteriormente combinadas. As incertezas são provenientes do método de preparo de amostra, medição, efeito da matriz, amostragem, condições ambientais, equipamentos, valores de referência, operador,

etc. Por ser fundamental a química analítica o EURACHEM/CITAC em 2012 lançou o guia “*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*” com regras gerais para a avaliação e expressão da incerteza na química analítica, onde temos as etapas: Especificar o mensurando, identificar as fontes de incerteza, calcular as incertezas padrão para cada fonte, calcular a incerteza padrão combinada e por fim calcular a incerteza expandida. (ELLISON; WILLIAMS, 2012)

Uma ferramenta comumente utilizada para a identificação das fontes de incerteza é o diagrama de Ishikawa⁴, conhecido como “diagrama causa e efeito ou espinha de peixe”. Ao se definir as incertezas padrão de cada etapa do preparo do MRC deve-se combiná-las e depois expandir. A avaliação do componente de incerteza pode ser obtida experimentalmente com a realização de várias medidas, assim, a incerteza padrão é relacionada ao desvio-padrão da média das medições, e temos que quanto maior o número de medições, menor será a incerteza em relação ao resultado obtido (apesar da estimativa de incerteza abranger vários componentes, o componente relacionado à precisão costuma ser aquele com maior contribuição).

$$u(x_i)_{pr} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (30)$$

Onde:

s é o desvio-padrão entre as medições e

p é o número de medições realizadas para a determinação de um resultado.

Para se obter a incerteza expandida, U , deve-se multiplicar a incerteza combinada por um fator de abrangência, k . Para distribuições de probabilidade normais para Y , é comum considerar $k=2$, ao qual corresponde a uma probabilidade de abrangência de 95,45%. E no caso de a distribuição de probabilidade não ser normal, é recomendado que o k seja determinado pelo fator de *t-student* em que k depende não só da propriedade de abrangência, mas também do número de graus

⁴Criado pelo engenheiro químico Kaoru Ishikawa em 1943 e posteriormente aperfeiçoado. O diagrama teve como objetivo de representar a relação entre um “efeito” e suas possíveis “causas” o que ajudou na descoberta e organização no que diz respeito as possíveis causas que contribuem para um determinado efeito.

de liberdade efetivos, esse fator é calculado através da formula Welch-Satterwaite e nesse caso conhecida como graus de liberdade efetivos (V_{eff}).

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{GL}} \quad (31)$$

Onde:

u_c é incerteza combinada e

GL graus de liberdade efetivos.

A incerteza expandida (U) é utilizada para determinar o intervalo onde o valor do analito está contido em um determinado nível de confiança (95,45%), para a concentração de cada analito certificado será calculada a partir da combinação das incertezas dos estudos de caracterização (u_c), estabilidade a longo prazo (u_{el}) e homogeneidade entre frascos (u_{bb}). O fator de expansão k será atribuído mediante cálculos conforme equação 31.

$$U = k \sqrt{u_c^2 + u_{el}^2 + u_{bb}^2} \quad (32)$$

3.12 Elaboração da Ficha de informação do MR e do certificado para MRC e dos respectivos rótulos

O documento que contenha todas as informações referentes ao uso de um MRC é denominado de “Ficha de informação de produto”. E o documento que contém as informações essenciais de uso, validade e rastreabilidade metrológica de um MRC é denominado de “Certificado de material de referência”. O guia que descreve todo processo de rotulação e certificação é o ISO Guia 31 Materiais de referência — Conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017c)

Estes documentos devem conter informações detalhadas como: título, identificação, nome do material, uso pretendido, quantidade mínima de amostragem, validade, armazenamento, instruções de uso, valor de propriedade, rastreabilidade

metrológica (caso de MRC) entre outras citadas no ISO Guia 31:2019. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2017c)

A rotulagem desses materiais também seguirá as orientações deste guia. Para a adequação do rótulo serão necessários alguns cuidados como: o rótulo deve estar firmemente aderido à embalagem do produto de uma unidade individual de MRC, este deve permanecer legível e intacto dentro das condições de armazenamento e de manuseio, as informações contidas devem ser claras e concisas, permitir a identificação da documentação apropriada do MRC, não é aconselhável os valores (certificados) de propriedade nem os valores indicativos sejam incluídos no rótulo.

3.13 Elaboração do Ensaio Interlaboratorial

Para a elaboração do ensaio de proficiência utilizou-se por base duas normas a “ABNT NBR ISO/IEC 17043:2011 - Avaliação de conformidade - Requisitos gerais para ensaios de proficiência” e a “ISO 13528:2015 *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison*”. Como provedor foi garantido a segurança e a confiabilidade dos resultados de cada participante. Bem como todo o preparo e o envio dos materiais para realização dos ensaios. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015)

A avaliação do desempenho dos laboratórios participantes é realizada por meio de testes estatísticos robustos⁵ que foram:

- Índice Z (*Z score*);
- Índice Zeta (*Zeta score*) e
- Índice En (*En score*).

⁵ A estatística robusta é uma aproximação alternativa aos métodos estatísticos clássicos. O objetivo é produzir estimadores que não sejam afetados por variações pequenas (outliers) relacionadas às hipóteses dos modelos.

Para os cálculos do Índice Z, utiliza-se o x_i que representa o resultado (ou a média das réplicas) relatado pelo participante i do ensaio de proficiência, deste valor é subtraído o x_{EP} que é o valor designado por consenso a partir dos resultados informados pelos participantes, e esta subtração dividido pelo desvio padrão do ensaio de proficiência σ_{EP} .

$$Z = \frac{(x_i - x_{EP})}{\sigma_{EP}} \quad (33)$$

Por conta do baixo número de participantes, o cálculo do σ_{EP} desvio padrão do ensaio de proficiência teve que ser adaptado, por conta disso utilizou-se a função de Horwitz⁶ modificada por Thompson e por meio do cálculo da fração mássica do analitos de cada participante pode-se calcular o desvio adequado. De acordo com a fração mássica (c) calcula-se o desvio σ que será utilizado para cálculo o Índice Z de acordo com a Figura 12. (THOMPSON, 2006)

Figura 12 – Abordagem de Horwitz para o cálculo do desvio padrão do ensaio de proficiência.

$$\sigma_R = \begin{cases} 0,22c & \text{when } c < 1,2 \times 10^{-7} \\ 0,02c^{0,8495} & \text{when } 1,2 \times 10^{-7} \leq c \leq 0,138 \\ 0,01c^{0,5} & \text{when } c > 0,138 \end{cases}$$

Fonte: (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015).

Com o desvio padrão da proficiência calculada, temos o índice z para cada laboratório. Considerando três intervalos de confiança conforme presente na Tabela 6

Tabela 6 – Avaliação de desempenho do Índice Z.

$z \leq 2,0$	Indica desempenho satisfatório e não gera sinal.
$2,0 < z < 3,0$	Indica desempenho questionável e gera um sinal de alerta.
$z \geq 3,0$	Indica desempenho insatisfatório e gera um sinal de ação.

Fonte: Autoria própria.

⁶ O modelo Horwitz é empírico, baseado em observações de ensaios colaborativos de muitos parâmetros durante um longo período de tempo.

Se o laboratório fornecer a sua incerteza, iremos utilizar os parâmetros do índice zeta (ζ), onde $u(x_i)$ é a incerteza padrão do laboratório participante calculada pelos próprios resultados x_i , $u(x_{EP})$ e a incerteza do valor atribuído x_{EP} . A avaliação do desempenho é similar à do Índice Z, ver Tabela 7.

$$\zeta_i = \frac{x_i - x_{EP}}{\sqrt{u^2(x_i) + u^2(x_{EP})}} \quad (34)$$

E por fim o Índice En (erro normalizado) avalia a capacidade do participante em ter resultados próximos ao valor atribuído dentro de sua incerteza expandida alegada. Para seu cálculo é preciso: onde $u(x_i)$ é a incerteza padrão do laboratório participante calculada pelos próprios resultados x_i , $u(x_{EP})$ e a incerteza do valor atribuído x_{EP} , semelhante aos cálculos do Índice zeta só que ao invés da incerteza u será utilizada a incerteza expandida U .

$$E_n = \frac{x_i - x_{EP}}{\sqrt{U^2(x_i) + U^2(x_{EP})}} \quad (35)$$

Com o índice En calculado para cada laboratório, a avaliação do desempenho foi realizada conforme os critérios estabelecidos ISO 17043 e estão na Tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação de desempenho do Índice En.

IE_n ≤ 1,0	Indica desempenho "satisfatório" e não gera sinal.
IE_n > 1,0	Indica desempenho "insatisfatório" e gera um sinal de ação.

Fonte: Autoria própria.

Afim de unir todos os dados separados por analitos e material foi utilizados métodos gráficos, foi utilizado gráfico de barras indicando os limites de desempenho de cada índice descritos acima. No gráfico contém também os códigos de cada participante onde facilitará a interpretação dos resultados.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Método RQA-IQSC-USP (GC-FID)

4.1.1 Materiais e instrumentos

Padrão interno utilizado:

- 1-pentanol da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,5\%$, Número CAS: 71-41-0.

Os padrões analíticos disponíveis possuem certificado de análise, onde apresentam alto grau de pureza, incerteza e rastreabilidade. Os padrões analíticos utilizados, com respectivas marcas e pureza foram:

- Acetato de etila da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,81\%$, Número CAS: 141-78-6;
- Metanol da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,89\%$, Número CAS: 67-56-1;
- 1-propanol da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,70\%$, Número CAS: 71-23-8;
- 2-metil-1-propanol da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,77\%$, Número CAS: 78-83-1;
- 2-metil-1-butanol da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza $\geq 99,5\%$, Número CAS: 137-32-6 e
- Furfural da marca Dr. Ehrenstorfer com pureza de $99,51\%$, Número CAS: 98-01-1.

Os certificados dos padrões utilizados estão no **ANEXO I – CERTIFICADOS DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DO GC-FID.**

A água deionizada utilizada no preparo da solução 40% etanol foi fornecida pelo Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Ambientais (LDTAmb) localizado no Instituto de Química de São Carlos (IQSC), onde segue as especificações da ISO 3696 – “*Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*”. E o etanol utilizado foi da marca J.K. Baker com pureza $\geq 99,7\%$. Como não se pode garantir a pureza da água deionizada, foram realizadas análises da solução 40% como branco para identificação de possíveis contaminações, aos quais não foram encontradas.

Afim de preparar os MRC e conduzir seus estudos, foram utilizados os seguintes instrumentos:

- Cromatógrafo gasoso 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 μ m da marca J&W Scientific;
- Balança analítica modelo TE214S da marca Sartorius Mechatronics;
- Micropipeta com volume variável de 0,5 a 10 μ l da marca Eppendorf;
- Micropipeta com volume variável de 10 a 100 μ l da marca Eppendorf e
- Micropipeta com volume variável de 100 a 1000 μ l da marca Eppendorf.

4.1.2 *Preparo dos candidatos a MRC*

4.1.2.1 Análise qualitativa e condições operacionais

O experimento se iniciou com o ajuste das condições operacionais do cromatógrafo. Para isso preparou-se uma solução contendo todos os analitos incluindo o padrão interno, a concentração de cada um foi de aproximadamente 25mg/ml em solução 40% etanol. Os parâmetros cromatográficos foram otimizados e após a eluição do último pico, houve um período de tempo em alta temperatura afim

de evitar a contaminação por *carryover*⁷. As condições cromatográficas para análise no GC-FID estão na Tabela 8. Foi definida a melhor condição cromatográfica levando em conta as condições do laboratório, boa resolução e boa separação dos analitos no menor tempo de análise.

A avaliação qualitativa, onde houve a identificação dos analitos, foi realizada através do tempo de retenção (t_R), cada analito foi injetado um por vez e identificado na solução contendo todos. Quando o analito era difícil de identificar a amostra contendo todos foi dopada com o analito em questão.

Tabela 8 – Condições operacionais do cromatógrafo para as análises no GC-FID.

Condições operacionais	
Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica	Inicialmente a uma temperatura de 35°C por 4,0 minutos, aumentando após esse período a uma taxa de 35°C/min até 200°C, essa temperatura foi mantida por mais 6,3 minutos.
Tempo total da corrida	11,00 minutos
Temperatura do injetor	200°C
Volume de injeção	1µl com razão de split 1:30

Fonte: Autoria própria.

A separação cromatográfica obtida pelo GC-FID e os picos identificados estão representadas na Figura 13. O pico em 4,96 min que ultrapassa o cromatograma é o do solvente, etanol 40%. Os tempos de retenção dos analitos foram ordenados como: 1- Acetato de Etila, 2- Metanol, 3- Solvente, 4- 1-propanol, 5 -2-metil-1-propanol, 6- 2-metil-1-butanol, 7*- 1-pentanol e 8- Furfural (*padrão interno). Pode-se observar os tempos de retenção dos analitos na Tabela 9, levou-se em consideração o tempo médio da triplicata das análises.

⁷ Contaminação da amostra por resíduos advindos da coluna cromatográfica após a corrida anterior.

Figura 13 - Separação cromatográfica obtida após otimização do GC-FID.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 9 - Tempos de retenção aproximados dos analitos na condição cromatográfica considerada ideal em solvente 40% etanol.

Nº	Analito	Tempo de Retenção (min)
1	Acetato de Etila	3,76
2	Metanol	4,28
3	1-propanol	6,11
4	2-metil-1-propanol	6,80
5	2-metil-1-butanol	7,88
6	1-pentanol	8,17
7	Furfural	9,52

Fonte: Autoria própria.

Para identificar o efeito de matriz (mudança no tempo de retenção ou outro interferente relacionado a matriz natural do produto), foram preparadas para cada analito, soluções na mesma concentração de aproximadamente 25mg/ml de solvente, o diferencial foi a utilização da cachaça e da vodca brutas como solventes. Para cachaça, observou-se ligeira mudança no tempo de retenção dos seguintes analitos: 1-propanol e 2-metil-1-propanol. E para a vodca não houve influência significativa da matriz nos analitos.

4.1.2.2 Construção das curvas de calibração

Preparou-se cinco soluções para a construção da curva de calibração da cachaça e da vodca, por conta de conterem os mesmos analitos foi construída uma curva para ambas as bebidas. A curva foi construída tendo em mente a concentração máxima permitida para cada analito em cada bebida presentes nas tabelas 2 e 3.

Para diminuir a incerteza associada à preparação dessas soluções, todas foram preparadas gravimetricamente em solução 40% (v/v), a solução foi adicionada primeiro aos balões para evitar perdas do analito por evaporação.

As soluções utilizadas para preparar a curva de calibração são soluções estoque. Uma solução estoque A contendo todos os analitos de interesse da cachaça e da vodca, e uma solução estoque B única, onde há apenas o padrão interno como ilustrado na Figura 14. A cada adição de padrão analítico, a balança foi tarada e a massa registrada. Com as massas registradas, utilizou-se as densidades de cada padrão adicionado e da solução 40% (v/v) etanol para a determinação do volume real adicionado e realizou-se o cálculo das concentrações dos padrões na solução estoque na unidade de g/ml.

Figura 14 – Composição das soluções estoque A e B para a construção da curva de calibração.

Fonte: Autoria própria.

Estimou-se as densidades das soluções por meio de pesagens consecutivas de 0,1 mL, uma vez que a incerteza da balança é menor que os instrumentos volumétricos. Utilizando-se o valor médio dos resultados de massa, estimou-se a densidade das duas soluções. Essas densidades estimadas foram utilizadas para

determinar a quantidade destas soluções que foram adicionadas às soluções utilizadas na construção das curvas de calibração.

Com as massas registradas, as densidades das soluções estoque A e B e o teor de etanol da solução 40%(v/v) etanol, construiu-se cinco níveis para a curva de calibração (Figura 15).

Figura 15 – Construção dos cinco níveis da curva de calibração.

Fonte: Autoria própria.

Foram construídas duas curvas de calibração, uma para a etapa de caracterização e estudo da homogeneidade e outra para o estudo das estabilidades longa e curta. Cada curva será avaliada separadamente no próximo tópico.

4.1.2.3 Avaliação das curvas aplicadas na quantificação dos compostos encontrados naturalmente na cachaça e na vodca

As duas curvas de calibração realizadas em datas diferentes tiveram a mesma forma de avaliação estatística. A linearidade foi avaliada pelo software de validação ConfLab® Validação/Verificação por meio de diferentes cálculos estatísticos bem como outros parâmetros para validação. Cada uma das cinco soluções para o preparo das curvas foi analisada em quintuplicata pelo GC-FID, ao todo foram 25 corridas. Foram necessárias duas curvas uma para a homogeneidade, estabilidade a curto

prazo e caracterização e outra para o posterior do estudo de estabilidade de longo prazo. As curvas foram avaliadas com as expressões (4-14).

A razão entre os tempos de retenção dos analitos e o padrão interno foram avaliadas para colaborar na identificação de interferentes e desvios. A área obtida de cada analito em cada medição foi dividida pela área obtida do padrão interno na mesma medição. As concentrações de cada solução também foram divididas pelas concentrações do padrão interno para cada analito.

Os valores de área obtidos para cada réplica foram avaliados pelo teste de Grubbs, com a finalidade de identificar possíveis valores discrepantes. Os valores que foram identificados como “*outliers*” por esse teste, foram submetidos a outro teste, o de Dixon (teste Q) para confirmar se o valor é discrepante ou não. Os valores que foram identificados como valores discrepantes pelos dois testes foram eliminados de acordo com as expressões (2-3). Os níveis de concentração para cada analito estão presentes na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 – Níveis de concentração dos analitos presentes na primeira curva de calibração.

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
*Acetato de Etila	2,2	9,83	24,63	40,9	59,29
*Metanol	1,75	15,84	35,26	59,25	70,21
Propanol	5,44	10,87	24,49	53,32	65,99
*2-metil-1-propanol	1,75	15,87	50,7	75,4	97,43
2-metil-1-butanol	5,71	11,75	26,47	57,64	71,34
Furfural	0,69	2,7	6,09	13,26	16,40

*Analitos presentes na vodca. Fonte: Autoria própria.

A Tabela 11 apresenta os resultados dos testes estatísticos para cada analito estudado para a cachaça e a vodca presentes na primeira curva de calibração.

Tabela 11 – Resultados dos testes estatísticos para as curvas de calibração por GC-FID para os analitos na primeira curva de calibração.

Analito	LQ	Linearidade							Incerteza centro curva
		Faixa de trabalho	Avaliação da Homocedasticidade	Equação da reta	R	ANOVA	Maior desvio %	Maior resíduo %	
*Acetato de Etila	2,2	2,2-59,29	Heterocedastico	$y=0,01x+0,03$ Regressão Ponderada	0,9875	Y efetivamente varia em função de X	106,62	43,95	15,05%
*Metanol	1,75	1,75-70,21	Homocedastico	$y=0,010x+1,23$ Regressão Ordinária	0,9926	Y efetivamente varia em função de X	1461,03	21,38	21,06%
Propanol	5,44	5,44-65,99	Homocedastico	$y=0,07x+0,27$ Regressão Ordinária	0,9975	Y efetivamente varia em função de X	47,58	38,87	2,94%
*2-metil-1-propanol	1,75	1,75-97,43	Heterocedastico	$y=0,00x+0,04$ Regressão Ponderada	0,9991	Y efetivamente varia em função de X	415,55	39,59	16,91%
2-metil-1-butanol	5,71	5,71-71,34	Heterocedastico	$y=0,02x+0,11$ Regressão Ponderada	0,9997	Y efetivamente varia em função de X	16,32	7,52	1,77%
Furfural	0,69	0,69-16,40	Heterocedastico	$y=0,01x+0,03$ Regressão Ponderada	0,9996	Y efetivamente varia em função de X	112,19	21,02	21,68%

*Analitos presentes na vodca. Fonte: Autoria própria.

Nesta primeira curva pode-se avaliar que o LQ foi definido como a menor concentração analisada na curva, como exemplo o Furfural com o limite de 0,69 mg/ml e o 2-metil-1-butanol com o limite de 5,71 mg/ml.

A curva do analito Acetato de Etila, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e Furfural apresentaram caráter heterocedástico, já os demais analitos, Metanol, Propanol e apresentaram caráter homocedástico.

Para os analitos com o coeficiente de correlação (R) maior que 0,99 são considerados aprovados. Neste quesito todos foram aprovados.

Com o parâmetro ANOVA, podemos confirmar que os analitos foram satisfatórios com Y variando em função de X.

O analito com maior desvio foi o Metanol, com 1461,03% o que pode ser justificar pela grande faixa de trabalho estabelecida e pela natureza do analito

Em relação ao maior resíduo temos o Acetato de Etila com o maior com 43,95% e o 2-metil-1-butanol com o menor resíduo com 7,52%.

A incerteza do ponto central foi melhor avaliada nos analitos 2-metil-1-butanol com 1,77% e no propanol com 2,94% e pior avaliado nos analitos: metanol com 21,06% e furfural com 21,68%.

Os níveis de concentração para cada analito estão presentes na Tabela 12 abaixo.

Tabela 12 – Níveis de concentração dos analitos presentes na segunda curva de calibração.

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
*Acetato de Etila	2,51	14,81	28,14	43,46	62,24
*Metanol	2,03	24,61	42,15	56,32	75,31
Propanol	14,44	33,60	55,00	78,80	92,51
*2-metil-1-propanol	0,46	7,25	16,49	27,84	37,35
2-metil-1-butanol	5,26	17,41	34,25	51,20	71,25
Furfural	0,25	2,65	5,28	7,38	10,45

*Analitos presentes na vodca. Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 13 pode-se observar os valores obtidos a partir da segunda curva de calibração dos analitos em estudo.

Tabela 13 - Resultados dos testes estatísticos para as curvas de calibração por GC-FID para os analitos na segunda curva de calibração.

Analito	LQ	Linearidade							Incerteza centro curva
		Faixa de trabalho	Avaliação da Homocedasticidade	Equação da reta	R	ANOVA	Maior desvio %	Maior resíduo %	
*Acetato de Etila	2,51	2,51-62,24	Homocedástico	$y=0,05x+0,54$ Regressão Ordinária	0,9942	Y efetivamente varia em função de X	149,70	37,34	7,47%
*Metanol	2,03	2,03-75,31	Heterocedástico	$y=0,02x+2,93$ Regressão Ponderada	0,9961	Y efetivamente varia em função de X	10456,65	132,43	21,87%
Propanol	14,44	14,44-92,51	Homocedástico	$y=0,03x+0,31$ Regressão Ordinária	0,9932	Y efetivamente varia em função de X	34,13	24,52	3,74%
*2-metil-1-propanol	0,46	0,46-37,35	Homocedástico	$y=0,23x+1,93$ Regressão Ordinária	0,9972	Y efetivamente varia em função de X	296,60	18,28	2,52%
2-metil-1-butanol	5,26	5,26-71,25	Heterocedástico	$y=0,02x+0,36$ Regressão Ponderada	0,9965	Y efetivamente varia em função de X	95,88	32,93	8,60%
Furfural	0,25	0,25-10,45	Heterocedástico	$y=0,03x+0,06$ Regressão Ponderada	0,9994	Y efetivamente varia em função de X	81,36	9,99	6,97%

*Analitos presentes na vodca. Fonte: Autoria própria.

Nesta segunda curva pode-se avaliar que o LQ foi definido como a menor concentração analisada na curva, como exemplo o Furfural com o limite de 0,25 mg/ml e o 2-metil-1-butanol com o limite de 5,26 mg/ml.

A curva do analito Acetato de Etila, Propanol, 2-metil-1-propanol homocedastico, já os demais analitos, Metanol, 2-metil-1-butanol e Furfural apresentaram caráter heterocedastico.

Para os analitos com o coeficiente de correlação (R) maior que 0,99 são considerados aprovados. Neste quesito todos foram aprovados.

Com o parâmetro ANOVA, podemos confirmar que os analitos foram satisfatórios com Y variando em função de X.

O analito com maior desvio foi o Metanol, com 10456,65% o que pode ser justificar pela grande faixa de trabalho estabelecida e pela natureza do analito

Em relação ao maior resíduo também temos o Metanol com o maior com 132,43% e o Furfural com o menor resíduo com 9,99%.

A incerteza do ponto central foi bem avaliada em todos os analitos. A maior incerteza foi encontrada no analito metanol com 21,87%.

Como exemplo temos os resultados obtidos pelo software Conflab para o analito Propanol no **ANEXO II – Resultados estatísticos obtidos pelo software Conflab das curvas de calibração dos analitos em estudo.**

4.1.2.4 Avaliação do método RQA-USP (GC-FID)

Os cálculos da validação do método foram efetuados via software de validação ConfLab® Validação/Verificação. (CONFLAB, 2018a) E tendo em vista os critérios estabelecidos pelo “Manual de Garantia da Qualidade Analítica - Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos. (BRASIL, 2015) os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Parâmetros para a validação do método RQA-USP (GC-FID).

Parâmetro	Analito	Resultado	Aceitação
Linearidade	Acetato de Etila	0,99	$r \geq 0,99$
	*Metanol	0,99	
	Propanol	0,99	
	*2-metil-1-propanol	0,99	
	2-metil-1-butanol	0,99	
	Furfural	0,99	
Precisão (repetibilidade)	Acetato de Etila	10,90%	$CV \leq 20\%$
	*Metanol	1,42%	
	Propanol	0,69%	
	*2-metil-1-propanol	1,92%	
	2-metil-1-butanol	0,77%	
	Furfural	14,40%	
Exatidão/Tendência	Acetato de Etila	10,90%	$\leq 20\%$
	*Metanol	1,42%	
	Propanol	0,69%	
	*2-metil-1-propanol	1,92%	
	2-metil-1-butanol	0,77%	
	Furfural	14,40%	
Precisão Intermediária	Acetato de Etila	8,84%	$CV \leq 20\%$
	*Metanol	1,60%	
	Propanol	1,34%	
	*2-metil-1-propanol	2,57%	
	2-metil-1-butanol	0,68%	
	Furfural	14,60%	

*Analitos presentes na vodca. Fonte: Autoria própria.

A precisão (repetibilidade) foi calculada considerando para cada analito cinco níveis de concentração com cinco réplicas cada com o mesmo procedimento de medição; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob mesmas condições; mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível. A precisão intermediária foi avaliada similar a precisão (repetibilidade) porém alterando-se o tempo, foi realizada uma semana após a primeira avaliação. Pode-se ver que o método foi validado para todos os analitos propostos.

4.1.2.5 Quantificação dos contaminantes naturalmente presentes nas amostras de cachaça e vodca (background)

A quantificação dos contaminantes naturalmente presentes é conhecida como “caracterização de *background*” sendo necessário para fornecer uma orientação para a fortificação do material, isto é, reconhece-se a quantidade de cada analito presente na amostra real de cachaça e vodca.

O preparo da amostra para análise foi: 5 ml de cachaça, pesada dentro de um balão volumétrico e adicionou-se a solução contendo o padrão interno (solução B) a uma concentração próxima da utilizada na curva. A partir das massas da cachaça e de solução B e utilizando-se os dados densidade e alcoometria da cachaça, obteve-se as concentrações dos padrões adicionados de forma análoga à utilizada no preparo das soluções da curva. A solução para a vodca foi realizada de maneira análoga, apenas trocando a matriz bebida.

As amostras de cachaça/vodca junto com o padrão interno foram analisadas no GC-FID por injeção direta em quintuplicata. Os valores de área obtidos para cada réplica foram avaliados pelo teste de Grubbs, com a finalidade de identificar possíveis valores discrepantes. Os valores que foram identificados como “outliers” por esse teste, foram submetidos a outro teste, o de Dixon (teste Q) para confirmar se o valor é discrepante ou não. Os valores que foram identificados como valores discrepantes pelos dois testes foram eliminados.

Para melhorar a identificação dos picos de interesse, utilizou-se novamente as razões entre os tempos de retenção dos picos e dos padrões internos

correspondentes. As razões obtidas foram utilizadas para o cálculo da concentração dos analitos utilizando-se a curva de calibração.

Para a determinação da concentração de cada analito em cada matriz, foi utilizada a equação da reta modificada na expressão (1).

A quantificação dos contaminantes naturalmente presentes nas amostras de cachaça e vodca (*background*) estão nas tabelas 15 e 16. Para a cachaça os analitos 1-propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol são avaliados pela somatória de 360mg/100mL de etanol anidro. E para a vodca o limite de metanol na legislação brasileira é de 20mg/100mL de etanol anidro e na europeia é de 10mg/100mL de etanol anidro, então considera-se a mais restritiva. As figuras 16 e 17 representam os cromatogramas de background da cachaça e da vodca respectivamente.

Tabela 15 - Resultados da quantificação do *background* da cachaça.

Analito	Cachaça Bruta (mg/100 mL de etanol 40%)	Cachaça Bruta (mg/100 mL de etanol anidro)
Acetato de Etila	20,08	8,03
Metanol	1,55	0,62
1-propanol	35,05	14,02
2-metil-1-propanol	10,82	4,33
2-metil-1-butanol	33,33	13,33
Furfural	0,93	0,37

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16 - Resultados da quantificação do *background* da vodca.

Analito	Vodca Bruta (mg/100 mL de etanol 40%)	Vodca Bruta (mg/100 mL de etanol anidro)
Acetato de Etila	3,45	1,38
2-metil-1-propanol	0,81	0,32
Metanol	1,98	0,79

Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Cromatograma representativo referente à análise da cachaça real.

Figura 17 - Cromatograma representativo referente à análise da vodca real.

No cromatograma da cachaça pode-se observar alguns picos a mais que os analitos propostos nesse estudo, já na vodca, por se tratar de uma bebida destilada e retificada a altas temperaturas para exclusão de contaminantes, espera-se que não haja interferentes.

De acordo com estudos publicados os valores de metanol encontrados na cachaça estão em torno de metanol 1,82mg/100mL de álcool anidro e 1,16mg /100mL de álcool anidro para destilação em alambiques de cobre e aço inox respectivamente. Neste mesmo trabalho avaliou-se o acetato de etila com valores em torno de 16,3mg /100mL de álcool anidro a 108mg/100mL de álcool anidro para destilação em alambiques de cobre e aço inox respectivamente. Continuando também foram estudados o analito propanol, com concentrações de 58,05mg/100mL de álcool anidro e 78,2mg/100mL de álcool anidro para destilação em alambiques de cobre e aço inox respectivamente (NASCIMENTO et al., 1998a).

Em outro estudo foram analisadas 60 amostras de cachaça comercializadas na cidade de São Paulo, as concentrações encontradas de metanol estavam abaixo da máxima permitida pela legislação (20mg/100mL de álcool anidro). Para o acetato de etila, as concentrações variaram de 5,4 a 200,0mg/100mL álcool anidro (CARUSO; NAGATO; ALABURDA, 2008).

Outra pesquisa analisou 25 amostras de cachaça, estas comercializadas em diferentes regiões do Brasil, e não detectaram concentrações de acetato de etila e metanol acima do limite máximo permitido pela legislação (BOSCOLO et al., 2000).

Quanto as concentrações de furfural, em estudo realizado com 12 amostras de cachaças advindas do Rio Grande do Sul, variaram de 4,28 a 39,78mg/100mL de álcool anidro (ZACARONI et al., 2011). Em outro estudo avaliando 14 cachaças as concentrações encontradas foram de >LQ até 1,31mg/100mL de álcool anidro (NASCIMENTO et al., 1998b).

Neste trabalho foram avaliadas 27 cachaças com originadas no noroeste do Rio Grande do Sul, as concentrações de metanol detectadas ficaram abaixo de 2,95mg/ 100mL de álcool anidro; as concentrações de acetato de etila variaram de 21,23 a 44,18mg/100mL de álcool anidro; as concentrações do propanol (ácido n-propílico) variaram de 18,78 a 47,27mg/100mL de álcool anidro e as concentrações

de 2-metil-1-propanol (ácido isobutílico) variaram de 43,40 a 83,93mg/100mL de álcool anidro (BOGUSZ JUNIOR et al., 2006).

Ao analisar a vodca bruta não foram detectadas concentrações de metanol. Em outro estudo onde foram avaliadas 32 vodcas, também não houve essa quantificação por conta de as concentrações estarem abaixo dos limites de quantificação do instrumento de 0,5 mg/100mL de etanol puro. Para acetato de etila as concentrações encontradas não provocarem problemas de saúde nos brasileiros elas não ficaram em conformidade com a legislação europeia que regulamenta o máximo de 1,3mg/100mL de álcool anidro e os valores obtidos no estudo foram de <LQ a 4,00 mg/100mL de álcool anidro (PEREIRA et al., 2013).

Em um estudo russo onde foram avaliadas vodcas russas e internacionais foram detectadas concentrações de álcoois superiores (1-propanol, 2-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol e álcool isoamílico) entre 0,5 a 4,9 mg/100mL de álcool anidro para vodcas russas e de 6,00 a 45,0mg/100mL de álcool anidro para vodcas estrangeiras. As concentrações de ésteres (acetado de metila e acetato de etila) entre 0,5 a 1,0mg/100mL de álcool anidro para vodcas russas e 40,0mg/100mL de álcool anidro. As concentrações de metanol de 0,00014 a 0,00290mg/100mL de álcool anidro para vodcas russas e 0,04 mg/100mL de álcool anidro para vodcas estrangeiras (ABRAMOVA et al., 2020).

4.1.2.6 Fortificação das amostras de bebidas reais (*spiking*)

Com os resultados da caracterização do *background* foi possível realizar a fortificação dos candidatos a MRC em valores acima aos limites da legislação afim de garantir uma presença marcante de cada analito. Os analitos que estavam em menor concentração da legislação ou que não estavam presentes foram adicionadas as soluções de acordo com a disponibilidade de cada padrão analítico. Os cálculos dos volumes de cada padrão a serem adicionados foram baseados na massa de cachaça bem como da vodca, ambas contidas em balões de 100 mL cada, na porcentagem presente de etanol nas duas bebidas e na densidade dos padrões.

Os candidatos a MRC foram distribuídos em 200 frascos, sendo 100 frascos para a cachaça e 100 frascos para a vodka, todos identificados e contendo 1,0ml cada. A Figura 18 apresenta os candidatos a MRCs finalizados.

Figura 18 – Apresentação dos 200 frascos de MRC prontos, 100 para a cachaça e 100 para a vodka.

Fonte: Autoria própria.

4.2 Estudos da Homogeneidade (Método RQA-IQSC-USP)

Os estudos da homogeneidade dos lotes produzidos foram executados por GC-FID. Para estes estudos, foram avaliados 18 frascos do candidato a MRC de cachaça e 18 frascos do candidato a MRC de vodka. Afim de conferir aleatoriedade as escolhas dos frascos, foi utilizada a ferramenta “*Random Org.*”, onde foram gerados de modo aleatório números de 0 a 100. Nos frascos sorteados foram adicionados, por gravimetria, a solução contendo o padrão interno.

As concentrações do padrão interno adicionados a cada frasco foram mensuradas por meio das massas de solução B adicionadas por gravimetria para a determinação do analito a cada medição. As determinações foram realizadas em triplicata, e em três ordens distintas afim de eliminar a possibilidade de tendências nas medições: ordem crescente, ordem decrescente e ordem aleatória. Na Figura 19 há a esquematização simplificada do estudo da homogeneidade onde foram selecionados

18 frascos para análise em triplicata totalizando 54 corridas para cada candidato a MRC.

Figura 19 – Esquemática da condução do estudo da homogeneidade.

Fonte: Autoria própria.

Para avaliar o nível de heterogeneidade das amostras em porcentagem, foi utilizado o cálculo ANOVA de fator único e as expressões (11-12), o desvio-padrão entre os frascos (s_{bb}), o desvio padrão da repetibilidade da análise e a incerteza relativa da homogeneidade (u_{bb}) pela divisão de u_{bb} na unidade de concentração pela concentração de cada analito obtida a partir da média das concentrações dos frascos obtidos do ensaio de homogeneidade. As expressões utilizadas são (17-25). Os resultados obtidos estão na Tabela 17 para a cachaça e Tabela 18 para a vodca.

Tabela 17– Resultados do estudo de homogeneidade da cachaça.

Analito	u_{bb} (mg/100 ml cachaça)	s_r (mg/100ml cachaça)	u_{bb} (relativa)	Grau de Heterogeneidade (%)	F calculado (F crítico = 1,915)
Acetato de Etila	15,682	2,122	0,306	30,627	164,836
Metanol	0,213	0,775	0,006	0,592	1,227
Propanol	0,253	0,631	0,007	0,714	1,483
2-metil-1-propanol	0,212	0,419	0,012	1,212	1,766
2-metil-1-butanol	0,269	0,490	0,004	0,417	1,904
Furfural	0,001	0,006	0,001	0,144	0,551

Fonte: Autoria própria.

Tabela 18– Resultados do estudo de homogeneidade da vodca.

Analito	U_{bb} (mg/100 ml de vodca)	S_r (mg/100ml de vodca)	U_{bb} (relativa)	Grau de heterogeneidade (%)	F calculado (F crítico = 1,915)
Acetato de Etila	0,034	0,151	0,009	0,978	0,842
Metanol	0,253	0,940	0,008	0,797	1,212
2-metil-1-propanol	0,003	0,017	0,003	0,337	1,072

Fonte: Autoria própria.

Para o candidato a MRC da cachaça temos todos os analitos aprovados com $F_{\text{calculado}}$ menor que o $F_{\text{crítico}}$ com exceção apenas do acetato de etila que obteve o $F_{\text{calculado}}$ muito acima do $F_{\text{crítico}}$, comprovando ser heterogêneo dentro do lote. E para o candidato a MRC da vodca teve todos seus analitos aprovados com $F_{\text{calculado}}$ menor que o $F_{\text{crítico}}$ incluindo o acetato de etila. Afim de obter mais respaldo sobre a heterogeneidade do acetato de etila em cachaça este foi submetido ao estudo de estabilidade também (ver resultados e discussão nos próximos tópicos). O teste F é calculado pelas expressões (11-12).

Os analitos aprovados podem ser certificados e a incerteza associada à homogeneidade (u_{bb}) será combinada à incerteza dos outros estudos para a determinação da incerteza do valor certificado final.

4.3 Estudos da Estabilidade (Método RQA-IQSC-USP)

4.3.1 Estabilidade a longo prazo

Por conta destes estudos serem realizados posteriormente aos demais estudos foi necessário a construção de uma nova curva de calibração no GC-FID.

Para o estudo da estabilidade de longa duração foi aplicado o método isócrono onde foram retirados frascos de tempos em tempos, e estes mantidos em temperatura ambiente. Foram retirados aleatoriamente um frasco de cada candidato a MRC no momento da produção e por mais cinco vezes. Resultando no final seis meses de

estudo, com seis frascos para cada candidato. O período do estudo foi: out/19, nov/19, dez/19, jan/20, fev/20 e mar/20 sendo este último o tempo zero.

No último mês quando os últimos frascos foram retirados, em todos foi adicionado à solução contendo o padrão interno por gravimetria. Cada frasco foi analisado em triplicata, nas ordens: crescente, decrescente e aleatória. A Figura 20 ilustra o procedimento.

Figura 20 - Esquemática do estudo de estabilidade à longo prazo.

Fonte: Autoria própria.

Com a curva de calibração de cada analito, foram calculadas as concentrações para as replicatas de cada um dos seis meses avaliados para cada candidato a MRC. Foi realizado o método da regressão linear entre a concentração média de cada mês (representado no eixo y) e o tempo transcorrido em meses (representado no eixo x).

4.3.1.1 Avaliação de tendências à degradação

A avaliação de tendências à degradação foi realizada por meio das significâncias dos coeficientes angulares a partir da expressão (26). Nas tabelas 19 e 20 constam os valores dos coeficientes angulares em módulo, comparando com o erro-padrão do coeficiente angular (s_a) multiplicado pelo valor de t com probabilidade (95%) e graus de liberdade (6, para seis meses) em relação aos números de pontos

de regressão menos dois (n-2) para a cachaça e a vodca respectivamente. O valor do t tabelado é 2,776. Quanto maior o tempo de prateleira maior será a incerteza do MRC.

Tabela 19- Avaliação de tendências à degradação do candidato a MRC da cachaça.

Analito	 a 	$t_{0,95,n-2} \times S_a$
Acetato de Etila	4,525	18,73
Metanol	0,091	0,300
1-propanol	0,014	0,240
2-metil-1-propanol	0,007	0,099
2-metil-1-butanol	0,188	0,455
Furfural	0,007	0,013

Fonte: Autoria própria.

Abaixo temos a representação gráfica da avaliação da tendência de cada analito presente no candidato a MRC da cachaça as figuras 21 a 26.

Figura 21 – Avaliação de tendência do analito acetato de etila no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 22 – Avaliação de tendência do analito metanol no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 23 – Avaliação de tendência do analito propanol no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 24 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-propanol no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 25 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-butanol no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 26 – Avaliação de tendência do analito furfural no candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 20 - Avaliação de tendências à degradação do candidato a MRC da vodca.

Analito	a	$t_{0,95,n-2} \times s_a$
Acetato de Etila	0,059	0,075
Metanol	0,007	0,279
2-metil-1-propanol	0,014	0,026

Fonte: Autoria própria.

Abaixo temos a representação gráfica da avaliação da tendência de cada analito presente no candidato a MRC da vodca as figuras 27 a 29.

Figura 27 – Avaliação de tendência do analito acetato de etila no candidato a MRC da vodca.

Fonte: Autoria própria.

Figura 28 – Avaliação de tendência do analito metanol no candidato a MRC da vodca.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29 – Avaliação de tendência do analito 2-metil-1-propanol no candidato a MRC da vodca.

Fonte: Autoria própria.

Nenhum dos analitos obtiveram t calculado menor que o t crítico com exceção do acetato de etila em cachaça como esperado. O acetato de etila entre os demais analitos possui ponto de ebulição menor e, portanto, pode sofrer maior variação na concentração ao manusear os frascos e até na hora de transferir a solução para os frascos pode ter volatilizado o analito. O fato do acetato de etila ser estável e homogêneo na matriz vodca pode ser por conta da concentração menor e ficar retido na matriz, enquanto na cachaça a concentração era bem maior, ocasionando maior perda por evaporação.

Para estimar a incerteza relacionada ao tempo de prateleira de 12 meses a partir do momento da certificação, foi utilizada a expressão (27).

As tabelas 21 e 22 apresentam as incertezas U_{ts} relacionadas às estabilidades a longo prazo durante o tempo de prateleira dos candidatos a MRC da cachaça e da vodca respectivamente. A incerteza é determinada pelo s_a multiplicado por 12 meses, e a incerteza relativa, obtida pela divisão entre o valor de U_{ts} obtido na unidade de concentração pela média das concentrações determinadas pelo estudo de estabilidade.

Tabela 21 – Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira para o candidato a MRC da cachaça.

Analito	S_a	U_{ts} prateleira (mg/100mL de cachaça)	U_{ts}
Metanol	0,108	1,296	0,036
1-propanol	0,086	1,036	0,030
2-metil-1-propanol	0,036	0,427	0,025
2-metil-1-butanol	0,164	1,965	0,033
Furfural	0,005	0,057	0,045

Fonte: Autoria própria.

Tabela 22 - Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira para o candidato a MRC da vodca.

Analito	S_a	U_{ts} prateleira (mg/100mL de vodca)	U_{ts}
Acetato de Etila	0,027	0,322	0,091
Metanol	0,101	1,207	0,037
2-metil-1-propanol	0,009	0,111	0,168

Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Estabilidade a curto prazo

O intuito do estudo da estabilidade a curto prazo foi para avaliar as condições de transporte dos candidatos a MRC aos participantes do ensaio de proficiência realizado neste projeto. O local mais distante que o material foi submetido para os ensaios demorou cerca de 3 dias em transporte normal terrestre. Portanto foi estipulado um período de até 72 horas para transporte do material, a temperatura escolhida para o estudo, foi a temperatura de 40°C, considerando a temperatura dentro de um caminhão, e para o estudo os frascos foram somente tampados sem a adição do *parafilm* para vedação adicional, e para o transporte real foi adicionada a vedação.

Para a condução do estudo foram separados 4 frascos de cada candidato a MRC, onde dois frascos de cada foram mantidos por 24 horas à uma temperatura de 40°C, por 24 horas a 25°C, e por mais 8 horas a 40°C e a 25°C pelo restante do período como mostrado na Figura 30. Após as variações de temperatura, foram adicionados, por gravimetria, aos frascos a solução contendo o padrão interno.

Figura 30 – Esquema da condução do estudo de estabilidade a curto prazo.

Fonte: Autoria própria.

Após a adição da solução com o padrão interno, os frascos foram submetidos a análise por GC-FID. Cada frasco foi avaliado em triplicata e os resultados variaram dentro do esperado considerando a incerteza calculada no estudo da caracterização. Apesar disso aconselha-se a armazenar em refrigeração de -4°C para melhor desempenho do MRC.

Segundo estudos já publicados com MRC de cachaça, pode -se confirmar que a incerteza da estabilidade de curto prazo não contribui significativamente no cálculo

da incerteza combinada porque é ínfima quando comparada à incerteza da estabilidade de longo prazo. A incerteza de curto prazo foi avaliada apenas com intuito para a definição das condições de transporte das amostras. (MONTEIRO et al., 2013)

Vale ressaltar que o laboratório da universidade onde foram produzidos estes materiais não é um produtor acreditado de MRC e que esses candidatos a MRC foram produzidos durante o mestrado com o intuito de colaborar com o aprendizado e de também colaborar com o monitoramento desses analitos nas bebidas propostas.

4.4 Caracterização e estimativa das incertezas relacionadas aos candidatos a MRC

4.4.1 Método RQA-IQSC-USP (GC-FID)

Para a caracterização pelo GC-FID foi utilizada a mesma curva de calibração ao qual foi realizada a quantificação dos contaminantes naturalmente presentes nas amostras de cachaça e vodca (*background*) pois foi realizado no dia seguinte. Para o procedimento foi separado um frasco com o candidato a MRC para a cachaça e um frasco com o candidato a MRC da vodca, ambos foram pesados e fortificados com a solução contendo o padrão interno e avaliados em setuplicata. As figuras 31 e 32 representam os cromatogramas referentes a fortificação das bebidas.

Figura 31 - Cromatograma representativo referente ao candidato a MRC da cachaça por GC-FID.

Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Cromatograma representativo referente ao candidato a MRC da vodca por GC-FID.

Fonte: Autoria própria.

Para a caracterização dos analitos presentes nos candidatos a MRC da cachaça foram calculadas concentrações das sete replicatas, a partir das áreas dos picos pela equação da reta de cada analito. Foi avaliado a presença de *outliers* pelo teste de Grubbs e por fim calculada a média dos valores e designado o valor de propriedade para os dois candidatos a MRC com as expressões (2-3). Nas tabelas 23 e 24 estão os valores de propriedade de cada analito.

Tabela 23 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-FID.

Analito	MRC Cachaça (mg/100 mL de cachaça)
Metanol	36,30
1-propanol	34,68
2-metil-1-propanol	17,32
2-metil-1-butanol	60,43
Furfural	1,24

Fonte: Autoria própria.

Tabela 24 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca por GC-FID.

Analito	MRC Vodca (mg/100 mL de vodca)
Acetato de Etila	3,54
2-metil-1-propanol	0,66
Metanol	32,90

Fonte: Autoria própria.

Todos os analitos com exceção do Furfural presente no candidato a MRC da cachaça foram caracterizados por duas técnicas distintas. No caso do Furfural, a caracterização será avaliada pelos resultados do estudo de homogeneidade, utilizando como base a orientação da *ISO Guide 80:2014*:

“Uma maneira eficaz de determinar um valor indicativo de propriedade é usar a média geral derivada do estudo de homogeneidade. A faixa dentro da qual os valores da propriedade podem razoavelmente estar localizados pode ser estimado pelo desvio deste valor médio geral. Este desvio da média pode ser usado para estabelecer limites de advertência da carta de controle. Convencionalmente, limites de aviso e ação (também descritos como limites de ação inferior e superior) são estabelecidos em

duas e três vezes o desvio padrão, respectivamente.” (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2014)

Em outras palavras o analito furfural não será certificado de acordo com a ISO Guia 35:2020, mas poderá ser utilizado como controle interno das análises de rotina dos laboratórios. O valor de propriedade foi calculado a partir dos valores obtidos no ensaio de homogeneidade onde há 54 valores de concentração para se calcular a média bem como o desvio dividido por raiz quadrada do número de valores.

4.4.2 Estimativa das incertezas relacionadas à caracterização dos candidatos a MRC por GC-FID

Para a avaliação das incertezas relacionadas à caracterização dos candidatos a MRC por GC-FID foi utilizado o software Conflab® Incerteza (CONFLAB, 2018b). O cálculo foi realizado a partir da incerteza da curva de calibração utilizada na caracterização, na repetibilidade, do padrão utilizado, e da balança. Para cada analito foi gerado um diagrama de Ishikawa, como os diagramas são semelhantes entre si, apenas um servirá de exemplo ilustrado na Figura 33.

Figura 33 - Diagrama de Ishikawa para identificar as principais fontes de incerteza relacionadas à caracterização dos candidatos a MRC por GC-FID.

Fonte: Conflab Incerteza.

As contribuições de cada fonte foram calculadas pelo Software Conflab® Incerteza abaixo há um exemplo para o analito Metanol na Figura 34.

Figura 34 – Fontes de contribuição da incerteza do analito Metanol calculadas pelo software.

Fonte: Conflab Incerteza.

Compilado das contribuições de cada fonte também foram calculadas pelo Software Conflab® Incerteza na Figura 35.

Figura 35 - Gráfico comparativo entre as fontes de incerteza que compõem a incerteza combinada de uma das etapas de caracterização.

Fonte: Autoria própria.

As incertezas padrão percentual de cada analito estão apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 – Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-FID.

Analito	UCFID (%)
Metanol	21,65
Acetato de Etila	15,06
1-propanol	5,43
2-metil-1-propanol	19,13
2-metil-1-butanol	3,97
*Furfural	24,13

* *Obtido pelo desvio padrão das análises do estudo da homogeneidade.

Fonte: Autoria própria.

4.4.3 Método LFDA-MG (GC-MS)

4.4.3.1 Materiais e instrumentos

Neste método não foi utilizado padrão-interno. Os padrões analíticos utilizados, com respectivas marcas e pureza foram:

- Acetato de etila, marca Merck (pureza 99,8%), Número CAS: 141-78-6;
- Metanol, marca Sigma-Aldrich (pureza 99,75%), Número CAS: 67-56-1;
- 2-metil-1-butanol, marca Dr Ehrenstorfer (pureza 99,5%), Número CAS: 137-32-6;
- 1-propanol, marca Sigma-Aldrich (pureza 99,7%), Número CAS: 71-23-8;
- 2-metil-1-propanol, marca Sigma-Aldrich (pureza 100,0%), Número CAS: 78-83-1;
- Furfural, marca Dr. Ehrenstorfer (pureza 99,51%), Número CAS: 98-01-1;
- Etanol absoluto Merck (pureza 99,9 %), Número CAS: 64-17-5 | 107017. e

- Água tipo I.

Os certificados dos padrões utilizados estão no **ANEXO III – CERTIFICADOS DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DO GC-MS.**

A análise por GC-MS foi realizada em parceria com o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária - LFDA-MG por método já validado (apesar deste método não constar no escopo de acreditação da ISO/IEC 17025 deste laboratório, destaca-se que o laboratório é acreditado para vários outros ensaios, incluindo com o uso de cromatografia gasosa, fazendo que em suas instalações as operações ocorram conforme a ISO/IEC 17025). As condições cromatográficas estão descritas na Tabela 26.

- Cromatógrafo gasoso, marca Agilent, modelo 7890, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, marca Agilent, modelo 7000A para os analitos acetato de etila, metanol, 2-metil-1-butanol, 1-propanol e 2-metil-1-propanol. Coluna capilar HP-Innowax (60 m x 0,250 mm x 0,25 µm).

Tabela 26 – Condições operacionais do cromatógrafo para as análises no GC-MS.

Condições operacionais	
Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica	Programa de temperatura do forno: 40 °C por 1 min, de 40 a 70 °C com incremento de 3 °C/min, de 70 a 150 °C com incremento de 30 °C/min e de 150 a 230 °C com incremento de 120 °C/min, estável por 2,67 min
Tempo total da corrida	17 minutos
Temperatura do injetor	230°C
Temperatura do detector	230°C
Fase móvel	Hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1,5 mL/min
Volume de injeção	0,50µl com razão de split 60:1

Fonte: Autoria própria.

4.4.3.2 Caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-MS e incerteza associada

Para a caracterização dos analitos presentes nos candidatos a MRC da cachaça foram calculadas concentrações das cinco replicatas, a partir das áreas dos

picos pela equação da reta de cada analito. Foi avaliado a presença de outliers pelo teste de Grubbs e por fim calculada a média dos valores e designado o valor de propriedade para os dois candidatos a MRC. Os resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça e da vodca estão presentes nas tabelas 27 e 28 respectivamente.

Tabela 27 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça por GC-MS.

Analito	MRC Cachaça (mg/100 mL de cachaça)
Metanol	37,70
1-propanol	32,10
2-metil-1-propanol	16,70
2-metil-1-butanol	65,00

Fonte: Autoria própria.

Tabela 28 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca por GC-MS.

Analito	MRC Vodca (mg/100 mL de vodca)
Acetato de Etila	3,39
2-metil-1-propanol	0,67
Metanol	33,20

Fonte: Autoria própria.

As incertezas padrão de cada analito relacionadas a caracterização por GC-MS estão presentes nas tabelas 29 e 30 para a matriz cachaça e vodca respectivamente.

Tabela 29 - Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-MS para candidato da cachaça.

Analito	uc_{MS} (%)
Metanol	9,68
1-propanol	9,81
2-metil-1-propanol	9,88
2-metil-1-butanol	10,00

Fonte: Autoria própria.

Tabela 30 - Incertezas padrão de cada analito analisado no GC-MS para candidato da vodca.

Analito	u_{CMS} (%)
Acetato de Etila	9,13
Metanol	9,64
2-metil-1-propanol	10,45

Fonte: Autoria própria.

4.4.4 Designação do valor de propriedade e incerteza da caracterização dos candidatos a MRC

Para a determinar o valor de concentração dos analitos caracterizados foi utilizada a média das concentrações obtidas pelas duas técnicas e para verificar se os métodos foram compatíveis utilizou-se teste estatístico. Abaixo nas tabelas 31 e 32 estão os resultados da caracterização dos candidatos a MRC da cachaça e da vodca respectivamente. O analito furfural não foi avaliado pelo GC-MS e somente pelo GC-FID, para a estimativa do seu valor de propriedade foram avaliados os 48 resultados obtidos do estudo da homogeneidade e foi retirada a média e para o cálculo da incerteza da caracterização foi estimada pelo desvio das 48 análises realizadas no estudo da homogeneidade, o desvio calculado foi de $\pm 0,19$ mg/100 mL álcool 40% por esse motivo não foi certificado. Lembrando que foram avaliados e retirados os *outliers* pelas expressões (2-3).

Tabela 31 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da cachaça.

Analito	MRC Cachaça (mg/100 mL de cachaça)
Metanol	37,00
1-propanol	33,39
2-metil-1-propanol	17,01
2-metil-1-butanol	63,98
*Furfural	1,19

Legenda: *Furfural o valor de propriedade foi obtido exclusivamente do método GC-FID com os dados da homogeneidade. Fonte: Autoria própria.

Tabela 32 - Resultados da caracterização do candidato a MRC da vodca.

Analito	MRC Vodca (mg/100 mL de vodca)
Acetato de Etila	3,47
Metanol	33,05
2-metil-1-propanol	0,67

Fonte: Autoria própria.

Para o cálculo da incerteza relacionada a caracterização (u_{char}), esta foi obtida a partir da combinação das incerteza-padrão obtidas em cada técnica utilizada e da incerteza do desvio-padrão entre os métodos utilizando-se as expressões (28-29).

A comparação entre as contribuições das incertezas das duas técnicas é ilustrada por meio gráfico nas figuras 36 e 37 para cachaça e vodca respectivamente.

Figura 36 - Comparação das incertezas associadas ao estudo de caracterização do candidato a MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Comparação das incertezas associadas ao estudo de caracterização do candidato a MRC da vodca.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados da incerteza-padrão combinadas relacionadas à caracterização calculados a partir da expressão (28) estão presentes nas tabelas 33 e 34 para os candidatos a MRC da cachaça e da vodca respectivamente.

Tabela 33 - Incertezas combinadas de caracterização para cada analito avaliado do candidato a MRC da cachaça.

Analito	u _{char} (%)
Metanol	24,69
1-propanol	24,12
2-metil-1-propanol	11,39
2-metil-1-butanol	29,45
*Furfural	4,52

*Obtido pelo desvio padrão das análises do estudo da homogeneidade.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 34 - Incertezas combinadas de caracterização para cada analito avaliado do candidato a MRC da vodca.

Analito	U_{char}(%)
Acetato de Etila	21,72
Metanol	9,58
2-metil-1-propanol	39,74

Fonte: Autoria própria.

Para o MRC da cachaça os analitos metanol e 2-metil-1-propanol tiveram maior contribuição da caracterização por GC-FID no cálculo da incerteza e para os analitos propanol e 2-metil-1-butanol a maior contribuição partiram da caracterização por GC-MS. Já para os analitos da vodca todos tiveram maior contribuição advinda da caracterização por GC-FID. O desvio padrão entre as técnicas não contribuiu de forma significativa na maioria dos analitos, todos da cachaça o desvio não contribuiu e para a vodca os analitos 2-metil-1-propanol e acetato de etila o desvio padrão contribuiu de alguma forma.

4.5 Estimativa da incerteza expandida dos candidatos a MRC

Em definição da ISO Guia 35: *‘Atribuição de valor é o processo de combinar os resultados da avaliação de homogeneidade e de estabilidade com os resultados dos estudos de caracterização para determinar os valores atribuídos e suas incertezas. Esses valores são posteriormente emitidos em um certificado ou em uma ficha de informação do produto.’*

Para o cálculo das incertezas expandidas U, foi utilizada a expressão (32). Mas antes foi preciso calcular as incertezas-padrão (uc) combinadas com a expressão (30) para cada analito certificado. Para os cálculos da uc foi considerado a combinação das contribuições das incertezas relacionadas aos estudos de homogeneidade, estabilidade (longo e curto prazo) e caracterização. As incertezas-padrão combinadas foram então multiplicadas por um fator k de abrangência calculado pela expressão (32) para cada analito considerando um nível de confiança de 95%. A Tabela 17 mostra as incertezas-padrão combinadas, as incertezas expandidas e o fator k de abrangência para cada analito.

Tabela 35– Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC da cachaça.

Analito	u_c	k	U (%)
Metanol	0,113	2,179	24,69
Propanol	0,112	2,160	24,12
2-metil-1-propanol	0,054	2,093	11,39
2-metil-1-butanol	0,136	2,160	29,45

Fonte: Autoria própria.

Para o Furfural que poderá ser utilizado como padrão para controle interno temos os valores, $u_c = 0,045$, $k = 2,365$ e $U (\%) = 10,68$.

Tabela 36 – Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC da vodca.

Analito	u_c	k	U (%)
Acetato de Etila	0,092	2,365	21,72
Metanol	0,103	2,179	22,44
2-metil-1-propanol	0,168	2,365	39,74

Fonte: Autoria própria.

As figuras 38 e 39 apresentam os gráficos comparativos de cada contribuição para a incerteza-padrão combinada dos MRC da cachaça e da vodca respectivamente.

Figura 38 - Comparativo da contribuição de cada estudo realizado para a incerteza combinada do MRC da cachaça.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados sugerem que a menor contribuição decorre da homogeneidade, e por esse motivo foi garantida a homogeneidade do lote. No item em 4.3.1.1 foi discutido que ao estender o período de uso do MRC, elevaria a contribuição da estabilidade para a incerteza final, porém mesmo ao se considerar essa elevação.

Figura 39 - Comparativo da contribuição de cada estudo realizado para a incerteza combinada do MRC da vodca.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados sugerem que a menor contribuição decorre da homogeneidade, e por esse motivo foi garantida a homogeneidade do lote. No item em 4.3.1.1 foi discutido que ao estender o período de uso do MRC, elevaria a contribuição da estabilidade para a incerteza final, sendo a principal contribuinte para incerteza final nos analitos 2-metil-1-propanol e acetato de etila. A caracterização foi a que mais contribuiu somente no analito metanol.

Os valores certificados de concentração estão presentes nas tabelas 37 e 38 para os MRC da cachaça e vodca respectivamente. São apresentadas as incertezas expandidas e os fatores de abrangência utilizados para cada um dos analitos certificados. O furfural terá os valores informados para controle interno na matriz cachaça.

Tabela 37 – Valores certificados para o MRC da cachaça.

Analito	Concentração (mg/100 mL de cachaça)	k (95%)	U (%)
Metanol	37,00	2,179	24,69
Propanol	33,39	2,160	24,12
2-metil-1-propanol	17,01	2,093	11,39
2-metil-1-butanol	63,98	2,160	29,45

Fonte: Autoria própria.

O furfural apresenta a concentração de 1,24mg/100mL de álcool anidro com o fator de expansão k de 2,365 e a incerteza final expandida U é de 10,68%.

Tabela 38 – Valores certificados para o MRC da vodca.

Analito	Concentração (mg/100 mL de vodca)	k (95%)	U (%)
Acetato de Etila	3,47	2,365	21,72
Metanol	33,05	2,179	22,44
2-metil-1-propanol	0,67	2,365	39,74

Fonte: Autoria própria.

4.6 Certificado do MRC

O **ANEXO IV – CERTIFICADO DOS MRCS PRODUZIDOS** e **ANEXO V – FICHA DE INFORMAÇÃO DO MR PRODUZIDO** apresenta o certificado do MRC produzido. Os frascos contendo os MRCs estão identificados com etiquetas que contém: o nome do material, lote, código, armazenamento, selo do produtor e validade em que os valores de propriedade possam ser garantidos e armazenados no laboratório RQA-IQSC-USP na temperatura de -4°C predispostos a distribuição caso algum laboratório solicite.

4.7 Ensaio de proficiência: realização e resultados

Para iniciar o ensaio de proficiência foi feito um protocolo e enviado via e-mail aos participantes. O protocolo contém um total de 28 páginas onde foram apresentados aos participantes os seguintes itens: introdução, objetivo, parâmetros

de um ensaio de proficiência, itens do ensaio de proficiência, e também foram disponibilizados os métodos de ensaio para análise dos materiais, entretanto, os participantes também poderiam analisar os itens do EP conforme seus próprios métodos de rotina. Cada laboratório recebeu dois frascos com materiais de referência distintos. Cada laboratório pode escolher qual analito avaliar. As expressões que calculam os índices são (33-35). Os materiais disponíveis para o EP estão descritos na Tabela 39.

Tabela 39 - Descrição dos MRC fornecidos para a rodada do EP.

MRC	Volume	Analitos	Matriz	Armazenamento*
C01/20	1 mL	Metanol, 2-metil-1-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol e furfural**	Cachaça não adoçada	Entre 0°C e -4°C
V01/20	1 mL	Metanol, acetato de etila e 2-metil-1-propanol	Vodca	Entre 0°C e -4°C

*temperatura de armazenamento recomendada. **Furfural é um MR. Fonte: Autoria própria.

Cada laboratório participante recebeu um código RQA referente aos seus resultados no EP. Com este código o participante pode avaliar seu desempenho relacionado aos analitos do material C01/20. Os valores para os analitos em cachaça podem ser vistos nas tabelas 40-44 e nos gráficos representados pelas figuras 40-44.

Tabela 40. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 metanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	37,70	33,20	34,97	37,48	33,33	37,00
U participante (mg/100mL)	7,30	*	0,74	0,61	*	9,14
Z (Horwitz)	0,29	1,58	0,84	0,20	1,52	
Zeta (ζ)	0,12	**	0,44	0,10	**	
En	0,06	**	0,22	0,05	**	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	37,70	33,20	34,97	37,48	33,33	37,00
U Conflab (mg/100mL)	1,02	***	***	1,86	0,64	9,14
Zeta (ζ)	0,15	****	****	0,10	0,80	
En	0,08	****	****	0,05	0,40	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.
Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Metanol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 41. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 propanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	32,10	30,43	33,52	43,14	33,60	30,02	33,39
U participante (mg/100mL)	6,30	*	0,29	1,72	1,50	*	8,05
Z (Horwitz)	0,58	1,34	0,06	4,41	0,10	1,53	
Zeta (ζ)	0,25	**	0,03	2,37	0,05	**	
En	0,13	**	0,02	1,18	0,03	**	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	32,10	30,43	33,52	43,14	33,60	30,02	33,39
U Conflab (mg/100mL)	0,65	***	***	2,67	1,42	2,14	8,05
Zeta (ζ)	0,32	****	****	2,30	0,05	0,81	
En	0,16	****	****	1,15	0,03	0,40	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.

Fonte: Autoria própria.

Figura 41. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Propanol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 42. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 2-metil-1-propanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	16,70	16,39	16,80	17,88	15,08	17,01
U participante (mg/100mL)	3,30	*	0,06	0,81	*	1,94
Z (Horwitz)	0,25	0,50	0,17	0,70	1,55	
Zeta (ζ)	0,16	**	0,22	0,83	**	
En	0,08	**	0,11	0,41	**	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	16,70	16,39	16,80	17,88	15,08	17,01
U Conflab (mg/100mL)	0,35	***	***	1,73	0,28	1,94
Zeta (ζ)	0,32	****	****	0,67	1,97	
En	0,16	****	****	0,34	0,99	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.
Fonte: Autoria própria.

Figura 42. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 2-metil-1-propanol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 43. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 2-metil-1-butanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	65,00	45,04	55,80	26,47	63,98
U participante (mg/100mL)	13,00	*	0,54	*	18,84
Z (Horwitz)	0,27	4,93	2,13	9,77	
Zeta (ζ)	0,09	**	0,87	**	
En	0,04	**	0,43	**	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	65,00	45,04	55,80	26,47	63,98
U Conflab (mg/100mL)	0,88	***	***	3,42	18,84
Zeta (ζ)	0,11	****	****	3,92	
En	0,05	****	****	1,96	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.
Fonte: Autoria própria.

Figura 43. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 2-metil-1-butanol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 44. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para C01/20 furfural.

	RQAe901p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MR
x (mg/100 mL)	1,20	1,22	1,16	1,76	1,19
U participante (mg/100mL)	0,24	0,03	0,10	*	0,13
Z (Horwitz)	0,08	0,23	0,24	4,38	
Zeta (ζ)	0,07	0,46	0,39	**	
En	0,04	0,23	0,19	**	
	RQAe901p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MR
x (mg/100 mL)	1,20	1,22	1,16	1,76	1,19
U Conflab (mg/100mL)	0,04	***	0,09	0,10	0,13
Zeta (ζ)	0,16	****	0,46	8,36	
En	0,07	****	0,20	3,53	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.

Fonte: Autoria própria.

Figura 44. Avaliação de desempenho dos participantes C01/20 Furfural.

Fonte: Autoria própria.

Cada laboratório participante recebeu um código RQA referente aos seus resultados no EP. Com este código o participante pode avaliar seu desempenho relacionado aos analitos do material V01/20. Os valores para os analitos em vodca podem ser vistos nas tabelas 45-47 e nos gráficos representados pelas figuras 45-47.

Tabela 45. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 metanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	33,20	27,67	30,55	32,79	25,60	33,05
U participante (mg/100mL)	6,40	*	0,53	0,78	*	7,42
Z (Horwitz)	0,07	2,45	1,14	0,12	3,40	
Zeta (ζ)	0,03	**	0,67	0,07	**	
En	0,02	**	0,34	0,03	**	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe843p	MRC
x (mg/L)	33,20	27,67	30,55	32,79	25,60	33,05
U (Conflab)	1,49	***	***	5,38	1,02	7,42
zeta (ζ)	0,04	****	****	0,06	1,99	
En	0,02	****_	****	0,03	1,00	

Legenda: *Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante.

Fonte: Autoria própria.

Figura 45. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 Metanol.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 46. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 acetato de etila.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	3,39	3,80	0,78	4,12	*	2,26	3,47
U participante (mg/100mL)	0,66	**	0,07	0,33	0,45	**	0,75
Z (Horwitz)	0,25	1,01	8,32	2,01	n/a	3,74	
Zeta (ζ)	0,16	***	7,11	1,58	n/a	***	
En	0,11	***	7,02	1,30	n/a	***	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe359p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	3,39	3,80	0,78	4,12	*	2,26	3,47
U Conflab (mg/100mL)	0,20	****	****	4,39%	11,85%	9%	0,75
Zeta (ζ)	0,21	*****	*****	1,68	n/a	3,10	
En	0,10	*****	*****	0,84	n/a	1,55	

Legenda: *Significa que o resultado foi menor que o LQ. **Significa que o participante não informou a incerteza expandida. *** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados informados pelo participante. ****Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. ***** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante. Fonte: Autoria própria.

Figura 46. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 Acetato de Etila.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 47. Valores calculados com base na incerteza informada pelos participantes e pelo Conflab para V01/20 2-metil-1-propanol.

	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	0,67	*	1,00	*	*	0,67
U participante (mg/100mL)	0,14	**	0,02	0,58	**	0,27
Z (Horwitz)	0,00	n/a	4,13	n/a	n/a	
Zeta (ζ)	0,00	n/a	2,47	n/a	n/a	
En	0,00	n/a	2,45	n/a	n/a	
	RQAe901p	RQAe435p	RQAe097p	RQAe965p	RQAe843p	MRC
x (mg/100 mL)	0,67	*	1,00	*	*	0,67
U Conflab (mg/100mL)	0,16	***	***	0,09	0,26	0,27
Zeta (ζ)	0,00	n/a	****	n/a	n/a	
En	0,00	n/a	****	n/a	n/a	

Legenda: *Significa que o resultado foi menor que o LQ. **Significa que o participante não informou a incerteza expandida. ***Significa que o participante realizou a avaliação em unicata e por conta disso não pode ser calculada a incerteza U pelo software. **** Significa que o cálculo não pode ser realizado por falta de dados divulgados pelo participante. Fonte: Autoria própria.

Figura 47. Avaliação de desempenho dos participantes V01/20 2-metil-1-propanol.

Fonte: Autoria própria.

Por conta da participação de poucos laboratórios, para o cálculo do índice Z foi considerado o desvio calculado a partir de Horwitz, e este provou-se ser um parâmetro menos adequado, pois além de ter reprovado mais participantes quando em comparação aos outros índices, também traz uma insegurança em relação ao desvio padrão utilizado no cálculo que pode ter levado a uma avaliação inadequada. Talvez essa diferença se dê ao fato da utilização de uma equação empírica e formulada há algum tempo em que havia maior limitação nos instrumentos analíticos. Diferente do índice Z, os índices Zeta e En utilizam as incertezas informadas pelos participantes ao qual se trata de um valor calculado e com maior confiabilidade quando comparado ao valor predito por Horwitz.

Com este estudo notou-se que os participantes possuem dificuldades em calcular a incerteza expandida pois a maioria das incertezas informadas diferiram da incerteza expandida calculada pelo software validado Conflab, sendo por vezes menores que as calculadas pelos próprios participantes. E além disso se o participante informar um valor muito elevado para a incerteza (valor subestimado) este tende a ter desempenho satisfatórios.

Por este motivo seria interessante os provedores de EP pedirem também aos participantes, os dados brutos da curva e da quantificação, pois assim os cálculos da incerteza seriam padronizados e a avaliação mais normalizada e confiável.

5 CONCLUSÃO

Para a produção dos MRCs foram seguidas as metodologias estabelecidas no ISO Guia 35:2020, com os estudos de homogeneidade, estabilidade (longo e curto prazo), caracterização por duas técnicas (GC-FID e GC-MS), estimativa das incertezas associadas a cada etapa e cálculo da incerteza combinada expandida.

Para a matriz cachaça foram certificados os seguintes materiais: metanol ($37,00 \pm 9,14$ mg/100 ml de cachaça), propanol ($33,39 \pm 8,05$ mg/100 ml de cachaça), 2-metil-1-propanol ($17,01 \pm 1,94$ mg/100 ml de cachaça) e 2-metil-1-butanol ($63,98 \pm 18,84$ mg/100 ml de cachaça). Temos o furfural com valor informado de ($1,24 \pm 0,13$ mg/100 ml de cachaça) podendo ser utilizado para controle interno dos laboratórios.

Para a matriz vodca foram certificados os seguintes materiais: acetato de etila ($3,47 \pm 0,75$ mg/100 ml de vodca), metanol ($33,05 \pm 7,42$ mg/100 ml de vodca) e 2-metil-1-propanol ($0,67 \pm 0,27$ mg/100 ml de vodca)

O ensaio de proficiência foi elaborado seguindo a ISO 17043, o protocolo foi criado e enviado aos participantes, as amostras de MRCs foram enviadas pelo provedor, foi realizada uma rodada do Ensaio de Proficiência (EP) de Congêneres Orgânicos em Bebidas Destiladas e Retificadas. Os participantes foram avaliados com estatísticas específicas para atender o número reduzido de participantes. Os índices utilizados nos cálculos foram: índice Z, índice Zeta e índice En.

Considerando a importância de um adequado monitoramento de contaminantes e congêneres presentes em bebidas destiladas como a cachaça e destilo-retificadas como a vodca, este trabalho pôde fornecer uma importante contribuição por meio do desenvolvimento de todos os cálculos para a produção de MRCs, além de produzir uma pequena quantidade ao qual será disponibilizada aos laboratórios interessados. O Ensaio de Proficiência (EP) também foi uma importante contribuição pois pôde colaborar com os laboratórios participantes no controle da qualidade interlaboratorial além de estudar a aplicação de diferentes ferramentas de avaliação de desempenho para casos de EP com poucos participantes.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVA, I. M.; MEDRISH, M. E.; ROMANOVA, A. G.; GAVRILOVA, D. A.; PAVLENKO, S. V. Chemical characterization of ethanol and vodka in Russia. **IOP Conference Series: earth and environmental science**, Bristol, v. 548, p. 082059, 2020. DOI: 10.1088/1755-1315/548/8/082059. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/548/8/082059>. Acesso em 30 jan. 2021.
- AGÊNCIA BRASILEIRA DE PROMOÇÃO DE EXPORTAÇÕES E INVESTIMENTOS. **IBRAC celebra crescimento das exportações de cachaça em 2016**. Brasília: ApexBrasil, 2016. Disponível em: <https://portal.apexbrasil.com.br/noticia/IBRAC-CELEBRA-CRESCIMENTO-DAS-EXPORTACOES-DE-CACHACA-EM-2016/>
- ALCARDE, A. R. Bebidas retificadas: vodka e gin. *In*: Blucher ed. São Paulo.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 17034**: requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17043**: avaliação de conformidade - requisitos gerais para ensaios de proficiência (versão corrigida 2017). Rio de Janeiro: ABNT, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17011**: avaliação da conformidade - requisitos para os organismos de acreditação que acreditam organismos de avaliação da conformidade. Rio de Janeiro: ABNT, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 30**: materiais de referência - termos e definições selecionados. Rio de Janeiro: ABNT, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 31**: materiais de referência — conteúdo de certificados, rótulos e documentação associada. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO Guia 35**: materiais de referência - guia para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade. Rio de Janeiro: ABNT, 2020.
- BARCELOS, L. V. F.; CARDOSO, M. G.; VILELA, F. J.; ANJOS, J. P. Teores de carbamato de etila e outros componentes secundários em diferentes cachaças produzidas em três regiões do estado de Minas Gerais: zona da mata, sul de minas e vale do jequitinhonha. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 1009–1011, 2007. DOI: 10.1590/s0100-40422007000400043.

BOGUSZ JUNIOR, S.; KETZER, D. C. M.; GUBERT, R.; ANDRADES, L.; GOBO, A. B. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 793–798, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000400013. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000400013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 03 mar. 2021.

BOSCOLO, M.; BEZERRA, C. W. B.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar-cane spirit. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 86–90, 2000. DOI: 10.1590/S0103-50532000000100015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532000000100015&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em 14 fev. 2021.

BRASIL. **Decreto nº 6.871 de 2009**. Padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas. Brasília: Presidência da República, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROSTAT**: estatísticas de comércio exterior do agronegócio brasileiro. Brasília: MAPA, 2020. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em 10 maio 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 13, de 29 de junho de 2005**. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para aguardente de cana e para cachaça. Brasília: MAPA, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 29, de 19 de setembro de 2012**. Brasília: MAPA, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**: áreas de identidade e qualidade de alimentos e insumos. Brasília: MAPA, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial**. Brasília: MAPA, 2014. p. 38.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria 63 de 23 de abril de 2008**. Brasília: MAPA, 2008.

BRASIL. **Projeto de Lei Nº 5087-A de 2009**. Dia nacional da cachaça. Brasília: Câmara do Deputados, 2009.

BROOKMAN, B.; MANN, I. (ed.). **EURACHEM/CITAC guide**: selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes. 3. ed. [S. I.]: Eurachem, 2021. Disponível em: www.eurachem.org.

CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças evaluation of alcoholic strength and congeners in cachaças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 28–33, 2008.

CARUSO, M. S. F.; NAGATO, L. A. F.; ALABURDA, J. Benzo(a)pireno, carbamato de etila e metanol em cachaças. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1973–1976, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010000900027. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900027&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 25 fev. 2021.

CARVALHO, M. M.; PALADINI, E. P. **Gestão da qualidade**: teoria e casos. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CHALK, S.; MCEWEN, L. The IUPAC Gold Book. **Chemistry International**, Berlin, v. 39, n. 3, p. 25–30, 2017. DOI: 10.1515/ci-2017-0307. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ci-2017-0307/html>. Acesso em 13 abr. 2021.

CHEN, R.; WANG, Y. Z.; LIAO, Q.; ZHU, X.; XU, T. F. Hydrolysates of lignocellulosic materials for biohydrogen production. **BMB Reports**, Seoul, v. 46, n. 5, p. 244–251, 2013. DOI: 10.5483/BMBRep.2013.46.5.038. Disponível em: <http://koreascience.or.kr/article/JAKO201317660996510.pdf>. Acesso em 17 mar. 2021.

CONFLAB. **Validação**: software para validação de métodos. [S. l.]: ConfLab, 2018. Disponível em: <https://www.conflab.com.br/home>. Acesso em: 4 jan. 2021.

CONFLAB. **Incerteza**: software para cálculos de incerteza. [S. l.]: ConfLab, 2018. Disponível em: <https://www.conflab.com.br/home>. Acesso em: 7 jul. 2021.

CORRÊA, M. A cada cinco garrafas de vodca vendidas no Brasil, uma é falsificada, diz estudo. **O Globo**, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/a-cada-cinco-garrafas-de-vodca-vendidas-no-brasil-uma-falsificada-diz-estudo-24141004>. Acesso em: 15 fev. 2021.

CORTADA, J. W.; QUINTELLA, H. M. **TQM**: gerência da qualidade total. São Paulo: Makron Books, 1994.

DUNLOP, A. P. Furfural formation and behavior. **Industrial & Engineering Chemistry**, Washington, v. 40, n. 2, p. 204–209, 1948. DOI: 10.1021/ie50458a006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50458a006>. Acesso em 26 abr. 2021.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. **EURACHEM/CITAC guide**: quantifying uncertainty in analytical measurements. 3. ed. [S. l.]: Eurachem, 2012. v. 3

EMERY, E. M. The role of quantitation in gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, Oxford, v. 5, n. 12, p. 596–600, 1967. DOI: 10.1093/chromsci/5.12.596. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/chromsci/5.12.596>. Acesso em 12 fev. 2021.

GARONCE, L. Vodca e uísque são principais alvos de falsificação, diz especialista; veja como descobrir. **G1 DF**, Brasília, 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/df/distrito-federal/noticia/vodca-e-uisque-sao-principais-alvos-de-falsificacao-diz-especialista-veja-como-descobrir.ghtml>. Acesso em: 15 fev. 2021.

GROB, R. L.; BARRY, E. F. **Modern practice of gas chromatography**. 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. v. 42 DOI: 10.1002/0471651141. Disponível em: <http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.42-2820>. Acesso em 10 jan. 2021.

HAAHR, M. **Random.org**. True random number service. Dublin, 2021. Disponível em: www.random.org. Acesso em: 19 dez. 2020.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies (Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v. 67, n. 2, p. 331–343, 1995. DOI: 10.1351/pac199567020331. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199567020331/html>. Acesso em 01 jun. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Doq-Cgcre-008**: orientação sobre validação de métodos analíticos. [S. l.]: INMETRO, 2016. p. 31.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Vocabulário Internacional de Metrologia**. INMETRO 2012. p. 95.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO Guide 80:2014**: guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs). Geneva: ISO, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. **ISO 3696:1998**: Water for analytical laboratory use - Specification and test methods. Geneva, ISO, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 13528:2015**: statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison. Geneva: ISO, 2015.

ISLAM, N.; FERDOUS, N.; NESHA, K.; RASKER, J. J. Alcoholic beverages in Bangladesh-how much we know? **Family Medicine & Medical Science Research**, Brussels, v. 3, n. 2, 2014. DOI: 10.4172/2327-4972.1000123. Disponível em: https://pdfs.semanticscholar.org/31e5/f6064fa657cff39350d5fae86f1e428a577d.pdf?_ga=2.39919202.1733088243.1623161972-1245643275.1620651460. Acesso em: 17 fev. 2021.

JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochemical Journal**, London, v. 50, n. 5, p. 679–690, 1952. DOI: 10.1042/bj0500679. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/50/5/679/47119/Gasliquid-partition-chromatography-the-separation>. Acesso em 09 fev. 2021.

JURAN, J. M. **Controle de qualidade**: componentes básicos da função qualidade. São Paulo: Makron Books, 1991.

LACHENMEIER, D.; ANH, P. T. H.; POPOVA, S.; REHM, J. The quality of alcohol products in Vietnam and its implications for public health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 6, n. 8, p. 2090–2101, 2009. a. DOI: 10.3390/ijerph6082090. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/6/8/2090>. Acesso em 03 fev. 2021.

LACHENMEIER, D. W.; GANSS, S.; RYCHLAK, B.; REHM, J.; SULKOWSKA, U.; SKIBA, M.; ZATONSKI, W. Association between quality of cheap and unrecorded alcohol products and public health consequences in Poland. **Alcoholism: clinical and experimental research**, Hoboken, v. 33, n. 10, p. 1757–1769, 2009. b. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2009.01013.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1530-0277.2009.01013.x>. Acesso em 20 jan. 2021.

LANÇAS, F. M. **Fundamentos da cromatografia gasosa**. Campinas: Editora Átomo, 2017.

LAPORTA, T. Brasil é o 10º maior mercado de vodca, a bebida anfitriã da copa. **G1 Economia**, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/noticia/brasil-e-o-10-maior-mercado-de-vodca-a-bebida-anfitriã-da-copa.ghtml>. Acesso em: 15 fev. 2021.

LEAUTE, R. Distillation in alambic. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 41, n. 1, p. 90–103, 1990.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 3.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M.; SNOW, N. H. **Basic gas chromatography**. Hoboken: Wiley, 2019. DOI: 10.1002/9781119450795. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119450795>. Acesso em 27 mar. 2021.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6. ed. London: Pearson, 2010. DOI: 10.7861/clinmedicine.14-6-677.

MONTEIRO, T. M.; RODRIGUES, J. M.; REGO, E. C. P.; DE CARVALHO ROCHA, W. F.; DE MATTOS, J. S.; NUNES, F. F.; DA CUNHA, V. S.; DE LA CRUZ, M. H. C.; DE SOUZA, V. Development of a certified reference material for cachaça: an effective material for quality assurance. **Accreditation and Quality Assurance**, Heidelberg, v. 18, n. 3, p. 197–206, 2013. DOI: 10.1007/s00769-013-0985-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00769-013-0985-8>. Acesso em 20 jan. 2021.

NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C.; CARUSO, M. S. F.; BARSOTTI, R. C. F.; BADOLATO, E. S. G. Monitoramento da autenticidade de amostras de bebidas alcoólicas enviadas ao Instituto Adolfo Lutz em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campians, v. 21, n. 1, p. 39–42, 2001. DOI: 10.1590/S0101-20612001000100009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000100009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 03 jan. 2021.

NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Comparação de técnicas de determinação de ésteres em cachaça. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2323–2327, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000900016. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900016&lng=pt&nrm=iso&tling=pt. Acesso em 10 mar. 2021.

NASCIMENTO, R. F.; CARDOSO, D. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; FARIAS, J. B. Influência do material do alambique na composição química das aguardentes de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 735–739, 1998. a. DOI: 10.1590/S0100-40421998000600013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600013&lng=pt&nrm=iso&tling=pt. Acesso em 11 mar. 2021.

NASCIMENTO, R. F.; CERRONI, J. L.; CARDOSO, D. I. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Comparação dos métodos oficiais de análise e cromatográficos para a determinação dos teores de aldeídos e ácidos em bebidas alcoólicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 350–356, 1998. b. DOI: 10.1590/S0101-20611998000300018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000300018&lng=pt&nrm=iso&tling=pt. Acesso em 11 mar. 2021.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Furfural**. [S. l.]: NIOSH, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/idlh/98011.html>. Acesso em: 17 fev. 2021.

NOVO, M. A. L. **Viagem ao mundo da cachaça**. São Paulo: New Book, 2011.

NYKÄNEN, L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, n. 1, p. 84 LP – 96, 1986.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão da qualidade em laboratórios**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2019.

OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, n. October 1993, p. 109–121, 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2012.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.01.004>. Acesso em 20 mar. 2021.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2190–2193, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800047. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800047&lng=pt&nrm=iso&tling=pt. Acesso em 10 abr. 2021.

PEREIRA, E. V. S.; OLIVEIRA, S. P. A.; NÓBREGA, I. C. C.; LACHENMEIER, D. W.; ARAÚJO, A. C. P.; TELLES, D. L.; SILVA, M. Brazilian vodkas have undetectable levels of ethyl carbamate. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 822–825, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000600014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000600014&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em 08 jan. 2021.

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 744–754, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000600015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000600015&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 09 abr. 2021.

PUBCHEM. Bethesda: National Institute of Health (NIH), 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 21 fev. 2021.

REGULATION (EC) N° 110/2008 of the European Parliament and of the Council of 15 January 2008 on the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) N° 1576/89. **Official Journal of the European Union**, Luxembourg, v. 51, p. 16, 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos da química analítica**. 8. ed. São Paulo: Editora Thompson, 2006.

SOUZA, L. M.; FERREIRA, K. S.; PASSONI, L. C.; BEVITORI, A. B.; VIEIRA MELO, K.; VIANA, A. R. Teores de compostos orgânicos em cachaças produzidas na região norte fluminense - Rio de Janeiro. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2304–2309, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000900012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000900012&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 10 fev. 2021.

THOMPSON, M., ELLISON, S. L., WOOD, R. The international harmonised protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, Berlin, v.78, p. 145-196, 2006.

THOMPSON, M.; LOWTHIAN, P. J. **Notes on statistics and data quality for analytical chemists**. London: Imperial College Press, 2011. DOI: 10.1142/p739. Disponível em: <https://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/p739>. Acesso em 01 mar. 2021.

U. S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: ICH Q2B validation of analytical procedures: methodology**, 2018.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P.; MASSON, J.; DUARTE, F. C.; NELSON, D. L. Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 320–324, 2011. DOI: 10.1590/S0100-40422011000200026. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000200026&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em 05 abr. 2021.

ANEXO I – CERTIFICADOS DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DO GC-FID

Certificate of Analysis

ISO Guide 34 Reference Material

Product Identification

Article Code: DRE-C16415100

Article Name: 1-Propanol

Formula: C₃H₈O

Mol. Weight: 60.10

CAS No.: 71-23-8

Lot Number: G174865
Expiry Date: 09.04.2024
Storage Temperature: 20°C ± 4°C

Storage and handling: The RM should be stored in the original sealed bottle at the temperature given above. After use the bottle should be tightly closed and protected from moisture

Purity: 99.70% (g/g)

Expanded Uncertainty U= 1.62% (g/g)

The uncertainty of this standard is calculated in accordance with the ISO Guide 34 and EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. The expanded uncertainty is $U(\text{exp}) = u(\text{RM}) \times k$, where k is the coverage factor at the 95% confidence level ($k=2$). Uncertainty $u(\text{RM})$ is based on the combination of the uncertainties associated with each individual operation involved in the analysis of the product: $u(\text{RM}) = \sqrt{u(\text{char})^2 + u(\text{bb})^2 + u(\text{sts})^2 + u(\text{sts})^2}$; $u(\text{char})$ is the uncertainty of characterisation; $u(\text{bb})$ uncertainty of homogeneity test; $u(\text{sts})$ uncertainty of stability test long-term; $u(\text{sts})$ uncertainty of stability test short-term. $u(\text{sts})$ and $u(\text{sts})$ are not included in the calculation as the stability statement is based on real evidence opposed to simulation. Minimum sample: 1 mg is recommended as the minimal sample amount. If less material is used, it is recommended to increase the certified uncertainty by a factor of two for half sample and a factor of four for a quarter of sample. Intended use: Use this RM as calibrant for chromatography or any other analytical technique.

Analytical Data

Traceability of chromatography: To the International System of Units (SI).

Instrument:	GC/MS	Injector:	100°C
Detection:	MS	Initial Temp:	40°C for 5 min
Column:	Optima-SMS, 0.25 µm, 0.25 mm	End Temp:	100°C for 2 min
Inj.-Vol.:	1 µl	Gradient:	15°C/min
Flow:	1.0 ml/min		
Ret. Time:	2.33 min		

Comment

Traceability: The balances used are calibrated with weights traceable to the national standards (DKD).

Calibrated class A glassware is used for volumetric measurements.

Water Content: 0.11% (g/g) by Karl-Fischer-Titration ($U(\text{exp}) = 0.03\%$ (g/g)).

Identity: EA, NMR, RT, IR, MS

No chromatogram available

Certificate Revision 1 - 09.04.2018 - M. Beck

Certified on: 09.04.2018
Certified by: M. Beck
RM Release

M. Beck

Authorized copy
from the original

13. APR. 2018

Sign: *[Signature]*

The LGC Labor GmbH, accredited by DAkkS as indicated by the accreditation number D-RM-19883-01 & D-PL-19883-01, has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions of organic pure substances.

LGC Labor GmbH - Bgm.-Schlosser-Straße 6A - 86199 Augsburg - Germany
Phone +49 821 906080 - Fax +49 821 9060888 - augsburg.inquiry@lgcgroup.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for
Residue Analysis

Product Identification

15981100 1-Pentanol
CA 1-Pentanol
IUPAC 1-Pentanol
Formula C₅H₁₂O
Mol.Weight 88.15
CAS No. 71-41-0

Expiry Date 01.10.2021
Lot Number 109667
Store at 20 °C ±4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Toxicological Data R Code 10-20 S Code 24/25 LD50 (Rats female/male in mg/kg) N/A		Physical Data Phase liquid Color colourless Melt. Range Vapour pressure NA at °C Solubility in water NA g/l at °C Boiling Range (lit.)	
Analytical Data Detection: GC/FID Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm Inj.-Vol.: 1.00 µl Flow: 1.0 ml/min Ret.-Time: 5.29 min.		Method Details: Injector: 200° C Start Temperature: 40° C for 5 min End Temperature: 200° C for 16 min Gradient: 15° C/min	
Identity: MS, RT Comment: Purity was confirmed by external standard method.			
Water Content 0.1 % Determined by Karl-Fischer Titration Det. Purity 99.5 % Tolerance/Uncertainty +/- 0.5 % <p>The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is $U_c(y) \cdot K$, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.</p>			

Certified on 16.06.2016
by N. Müller

N. Müller

The Laboratory LGC Labor GmbH is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-19883-01 & D-PL-19883-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

LGC Labor GmbH · Bgm.-Schloss-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · augsburg.inquiry@lgcgroup.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Data file : L:\GERÄTE BACKUP\FID1\2015\2015KW37\15981100-11.D

=====

Injection Date	: Tue, 8. Sep. 2015	Seq Line	: 15
Sample Info	: 1-Pentanol	-> Location	: Vial 62
Acq Operator	: AT	Inj. No.	: 1
		Inj. Vol.	: 1 µl

=====

Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\200.M

Last Changed : Thu, 9. Jul. 2015, 00:04:32 pm

200

Peak #	RT [min]	Width [min]	Area %	Area	Height
1	5.286	0.050	100.000	1.565e3	407.886

*** End of Report ***

Instrument 1

Thu, 16. Jun. 2016

02:39:27 pm

Page 1 of 1

Certificate of Analysis

EHRENSTORFER™

ISO Guide 34 Reference Material

Product Identification

Article Code: DRE-C14995000
 Article Name: Methanol
 Formula: CH₄O
 Mol. Weight: 32.04
 CAS No.: 67-56-1

Lot Number: G171438
 Expiry Date: 31.01.2023
 Storage Temperature: 20°C ± 4°C

Storage and handling: The RM should be stored in the original sealed bottle at the temperature given above. After use the bottle should be tightly closed and protected from moisture and light. The expiry date is valid for original sealed bottles under recommended storage conditions only.

Purity: 99.89% (g/g)

Expanded Uncertainty U₉₅: 0.30% (g/g)

The uncertainty of this standard is calculated in accordance with the ISO Guide 34 and EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. The expanded uncertainty is $U_{95} = u(RM) \times k$, where k is the coverage factor at the 95% confidence level ($k=2$). Uncertainty $u(RM)$ is based on the combination of the uncertainties associated with each individual operation involved in the analysis of the product: $u(RM) = \sqrt{u(\text{char})^2 + u(\text{bb})^2 + u(\text{ts})^2}$; $u(\text{char})$ is the uncertainty of purity determination; $u(\text{bb})$ uncertainty of homogeneity test; $u(\text{ts})$ uncertainty of stability test long-term; $u(\text{ts})$ uncertainty of stability test short-term. $u(\text{ts})$ and $u(\text{ts})$ are not included in the calculation as the stability statement is based on real evidence opposed to simulation. Minimum sample: 1 mg is recommended as the minimal sample amount. If less material is used, it is recommended to increase the certified uncertainty by a factor of two for half sample and a factor of four for a quarter of sample.

Intended use: Use this RM as calibrant for chromatography or any other analytical technique.

Analytical Data

Traceability of chromatography: To the International System of Units (SI).

Instrument: GC/FID
 Detection: FID
 Column: Optima-SMS, 0.25 µm, 0.25 mm
 Inj.-Vol.: 1 µl
 Flow: 1.0 ml/min
 Ret. Time: 2.24 min

Injector: 280°C
 Initial Temp: 60°C for 5 min
 End Temp: 280°C for 1 min
 Gradient: 15°C/min

Comment

Traceability: The balances used are calibrated with weights traceable to the national standards (DIN).

Calibrated class A glassware is used for volumetric measurements.

Certificate Revision 1

Water Content: 0.10% (g/g) by Karl-Fischer-Titration ($U_{95} = 0.03\%$ (g/g)).

Identity: EA, NMR, RT, IR, UV, MS

Certified on: 13.02.2018
 Certified by: N. Müller

Handwritten signature

The LGC Labor GmbH, accredited by DAkkS as indicated by the accreditation number D-RM-19883-01 & D-PL-19883-01, has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions of organic pure substances.

LGC Labor GmbH - Bgm-Schlosser-Strasse 6A - 86199 Augsburg - Germany
 Phone +49 821 906080 - Fax +49 821 9060888 - augsburg.inquiry@lgcgroup.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

12.12.18
W

Data file: 14995000-05-r001.dx

Instrument: FID 3

Sample name: G171438

Sequence Name: 2018KW07-1a

Inj. volume [μ l]: 1.0

Injection date: 2/12/2018 4:32:44 PM

Acq. method: pesk.amx

Location: 31

Sample Description: Methanol

Signal: FID1A

Nr.	RT [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area%	Width [min]	S/N
1	2.24	315752.77751	49202.10	100.00	0.516	2.0
	Sum	315752.78				

H. J.

Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for
Residue Analysis

Certificate of Analysis

ISO Guide 34 Reference Material

Product Identification

Article Code: DRE-C13972100
 Article Name: Furfural
 Formula: C₅H₄O₂
 Mol. Weight: 96.09
 CAS No.: 98-01-1

Lot Number: G142918
 Expiry Date: 12.06.2021
 Storage Temperature: 4°C ± 4°C

Storage and handling: The RM should be stored in the original sealed bottle at the temperature given above. After use the bottle should be tightly closed and protected from moisture and light. The expiry date is valid for original sealed bottles under recommended storage conditions only.

Purity: 99.51% (g/g)

Expanded Uncertainty U_m: 0.46% (g/g)

The uncertainty of this standard is calculated in accordance with the ISO Guide 34 and EURACHEM/QTAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. The expanded uncertainty is $U(\text{exp}) = u(\text{RM}) \times k$, where k is the coverage factor at the 95% confidence level ($k=2$). Uncertainty $u(\text{RM})$ is based on the combination of the uncertainties associated with each individual operation involved in the analysis of the product: $u(\text{RM}) = \sqrt{u(\text{char})^2 + u(\text{bb})^2 + u(\text{ts})^2 + u(\text{st})^2}$; $u(\text{char})$ is the uncertainty of purity determination; $u(\text{bb})$ uncertainty of homogeneity test; $u(\text{ts})$ uncertainty of stability test long-term; $u(\text{st})$ uncertainty of stability test short-term. $u(\text{ts})$ and $u(\text{st})$ are not included in the calculation as the stability statement is based on real evidence opposed to simulation. Minimum sample: 1 mg is recommended as the minimal sample amount. If less material is used, it is recommended to increase the certified uncertainty by a factor of two for half sample and a factor of four for a quarter of sample.

Intended use: Use this RM as calibrant for chromatography or any other analytical technique.

Analytical Data

Traceability of chromatography: To the International System of Units (SI).

Instrument: GC/FID
 Detection: FID
 Column: Optima-SMS, 0.25 µm, 0.25 mm
 Inj.-Vol.: 1 µl
 Flow: 1.0 ml/min
 Ret.Time: 7.72 min

Injector: 200°C
 Initial Temp: 40°C for 5 min
 End Temp: 200°C for 16 min
 Gradient: 15°C/min

Comment

Traceability: The balances used are calibrated with weights traceable to the national standards (DIN).

Calibrated class A glassware is used for volumetric measurements.

Certificate Revision 1

Water Content: 0.00% (g/g) by Karl-Fischer-Titration ($U(\text{exp}) = 0.03\%$ (g/g)).

Identity: EA, NMR, RT, IR, MS

Certified on: 12.06.2017
 Certified by: M. Beck

Authorized copy
from the original

13. JUNI 2017

Sign.:

The LGC Labor GmbH, accredited by DAkkS as indicated by the accreditation number D-RM-15883-01 & D-PL-15883-01, has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions of organic pure substances.

LGC Labor GmbH - Bgm.-Schlosser-Str. 6A - 84199 Augsburg - Germany
 Phone +49 821 906080 - Fax +49 821 9060888 - augsburg.inquiry@lgcgroup.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

170617
Hk

Data file: 13972100-04.dx
Sample name: 70608AL G142918
Inj. volume [µl]: 1.0
Acq. method: 200.amx
Sample Description: Furfural

Instrument: FID 1
Sequence Name: 2017KW23-4a
Injection date: 8/8/2017 4:50:25 PM
Location: 29

Signal: FID1A					
Nr.	RT [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area%	Width [min]
1	7.723	42.55684	22.88	100.00	0.272
	Sum	42.56			

H. Bel

Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for
Residue Analysis

Certificate of Analysis

ISO Guide 34 Reference Material

Product Identification

Article Code: DRE-C13319000
 Article Name: Ethylacetate
 Formula: C₄H₈O₂
 Mol. Weight: 88.11
 CAS No.: 141-78-6

Lot Number: G148631
 Expiry Date: 05.12.2023
 Storage Temperature: 20°C ± 4°C

Storage and handling: The RM should be stored in the original sealed bottle at the temperature given above. After use the bottle should be tightly closed and protected from moisture and light. The expiry date is valid for original sealed bottles under recommended storage conditions only.

Purity: 99.81% (g/g)

Expanded Uncertainty U= 0.30% (g/g)

The uncertainty of this standard is calculated in accordance with the ISO Guide 34 and EURACHEM/CTAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition. The expanded uncertainty is $U(\text{exp}) = u(\text{RM}) \times k$, where k is the coverage factor at the 95% confidence level ($k=2$). Uncertainty $u(\text{RM})$ is based on the combination of the uncertainties associated with each individual operation involved in the analysis of the product: $u(\text{RM}) = \sqrt{u(\text{char})^2 + u(\text{bb})^2 + u(\text{sts})^2 + u(\text{sts})^2}$; $u(\text{char})$ is the uncertainty of purity determination; $u(\text{bb})$ uncertainty of homogeneity test; $u(\text{sts})$ uncertainty of stability test long-term; $u(\text{sts})$ uncertainty of stability test short-term. $u(\text{sts})$ and $u(\text{sts})$ are not included in the calculation as the stability statement is based on real evidence opposed to simulation. Minimum sample: 1 mg is recommended as the minimal sample amount. If less material is used, it is recommended to increase the certified uncertainty by a factor of two for half sample and a factor of four for a quarter of sample.

Intended use: Use this RM as calibrant for chromatography or any other analytical technique.

Analytical Data

Traceability of chromatography: To the International System of Units (SI).

Instrument: GC/FID
 Detection: FID
 Column: Optima-SMS, 0.25 µm, 0.25 mm
 Inj.-Vol.: 1 µl
 Flow: 1.0 ml/min
 Ret.Time: 3.15 min

Injector: 280°C
 Initial Temp: 60°C for 5 min
 End Temp: 280°C for 1 min
 Gradient: 15°C/min

Comment

Traceability: The balances used are calibrated with weights traceable to the national standards (DKD).
 Calibrated class A glassware is used for volumetric measurements.

Certificate Revision 1

Water Content: 0.18% (g/g) by Karl-Fischer-Titration ($U(\text{exp}) = 0.12\%$ (g/g)).

Identity: EA, NMR, RT, IR, MS

Certified on: 05.12.2017
 Certified by: N. Möller

The LGC Labor GmbH, accredited by DAkkS as indicated by the accreditation number D-RM-19883-01 & D-PL-19883-01, has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions of organic pure substances.

LGC Labor GmbH - Bgm-Schlösser-Strasse 6A - 86199 Augsburg - Germany
 Phone +49 821 906080 - Fax +49 821 906088 - augsburg.inquiry@lgcgroup.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

MS. 4. 17
27

Data file: 13319000-02-r001.dx

Instrument: FID 2

Inj. volume [μ l]: 1.0

Sequence Name: 2017KW15-3a

Acq. method: PESKamx

Injection date: 4/12/2017 4:08:28 PM

Location: 21

Sample Description Ethylacetate

Signal: FID1A

Nr.	RT [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area%	Width [min]
1	3.148	768342.70890	74316.95	100.00	0.123
Sum		768342.71			

Handwritten signature.

Certificate of Analysis

Dr. Ehrenstorfer

Product Identification

15084400 2-Methyl-1-butanol
 CA 2-Methyl-1-butanol
 IUPAC 2-Methyl-1-butanol
 Formula C₅H₁₂O
 Mol.Weight 88.15
 CAS No. 137-32-6

Reference Materials for Residue Analysis

Expiry Date 19.02.2020
 Lot Number 124652
 Store at 20 °C ± 4 °C

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Toxicological Data R Code S Code LD50 (Rats female/male in mg/kg) N/A		Physical Data Phase liquid Color colourless Melt. Range Vapour pressure NA at °C Solubility in water NA g/l at °C Boiling Range (lit.)	
Analytical Data Detection: GC/FID Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm Inj.-Vol.: 1.00 µl Flow: 1.0 ml/min Ret.-Time: 6.89 min. Method Details: Injector: 100° C Start Temperature: 40° C for 5 min End Temperature: 100° C for 2 min Gradient: 15° C/min			
Identity: RT Comment: Purity was determined by external standard method. No chromatogram available.			
Water Content 0.0 % Determined by Karl-Fischer Titration Det. Purity 99.5 % Tolerance/Uncertainty +/- 1.0 % <p>The uncertainty/tolerance of this standard is calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is U_c(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.</p>			

Certified on 01.12.2016

by M. Beck

The Laboratory LGC Labor GmbH is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-19883-01 & D-PL-19883-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

LGC Labor GmbH · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
 Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · augsburg.inquiry@lgcgroup.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

ANEXO II – RESULTADOS ESTATÍSTICOS OBTIDOS PELO SOFTWARE CONFLAB DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS ANALITOS EM ESTUDO

ConfLab

Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO/VERIFICAÇÃO

1. IDENTIFICAÇÃO

Título: RMB - Propanol (2ª Curva)
Método: Método para análise de cachaça/vodka por GC-FID
Análito: Propanol
Matriz: Solução Hidroalcoólica 40%

2. RESUMO DE RESULTADOS

2.1. PARÂMETROS E CRITÉRIOS DA VALIDAÇÃO

LINEARIDADE

Coefficiente de determinação (r^2) ≥ 0.98
Coefficiente de correlação (r) ≥ 0.99
Anova
Teste de Intercepto
Desvio Max. 15 %
Coefficiente de variação (CV) ≤ 15 %
Critério diferenciado para o 1º ponto ≤ 20 %
Resíduo Relativo ≤ 20 %
Critério diferenciado para o 1º ponto ≤ 20 %
Outliers
Teste de Normalidade
Teste de Independência
 d_L : 1.35 d_U : 1.49
Teste de Homocedasticidade

2.2. LINEARIDADE

Avaliação da Homocedasticidade (Teste Cochran)			
Calculado	0,43	Tabelado	0,54
Homocedástico			

REGRESSÃO ORDINÁRIA (MMQO)

Parâmetros	Regressão Ordinária (MMQO)
Equação	$y = 0,03x + 0,31$
Coefficiente de correlação (r)	0,9932
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9864
Anova	Y efetivamente varia em função de X.
Teste de Significância para Intercepto	Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.
Menor Desvio (%)	34,13
Menor Coeficiente de Variação - Precisão (%)	4,17
Menor Resíduo (%)	24,52
Outlier para resíduos totais	Grubbs: Nenhum
Outlier para resíduos por níveis	Grubbs: Nenhum
Teste de Normalidade para Resíduos (Shapiro-wilk)	Os resíduos possuem distribuição normal.
Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)	Não Independente

ConfLab
 Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
 Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
 13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
 19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

REGRESSÃO PONDERADA (MMQP)

Parâmetros	Regressão Ponderada (MMQP)
Equação	$y = 0,03x + 0,20$
Coefficiente de correlação (r)	0,9876
Coefficiente de determinação (r²)	0,9754
Anova	Y efetivamente varia em função de X.
Teste de Significância para Intercepto	Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.
Menor Desvio (%)	17,12
Menor Coeficiente de Variação - Precisão (%)	4,17
Menor Resíduo (%)	15,81
Outlier para resíduos totais	Grubbs: Nenhum
Outlier para resíduos por níveis	Grubbs: Nenhum
Teste de Normalidade para Resíduos (Shapiro-wilk)	Os resíduos possuem distribuição normal.
Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)	Não Independente

ConfLab
 Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
 Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
 13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
 19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

3. DETALHAMENTO DE INFORMAÇÕES E RASTREABILIDADE

3.1. IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA

Empresa: ConfLab
 Condomínio Residencial Portal do Lago , 134
Endereço: Residencial Portal do Lago 13803-870 Rua Cynira de Godoy Bueno
 Mogi Mirim SP
 Brasil
Telefone: 19992255339
E-mail:

3.2. PESSOAL ENVOLVIDO NA VALIDAÇÃO

RESPONSÁVEL PELO PROJETO

Rhaisa

ANALISTAS

Rhaisa

3.3. DOCUMENTOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO

ISO GUIA 35
 NBR ISO 17025
 NBR ISO 17034
 Guia MAPA Bebidas

3.4. RASTREABILIDADE (EQUIPAMENTO E REAGENTES)

GRUPOS DE EQUIPAMENTOS PARA EXECUÇÃO DE MÉTODOS

Configuração 1
 • Shimadzu, modelo GC-17A - FID

INSUMOS/REAGENTES

Acetonitrila
 Propanol

4.1. LINEARIDADE

IDENTIFICAÇÃO

Analista: Rhaissa
 Configuração de Equipamentos Utilizada: Configuração 1
 Data de Realização do Teste: 10/10/2019

ENTRADA DE DADOS

DADOS DA CURVA

Níveis de Concentração (mg/100mL)	Sinais(Replicatas) (Area)				
14,44	3423	1231	6614	3501	3702
33,6	10169	10348	10376	10627	10000
55	11560	11747	12905	11469	11489
78,8	13655	15698	14771	16585	15587
92,51	17510	20154	17832	18904	18000

DADOS PADRÃO INTERNO

Níveis de Concentração	Sinais(Replicatas)				
14,44	5551	1906	10324	5927	5900
33,6	6941	7156	7367	7379	7210
55	5972	5621	6357	5901	5799
78,8	5227	6541	6167	6419	6088
92,51	5825	6296	5924	6015	6145

RESULTADOS

AVALIAÇÃO DA HOMOCEDASTICIDADE

Avaliação da Homocedasticidade (Teste Cochran)				
Calculado	0,43	Tabelado	0,54	Homocedástico

REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS (MMQO)

ConfLab

Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

Parâmetros	Regressão Ordinária (MMQO)
Equação	$y = -0,03x + 0,31$
Coefficiente de correlação (r)	0,9932
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9864
Anova	Y efetivamente varia em função de X.
Teste de Significância para Intercepto	Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.
Maiores Desvio (%)	34,13
Maiores Coeficiente de Variação - Precisão (%)	4,17
Maiores Resíduo (%)	24,52
Outlier para resíduos totais	Grubbs: Nenhum
Outlier para resíduos por níveis	Grubbs: Nenhum
Teste de Normalidade para Resíduos (Shapiro-wilk)	Os resíduos possuem distribuição normal.
Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)	Não Independente

TESTES GERAIS

Teste de Normalidade para Resíduos (Shapiro-wilk)				
W Calculado	0,94	W Tabelado	0,92	Os resíduos possuem distribuição normal.

Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)				
D Calculado	0,99	D Tabelado	$d_L: 1,35$ $d_U: 1,49$	Não Independente

Teste Anova				
F Calculado	217,45	F Tabelado	17,44	Y efetivamente varia em função de X.

Teste de Significância para Intercepto (teste t)				
T Calculado	18,03	T Tabelado	2,78	Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.

RESÍDUOS ABSOLUTOS **RESÍDUOS RELATIVOS**

ConfLab

Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

OUTLIERS (GRUBBS POR NÍVEL)

Conc. (mg/100mL)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	-0,119	-0,090	-0,095	-0,145	-0,108
33.6	0,167	0,148	0,110	0,142	0,088
55	0,008	0,162	0,103	0,016	0,054
78.8	-0,014	-0,227	-0,232	-0,043	-0,066
92.51	-0,024	0,171	-0,020	0,113	-0,100

OUTLIERS (GRUBBS TOTAL)

Conc. (mg/100mL)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	-0,119	-0,090	-0,095	-0,145	-0,108
33.6	0,167	0,148	0,110	0,142	0,088
55	0,008	0,162	0,103	0,016	0,054
78.8	-0,014	-0,227	-0,232	-0,043	-0,066
92.51	-0,024	0,171	-0,020	0,113	-0,100

DÉSVIO

Conc. ((mg/100mL))	Desvio (%)				
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	28,013	21,129	22,357	34,130	25,465
33.6	16,866	14,941	11,132	14,345	8,956
55	0,515	10,052	6,352	1,001	3,330
78.8	0,620	9,795	10,001	1,858	2,871
92.51	0,869	6,307	0,717	4,163	3,694

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

Conc. ((mg/100mL))	Coefficiente de Variação (%)
14.44	3,519
33.6	2,186
55	3,224
78.8	4,166
92.51	3,629

REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS (MMQO)

ConfLab

Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do Lago
Rua Cynira de Godoy Bueno
13803-870 Mogi Mirim - SP Brasil
19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

Parâmetros	Regressão Ponderada(MMQP)
Equação	$y = -0,03x + 0,20$
Coefficiente de correlação (r)	0,9876
Coefficiente de determinação (r²)	0,9754
Anova	Y efetivamente varia em função de X.
Teste de Significância para Intercepto	Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.
Maior Desvio (%)	17,12
Maior Coeficiente de Variação-Precisão(%)	4,17
Maior Resíduo(%)	15,81
Outlier para resíduos totais	Grubbs: Nenhum
Outlier para resíduos por níveis	Grubbs: Nenhum
Teste de Normalidade para Resíduos (Shapiro-wilk)	Os resíduos possuem distribuição normal.
Teste de Independência para Resíduos (Durbin-Watson)	Não Independente

TESTES GERAIS

Teste de Normalidade para Resíduos(Shapiro-wilk)				
W Calculado	0,95	W Tabelado	0,92	Os resíduos possuem distribuição normal.

Teste de Independência para Resíduos(Durbin-Watson)				
D Calculado	0,51	D Tabelado	$d_L: 1,35$ $d_U: 1,49$	Não Independente

Teste Anova			
F Calculado	373,15	F Tabelado	17,44
Y efetivamente varia em função de X.			

Teste de Significância para Intercepto(teste t)			
t Calculado	15,66	t Tabelado	2,78
Existe diferença entre o valor médio b experimental e o valor 0.			

RESÍDUOS ABSOLUTOS **RESÍDUOS RELATIVOS**

ConfLab

Condomínio Residencial Portal do Lago, 134 Residencial Portal do
Lago Rua Cynira de Godoy Bueno
13803-870 Mogi Mirim SP Brasil
19992255339

Versão do Software 1.0.1.0

OUTLIERS (GRUBBS POR NÍVEL)

Conc. (mg/100mL)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	-0,055	-0,026	-0,031	-0,081	-0,044
33.6	0,168	0,149	0,111	0,143	0,090
55	-0,061	0,094	0,034	-0,053	-0,015
78.8	-0,161	-0,374	-0,379	-0,190	-0,213
92.51	-0,216	-0,021	-0,211	-0,079	-0,292

OUTLIERS (GRUBBS TOTAL)

Conc. (mg/100mL)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	-0,055	-0,026	-0,031	-0,081	-0,044
33.6	0,168	0,149	0,111	0,143	0,090
55	-0,061	0,094	0,034	-0,053	-0,015
78.8	-0,161	-0,374	-0,379	-0,190	-0,213
92.51	-0,216	-0,021	-0,211	-0,079	-0,292

DÉSVIO

Conc. ((mg/100mL))	Desvio (%)				
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 4	Replicata 5
14.44	11,617	5,425	6,530	17,121	9,325
33.6	15,285	13,554	10,126	13,017	8,169
55	3,375	5,205	1,877	2,937	0,842
78.8	6,269	14,523	14,708	7,382	8,293
92.51	7,134	0,679	6,998	2,607	9,676

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO

Conc. ((mg/100mL))	Coefficiente de Variação (%)
14.44	3,519
33.6	2,186
55	3,224
78.8	4,166
92.51	3,629

REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ORDINÁRIOS (MMQO) VERSUS
REGRESSÃO DOS MÍNIMOS QUADRADOS PONDERADOS (MMQP)

ANEXO III – CERTIFICADOS DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DO GC-MS

SIGMA-ALDRICH®
sigma-aldrich.com

3330 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

 Website: www.sigmaaldrich.com

 Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

 Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

 Product Name:
Methanol - anhydrous, 99.8%

Product Number: 322416
 Batch Number: 8HBD6423V
 Brand: SIAL
 CAS Number: 67-56-1
 MDL Number: MFCD00004595
 Formula: CH₄O
 Formula Weight: 32.04 g/mol
 Quality Release Date: 06 AUG 2013

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 99.75 %	99.97 %
Residue on Evaporation	≤ 0.0003 %	0.0001 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.002 %	0.001 %

Note

For 100 mL unit size, water content may exceed above specification; not to exceed 0.005%.

Jamie Gleason, Manager
 Quality Control
 Sheboygan Falls, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

Product Name: 2-METHYL-1-PROPANOL
BioUltra, for molecular biology, ≥ 99.5 % (GC)
Product Number: 58448
Product Brand: Sigma
Molecular Formula: C₄H₁₀O
Molecular Mass: 74.12
CAS Number: 78-83-1

TEST	SPECIFICATION	LOT BCBB7545 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	CLEAR LIQUID	CLEAR LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥ 99.5 %	99.7 %
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.395 - 1.397	1.396
WATER (COULOMETR.)	≤ 0.1 %	0.040 %
RESIDUE (EVAPORATION)	≤ 0.001 %	0.0005 %
TRACES ALDEHYDE	≤ 100 MG/KG (AS N-BUTANAL)	< 100 MG/KG (AS N-BUTANAL)
TRACES KETONE (AS CH ₃ COCH ₃)	≤ 100 MG/KG	< 100 MG/KG
TRACES PEROXIDE (AS H ₂ O ₂)	≤ 10 MG/KG	< 10 MG/KG
METAL TRACE ANALYSIS (ICP)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	PASSED
ALUMINIUM (ICP)	≤ 0.5 MG/KG	< 0.5 MG/KG
BARIUM (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
BISMUTH (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
CALCIUM (ICP)	≤ 0.5 MG/KG	< 0.5 MG/KG
CADMIUM (ICP)	≤ 0.05 MG/KG	< 0.05 MG/KG
COBALT (ICP)	≤ 0.02 MG/KG	< 0.02 MG/KG
CHROMIUM (ICP)	≤ 0.02 MG/KG	< 0.02 MG/KG
COPPER (ICP)	≤ 0.02 MG/KG	< 0.02 MG/KG
IRON (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
POTASSIUM (ICP)	≤ 0.5 MG/KG	< 0.5 MG/KG
LITHIUM (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
MAGNESIUM (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG
MANGANESE (ICP)	≤ 0.02 MG/KG	< 0.02 MG/KG
MOLYBDENUM (ICP)	≤ 0.1 MG/KG	< 0.1 MG/KG

SIGMA-ALDRICHHedstrasse 2, D-68225 Steinheim/Germany
Tel: +49 73 3967 3550 Fax: +49 73 3967 3557

Certificate of Analysis

Product Name: 1-PROPANOL
 anhydrous, 99.7 %
Product Number: 279544
Product Brand: Sigma-Aldrich
Molecular Formula: C_3H_8O
Molecular Mass: 60.10
CAS Number: 71-23-8

TEST	SPECIFICATION	LOT STBC0338V RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥ 99.65 %	99.68 %
WATER (COULOMETRY)	≤ 0.005 %	0.003 %
RESIDUE (EVAPORATION)	≤ 0.0003 %	0.0002 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
QC RELEASE DATE	04/APR/11

Claudia Mayer, Manager
 Quality Control
 Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. (See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.

Certificate of Analysis

1.03649.1000 Ethyl acetate hypergrade for LC-MS LiChrosolv®
Batch I0942649

Batch Values		
Purity (GC)	≥ 99.8	%
Identity (IR)	conforms	
Evaporation residue	≤ 2.0	mg/l
Water	≤ 0.05	%
Acidity	≤ 0.0002	meq/g
Alkalinity	≤ 0.0002	meq/g
Al (Aluminium)	≤ 10	ppb
Ca (Calcium)	≤ 10	ppb
Fe (Iron)	≤ 10	ppb
K (Potassium)	≤ 5	ppb
Mg (Magnesium)	≤ 10	ppb
Na (Sodium)	≤ 50	ppb
Transmission (at 260 nm)	≥ 50	%
Transmission (at 265 nm)	≥ 80	%
Transmission (from 270 nm)	≥ 98	%
Suitable for LC-MS (tested with ion trap MS); (Intensity of background mass peak based on reserpine (APCI/ESI positiv))	≤ 2	ppb
Suitable for LC-MS (tested with ion trap MS); Intensity of background mass peak based on reserpine (APCI/ESI negative)	≤ 20	ppb

Filtered by 0.2 µm filter.

Date of release (DD.MM.YYYY) 09.03.2018
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.03.2021

Jeannette David
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

N^o 311 A2A
241
18105111

Certificate of Analysis

8.06031.1000 2-Methyl-1-butanol for synthesis
Batch S5361431

Batch Values

Assay (GC, area%)
Density (d 20 °C/ 4 °C)
Identity (IR)

99.9 %
0.819
passes test

Date of examination (DD.MM.YYYY): 18.05.2009
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 31.05.2014

Dr. Wolfgang Bolkart

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

ANEXO VI – CERTIFICADO DOS MRCS PRODUZIDOS

RQA Labs – Research in Quality Assurance for Laboratories
Instituto de Química de São Carlos
Universidade de São Paulo

Certificado de Material de Referência

RQACAC01/20

Número do Certificado

Identificação do item

MRC: Metanol, Propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol em etanol 40%.

Unidade produtora: RQA Labs

Número do lote: C01/20

Código do serviço: 0001

01/06/2021

Data de emissão

Rhaissa Mecca Bontempi

Mestranda do Instituto de Química de São Carlos

Certificado de Material de Referência

RQACAC01/20

Número do Certificado

Descrição e preparo do MRC

Este material de referência certificado (MRC) consiste em metanol, propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol em etanol 40%, preparado através de método gravimétrico seguindo as orientações da ISO Guia 35:2020¹, ISO Guia 31:2017² e NBR ISO 17034³. Este MRC foi envasado em frascos âmbar contendo 1,0 mL de solução por frasco.

Metodologia analítica

A certificação foi realizada pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao FID e cromatografia gasosa acoplada ao MS. Condições cromatográficas do GC-FID: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica, inicialmente a uma temperatura de 35°C por 4,0 minutos, aumentando após esse período a uma taxa de 3,5°C/min até 200°C, essa temperatura foi mantida por mais 6,3 minutos. Tempo total da corrida, 11,00 minutos. Temperatura do injetor, 200°C. Volume de injeção, 1 µl com razão de split 1:30. Condições cromatográficas do GC-MS: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica, programa de temperatura do forno: 40 °C por 1 min, de 40 a 70 °C com incremento de 3 °C/min, de 70 a 150 °C com incremento de 30 °C/min e de 150 a 230 °C com incremento de 120 °C/min, estável por 2,67 min. Tempo total da corrida, 17 minutos. Temperatura do injetor, 230°C. Temperatura do detector, 230°C. Fase móvel, Hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1,5 mL/min. Volume de injeção, 0,50 µl com razão de split 60:1.

Rastreabilidade metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida por meio do uso de padrões certificados e rastreáveis, gravimetria, duas técnicas de caracterização, métodos primários de determinação, padrões puros utilizados no preparo das soluções das curvas de calibração.

Uso pretendido

Este MRC tem sua utilização destinada a ensaios na determinação de congêneres e contaminantes em bebida destilada: cachaça, sendo metanol, propanol, 2-metil-1-propanol e 2-metil-1-butanol presentes.

Instruções de uso

Este MRC deve ser manipulado o mais rápido possível após a abertura do frasco ou não abrir apenas furar o topo emborrachado do frasco e retirar sua alíquota. Material tóxico. A fim de garantir a amostragem homogênea, a quantidade mínima a ser utilizada é de 1 µL.

Certificado de Material de Referência

RQACAC01/20
Número do Certificado

Transporte e armazenagem

Este MRC deve ser armazenado em local refrigerado, de preferência em $-4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Valor Certificado

Os valores certificados do MRC C01/20, com as respectivas incertezas expandidas (U) para um nível de confiança de aproximadamente 95% e fator de abrangência k, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores certificados (mg/mL de etanol 40%, fator de abrangência e incertezas expandidas).

Analito	Valor propriedade (mg/mL etanol 40%)	k	U (mg/mL etanol 40%)
Metanol	37,00	2,179	9,135
Propanol	33,39	2,160	8,053
2-metil-1-propanol	17,01	2,093	1,937
2-metil-1-butanol	63,98	2,160	18,842

A incerteza expandida, com fator de abrangência aproximadamente $k=2$ (intervalo de 95% de confiança) foi calculada a partir da combinação da incerteza do estudo da homogeneidade do lote, do estudo de estabilidade de longa duração (armazenamento) e da caracterização. A incerteza da caracterização inclui a incerteza do GC-FID e do GC-MS, mais a pureza dos padrões utilizados. Calculados a partir do Guia para expressão da incerteza de medição⁴ (GUM).

Prazo de validade

O MRC C01/20 é válido até 31/12/2021.

Este MRC deve ser manuseado e armazenado de acordo com as instruções contidas neste certificado. O certificado não valerá caso o MRC esteja danificado, contaminado ou alterado. Garantimos a integridade do MRC até seu primeiro uso.

Referências

- [1] ABNT ISO Guia 35:2020 Materiais de referência - Guia para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade.
- [2] ABNT ISO GUIA 31:2017, Materiais de referência - conteúdo, rótulos e documentação associada.
- [3] ABNT NBR ISO 17034:2017, Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência.
- [4] Guia para expressão da incerteza de medição - GUM 2008. Primeira edição Brasileira da Primeira edição do BIPM de 2008, Inmetro, 2012.

RQA Labs – Research in Quality Assurance for Laboratories
Instituto de Química de São Carlos
Universidade de São Paulo

Certificado de Material de Referência

RQAVOV01/20

Número do Certificado

Identificação do item

MRC: Acetato de Etila, Metanol, 2-metil-1-propanol em etanol 40%.

Unidade produtora: RQA Labs

Número do lote: V01/20

Código do serviço: 0002

01/06/2021

Data de emissão

Rhaissa Mecca Bontempi
Mestranda do Instituto de Química de São Carlos

Certificado de Material de Referência

RQAVOC01/20

Número do Certificado

Descrição e preparo do MRC

Este material de referência certificado (MRC) consiste em Acetato de Etila, Metanol, 2-metil-1-propanol em etanol 40%, preparado através de método gravimétrico seguindo as orientações da ISO Guia 35:2020¹, ISO Guia 31:2017² e NBR ISO 17034³. Este MRC foi envasado em frascos âmbar contendo 1,0 mL de solução por frasco.

Metodologia analítica

A certificação foi realizada pelas técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao FID e cromatografia gasosa acoplada ao MS. Condições cromatográficas do GC-FID: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica, inicialmente a uma temperatura de 35°C por 4,0 minutos, aumentando após esse período a uma taxa de 3,5°C/min até 200°C, essa temperatura foi mantida por mais 6,3 minutos. Tempo total da corrida, 11,00 minutos. Temperatura do injetor, 200°C. Volume de injeção, 1 µL com razão de split 1:30. Condições cromatográficas do GC-MS: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica, programa de temperatura do forno: 40 °C por 1 min, de 40 a 70 °C com incremento de 3 °C/min, de 70 a 150 °C com incremento de 30 °C/min e de 150 a 230 °C com incremento de 120 °C/min, estável por 2,67 min. Tempo total da corrida, 17 minutos. Temperatura do injetor, 230°C. Temperatura do detector, 230°C. Fase móvel, Hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1,5 mL/min. Volume de injeção, 0,50 µL com razão de split 60:1.

Rastreabilidade metrológica

O valor certificado possui rastreabilidade metrológica garantida por meio do uso de padrões certificados e rastreáveis, gravimetria, duas técnicas de caracterização, métodos primários de determinação, padrões puros utilizados no preparo das soluções das curvas de calibração.

Uso pretendido

Este MRC tem sua utilização destinada a ensaios na determinação de congêneres e contaminantes em bebida destilado-retificada: vodca, sendo Acetato de Etila, Metanol, 2-metil-1-propanol presentes.

Instruções de uso

Este MRC deve ser manipulado o mais rápido possível após a abertura do frasco ou não abrir apenas furar o topo emborrachado do frasco e retirar sua alíquota. Material tóxico. A fim de garantir a amostragem homogênea, a quantidade mínima a ser utilizada é de 1 µL.

Certificado de Material de Referência

RQAVOV01/20
Número do Certificado

Transporte e armazenagem

Pág.02/03

Este MRC deve ser armazenado em local refrigerado, de preferência em $-4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Valor Certificado

Os valores certificados do MRC C01/20, com as respectivas incertezas expandidas (U) para um nível de confiança de aproximadamente 95% e fator de abrangência k, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores certificados (mg/mL de etanol 40%, fator de abrangência e incertezas expandidas.

Analito	Valor propriedade (mg/mL etanol 40%)	k	U (mg/mL etanol 40%)
Acetato de Etila	3,47	2,365	0,754
Metanol	33,05	2,179	7,416
2-metil-1-propanol	0,67	2,365	0,266

A incerteza expandida, com fator de abrangência aproximadamente k=2 (intervalo de 95% de confiança) foi calculada a partir da combinação da incerteza do estudo da homogeneidade do lote, do estudo de estabilidade de longa duração (armazenamento) e da caracterização. A incerteza da caracterização inclui a incerteza do GC-FID e do GC-MS, mais a pureza dos padrões utilizados. Calculados a partir do Guia para expressão da incerteza de medição⁴ (GUM).

Prazo de validade

O MRC V01/20 é válido até 31/12/2021

Este MRC deve ser manuseado e armazenado de acordo com as instruções contidas neste certificado. O certificado não valerá caso o MRC esteja danificado, contaminado ou alterado. Garantimos a integridade do MRC até seu primeiro uso.

Referências

- [1] ABNT ISO Guia 35:2020 Materiais de referência - Guia para caracterização e avaliação da homogeneidade e estabilidade.
- [2] ABNT ISO GUIA 31:2017, Materiais de referência - conteúdo, rótulos e documentação associada.
- [3] ABNT NBR ISO 17034:2017, Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência.
- [4] Guia para expressão da incerteza de medição - GUM 2008. Primeira edição Brasileira da Primeira edição do BIPM de 2008, Inmetro, 2012.

Pág.03/03

ANEXO V – FICHA DE INFORMAÇÃO DO MR PRODUZIDO

RQA Labs – Research in Quality Assurance for Laboratories
Instituto de Química de São Carlos
Universidade de São Paulo

Ficha de Informação MR

ROACAC01/20

Número do Certificado

Identificação do item

MR: Furfural em etanol 40%.

Unidade produtora: RQA Labs

Número do lote: C01/20

Código do serviço: 0003

01/06/2021

Data de emissão

Rhaissa Mecca Bontempi
Mestranda do Instituto de Química de São Carlos

Ficha de Informação MR

RQACAC01/20
Número do Certificado

Descrição e preparo do padrão

Este material contém furfural em etanol 40%, preparado através de método gravimétrico seguindo as orientações da ISO *Guide* 80:2014¹. Este padrão foi envasado em frascos âmbar contendo 1,0 mL de solução por frasco.

Metodologia analítica

A certificação foi realizada pela técnica de cromatográfica gasosa acoplada ao FID. Condições cromatográficas do GC-FID: Rampa de aquecimento da coluna cromatográfica, inicialmente a uma temperatura de 35°C por 4,0 minutos, aumentando após esse período a uma taxa de 35°C/min até 200°C, essa temperatura foi mantida por mais 6,3 minutos. Tempo total da corrida, 11,00 minutos. Temperatura do injetor, 200°C. Volume de injeção, 1µl com razão de split 1:30.

Rastreabilidade metrológica

O valor indicativo de propriedade possui rastreabilidade metrológica garantida por meio do uso de padrões certificados e rastreáveis, gravimetria, métodos primários de determinação, padrões puros utilizados no preparo das soluções das curvas de calibração.

Uso pretendido

Este padrão tem sua utilização destinada a ensaios na determinação do congênere Furfural em bebida destilada: cachaça.

Instruções de uso

Este padrão deve ser manipulado o mais rápido possível após a abertura do frasco ou não abrir apenas furar o topo emborrachado do frasco e retirar sua alíquota. Material tóxico. A fim de garantir a amostragem homogênea, a quantidade mínima a ser utilizada é de 1 µL.

Transporte e armazenagem

Este padrão deve ser armazenado em local refrigerado, de preferência em -4°C ± 2°C.

Ficha de Informação MR

RQACAC01/20
Número do Certificado

Valor indicativo de propriedade

O valor de propriedade do Furfural contido no MRC C01/20, com as respectivas incertezas expandidas (U) para um nível de confiança de aproximadamente 95% e fator de abrangência k, está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Valores indicativo de propriedade (mg/mL de etanol 40%, fator de abrangência e incertezas expandidas).

Analito	Valor indicativo de propriedade (mg/mL etanol 40%)	k	U (mg/mL etanol 40%)
Furfural	1,24	2	0,130

A incerteza expandida, com fator de abrangência aproximadamente k=2 (intervalo de 95% de confiança) foi calculada a partir da combinação da incerteza do estudo da homogeneidade do lote, do estudo de estabilidade de longa duração (armazenamento) e da caracterização, esta por meio da média geral advinda do estudo da homogeneidade. A incerteza da caracterização inclui a incerteza do GC-FID mais a pureza dos padrões utilizados. Calculados a partir do Guia para expressão da incerteza de medição² (GUM).

Prazo de validade

O padrão para controle interno do furfural contido no C01/20 é válido até 31/12/2021. Este padrão deve ser manuseado e armazenado de acordo com as instruções contidas neste certificado. O certificado não valerá caso o padrão esteja danificado, contaminado ou alterado. Garantimos a integridade do padrão até seu primeiro uso.

Referências

- [1] ISO Guide 80:2014 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs).
- [2] Guia para expressão da incerteza de medição – GUM 2008. Primeira edição Brasileira da Primeira edição do BIPM de 2008, Inmetro, 2012.