UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Instituto de Química de São Carlos

DANIELI CRISTINA MARCKI

Desenvolvimento de candidato a material de referência certificado para Uísque: um material eficaz para a garantia da qualidade e manutenção da ISO/IEC 17025 em Laboratórios de Ensaio

São Carlos

2017

DANIELI CRISTINA MARCKI

Desenvolvimento de candidato a material de referência certificado para Uísque: um material eficaz para a garantia da qualidade e manutenção da ISO/IEC 17025 em Laboratórios de Ensaio

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Igor Renato Bertoni Olivares

São Carlos

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer meu orientador Igor Renato B. Olivares por ter compartilhado comigo, além de uma parte do seu vasto conhecimento sobre Química Analítica e Gestão da Qualidade, muitos cafés e uma grande amizade.

Também gostaria de agradecer ao professor Vitor Hugo P. Paces por mais alguns cafés, pela amizade e ajuda com seus conhecimentos tecnológicos.

À professora Maria Olímpia O. de Rezende que permitiu a realização de parte do trabalho em seu laboratório e à Maria Diva Landgraf que colaborou na execução das análises.

Aos professores e funcionários do IQSC que sempre me trataram com tanta simpatia e que colaboraram direta ou indiretamente com o trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À FAPESP por apoiar o projeto financeiramente e acreditar em nossa proposta.

Ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e à Rede de Metrologia Química do INMETRO que apoiaram o projeto formalmente.

Ao LANAGRO-SP que foi um grande parceiro no desenvolvimento do trabalho, compartilhando insumos e análises.

Aos meus pais Eder Marcki e Adriana por dois grandes privilégios: o de poder dar continuidade à minha educação e o de ser filha deles.

Ao meu irmão Eder por ser a melhor pessoa do mundo.

Às minhas avós Geni e Benedita pelo amor e carinho.

Ao meu namorado Eduardo pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório e agregados que tornaram esses dois anos tão agradáveis: Heloísa, Ricardo, Eduardo, Laís, Guilherme, Pedro e especialmente ao Lucas, que participou diretamente de parte do trabalho e enfrentou comigo os desafios iniciais.

Aos amigos que São Carlos me trouxe e que se tornaram uma parte da minha vida da qual muito me orgulho.

RESUMO

Atualmente, a produção de Material de Referência Certificado (MRC) tem apresentado destaque devido a sua importância na aplicação durante a validação de métodos, estimativa de incerteza e controles de rotina, atendendo uma grande demanda de laboratórios que aplicam sistemas de gestão da qualidade (como por exemplo, baseados na ISO/IEC 17025) e necessitam desenvolver estas atividades em busca da rastreabilidade metrológica. Dentre estes diferentes laboratórios, podemos destacar os laboratórios de bebidas que analisam, por exemplo, contaminantes em uísque visando um monitoramento adequado deste produto de grande consumo interno, seja de produtos importados e, ou produção nacional. Desta maneira este projeto realizou o desenvolvimento de um candidato a MRC para Uísque, considerando a importância em desenvolver métodos para a produção de material de referência, sendo o uísque um excelente candidato devido à importância em monitorar adequadamente este produto que tem apresentado um crescimento exponencial de consumo nos últimos anos. O MRC produzido possui rastreabilidade demonstrada e o tratamento estatístico dos dados foi realizado de acordo com o ISO Guia 35. A partir da caracterização por duas técnicas (GC-FID e GC-MS), estudos de homogeneidade e estabilidade e estimativa das incertezas associadas a cada etapa do preparo, o material foi certificado para os analitos 2-butanol (58 ± 16 mg/100 ml de etanol anidro), 1-propanol (80 ± 7 mg/100 ml de etanol anidro), 2-metil-1-propanol (76 ± 17 mg/100 ml de etanol anidro), 3-metil-1-butanol (104 ± 16 mg/100 ml de etanol anidro), furfural (7 ± 3 mg/100 ml de etanol anidro) e possui o valor indicativo para o metanol (21 ± 9 mg/100 ml de etanol anidro).

Palavras-chave: Ferramentas da Qualidade, Controle de Qualidade, Material de Referência Certificado.

ABSTRACT

Currently, the production of CRM has been highlighted due to its importance in method validation, uncertainty measurement and routine controls, necessary for laboratories that apply quality management systems (e.g. based on ISO/IEC 17025) and need to develop these activities to achieve an adequate metrological traceability. Among these different laboratories, we can highlight the beverage laboratory that analyses, for example, contaminants in whiskey to ensure an appropriate monitoring of this product that has great domestic consumption. In this project, a candidate of certified reference material for whiskey was developed, considering the importance of developing methods to produce reference material, being the whiskey an excellent candidate because of its importance to properly monitor this product that has shown an exponential growth of consumption in recent years. The produced MRC has demonstrable traceability and the statistical treatment of data was performed according to ISO Guide 35. From the characterization by two techniques (GC-FID and GC-MS), studies of homogeneity and stability and estimation of the uncertainties of each step in its prepare, the material was certified for 2-butanol (58 ± 16 mg/100 ml anhydrous ethanol), 1-propanol (80 ± 7 mg/100 ml anhydrous ethanol), 2-methyl-1-propanol (76 ± 17 mg/100 ml anhydrous ethanol), 3-methyl-1-butanol (104 ± 16 mg/100 ml anhydrous ethanol), furfural (7 ± 3 mg/100 ml anhydrous ethanol) and has the indicative value for methanol (21 ± 9 mg/100 ml of anhydrous ethanol).

Keywords: Quality Tools; Certified Reference Material; Quality Control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico demonstrativo do crescimento do número de laboratórios acreditados no Brasil por diferentes Sistemas de Gestão com base no cadastro do INMETRO.....	3
Figura 2 - Gráfico demonstrativo dos laboratórios acreditados considerando as entidades de acreditação de aproximadamente 112 países que são membros e associados ao ILAC.....	4
Figura 3 - Ciclo de garantia da qualidade.....	5
Figura 4 - Gráfico demonstrativo das categorias de MR de interesse de laboratórios nacionais.....	7
Figura 5 - Gráfico da evolução da importação de Uísque do Reino Unido pelo Brasil em milhões de Libras por ano.....	8
Figura 6 - Fluxograma do processo de produção de um MRC.....	13
Figura 7 - Etapas principais na produção de um Material de Referência Certificado.....	15
Figura 8 - Esquematização do modelo ideal para a realização de um teste de homogeneidade entre frascos.....	24
Figura 9 - Esquematização do método de avaliação da incerteza de uma medição.....	32
Figura 10 - Apresentação esquemática dos componentes principais de um relatório de certificação.....	36
Figura 11 - Otimização da separação cromatográfica.....	40
Figura 12 - Preparo das soluções estoque A e B.....	42
Figura 13 - Preparo das soluções para a construção da curva de calibração.....	43
Figura 14 - Cromatograma representativo referente à análise do uísque bruto em GC-FID....	46
Figura 15 - Esquematização do procedimento de fortificação do uísque bruto.....	48
Figura 16 - Cromatograma representativo referente ao ensaio de caracterização por GC-FID.....	49
Figura 17 - Diagrama de Ishikawa utilizado para a identificação das principais fontes de incerteza relacionadas à caracterização do candidato a MRC por GC-FID.....	51
Figura 18 - Gráfico comparativo entre as fontes de incerteza que compõem a incerteza combinada da etapa de caracterização por GC-FID.....	54
Figura 19 - Cromatograma representativo referente à separação do candidato a MRC por GC-MS.....	57
Figura 20 - Gráfico comparativo das fontes de incertezas associadas à caracterização por GC-MS.....	59
Figura 21 - Gráfico comparativo das incertezas associadas ao estudo de caracterização.....	62
Figura 22 - Esquematização do estudo de homogeneidade entre frascos.....	64
Figura 23 - Esquematização do estudo de estabilidade à longo prazo.....	66
Figura 24 - Esquematização do estudo de estabilidade a curto prazo.....	68

<u>Figura 25 - Gráfico comparativo das etapas de preparo do MRC para a incerteza combinada</u>	
.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os valores de concentração dos MRC para cachaça e MRC para uísque em relação aos valores para os analitos definidos pelo MAPA	9
Tabela 2 - Tabela ANOVA.....	25
Tabela 3 - Tempo de retenção dos analitos de interesse e padrões internos analisados por GC-FID.....	41
Tabela 4 - Coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração por GC-FID	45
Tabela 5 - Resultados da caracterização de background	47
Tabela 6 - Valores de propriedade obtidos na caracterização por GC-FID.....	50
Tabela 7 - Incertezas-padrão relativas associadas à caracterização por GC-FID e incertezas combinadas	53
Tabela 8 - Íons monitorados para a caracterização por GC-MS e tempos de retenção avaliados	55
Tabela 9 - Coeficientes de correlação referentes às curvas de calibração utilizadas para a caracterização por GC-MS	56
Tabela 10 - Concentrações obtidas no estudo de caracterização por GC-MS.....	58
Tabela 11 - Incertezas-padrão relativas associadas à caracterização por GC-MS e incertezas combinadas	59
Tabela 12 - Concentrações dos analitos presentes no candidato a MRC e a componente de incerteza relacionada à discrepância entre os resultados	61
Tabela 13 - Incertezas-padrão combinadas da etapa de caracterização para cada analito avaliado.....	62
Tabela 14 - Resultados do estudo de homogeneidade	64
Tabela 15 - Avaliação de tendências à degradação	66
Tabela 16 - Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira	67
Tabela 17 - Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC	69
Tabela 18 - Valores certificados	71

LISTA DE SÍMBOLOS

t_R : tempo de retenção	μ : média geral quando o número de replicatas tende ao infinito
α : fator de separação	A_j : erro relacionado à variabilidade dos resultados entre os frascos
R_s : resolução cromatográfica	ξ_{ij} : variância de repetibilidade
CV : coeficiente de variação	SQ_{total} : soma dos quadrados total
s : desvio-padrão	$\bar{\bar{Y}}$: média das médias de y
$\bar{x}$: média de x	α : número de grupos
n : número de medições	n_i : número de membros no grupo
G : valor crítico de Grubbs	MQ_{dentro} : quadrados médios relacionados à repetibilidade dentro do grupo
Q : valor crítico de Dixon	MQ_{entre} : quadrados médios relacionados à variabilidade entre grupos
b : coeficiente linear	n_0 : número total de medições consideradas na ANOVA
a : o coeficiente angular	s_r : desvio-padrão relacionado à repetibilidade
ε : relacionada ao erro aleatório	s_{bb} : desvio-padrão entre grupos
r : coeficiente de correlação	u_{bb} : componente da incerteza devido à homogeneidade
$\hat{y}$: resíduos em y	$v_{MQ_{dentro}}$: graus de liberdade de MQ_{dentro}
SQ_{res} : soma dos desvios quadrados	s_a : erro-padrão do coeficiente angular
$\bar{y}$: média dos sinais instrumentais	$t_{0,95,n-2}$: fator t para uma probabilidade de 95% e graus de liberdade $n-2$
MQ_{res} : quadrados médios residuais	u_{lts} : componente da incerteza relacionado à estabilidade a longo prazo
S^2 : variância da regressão	y_0 : valor inicial da propriedade
S : desvio-padrão residual em y	$u(y)$ é a incerteza total para uma única unidade de MRC com taxa de degradação a após um tempo x
S_{xx} : desvio-padrão residual em x	$u(y_0)$ é a incerteza do MRC no momento da certificação
C_0 resultado da concentração da amostra analisada	
$u(C_0)_{cur}$: incerteza-padrão relacionada à curva de calibração para a determinação de C_0	
p : número de medições para determinação da concentração na amostra	
$\bar{C}$ média dos diferentes níveis de concentração da curva analítica	
Y_{ij} resultado de uma medição individual	

$u(a)$: incerteza na determinação da taxa de degradação

$u(x_i)$: incerteza-padrão associada a uma fonte de incerteza x_i

$u_c(y)$: incerteza-padrão combinada da medição

U : incerteza expandida

k : fator de expansão

c_i e c_k : coeficientes de sensibilidade

v_{eff} : graus de liberdade efetivos

u_{car} : componente da incerteza relacionada à caracterização

u_{pur} : componente da incerteza relacionada à pureza

u_m : componente da incerteza relacionada à pesagem

u_{tara} : componente da incerteza relacionado à tara da balança

u_{bruta} : componente da incerteza relacionado à pesagem da massa

u_s : desvio-padrão relacionado à verificação da balança

u_{solB} : incerteza-padrão associada ao preparo da solução B

$u_{m_rel_cpi}$: incerteza-padrão relativa relacionada à pesagem do padrão interno

$u_{m_rel_sol}$: incerteza-padrão relativa relacionada à pesagem da solução

u_{pur_rel} : incerteza-padrão relativa relacionada à pureza do padrão interno

u_{cpi} : incerteza-padrão relacionada à concentração do padrão interno na amostra caracterizada

u_{c_FID} : incerteza combinada associada à caracterização por GC-FID

u_{cpi_rel} : incerteza-padrão relativa associada à concentração de padrão interno adicionado à amostra

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Sistemas de Gestão da Qualidade nos laboratórios de ensaios	1
1.2 O uso de Materiais de Referência e Materiais de Referência Certificados no controle de qualidade	6
1.3 O impacto econômico do uísque.....	7
2 OBJETIVOS.....	10
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	11
3.1 Produção de um MRC.....	11
3.2 Definição do candidato a Material de Referência.....	13
3.3 Amostragem.....	14
3.4 Preparação do candidato a MRC	14
3.5 Estudo de caracterização.....	15
3.5.1 Cromatografia Gasosa	16
3.5.2 Método do padrão interno	17
3.5.3 Avaliação do método.....	18
3.5.4 Estimativa da incerteza devido à calibração	21
3.6 Estudo de Homogeneidade	22
3.7 Estudo de Estabilidade.....	27
3.7.1 Análise de tendências	28
3.7.2 Determinação do tempo de prateleira em relação à estabilidade a longo prazo	29
3.8 Cálculo da Incerteza Expandida do MRC produzido	31
3.9 Elaboração do certificado	36
4 DESENVOLVIMENTO.....	37
4.1 Materiais e métodos	37
4.1.1 Padrões analíticos e amostras	37
4.1.2 Instrumentação	39
4.1.3 Separação cromatográfica	39
4.1.4 Construção das curvas de calibração.....	41
4.1.5 Avaliação do método.....	44
4.2 Preparo do candidato a MRC.....	45
4.2.1 Caracterização de background	45
4.2.2 Fortificação.....	47

4.3 Ensaio de caracterização	48
4.3.1 GC-FID.....	48
4.3.2 Caracterização por GC-MS	54
4.3.3 Designação do valor de propriedade	60
4.3.4 Incerteza relacionada à caracterização	61
4.4 Ensaio de homogeneidade	63
4.5 Ensaio de estabilidade.....	65
4.5.1 Estabilidade à longo prazo	65
4.5.2 Estudo de estabilidade a curto prazo	68
4.6 Estimativa da incerteza expandida do MRC.....	69
5 CONCLUSÃO.....	71
6 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas de Gestão da Qualidade nos laboratórios de ensaios

De acordo com Olivares¹, o conceito de qualidade surgiu de forma intuitiva desde o início das relações comerciais, pois, mesmo na ausência de estudiosos na área, foi desenvolvida uma percepção de que para ser vendido um determinado produto, este deveria atender a alguma necessidade do cliente e, para que um produto continuasse sendo comercializado, este deveria também atender as expectativas do cliente.

Com a industrialização, onde a produção passou a ser segmentada e em grande escala, o controle rigoroso pelo qual a mercadoria passava na época dos artesãos foi perdido. Nesse contexto, no campo das ciências administrativas, criou-se a base da Gestão da Qualidade, cujos conceitos relacionados à qualidade e a sua importância começaram a ser difundidos na indústria na década de 1920.

O grande crescimento da Gestão da Qualidade ocorreu após a Segunda Guerra Mundial onde a aplicação dos conhecimentos sobre Gestão da Qualidade, principalmente por Joseph M. Juran e W. Edwards Deming, tornaram possível a reestruturação econômica do Japão no pós-guerra, aumentando a produção, desenvolvimento tecnológico e qualidade dos produtos japoneses antes reconhecidos por apresentarem baixa qualidade.

Para Juran, existe uma dualidade entre os dois principais significados da palavra “qualidade”. Um deles se baseia no fato de que o desenvolvimento de um produto que seja capaz de promover a satisfação do cliente necessita, na maioria das vezes, de maior investimento, portanto, maior custo; outro significado relaciona-se com a ausência de falhas, ou seja, com a ausência de defeitos e reclamações por parte do cliente, que impactam negativamente no custo de produção a longo prazo. Assim, a busca de estratégias para a eliminação das falhas leva a um menor custo. Para solucionar essa dualidade, a definição de Juran para “qualidade” é de “*adequação ao uso*”, ou seja, está associado à relação entre a necessidade e a expectativa do cliente em relação a um determinado produto, assim, o cliente adquire um produto por necessidade e se fideliza a uma marca por ser a que melhor atende suas expectativas.

Outros grandes estudiosos criaram definições para Qualidade, como Phillip Crosb, que criou o conceito de “zero defeito”, Kaoru Ishikawa que desenvolveu o diagrama de causa e efeito conhecido também como diagrama “espinha de peixe”, importante ferramenta para a descoberta da causa-raiz de problemas e Armand Feigenbaum que introduziu nos Estados Unidos o termo

Controle da Qualidade Total (Total Quality Control -TQC), cujos conceitos preconizaram o desenvolvimento do Sistema de Gestão da Qualidade cujas diretrizes foram estabelecidas pelas normas da série ISO 9000 na década 1980.

Nos laboratórios, o conceito de qualidade está ligado principalmente à confiabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos. Portanto, um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) fornece ferramentas que permitem gerenciar todos os fatores que possam afetar a qualidade dos resultados emitidos por um laboratório, utilizando procedimentos documentados para que essas ferramentas sejam aplicadas de forma adequada e sempre da mesma forma.

Há normas específicas para regulamentar as diretrizes para implantação de um sistema de gestão da qualidade em laboratórios, dentre elas as mais utilizadas nos laboratórios de ensaio são as normas ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 e BPL (Boas Práticas de Laboratório). Enquanto a BPL é focada em cada estudo realizado, a ISO/IEC 17025 é mais flexível para atender a qualquer tipo de laboratório.

A ISO (International Organization for Standardization) é uma entidade não-governamental composta por 163 organismos nacionais de padronização que colaboram entre si, estabelecendo especificações para produtos, serviços e sistemas de forma a assegurar a qualidade, eficiência e segurança, permitindo e facilitando o comércio exterior.²

A IEC (International Electrotechnical Commission) é uma das três entidades principais que desenvolvem normas de padronização internacionais no mundo. Composta por cerca de 20000 especialistas provenientes da indústria, comércio, governo, laboratórios de pesquisas e testes, Academia e grupos de clientes, a IEC prepara e publica normas internacionais de padronização nas áreas elétricas, eletrônicas e tecnologias relacionadas.

A colaboração entre as entidades ISO e IEC garante que os parâmetros de padronização se ajustem e complementem, a partir da união do conhecimento de profissionais das áreas relacionadas, dentro desse contexto foi criada a Norma ISO/IEC 17025.³

A ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) é uma entidade privada e sem fins lucrativos, membro fundador da ISO, da Comisión Panamericana de Normas Técnicas (Comissão Pan-Americana de Normas Técnicas - Copant) e da Asociación Mercosur de Normalización (Associação Mercosul de Normalização - AMN). Desde a sua fundação, é também membro da IEC, responsável pela elaboração das Normas Brasileiras (ABNT NBR).⁴

Para o reconhecimento formal (acreditação) dos laboratórios que adotam um sistema de gestão da qualidade aplicando a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, existem órgãos específicos que realizam auditorias para avaliação de todos seus requisitos. No Brasil, o órgão

responsável é a CGCRE/INMETRO (Coordenação geral de acreditação/ Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia).¹

A adoção de um sistema de gestão da qualidade e acreditação são voluntárias, no entanto, órgãos nacionais como o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), ANA (Agência Nacional de Águas), IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente), exigem a acreditação dos laboratórios que lhes prestam serviços. Esta exigência, juntamente com a forte concorrência do mercado, tem levado a um aumento dos laboratórios acreditados no Brasil, como pode ser visto na Figura 1 que mostra a evolução no número de acreditações de laboratórios de calibração (RBC – Rede Brasileira de laboratórios de acreditação) e de ensaios (RBLE – Rede Brasileira de Laboratórios e Ensaios).

Figura 1 - Gráfico demonstrativo do crescimento do número de laboratórios acreditados no Brasil por diferentes Sistemas de Gestão com base no cadastro do INMETRO

Fonte: Modificado de OLIVARES, 2016.

Esta realidade tem abrangência global. Diversos países apresentam suas próprias exigências quanto à obrigatoriedade na aplicação de sistemas de gestão da qualidade para laboratórios.

O reconhecimento formal da implantação de um sistema de gestão da qualidade para laboratórios como a ISO/IEC17025, se faz pela avaliação destes sistemas por entidades de acreditação presentes nos diferentes países. Visando um reconhecimento mútuo entre avaliações de diferentes países, entidades como o ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) promovem acordos de reconhecimento mútuo com seus membros plenos. Esses membros realizam a avaliação da conformidade dos laboratórios acreditados com as normas

internacionais. O crescimento de entidades de acreditação em diferentes países que são membros e associados ao ILAC e fazem a inspeção de laboratório de ensaio e calibração acreditados na ISO/IEC 17025 e laboratórios de análises clínicas acreditados na norma ISO 15189 e o número crescente de laboratórios acreditados nessas normas podem ser mostrados na Figura 2.

Figura 2 - Gráfico demonstrativo dos laboratórios acreditados considerando as entidades de acreditação de aproximadamente 112 países que são membros e associados ao ILAC

Fonte: Modificado de ILAC.

A ISO/IEC 17025 apresenta tanto requisitos de gestão relacionados ao funcionamento do sistema de gestão da qualidade e à administração do laboratório, quanto a requisitos técnicos, relacionados ao método, calibração dos equipamentos, pessoal e operações realizadas pelo laboratório. Entre os requisitos técnicos, podem ser destacados três que são considerados essenciais para a confiabilidade e rastreabilidade dos resultados (os quais também se relacionam entre si), conforme apresentado na Figura 3, pelo AQAC (Analytical Quality Assurance Cycle)⁷:

1. **Validação do método (item 5.4.5 da Norma ISO/IEC 17025):** avalia se um método é adequado ao uso a que se pretende.
2. **Estimativa da incerteza (item 5.4.6 da Norma ISO/IEC 17025):** avalia o nível de confiança de um resultado podendo utilizar os dados obtidos na etapa de validação.
3. **Controle de qualidade (item 5.9 da Norma ISO/IEC 17025):** avalia continuamente a validade dos resultados obtidos após as etapas de validação e estimativa de incerteza, realizando um monitoramento contínuo do método e fornecendo dados que podem ser incorporados aos de validação. Ao se analisar uma amostra com quantidade conhecida de analito (um Material de Referência, por exemplo), é possível avaliar a exatidão de uma medição

e, a longo prazo, a precisão intermediária que é um parâmetro da validação utilizado no cálculo de incerteza.

Figura 3 - Ciclo de garantia da qualidade

Fonte: OLIVARES e LOPES (2012). Utilização autorizada pela Elsevier (número da licença: 4104350454325).

Dentro do Controle de Qualidade, é importante que sejam tomadas medidas para se detectar tendências, aplicando-se técnicas estatísticas para se obter uma análise mais crítica dos valores obtidos. Há várias formas de realizar o controle de qualidade que podem ser divididos entre controle interlaboratorial e intralaboratorial. O controle interlaboratorial é baseado em ensaios de proficiência (EP), ou seja, o desempenho do laboratório é determinado por meio de comparação interlaboratorial. Os EPs devem ser realizados de forma periódica pelo laboratório, no entanto, no caso da avaliação rotineira do método, não é aplicável, uma vez que possuem alto custo e são demorados, levando os laboratórios a aplicarem os controles intralaboratoriais, tais quais amostras fortificadas, amostras brancas, material de referência e, ou material de referência certificado.

As amostras brancas apenas identificam possíveis contaminações do método não fornecendo informações quanto à precisão ou exatidão. As amostras fortificadas são preparadas no próprio laboratório e estão sujeitas ao erro do analista, além de muitas vezes não representar a amostra com contaminação natural devido à interação analito/matriz. Desta maneira, o ideal é a aplicação de materiais de referência e, ou materiais de referência certificado que se apresentam como ferramentas essenciais para o controle da qualidade, como indicado no item 5.9.1.a da norma ABNT NBT ISO/IEC 17025.⁸

1.2 O uso de Materiais de Referência e Materiais de Referência Certificados no controle de qualidade

De acordo com o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM), um Material de Referência (MR) é um “material, suficientemente homogêneo e estável em relação a propriedades específicas, preparado para se adequar a uma utilização pretendida numa medição ou num exame de propriedades qualitativas”.

Um MR pode ser usado para a calibração de um método, atribuição de valores de propriedades a outros materiais e controle de qualidade.⁹

Ainda de acordo com o VIM, pode-se definir Material de Referência Certificado como “material de referência acompanhado duma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos”.

Os procedimentos metrológicos válidos utilizados na certificação do MR são definidos pela ISO 17034:2016 e ISO Guia 35:2016. No caso de propriedades qualitativas, as incertezas associadas aos resultados podem ser dadas como probabilidades ou níveis de confiança.

Desde os anos 90, a confiabilidade e comparabilidade dos resultados das medições químicas tem sido preocupação dos Institutos Nacionais de Metrologia. Em 1993, foi criado no âmbito do Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), o Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria (CCQM), que é o fórum de referência nas discussões que envolvem a metrologia química no mundo.¹⁰

Para apoiar as empresas brasileiras frente ao mercado internacional cada vez mais competitivo e inovador, é importante que haja coordenação e cooperação em metrologia química para gerar resultados mais confiáveis e um melhor aproveitamento dos recursos e infraestrutura do país. Por esse motivo, em 2012 foi criada a Rede de Metrologia Química do Inmetro (REMEQ-I). Na portaria de criação desta rede, é destacado que os Materiais de Referência são as principais ferramentas para a área de metrologia química e que existe no Brasil uma demanda metrológica reprimida para o desenvolvimento e a produção destes materiais, exemplificada pelos resultados do “Estudo de Prospecção de Demanda Metrológica junto ao Setor Químico”, sendo assim um dos objetivos principais desta rede incentivar a produção de MR e MRC.

O último estudo de prospecção de demanda por MR e MRC em laboratórios de ensaios químicos realizado pelo INMETRO a que se tem acesso, realizado em 2012, tinha a pergunta objetiva: “Que material de referência, inédito ou não, sua instituição/laboratório gostaria que

fosse produzido no Brasil?”. Dentre os laboratórios participantes da pesquisa, 70% utilizavam algum tipo de Material de Referência, dentre eles, 82% eram certificados. Como resultados, este estudo apontou que a maioria dos MR/MRC utilizados era de origem importada (80%) e que a produção de MR/MRC nacional é uma grande necessidade do mercado, como é mostrado na Figura 4, onde há uma grande demanda de MR/MRC para alimentos, os quais também são de grande interesse ao MAPA, devido ao seu programa de monitoramento da qualidade de alimentos.¹¹

Figura 4 - Gráfico demonstrativo das categorias de MR de interesse de laboratórios nacionais

Fonte: Modificado de REMEQ-I - Workshop de Estruturação da REMEQ-I, 2013.

1.3 O impacto econômico do uísque

Entre os diferentes produtos monitorados pelo MAPA, o uísque merece destaque devido ao seu grande volume de importação e fraudes frequentemente identificadas neste produto.

Segundo a Instrução Normativa MAPA nº 15 de 31 de março de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o uísque (whisky ou whiskey) refere-se a uma vasta categoria de bebidas alcoólicas que são destilados simples de cereais envelhecidos com teor alcoólico entre 38% e 54%, parcial ou totalmente maltados, podendo ser adicionados de álcool etílico potável de origem agrícola ou de destilado alcoólico simples de cereais, bem como água para redução de graduação alcoólica e caramelo para correção de cor.¹²

O aumento de renda e do requinte dos brasileiros gerou um aumento na importação de uísque escocês. Observando-se a a Figura 5, é possível se acompanhar a evolução da importação de uísque oriundo das tradicionais destilarias do Reino Unido pelo Brasil no período de 2008 a 2014.¹³⁻¹⁸

Figura 5 - Gráfico da evolução da importação de Uísque do Reino Unido pelo Brasil em milhões de Libras por ano

Fonte: Scotch Whisky Association. Statistical Report 2009-2014.

A demanda por uísque escocês de mercados maduros e emergentes em todo o mundo cresceu fortemente nos últimos anos, a Scotch Whisky Association (SWA) em seu relatório anual de exportações mostrou que houve um rápido crescimento em toda a América do Sul e Central, registrando um crescimento expressivo desde 2010 da exportação de uísque escocês para o Brasil. De acordo com o último relatório de exportação emitido pela SWA do ano de 2014, o Brasil é o 5º maior importador de uísque escocês em volume e 13º em valor, tendo importado cerca de 80 milhões de libras (R\$ 379 milhões) em 2014, à frente de países como Canadá, Holanda e Japão.¹⁸

Além do grande volume importado, o Departamento de Qualidade em Alimentos e Bebidas do MAPA contabiliza 45 produtores e 12 fabricantes de uísque cadastrados espalhados pelo país.¹⁹

Dados estatísticos do ano de 2012 destacam que o agronegócio no Brasil responde por 33% do PIB, 42% das exportações totais e 37% dos empregos no país, e há uma previsão de expansão. Desta maneira, notoriamente sua economia está baseada no agronegócio exportador, assim só poderá se manter e expandir suas exportações (bebidas e alimentos) sendo competitivo e adequando o produto nacional às exigências do mercado internacional.²⁰

No mercado nacional, são crescentes os números de apreensões de bebidas falsificadas e adulteradas realizadas pela Polícia Federal e demais Órgãos. O uísque falsificado não possui

álcoois superiores, que contem cadeias carbônicas diferenciadas e garantem sabor e qualidade ao produto. O álcool de boa qualidade é resultado da decomposição de cereais, mas há falsificações que usam tipos de álcool impróprio para o consumo e que representam risco à saúde, podendo até, em casos extremos, causar danos irreversíveis ao organismo.

Entre as bebidas alcoólicas, o uísque é o principal alvo das falsificações devido ao alto custo do produto no mercado. O uísque falso normalmente tem álcool etílico, éter, iodo e corantes, podendo conter até analgésicos, dentre outros compostos de procedência, qualidade e pureza questionáveis e que são inapropriados para o consumo. Por isso, o MAPA realiza o monitoramento do uísque nacional, que avalia uma série de compostos, os quais, acima de certos limites, podem ser tóxicos para o homem.

A Tabela 1 apresenta os limites máximos estabelecidos de alguns analitos em uísque¹² e para a cachaça. A cachaça foi utilizada como referência uma vez que existe um MRC no INMETRO para esta matriz (embora, este não esteja disponível atualmente) e o método de análise desta matriz é similar ao do uísque.²¹

Tabela 1 - Comparação entre os valores de concentração dos MRC para cachaça e MRC para uísque em relação aos valores para os analitos definidos pelo MAPA

Analito	MRC Cachaça (INMETRO) Concentração (mg/100 g de cachaça)	Cachaça (limites estabelecidos pelo MAPA) Concentração máxima permitida (mg/100 mL de álcool anidro)	CQ Uísque (Fapas) Concentração (mg/100 mL de álcool anidro)	Uísque (limites estabelecidos pelo MAPA) Concentração máxima permitida (mg/100 mL de álcool anidro)
Álcool metílico	8,67	20	8,34	20
Acetato de etila	*NE	200	30,4	150
Aldeído acético	NE	30	4,97	20
2-butanol	3,92	360 (somatória)	NE	300 (somatória)
1-butanol	1,23		NE	
1-propanol	27,8		9,15	
2-metil-1-propanol	22,7		32,6	
2-metil-1-butanol	NE		(somatória)	
3-metil-1-butanol	NE		143	
Furfural	NE	5	NE	5

*NE – não especificado

Fonte: Monteiro et.al. (2013), FAPAS (Available quality control materials), Instrução Normativa n.15 de 31 de março de 2011.

Pode ser observado que além da cachaça ser uma matriz diferente, apesar de ser classificada como uma bebida destilada, os limites de concentrações dos analitos exigidos pela Instrução Normativa nº 15, que estabelece diretrizes para os valores máximos de alguns analitos referente aos padrões de identidade e qualidade em destilados e derivados, são diferentes dos do uísque. Além disso, o MRC da cachaça não apresenta todos os analitos exigidos para o uísque, ratificando o fato do MRC da cachaça não poder ser utilizado para controle da qualidade nas análises de uísque.

Utiliza-se também como comparativo, um Material para Controle de Qualidade produzido pelo FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme), no entanto este material, além de não ser um MRC e não possuir todos os analitos exigidos, os analitos presentes se encontram em concentração distantes aos limites nacionais estabelecidos, e somado a isso, destaca-se o elevado custo e as dificuldades encontradas nos tramites de importação que podem encarecer ainda mais o MRC.²²

Com base nas considerações supracitadas, destaca-se que o desenvolvimento do processo de produção de MRC é de grande interesse nacional, considerando a falta de produtores nacionais e especialistas neste tema, sendo o uísque um excelente candidato para que a criação de um MRC nacional para uísque seja adequado as necessidades do programa de monitoramento deste produto no Brasil e que seja obtido por um processo que seja célere e seguro.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a produção de um material de referência certificado para uísque com os analitos álcool metílico, acetato de etila, aldeído acético, 2-butanol, 1-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e furfural em concentrações o mais próximas possível das concentrações máximas permitidas pela legislação brasileira (no caso dos componentes dados como somatória, foi utilizada a média como referência), desenvolvendo assim um material mais abrangente, quando comparado ao já existente para cachaça, e necessário na avaliação de métodos de ensaio, seja para validação, estimativa da incerteza de resultados ou controle da qualidade, visando colaborar em um adequado monitoramento do uísque pelos laboratórios nacionais, o que leva a garantir um produto adequado para o consumo interno (produtos nacionais e importados) e competitivo nas exportações (produtos nacionais).

O MRC produzido poderá ser utilizado para o controle de qualidade interno, e, embora não seja produzido por um laboratório acreditado na ISO 17034:2016, que garante as competências gerais para a produção de MRCs, foi desenvolvido de acordo com os procedimentos exigidos (ISO Guia 35) e apresenta as incertezas relacionadas aos valores de propriedade calculadas e rastreabilidade demonstrada no certificado que deverá acompanhar o produto ao ser fornecido.

Com base neste objetivo principal ainda foram alcançados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Desenvolvimento de um método para produção de material de referência certificado para uísque, o qual poderá ser utilizado como referência na produção de outros MRCs (considerando a demanda reprimida de produção existente no país), inclusive para outros tipos de bebidas;

- ✓ Produção de cerca de 40 frascos de material de referência certificado para uísque dos quais alguns foram distribuídos para laboratórios de interesse (como por exemplo, para a unidade de análise de bebidas do Laboratório Nacional Agropecuário do MAPA) e alguns ainda se encontram disponíveis para serem distribuídos pela Rede de Metrologia Química (REMEQ-I) e demais laboratórios que realizam o controle interno de qualidade de uísque, visando colaborar nos processos de validação, cálculo de incerteza e controles de rotina, auxiliando assim estes laboratórios no estabelecimento da rastreabilidade metrológica dos resultados de medição;

3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Produção de um MRC

A produção de MRCs é realizada de acordo com Normas e Guias específicos que tem como objetivo fornecer as diretrizes para controlar todos os parâmetros que possam afetar a qualidade do material produzido, de forma que três deles podem ser destacadas ao fornecer as diretrizes para que o produtor estabeleça e mantenha instalações adequadas, utilize procedimentos adequados e emita um certificado com as informações necessárias para que o uso do material seja realizado. Tais Guias correspondem, respectivamente, a: ISO 17034:2016, ABNT ISO Guia 35:2012 e ABNT ISO Guia 31, respectivamente. ²³⁻²⁵

Os requisitos gerais que garantem a competência técnica e científica dos produtores de Materiais de Referência e Materiais de Referência certificados são definidos pelo ISO GUIA 17034, que tem como objetivo garantir a qualidade de todos os aspectos do MRC, exigindo que a sua produção seja realizada de acordo com os parâmetros de um Sistema de Gestão da Qualidade.

A ISO 17034 possui as diretrizes a serem seguidas para que as condições de transporte e armazenamento sejam adequadas de forma a evitar contaminações, assegura a segurança dos funcionários, a calibração dos equipamentos, que os métodos de ensaio utilizados sejam validados e que sejam estabelecidos procedimentos, orientados pela ISO Guia 35, para seleção, caracterização, avaliação da homogeneidade, avaliação da estabilidade e análise estatística, garantindo que toda a produção de um determinado MRC seja realizada da mesma forma e garantindo a confiabilidade dos valores das propriedades no certificado.

As etapas principais que compreendem o desenvolvimento e certificação de um MRC estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Etapas do processo de produção de um MRC

Fonte: Adaptado de ABNT ISO GUIA 34, 2012.

3.2 Definição do candidato a Material de Referência

Primeiramente, é necessário que se defina o MRC que será produzido, qual a sua finalidade, a necessidade do cliente, quais propriedades serão avaliadas, quais os valores alvo das propriedades, qual a faixa de aceitação das incertezas associadas aos valores certificados. Para isso, deve-se utilizar referências estabelecidas, como por exemplo, uma legislação.

Antes de iniciar a produção é necessário analisar fatores referentes à custo, transporte, finalidade, manuseio, embalagem e toxicidade, para que a produção seja viável.

Devido às necessidades do mercado e ao grande volume de adulterações, o candidato a MR escolhido foi o uísque e os analitos quantificado de acordo com a Instrução Normativa nº 15 do MAPA: álcool metílico, acetato de etila, aldeído acético, 2-butanol, 1- butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol e furfural, que serão fortificados a limites próximos aos considerados máximos pela legislação.

3.3 Amostragem

A segunda etapa para a produção de qualquer MRC consiste em se obter uma quantidade de material inicial suficiente levando-se em conta o número de amostras do material que serão produzidas, a necessidade dos estudos de homogeneidade, estabilidade e caracterização e a quantidade de material que será utilizada para as medições em cada um desses estudos. A quantidade de amostra está ligada à estabilidade do produto durante sua vida-útil, portanto podem ser planejadas etapas que tenham como objetivo aumentar o tempo de prateleira do MRC, como por exemplo, o uso de aditivos.

Para produção do candidato a MRC para uísque, foi utilizada uma mistura de amostras de diferentes tipos e marcas de uísques que são fornecidos pelo LANAGRO-SP (Laboratório Nacional Agropecuário). A mistura foi realizada de forma aleatória pelo LANAGRO e uma amostra de aproximadamente 200 ml dessa mistura nos foi enviada para que o preparo e estudos necessários fossem realizados.

3.4 Preparação do candidato a MRC

Podem ser realizadas uma ou mais técnicas de preparo de acordo com o material utilizado. No caso do candidato a MRC produzido, será utilizada a fortificação (spiking) do uísque para que os analitos se aproximem das concentrações desejadas.

A mistura (blend) contendo as diferentes amostras de uísque após fortificada foi dividida em vials contendo cerca de 1,5 ml cada e identificados em sequência. Os vials foram armazenados sob refrigeração para a realização dos estudos necessários para a certificação do material.

Há três etapas principais na produção de um candidato a MRC. Essas três etapas correspondem ao estudo de caracterização, estudo de homogeneidade e estudo de estabilidade. A Figura 7 ilustra essas três etapas e a importância dos seus resultados na estimativa de incerteza.

Figura 7 - Etapas principais na produção de um Material de Referência Certificado

Fonte: própria

De acordo com a definição de MR/MRC do VIM, portanto, para ser utilizado como MRC, o material precisa ter homogeneidade e estabilidade suficientes para que o valor de propriedade definido pela caracterização seja assegurado a um nível de confiança dado pela estimativa de incerteza.

3.5 Estudo de caracterização

O objetivo da caracterização é o de fornecer o valor de propriedade. Para a obtenção de valores de propriedade confiável, é necessário que se escolha cuidadosamente o método a ser utilizado.²³

É importante que o método escolhido para a caracterização seja metrologicamente rastreável e o valor de propriedade obtido seja combinado aos obtidos nos estudos de homogeneidade e estabilidade para se obter a estimativa do valor da propriedade e sua incerteza-padrão.

A definição do VIM para Rastreabilidade metrológica é “propriedade de um resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através de uma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição”.⁹

Alguns aspectos contribuem para estabelecer e, ou demonstrar a rastreabilidade metrológica dos resultados de medição, estes são²³:

- Pesagem da amostra;
- Pureza dos reagentes;
- Qualificação dos equipamentos e calibração das vidrarias;
- Identificação de interferências nos resultados de medição;
- Uso de técnicas estatísticas/matemáticas apropriadas e validadas;
- Identificação de contaminação, perdas ou falhas nos processos de medição

A caracterização de materiais de referência certificados pode ser realizada de quatro modos: um único método primário em um único laboratório; dois ou mais métodos de referência independentes em um ou mais laboratórios; um ou mais métodos com exatidão demonstrado, realizado por uma rede de laboratórios competentes (acreditados na norma ISO/IEC 17025); utilizando uma abordagem que forneça valores da propriedade e métodos-específicos definidos operacionalmente, utilizando uma rede de laboratórios competentes.

A escolha do modo em que o estudo de caracterização é conduzido depende da matriz e dos métodos disponíveis. Como se trata de um MRC em matriz (não sendo um MRC de substância pura, por exemplo, em que a matriz não apresenta nenhum tipo de interferência), a utilização de um único método poderia ocasionar a perda de efeitos de matriz e não identificação de interferentes, portanto, como recomendado pela ISO Guia 35²⁴ e, baseando no trabalho de Monteiro et al. (2013), será adotada a certificação usando duas técnicas independentes por um único laboratório.

Existe um método normalizado do MAPA para a análise de bebidas.²⁶ Baseando-se nesse método, as técnicas utilizadas serão a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GD-FID) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

O método, apesar de ser um método de referência, precisa ser avaliado nas condições do laboratório por meio de alguns parâmetros de validação como linearidade e precisão.

3.5.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é uma técnica física de separação em que os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fase fixa de grande área superficial (fase estacionária) e uma fase fluida (fase móvel).²⁷

Para a caracterização do candidato a MR, utilizou-se a cromatografia gás líquido, que tem como fase móvel um gás de arraste (inerte) cuja finalidade é apenas transportar a amostra a ser separada pela coluna e uma coluna de diâmetro capilar contendo uma fase estacionária líquida em forma de filme na superfície interna do tubo de sílica fundida. Conforme a amostra

passa pela coluna, devido à um fenômeno de partição, as moléculas de um analito se distribuem e se equilibram entre o gás de arraste e a fase líquida da coluna. As espécies mais solúveis na fase líquida permanecem menos tempo no gás de arraste, se deslocando mais lentamente na coluna.

Para a avaliação do cromatograma obtido, alguns parâmetros devem ser considerados, como o tempo de retenção (t_R) que é o tempo transcorrido entre o momento da injeção até o máximo do pico de determinado analito e é característico das condições cromatográficas, o fator de separação (α), que avalia a separação entre os picos em termo dos tempos de retenção e a resolução dos picos (R_s) que mede o quão bem os picos se encontram separados um do outro e se não se encontram sobrepostos.

O princípio de funcionamento do detector por ionização de chama baseia-se na combustão dos compostos em uma chama, sendo assim, um ótimo detector para compostos orgânicos, já que compostos inorgânicos e água não apresentam sinal mensurável. Além disso, trata-se de um detector robusto, seletivo e sensível para compostos orgânicos.

No detector de massas, cada pico eluido da coluna é bombardeado por uma fonte de elétrons que fragmenta o composto em vários íons os quais são separados em um analisador. Os íons são, então, direcionados para um sistema de detecção de íons. Este detector é altamente sensível e seletivo, porém seu custo é elevado e exige maior treinamento e grau de especialização.

A resposta do detector pode ser medida por intermédio da altura ou da área dos picos, sendo a área a mais utilizada, uma vez que permite a medição de picos alargados ou não simétricos de forma mais precisa.

A correlação entre a resposta do detector e a concentração de um composto de interesse é dada a partir de uma curva de calibração, que pode ser obtida utilizando diferentes métodos, dentre eles, o método do padrão interno foi o escolhido para esta aplicação por orientação do método normalizado do MAPA.²⁶

3.5.2 Método do padrão interno

O padrão interno é um composto, não necessariamente similar ao analito, mas com tempo de retenção próximo, boa resolução em relação a este e que não está presente na matriz naturalmente.

Este método envolve a adição de uma mesma concentração conhecida de um padrão interno a cada solução a ser analisada, tanto nas soluções para a construção da curva de calibração quanto amostras.

Tanto na calibração quanto na análise da amostra desconhecida, são utilizadas as razões entre as áreas do analito pelas áreas do padrão interno e as razões das concentrações. Dessa forma, é possível corrigir variações aleatórias e sistemáticas que possam ocorrer durante a corrida cromatográfica, uma vez que o analito e o padrão interno respondem proporcionalmente a flutuações instrumentais ou do método.²⁸

A adição do padrão interno tem como objetivo melhorar a repetibilidade do método, reduzindo as incertezas associadas à curva de calibração e a precisão na análise da amostra caracterizada. Além do padrão interno, outras estratégias foram utilizadas com o intuito de reduzir a incerteza associada ao valor de propriedade, como o preparo gravimétrico das soluções utilizadas na calibração dos equipamentos, a redução da amplitude da faixa de concentração da curva de calibração que deve abranger a concentração esperada do analito na amostra, uma vez que, devido à imprevisibilidade do comportamento do analito fora da faixa de concentração dada pela curva, os resultados devem ser obtidos por interpolação.

As condições cromatográficas devem ser otimizadas de forma que a separação seja eficiente, ou seja, que os picos apresentem boa resolução entre si, não sejam identificados interferentes (efeito de matriz), a linha de base não apresente ruído elevado e que não haja a contaminação da amostra por carryover (contaminação da amostra por resíduos remanescentes na coluna após a corrida cromatográfica anterior), tudo isso no menor tempo possível.²⁷

Além da conformidade do sistema cromatográfico, devem ser avaliados alguns parâmetros de validação como linearidade, precisão relacionada à repetibilidade das medições e recuperação que serão utilizados nos cálculos de estimativa de incerteza. Para a validação do método foi utilizado o Guia de Validação do MAPA.²⁹

3.5.3 Avaliação do método

Um dos parâmetros necessários para a avaliação do método normalizados nas condições do laboratório e da incerteza associada ao resultado obtido é a precisão.

A precisão determina o grau de concordância entre os resultados obtidos nas mesmas condições operacionais no menor intervalo de tempo possível e é calculada pelo coeficiente de variação dado por:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Em que s é o desvio-padrão, calculado pela expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Uma vez que o método utiliza a injeção direta do candidato a MRC no sistema cromatográfico, não são utilizadas etapas de preparo de amostra como extração ou clean-up (remoção de interferentes), portanto não há a necessidade da avaliação da recuperação do método.

Outro parâmetro importante na avaliação do método é a linearidade, porém antes da avaliação da linearidade da curva de calibração, é necessário que se inspecione os dados obtidos para a identificação de possíveis valores discrepantes (outliers).

Há vários testes estatísticos para a avaliação de “outliers”. Tanto a ISO quanto o Guia de Validação do MAPA recomendam o teste de Grubbs.

O teste de Grubbs compara o desvio do valor suspeito em relação à média de todas as medições realizadas, levando em consideração o desvio-padrão entre elas. O cálculo é realizado utilizando-se a equação (3) e com o auxílio de tabelas de valores críticos de G , avalia-se o valor suspeito.³⁰

$$G = \frac{|valor\ suspeito - \bar{x}|}{s} \quad (3)$$

O teste de Dixon (ou teste Q) é outro teste utilizado para a avaliação de “outliers”. O teste é utilizado para comparar o valor suspeito ao valor mais próximo, em relação à amplitude dos valores das amostras. A obtenção dos valores de Q que serão avaliados pelas tabelas de valor crítico é dada por:

$$Q = \frac{|valor\ suspeito - valor\ mais\ próximo|}{maior\ valor - menor\ valor} \quad (4)$$

Uma vez que cada um dos testes tem suas peculiaridades, foi utilizada a combinação dos dois testes para a avaliação dos “outliers” entre as replicatas de cada ponto da curva de calibração e entre as medições realizadas para caracterização da amostra, obedecendo a recomendação do guia utilizado de que pontos experimentais podem ser retirados até no máximo 22,2%.²⁹

Após removidos os possíveis “outliers”, avalia-se a linearidade da curva de calibração.

Uma vez que usualmente se assume que os erros se encontram no eixo Y, realiza-se a regressão linear de Y em X, a curva de calibração é dada como uma linha reta, cujo gráfico tem a forma algébrica³⁰:

$$y = ax + b + \varepsilon \quad (5)$$

Onde:

y é o sinal do detector;

x é a concentração;

b é o intercepto com o eixo y (coeficiente linear);

a é o coeficiente angular;

ε denota a componente relacionada ao erro aleatório (podendo conter também fatores sistemáticos).

Um dos métodos utilizados para estimar o quão bem os pontos obtidos experimentalmente se adequam ao modelo linear, por recomendação do Guia de Validação do MAPA, é o cálculo do coeficiente de correlação, r, dado pela equação:

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (6)$$

Onde $\bar{x}$ e $\bar{y}$ denotam a média das concentrações e a média da resposta do detector, respectivamente. O numerador dividido por n é chamado de covariância entre duas variáveis x e y, que mede a variação conjunta entre elas, assim, se x e y não se relacionam, sua covariância será igual a zero. O denominador é dado pelo produto dos desvios padrões de x e y.

Portanto, r é um valor entre -1 e 1. Se r = -1 há uma correlação perfeita negativa e se r = +1 tem-se uma correlação positiva perfeita e se não há correlação, r se aproxima de 0. Em química analítica, é desejável que o r seja maior de 0,99, além da inspeção visual da reta para que o r não seja mal interpretado.

Há outros testes estatísticos para assegurar a linearidade de uma curva de calibração, no entanto, como o MRC produzido é de interesse do MAPA que faz o controle de qualidade de uísque, foi utilizado o Guia de Validação que atende às especificações deste órgão. Além disso, o interesse do trabalho está na quantificação da contribuição da curva de calibração para a incerteza dos valores certificados, de forma que alterações em relação ao modelo linear serão consideradas nesta fonte de incerteza.

Outro fator importante é determinar a melhor linha reta entre os pontos de calibração cada um sujeito a erro experimental. Já que assumimos que os erros se encontram no eixo y, procuramos linhas que minimizem os desvios em y. Os resíduos em y, denotados por $\hat{y}_i$, entre

os pontos experimentais e a linha calculada são obtidos pela equação (7) e são os pontos na linha de regressão calculada que corresponde aos valores individuais de x.

$$\hat{y}_i = ax_i + b \quad (7)$$

Como os resíduos em y são positivos ou negativos, utiliza-se a soma dos quadrados dos resíduos cujos valores são todos positivos. O que justifica o uso do termo método dos quadrados mínimos para o processo.

Assim, a soma dos desvios quadrados pode ser expressa por:

$$SQ_{res} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - b - ax_i)^2 \quad (8)$$

O objetivo da regressão é de minimizar SQ_{res} . Portanto, faz-se a derivada parcial da equação (8) em relação a “b” e “a”, iguala-se as derivadas parciais a zero e resolve-se as equações obtidas, obtendo-se as equações (9) e (10), que correspondem, respectivamente, aos parâmetros de regressão: coeficiente angular (a) e coeficiente linear (b).

$$a = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (9)$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (10)$$

3.5.4 Estimativa da incerteza devido à curva de calibração

Outro parâmetro importante na avaliação do método utilizado é a estimativa da incerteza relacionada à curva de calibração, u_{cur} , componente importante na estimativa do cálculo de incerteza da etapa de caracterização do MRC, que é, na maioria das vezes, o maior contribuinte desta etapa.

A estimativa da incerteza devido à calibração avalia os pequenos desvios em relação à linha de regressão. Para isso, utiliza-se a raiz da soma dos desvios quadrados dada por (8), dividida por (n-2), que são os graus de liberdade que estão relacionados ao fato de que uma linha reta precisa de dois pontos para ser traçada, assim, obtém-se a fórmula para o cálculo de S, chamado erro-padrão ou desvio-padrão residual:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b - aX_i)^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{SQ_{res}}{n-2}} = \sqrt{MQ_{res}} \quad (11)$$

Onde,

MQ_{res} ou S^2 representa os quadrados médios residuais sobre a regressão linear ou a variância da regressão.

Para estimar o desvio-padrão residual em x (S_{xx}) utiliza-se:

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = (\sum_{i=1}^n x_i^2) - n\bar{x}^2 \quad (12)$$

A avaliação da incerteza da curva de calibração em relação à uma amostra desconhecida, portanto, se dá pela combinação destes parâmetros³¹:

$$u(C_0)_{cur} = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (13)$$

Em que:

p é o número de medições realizadas para determinação da concentração do analito em uma amostra desconhecida;

n é o número de medições realizadas para a construção da curva;

C₀ é o resultado da concentração da amostra analisada;

$\bar{C}$ é a média dos diferentes níveis de concentração da curva.

Portanto, é possível observar que para a obtenção de baixas incertezas associadas à calibração, além de uma boa resposta linear alguns outros fatores devem ser considerados, como a construção de curvas com pelo menos cinco replicatas em cada nível de concentração quando possível. A escolha da faixa de concentração deve ter realizada de forma que a concentração esperada da amostra se posicione o mais próximo possível do centro desta e o número de medições para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida deve ser, também, tanto maior quanto possível de acordo com os recursos disponíveis.

3.6 Estudo de Homogeneidade

Um dos componentes da incerteza no modelo de certificação é o resultado da avaliação da homogeneidade. No desenvolvimento de um candidato a material de referência, o estudo de homogeneidade é de extrema importância porque indica possíveis variações na homogeneidade do material, permite que se detecte impurezas, interferências ou irregularidades que podem ocorrer no processo de preparação.³²

O material é dito homogêneo, e pode ser representativo de um lote, quando não há diferença significativa entre o valor de propriedade obtido na análise de um certo número de frascos pertencentes ao lote, o que é realizado na prática, comparando-se a componente da incerteza referente ao ensaio de homogeneidade, u_{bb} em relação ao componente da incerteza relacionado, por exemplo, à caracterização. Dessa forma, é possível se demonstrar que um frasco do candidato a MRC é capaz de representar todo o lote.

Para amostras líquidas, onde se espera elevado grau de homogeneidade, Monteiro e colaboradores, estabelecem que uma heterogeneidade entre frascos de até 2% é aceitável.²¹ Porém, é necessário que se inclua o componente da estimativa da incerteza relacionado à homogeneidade entre frascos de um lote de MRC no valor de propriedade, mesmo no caso de soluções.

Um segundo tipo de heterogeneidade pode ser encontrado dentro de um mesmo frasco. A estimativa de incerteza associada a esse tipo de heterogeneidade deve ser levada em consideração, principalmente se o processo no qual o MRC será utilizado envolve etapas de sub amostragem, como por exemplo, utilizando-se um gás em um cilindro. No caso de amostras que envolvem misturas ou soluções, esse tipo de heterogeneidade pode ser praticamente eliminado agitando-se o frasco contendo a solução antes da sua utilização.

O número de amostras neste estudo deve ser determinado estatisticamente para que haja representatividade do lote como um todo e o método utilizado na análise das amostras para o estudo de homogeneidade deve ter repetitividade e seletividade muito boas. Um subconjunto do lote compreende, normalmente, de 10 a 30 frascos que podem ser selecionados por amostragem aleatória, amostragem aleatória estratificada ou amostragem sistemática.²⁴

O plano de amostragem aleatório estratificado é recomendado na maioria das situações, uma vez que garante que os frascos escolhidos para o estudo estejam igualmente distribuídos no lote.

As medições devem ser realizadas sob condições de repetitividade e o desvio-padrão de repetitividade ser pequeno. As medições também devem ser realizadas de modo que tendências nas medições possam ser distinguidas de tendências nos lotes, o que pode ser alcançado analisando-se as replicatas das amostras em ordem aleatória e invertida uma em relação à outra.

Um esquema genérico ideal para a realização de um ensaio de homogeneidade é apresentado na Figura 8. Assim, como as transformações foram feitas individualmente nas diferentes porções retiradas dos frascos, a variância chamada “entre grupos” inclui apenas a heterogeneidade entre frascos e a variância chamada “dentro dos grupos” inclui as incertezas da medição, transformação (no caso de amostras que necessitem de etapas de preparo de amostra) e sub amostragem, sendo a abordagem pela qual se obtém uma melhor estimativa da incerteza relacionada à heterogeneidade entre frascos. Quando não é possível se realizar a sub amostragem ou não é economicamente viável, a etapa de sub amostragem pode ser eliminada. Neste caso tanto a incerteza relacionada a heterogeneidade quanto relativos a possíveis efeitos

das transformações são incluídos na variância “entre grupos”, enquanto que a variância “dentro dos grupos” está relacionada à repetitividade da medição.

Figura 8 - Esquematisação do modelo ideal para a realização de um teste de homogeneidade entre frascos

Fonte: Adaptado de ABNT ISO GUIA 35, 2012.

A incerteza associada ao ensaio de homogeneidade é determinada, por orientação do ISO GUIA 35²⁴, por meio de uma análise de variância (ANOVA).

Na ANOVA de fator único, uma população, no caso um lote de frascos, tem uma característica comum chamada fator ou tratamento que é a concentração de cada analito na amostra e os valores diferentes são chamados de níveis ou grupos. Assim, a comparação entre os frascos que compõem o lote é realizada comparando-se a resposta obtida nas análises de cada item ou frasco de candidato a MRC. O fator é considerado variável independente e a resposta é a variável dependente.³³

Em um modelo básico para a realização de um teste de homogeneidade em que $i=1, 2, \dots$, frascos e $j=1, 2, \dots$, n medições:

$$Y_{ij} = \mu + A_j + \xi_{ij} \quad (14)$$

Onde,

Y_{ij} é o resultado de uma medição individual;

μ é o valor que a média geral assume quando o número de medidas repetidas tende ao infinito, considerada a média real na ausência de tendências, no caso do teste de homogeneidade, seria o valor médio de concentração se todos os frascos obtivessem exatamente o mesmo resultado;

A_j é o termo de erro relacionado à variabilidade dos resultados entre os frascos;

ξ_{ij} é o termo de erro aleatório relacionado à medição, ou seja, a variância de repetibilidade.

A_i e ξ_{ij} são variáveis mutualmente independentes e frequentemente assumidas como normalmente distribuídas com $\mu=0$ e variância σ^2 .

Os desvios entre os resultados de medição obtidos em uma análise de variância são expressos em termos de somas dos quadrados. A soma dos quadrados total é dada por:

$$SQ_{total} = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{\bar{Y}})^2 \quad (15)$$

Sendo

$$\bar{\bar{Y}} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{\alpha} n_i} \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij} \quad (16)$$

Em que:

$\bar{\bar{Y}}$ é a média das médias;

α é o número de grupos;

n_i é o número de membros no grupo.

Assim, a soma dos quadrados total pode ser dividida em duas partes:

$$SQ_{dentro} = \sum_{i=1}^{\alpha} \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2 \quad (17)$$

$$SQ_{entre} = \sum_{i=1}^{\alpha} n_i (\bar{Y}_i - \bar{\bar{Y}})^2 \quad (18)$$

Que correspondem à parte da soma dos quadrados total que é atribuída à variação dentro dos grupos e a parte da soma dos quadrados total que é atribuída à variação entre os grupos.

Cada uma dessas somas de quadrados tem números de graus de liberdade bem definidos. Dividindo cada soma dos quadrados pelo seu respectivo número de graus de liberdade, temos seus respectivos quadrados médios, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela ANOVA

Causa de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios
Entre grupos	SQ_{entre}	$\alpha - 1$	MQ_{entre}
Dentro dos grupos	SQ_{dentro}	$\sum_{i=1}^{\alpha} n_i - \alpha$	MQ_{dentro}
Total	SQ_{total}	$\sum_{i=1}^{\alpha} n_i - 1$	MQ_{total}

Fonte: Van der Veen e Pauwels (2000).

Expressando os quadrados médios em termos de variância:

$$MQ_{dentro} = s^2 \quad (19)$$

$$MQ_{entre} = s^2 + n_0 s_A^2 \quad (20)$$

Em que n_0 é igual a n , se não houverem dados faltantes.

Ou seja, MQ_{dentro} corresponde à uma estimativa da repetibilidade da medição, enquanto que MQ_{entre} corresponde à uma estimativa da variância da variabilidade natural de medição mais a variância entre os grupos.

Usando e rearranjando as expressões apresentadas em (19) e (20):

$$s_r = \sqrt{MQ_{dentro}} \quad (21)$$

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n_0}} \quad (22)$$

Desta forma, é possível determinar o desvio-padrão relacionado à repetibilidade, s_r , e entre frascos, s_{bb} , (between bottles), respectivamente. Se não houver um efeito entre grupos, espera-se que s_A^2 seja próximo de zero. Se o valor obtido for negativo próximo de zero, deve ser ajustado para zero.

Nestes casos, a variância entre os frascos s_{bb}^2 é idêntica à componente de incerteza devido à heterogeneidade do lote que será incluído no modelo para certificação, u_{bb}^2 , que inclui as etapas de caracterização, estudo de estabilidade e estudo de homogeneidade como fontes de incerteza para estimativa da incerteza final do MRC ²⁴.

No caso de métodos de medição que não sejam suficientemente repetitivos utiliza-se outra abordagem para estimar o efeito máximo ³⁴:

$$\frac{MQ_{entre} - MQ_{dentro}}{n} \leq u_{bb}^2 \leq s_{bb}^2 + \frac{s_r^2}{n_0} \quad (23)$$

A variância da repetibilidade pode ser estimada separadamente ou ser igualada a MQ_{dentro} .

O lado esquerdo da equação (23) representa o efeito “puro” devido à heterogeneidade entre os frascos conforme estimado pela análise de variância, enquanto que o lado direito representa o quadrado da incerteza-padrão associada ao resultado de um frasco.

Considerando-se que um intervalo de confiança pode ser desenvolvido para s_{bb} e, tomando-se a amplitude do intervalo de confiança de 95% convertida para incerteza-padrão, pode-se estimar o máximo de variabilidade entre frascos que pode ser mascarada pela variação do método por:

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MQ_{dentro}}{n}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{v_{MQ_{dentro}}}} \quad (24)$$

Em que $v_{MQ_{dentro}}$ corresponde aos graus de liberdade de MQ_{dentro} .

Assim, a menos que se tenha conhecimento adicional sobre a homogeneidade de um MRC ou a certificação seja organizada de modo que a influência da variabilidade entre as medições seja incluída em outros componentes da incerteza final do MRC, pode-se utilizar a equação (24) para estimar o impacto da variabilidade analítica em s_{bb} como obtido na análise de variância, que pode ser utilizado como limite inferior para u_{bb} .

Para a realização do estudo de homogeneidade, define-se estatisticamente um número de frascos contendo o candidato a MRC que são escolhidos aleatoriamente e analisados em triplicata por GC-FID utilizando-se o método do padrão interno para assegurar a repetibilidade do método.

3.7 Estudo de Estabilidade

Este estudo tem como objetivo comprovar a estabilidade do candidato a MRC após sua preparação, determinando seu grau de instabilidade para um ou mais valores de propriedade. A estabilidade é avaliada sob duas condições distintas: estabilidade a longo prazo (tempo de prateleira) e estabilidade a curto prazo (sob condições de transporte).³⁵

A estabilidade a longo prazo (long-term stability), u_{lts} , está relacionada à estabilidade do MRC sob condições específicas de armazenamento, que devem ser primeiramente determinadas, escolhendo-se uma temperatura a qual se supõe que o MRC seja estável. A estabilidade a curto prazo só é considerada como um componente da incerteza de uma propriedade quando o transporte do MRC sob condições específicas afeta mais o MRC que as condições de armazenamento.²⁴

No caso do candidato a MRC para uísque, a temperatura utilizada como referência (temperatura de armazenamento), devido ao histórico da amostra, foi a temperatura média de um freezer doméstico (aproximadamente -20°C).

É conveniente que o transporte do material seja realizado sempre o mais breve possível. Não há uma regra em relação ao tempo e número de pontos que o estudo de estabilidade a curto prazo deva seguir, entretanto, convém que sejam estudadas temperaturas que possam ocorrer durante o transporte para um período que seja pelo menos tão longo quanto o permitido para o transporte do MRC.

Esta avaliação pode ser realizada usando o modelo clássico ou isócrono. No modelo clássico o método utilizado deve possuir alta precisão intermediária, neste caso os recipientes

são deixados ao mesmo tempo nas mesmas condições e avaliados no transcorrer do tempo para cada faixa de temperatura. Já pelo método isócrono, as medições são realizadas em condições de repetitividade, ou seja, os recipientes permanecem nas temperaturas de referência estável por um período determinado e vão sendo retirados dessa temperatura e submetidas à temperatura de ensaio conforme o tempo determinado. As amostras são analisadas todas ao mesmo tempo na temperatura de ensaio, o que reduz a dispersão dos pontos no tempo, proporcionando uma incerteza relativa menor. Os pontos são dados pelo tempo que se passa desde que a amostra foi submetida à temperatura do ensaio até o momento da medição.

Para o estudo de estabilidade do candidato a MRC para uísque, será adotado o método isócrono, onde as amostras serão adicionadas de padrão interno e analisadas todas em um mesmo dia em triplicata por GC-FID.

Como os dados obtidos no estudo de estabilidade são obtidos em função do tempo, devem ser investigados primeiramente como tendências. Para isso, assume-se, baseado em observações empíricas, que se houverem mudanças nos valores das propriedades do MRC durante o estudo de estabilidade, espera-se que estas sejam pequenas, portanto, utiliza-se como primeira alternativa um modelo linear simples, em que a área do analito é proporcional à sua concentração pela equação (5).

3.7.1 *Análise de tendências*

A análise por regressão linear, é análoga à utilizada na caracterização do candidato a MRC só que a análise é realizada avaliando-se alterações nas concentrações dos analitos em relação ao tempo, assim, o modelo básico para a regressão linear é a forma análoga da equação (5):

$$y = b + ax + \varepsilon \quad (25)$$

Em que:

x indica o tempo;

y está relacionado à um valor de propriedade, no caso à concentração;

Se o material de referência for estável, espera-se que o coeficiente angular seja estatisticamente insignificante, podendo assumir o valor de zero.³⁵

A partir da análise de erro na equação (9), obtém-se expressões para calcular o desvio-padrão dos coeficientes de regressão.

A incerteza associada à inclinação, o erro-padrão do coeficiente angular ou o desvio-padrão estimado do coeficiente angular pode ser calculado por:

$$s_a = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

Em que S é o desvio-padrão residual dado por (11).

Portanto, utilizando-se o desvio-padrão de a dado por (26) e um fator t apropriado (número de graus de liberdade é igual a n-2), o coeficiente angular pode ser testado para significância:

$$|a| < t_{0,95,n-2} s_a \quad (27)$$

Se a condição estabelecida por (27) for atendida, o material não apresenta nenhuma tendência de degradação no tempo de estudo e pode ser utilizada como MRC.

Deve ser observado que o resultado obtido só será significativo se o desvio-padrão da repetitividade de medição juntamente com a homogeneidade entre frascos, for suficientemente pequeno.

No caso da ausência de tendências, a avaliação da incerteza relacionada à estabilidade pode ser realizada por meio da incerteza associada à linha de regressão obtida em relação ao tempo em que o estudo foi conduzido pela equação:

$$u_{lts} = s_a x \quad (28)$$

Onde x corresponde ao tempo em meses.

3.7.2 Determinação do tempo de prateleira em relação à estabilidade a longo prazo

Se a condição de estabilidade necessária para a certificação do candidato a MRC for atendida, assume-se que possíveis degradações a que o material seja submetido sejam pequenas, neste caso a degradação pode ser considerada uma função linear.³⁶

Portanto, baseando-se na ausência de uma tendência significativa nos dados de estabilidade, é possível se assumir que o valor de uma propriedade decresce a uma certa taxa em decorrer do tempo, portanto, a seguinte expressão é válida:

$$y(y_0, a, x) = y_0(1 + ax) \quad (29)$$

Onde:

y é o valor de propriedade;

y₀ é o valor inicial da propriedade;

a é a taxa de degradação relativa constante;
 x é o tempo.

Utilizando-se a equação (28), nota-se que a redução na incerteza associada à inclinação da reta, s_a , melhora os resultados do teste de estabilidade. Alguns fatores influenciam a redução do valor deste parâmetro, como a utilização do método isócrono e o aumento do número de medições distribuídas em um tempo maior de análise, no entanto, para que esta redução seja significativa um longo período de análise é necessário, o que é inviável economicamente.

Assim, utilizando-se da equação (29), é possível se estimar a incerteza do MRC por propagação das incertezas $u(y_0)$, $u(x)$ e $u(a)$ da variável dependente y em relação as variáveis independentes y_0 , x e a . Assim,

$$u^2(y) = \left(\frac{\partial y}{\partial y_0}\right)^2 u^2(y_0) + \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)^2 u^2(x) + \left(\frac{\partial y}{\partial a}\right)^2 u^2(a) \quad (30)$$

Onde:

$u(y)$ é a incerteza total para uma única unidade de MRC com taxa de degradação a após um tempo x ;

$u(y_0)$ é a incerteza do MRC no momento da certificação;

Enquanto que a derivada parcial de y em relação a y_0 é 1, ou seja, o primeiro termo da equação não tem influência sobre a estabilidade do MRC, a derivada parcial de y em relação a x é igual $y_0 a$, que corresponde à real degradação do material que não é levada em consideração pela mudança da concentração certificada e se o coeficiente linear não for considerado significativo, no caso da ausência de tendências, e ajustado para zero, esse termo também é zero.

O último produto da equação, obtido pela derivada parcial a respeito de a , $u(a)$, corresponde à incerteza na determinação da taxa de degradação é dado pela expressão linear $y_0 x$.

Uma vez, como será discutido posteriormente, para combinar a contribuição das incertezas dos estudos de estabilidade, caracterização e homogeneidade utiliza-se as incertezas-padrão relativas de cada estudo, portanto, divide-se a expressão obtida por y_0 .

Como $u(a)$ é o erro-padrão do coeficiente angular (s_a), tem-se que, na ausência de degradação significativa, a função linear (31), pode ser utilizada para expressar a incerteza devido à instabilidade a longo prazo para um dado tempo de prateleira, x .

$$u_{lts}(x) = x s_a \quad (31)$$

Essa proporcionalidade entre o aumento do tempo de prateleira e da incerteza da estabilidade a longo prazo pode ser observada também de forma intuitiva, uma vez que o senso comum indica que a confiança no valor da concentração do analito na amostra é reduzida conforme o tempo é transcorrido.

3.8 Estimativa do cálculo da Incerteza Expandida do MRC produzido

De acordo com o VIM, pode-se definir incerteza de medição como:

“Parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas”.

Ou seja, a incerteza da medição é a “dúvida” associada a um resultado.⁹

Em geral, o resultado de uma medição é apenas uma estimativa ou uma aproximação do valor verdadeiro do mensurando, portanto, para ser completo, o valor de uma medição deve ser acompanhado da sua incerteza. A incerteza de medição indica a qualidade dos resultados da medição, sem ela não se pode comparar resultados obtidos com os valores de referência especificados ou com um padrão.³⁷

Em 1993, foi publicado o Guia de Expressão da Incerteza de Medidas (GUM), que estabelece as regras gerais para a avaliação e expressão das incertezas em diversas áreas. O Guia EURACHEM/CITAC traz os conceitos do GUM aplicado à química analítica.

A incerteza de um resultado é composta por diversos componentes denominados fontes de incerteza que podem ser avaliadas separadamente e então combinadas. Tais fontes são provenientes do método de preparo de amostra, medição, efeito da matriz, amostragem, condições ambientais, equipamentos, valores de referência, entre outras.³¹

Os componentes da incerteza podem ser agrupados em duas categorias de acordo com o método utilizado para estimar seu valor:

- **Tipo A:** resultados determinados utilizando-se a análise estatística em uma série de observações repetidas no momento do ensaio e podem ser expressas pelo desvio padrão experimental da média dos resultados.
- **Tipo B:** resultados determinados por quaisquer outros meios, como, por exemplo, por conhecimentos de dados históricos do desempenho do método de medição, incertezas herdadas da calibração dos equipamentos e padrões, especificações dos equipamentos.

Quando expressas em relação ao desvio-padrão, um componente de incerteza é chamado de “incerteza-padrão”.

Para um resultado de uma medição y , a incerteza total denominada “incerteza-padrão combinada”, que é denotada por $u_c(y)$ e é obtida a partir da lei da propagação de erros, assim é calculada a raiz quadrada positiva da soma das variâncias das fontes de incerteza identificadas.

Na maioria das análises químicas, a incerteza expandida, U , é utilizada na determinação de um intervalo em que o mensurando está contido com uma determinada probabilidade (nível de confiança). Este nível de confiança, na maioria dos casos é de 95%. Para se obter U , multiplica-se a incerteza padrão combinada, $u_c(y)$ por um fator de expansão definido a partir do nível de confiança desejado dependendo do tipo de distribuição.

Resumidamente, os passos do método de expressão da incerteza descritos pelo Guia Eurachem estão mostrados na Figura 9:

Figura 9 – Etapas para avaliação da incerteza de uma medição

Fonte: Adaptado de EURACHEM/CITAC Guide CG 4, 2012.

Portanto, o primeiro passo para a estimativa da incerteza, é a definição de forma inequívoca de qual é o mensurando, ou seja, a grandeza que se pretende medir. No caso da certificação de um candidato a MRC, o valor de propriedade, ou seja, a concentração de cada analito a ser certificado presente no candidato a MRC corresponde ao mensurando.

Após a definição do mensurando, é necessário que sejam identificadas todas as fontes que contribuam na incerteza deste resultado. Para isso, é necessário que se avalie criticamente todos os passos que contribuam na incerteza do método de análise

Uma das formas de se fazer a identificação das fontes de incerteza que afetam um resultado, é por meio de um diagrama de Ishikawa, também conhecido como diagrama espinha de peixe ou diagrama de causa e efeito. O diagrama facilita a identificação das fontes e permite a visualização das relações entre elas.

Para a estimativa da incerteza final da concentração de cada analito de interesse, as fontes de incertezas de cada etapa de preparo precisam ser combinadas, portanto, as incertezas devem ser obtidas em sua forma padrão.

A incerteza padrão $u(x_i)$ é uma medida de dispersão que equivale a um desvio-padrão. As incertezas-padrão são dependentes do tipo de componente da incerteza (Tipo A ou Tipo B) e da distribuição de probabilidade a ela associada, assim é possível se estimar a incerteza padrão de cada grandeza de entrada do modelo matemático de medição já determinado.

Para se transformar um componente de incerteza em incerteza-padrão, deve-se dividir por um divisor adequado conforme a distribuição de probabilidade associada que depende do tipo de informação que se tem disponível a respeito da respectiva componente da incerteza.

Quando o componente de incerteza é avaliado experimentalmente por intermédio de várias medições, como por exemplo, a precisão da análise realizada na etapa de caracterização, u_{pr} , a incerteza padrão deve estar relacionada ao desvio-padrão da média, uma vez que quanto maior o número de medições, menor a incerteza em relação ao resultado obtido. Assim, utiliza-se:

$$u(x_i)_{pr} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (32)$$

Onde,

s é o desvio-padrão entre as medições;

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

No caso da caracterização, foram efetuadas múltiplas medições na avaliação do candidato a MRC produzido por ambas as técnicas para que este componente de incerteza fosse reduzido.

No caso de contribuições realizadas a partir de uma única análise, como a avaliação da incerteza da precisão de um método, por exemplo, a incerteza-padrão é dada pelo desvio-padrão observado.

No caso de equipamentos calibrados ou pesos-padrão em que a incerteza é do tipo B e é fornecido o fator de expansão, k . A incerteza-padrão é dada pela razão entre a incerteza expandida, U , e o fator k fornecido, assim

$$u(x_i) = \frac{U}{k} \quad (33)$$

No caso de situações em que se conhece apenas os valores máximos e mínimos de uma variação ($\pm\alpha$) sem intervalo de confiança definido e não se tem informações adicionais que eliminem a possibilidade de se obter valores extremos, a distribuição utilizada é a retangular e a incerteza-padrão é obtida pela da divisão por $\sqrt{3}$.

No caso em que se conhecem valores máximos e mínimos de variação ($\pm\alpha$) sem intervalo de confiança, mas valores extremos são improváveis (espera-se valores mais próximos à média), como no caso de vidrarias, a distribuição de probabilidade utilizada é triangular e obtida pelo do divisor $\sqrt{6}$.

Uma vez determinadas as incertezas padrão, a lei da propagação de incertezas estabelece que as incertezas-padrão relacionadas a cada variável do modelo matemático da medição devem ser propagadas para gerar uma incerteza combinada $u_c(y)$, esta que representa uma faixa de dispersão equivalente a um desvio-padrão avaliado ao redor do resultado da medição, e tem como modelo original:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u^2(x_i)} \quad (34)$$

Em que c_i é o coeficiente de sensibilidade avaliado a partir das derivadas parciais da função y em relação aos parâmetros das quais y depende, que mostra como y varia com a mudança de parâmetro.

Se as variáveis não forem independentes, a (34) passa a ser:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 (u(x_i))^2 + \sum_{i,k=1}^N c_i c_k u(x_i, x_k)} \quad (35)$$

Em que $i \neq k$, $u(x_i, x_k)$ é a covariação entre x_i e x_k e c_i e c_k são os coeficiente de sensibilidade. Essa covariação pode ser relacionada por um coeficiente de correlação r_{ik} que multiplica o produto das incertezas de x_i e x_k e é um valor entre -1 e 1.

Em outros casos, a utilização de duas regras para combinação de incertezas padrão podem simplificar o cálculo:

– **Regra 1:** em modelos que envolvam somente uma soma ou diferença de valores de forma que $y = (p + q + r + \dots)$, a incerteza padrão combinada é dada por

$$u_c(y) = \sqrt{(u(p))^2 + (u(q))^2 + \dots} \quad (36)$$

– **Regra 2:** em modelos que envolvam o quociente ou produto de forma que $y = (p \times q \times r \dots)$ ou $y = p/(q \times r \times \dots)$ a incerteza-padrão combinada é dada por:

$$u_c(y) = y \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (37)$$

Onde $(u(p)/p)$, $(u(q)/q)$ são expressas por incertezas padrão relativas.

O mais conveniente, no entanto, é se alterar o modelo original de forma com que se possa obter apenas expressões abrangidas pelas duas regras mostradas.

Nos casos em que as incertezas são expressas em unidades diferentes, é conveniente se utilizar as incertezas relativas para torna-las adimensionais antes de serem combinadas.

A incerteza expandida é necessária para gerar um intervalo que envolva uma grande fração da distribuição de valores que podem ser atribuídos ao mensurando.

Para se obter a incerteza expandida, U , deve-se multiplicar a incerteza combinada por um fator de abrangência, k . Em que k é definido para uma determinada probabilidade de abrangência. Em uma distribuição de probabilidade normal para Y , é comum se utilizar um $k = 2$, que corresponde a uma probabilidade de abrangência de 95,45%, porém esse valor depende de alguns fatores como a distribuição de probabilidade e graus de liberdade efetivos.

Em situações em que a distribuição de probabilidade não é a distribuição normal, recomenda-se 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 de liberdade efetivos.

Aplicando o Teorema do Limite Central, pode-se dizer que a distribuição de probabilidade de Y será aproximadamente normal ou s-Student para um determinado grau de liberdade v_{eff} que pode ser estimado por meio da fórmula de Welch-Satterthwaite no caso de variáveis não correlacionadas:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(c_i u(x_i))^4}{v_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (38)$$

No candidato a MRC produzido, em que as condições de transporte serão definidas de modo que não influenciem os valores certificados, a incerteza expandida para a concentração de cada analito certificado será calculada a partir da combinação das incertezas dos estudos de caracterização (u_{car}), estabilidade a longo prazo (u_{lts}) e homogeneidade entre frascos (u_{bb}), expandida a partir de um fator de abrangência adequado, k .

$$U = k \sqrt{u_{car}^2 + u_{lts}^2 + u_{bb}^2} \quad (39)$$

3.9 Elaboração do certificado

É fundamental que o certificado que acompanha um MRC contenha, de forma clara e concisa, todas as informações necessárias para o seu uso. Para atender essa necessidade, a Comissão da ISO para Materiais de Referência (ISO/REMCO) publicou em 1981 a primeira edição da ISO Guia 31: Materiais de referência - Conteúdo de certificados e rótulos, que tem como objetivo orientar o produtor do MRC na produção de um certificado que permita a utilização eficiente do MRC para o uso a que este é destinado.²⁵

Este Guia, apresenta categorias a serem consideradas de forma ampla para que todos os tipos de MRCs sejam incluídos. Essas categorias estão relacionadas ao produtor, ao material em si e seu uso pretendido, à rastreabilidade e prazo de validade do certificado e outros detalhes e informações cuja avaliação da relevância são de responsabilidade do produtor que deve visar a utilização correta do produto pelo usuário final. Essas informações podem ser divididas em seções como apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Apresentação esquemática dos componentes principais de um relatório de certificação

Fonte: ISO Guia 31, 2012.

A primeira seção corresponde à apresentação do material, onde são fornecidas informações sobre o produtor como contato, endereço, registros e creditações. Devem ser incluídas também informações sobre o material como seu código, lote, matriz e informações que possibilitem a identificação inequívoca do MRC, que deve concordar com as informações contidas nas etiquetas.

Na segunda seção apresenta-se detalhadamente o material, detalhes da matriz, seleção de métodos analíticos apropriados, substâncias que possam agir como interferentes, tamanho da amostra a ser analisada e outras informações que sejam pertinentes para que o usuário avalie a proposta de uso do material em relação às suas necessidades.

Nas instruções de uso devem ser informadas as condições ideais de armazenamento, utilização, se há a necessidade de se homogeneizar o conteúdo do frasco, informações sobre segurança, quantidade mínima de amostra a ser utilizada que se relacionada com o valor certificado e nível de homogeneidade do material.

Na próxima seção, são informados os valores de propriedades e as incertezas associadas a estes valores. Devem ser descritos os métodos utilizados na caracterização, avaliação da homogeneidade, estabilidade e incertezas associadas.

Valores de propriedades que não são certificadas por não atenderam aos critérios necessários para a certificação, mas que podem ser de utilidade ao usuário podem ser incluídas desde que sejam claramente distintas das propriedades certificadas.

É importante que um MRC tenha sua rastreabilidade comprovada, portanto devem ser declarados procedimentos de medição, evidências de sua validade e escala a que são rastreáveis.

A data de validade deve informar quando o certificado foi emitido pela primeira vez e eventuais revisões. Onde for demonstrada instabilidade ou houver indicações da necessidade de monitoramento periódico do MRC produzido, deve ser garantido que o usuário será notificado caso ocorram mudanças significativas que possam levar à necessidade de recertificação (e emissão de novo certificado) ou a impossibilidade de utilização do material.

O ANEXO A apresenta o certificado do MRC produzido a ser fornecido juntamente com o MRC. Além do certificado, é importante que os vials sejam identificados com etiquetas que informem o nome do material, lote, código e validade em que os valores de propriedade possam ser garantidos.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Padrões analíticos e amostras

Tanto as amostras de uísque (na forma de “blend”), quanto os padrões analíticos utilizados para a avaliação e preparo do candidato a MRC, foram cedidos pelo LANAGRO-SP,

que também realizou o preparo da solução 40% (v/v) etanol, juntamente com a medição da densidade e do grau alcoólico desta solução e do uísque bruto utilizando um densímetro calibrado, cujo certificado é apresentado no ANEXO B.

Para a análise dos analitos de interesse por GC-FID, foram definidos, baseado em seus tempos de retenção, dois padrões internos: acetonitrila para o acetaldeído, acetato de etila, 2-butanol e 1-propanol e o 1-pentanol para o 2-metil-1-propanol, n-butanol, 3-metil-1-butanol e furfural.

Apesar dos padrões analíticos utilizados disponíveis não serem fornecidos por produtor acreditado na norma ISO 17034, é assegurado pelo item 8.3.2 da NIT DICLA-030 (revisão 09) a possibilidade de utilização destes padrões, uma vez que apresentam informações relevantes em relação à incerteza, assegurando a rastreabilidade metrológica do material.³⁸

Para os analitos de interesse, os padrões analíticos utilizados, suas respectivas marcas e pureza foram:

- Acetaldeído da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- Acetato de etila da marca Sigma- Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- Metanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,9\%$;
- 1-propanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 1-butanol da marca Vetec com pureza $\geq 99,4\%$;
- 2-butanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 2-metil-1-propanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99,5\%$;
- 3-metil-1-butanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 98,5\%$;
- Furfural da marca Sigma-Aldrich com pureza de 99%;
- Acetonitrila da marca Merck com pureza $\geq 99,9\%$;
- 1-pentanol da marca Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99\%$;
- Etanol da marca Merck com pureza $\geq 99,9\%$;
- Água fornecida pelo ultra purificador modelo Master System MS2000 da marca GEHAKA utilizada no preparo da solução 40% etanol pelo Lanagro-SP. Embora os parâmetros da água purificada não sejam conhecidos, foram realizadas análises da solução 40% como branco para identificação de possíveis contaminações.

4.1.2 Instrumentação

Para o preparo do candidato a MRC e ensaio de caracterização por GC-FID foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama da marca Shimadzu, modelo GC-17A equipado com coluna capilar DB-WAX de 30 metros, com 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25µm da marca J&W Scientific;
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Plus com injetor automático da mesma marca modelo AOC-5000 equipado com coluna capilar DB-WAX de 30 metros, com 0,25mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25µm da marca J&W Scientific;
- Balança analítica modelo TE214S da marca Sartorius Mechatronics;
- Micropipeta com volume variável de 0,5 a 10µl da marca Eppendorf;
- Micropipeta com volume variável de 10 a 100 µl da marca Eppendorf;
- Micropipeta com volume variável de 100 a 1000 µl da marca Eppendorf;

4.1.3 Separação cromatográfica

Para a análise por GC-FID, a partir do método normalizado do MAPA para análise de bebidas destiladas²⁶, foram estudadas as condições cromatográficas que permitissem uma boa separação entre os componentes nas condições do laboratório.

Utilizando-se uma solução contendo todos os analitos e padrões internos a uma concentração de aproximadamente 25mg/ml em etanol, os parâmetros cromatográficos foram otimizados de forma que a separação obtida fosse realizada em um tempo curto, com boa resolução entre os picos, sem muito tempo morto entre eles e que após a eluição do último pico houvesse um período de tempo a alta temperatura para que fosse evitada a contaminação por carryover.

As condições cromatográficas para análise no GC-FID definidas foram:

- Rampa de aquecimento: inicialmente foi mantida uma temperatura de 35°C por 4 minutos, aumentando após esse período a uma taxa de 35°C/min até 200°C, temperatura que foi mantida por mais 5 minutos, totalizando uma corrida cromatográfica de 13,7 minutos;
- Temperatura do injetor: 200°C;
- Gás de arraste: nitrogênio a uma velocidade de 1,84µl/min;
- Volume de injeção: 1µl com razão de split 1:30.

Para a identificação dos analitos segundo seu tempo de retenção, foram injetadas soluções de cada analito com concentrações de aproximadamente 25mg/ml de etanol no método descrito.

Para identificar possíveis interferências (efeito de matriz) foram preparadas para cada analito, soluções na mesma concentração utilizando-se o uísque bruto como solvente. Foram avaliados os tempos de retenção e o formato dos picos em relação aos obtidos por meio da análise dos analitos na solução hidroalcoólica.

Foram identificados cada um dos analitos, analisando-os separadamente e determinando-se os tempos de retenção de cada componente. A separação cromatográfica obtida e os picos identificados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Separação cromatográfica obtida após otimização

Fonte: própria

Os tempos de retenção dos analitos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Tempo de retenção dos analitos de interesse e padrões internos analisados por GC-FID

Analito	t_R (min)
Acetaldeído	1,5
Acetato de etila	2,5
Metanol	2,7
Acetonitrila	4,3
2-butanol	4,9
1-propanol	5,1
2-metil-1-propanol	5,8
1-butanol	6,4
3-metil-1-butanol	6,9
1-pentanol	7,1
Furfural	8,4

4.1.4 Construção das curvas de calibração

Considerando-se os valores de referência presentes na Tabela 1, foram preparadas cinco soluções para a construção da curva de calibração, de forma que os valores desejados para cada analito estivessem dentro da faixa linear de trabalho.

Com o intuito de diminuir a incerteza associada à preparação das soluções, todas as soluções foram preparadas gravimetricamente em solução 40% (v/v) etanol para simular a matriz uísque que sempre teve uma porção adicionada primeiro aos balões para evitar perdas por evaporação.

Preparou-se duas soluções estoque: uma solução A contendo todos os analitos de interesse e uma solução B contendo os dois padrões internos. A cada adição a balança foi tarada e a massa da adição registrada.

A partir das massas registradas, utilizou-se as densidades de cada padrão analítico adicionado e da solução 40% (v/v) etanol para a determinação do volume adicionado e realizou-se cálculo das concentrações dos padrões na solução estoque em g/ml de solução.

O preparo da solução B, contendo os dois padrões internos, foi realizado de forma análoga a partir da mesma solução hidroalcoólica. A Figura 12 esquematiza o preparo das soluções estoque.

Figura 12 - Preparo das soluções estoque A e B

Fonte: própria.

Utilizando-se as soluções A, B e 40% (v/v) etanol, foram preparadas, também gravimetricamente, cinco soluções de concentrações diferentes.

Para reduzir os erros no eixo correspondente às concentrações, uma vez que a balança oferece uma incerteza menor em relação aos instrumentos volumétricos, estimou-se a densidade das soluções A e B utilizando-se 30 pesagens consecutivas de 0,1 ml de cada uma das soluções. Avaliou-se a existência de dados discrepantes e utilizando-se o valor médio dos resultados de massa, estimou-se a densidade das duas soluções. As densidades foram utilizadas para determinar de forma mais exata a quantidade destas soluções que foram adicionadas às soluções utilizadas na construção das curvas de calibração. Essa estratégia foi utilizada para reduzir a

incerteza relacionada ao eixo x, que já é muito menor em relação ao eixo y (resposta instrumental) para os métodos instrumentais de análise.^{30, 31}

A partir das massas e densidades das soluções estoque e utilizando-se o teor de etanol da solução 40%(v/v) etanol fornecido pelo Lanagro-SP, foram calculadas as concentrações das soluções em mg/100 ml de etanol anidro que corresponde a unidade fornecida pela legislação. A Figura 13 apresenta um esquema do processo de preparo.

Figura 13 - Preparo das soluções para a construção da curva de calibração

Fonte: própria.

A faixa de concentração utilizada foi, aproximadamente, de 10-125 mg/100 ml de etanol para o metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol e 2-butanol; 20-260 mg/100ml de etanol para o acetato de etila; 8-105 mg/100 ml de etanol para o acetaldeído; 3-40 mg/100ml de etanol para o furfural.

4.1.5 Avaliação do método

Cada uma das soluções foi analisada em quintuplicata por GC-FID, sendo a mesma amostra para cada concentração injetada cinco vezes no sistema cromatográfico. A razão entre os tempos de retenção dos analitos e o padrão interno respectivo foram avaliadas para colaborar na identificação de interferentes e desvios.

A área obtida de cada analito para cada medição foi dividida pela área obtida para o padrão interno na mesma medição. As concentrações de cada solução também foram divididas pelas concentrações do padrão interno correspondente para cada analito.

Os valores de área obtidos para cada replicata foram avaliados utilizando o teste de Grubbs para identificação de possíveis valores discrepantes. Os valores que foram identificados como “outliers” pelo teste de Grubbs foram submetidos ao teste de Dixon para confirmação da sua situação como valor discrepante. Os valores que foram identificados como valores aberrantes pelos dois testes foram eliminados.

Depois, para cada analito de interesse, aplicou-se o método da regressão linear utilizando como valores do eixo y, as razões entre as áreas obtidas para os analitos em casa ponto da curva de calibração e as áreas obtidas para o padrão interno e como valores do eixo x, as razões das concentrações destes compostos.

Por indicação do guia de validação utilizado²⁹, calculou-se o coeficiente de correlação de cada curva para se estimar o quão bem os pontos obtidos experimentalmente se adequam ao modelo linear. A Tabela 4 apresenta os coeficientes de correlação obtidos.

Tabela 4 - Coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração por GC-FID

Analito	Coeficiente de correlação (r)
Acetaldeído	0,99785
Acetato de etila	0,99883
Metanol	0,99939
2-butanol	0,99908
1-propanol	0,99929
2-metil-1-propanol	0,99949
1-butanol	0,99966
3-metil-1-butanol	0,99962
Furfural	0,99950

Todas as curvas obtidas tiveram r maior que 0,99, e, portanto, foram aprovadas.

Uma vez que a incerteza associada à curva de calibração inclui outros parâmetros da regressão apenas o coeficiente de correlação é o suficiente para a aceitação da curva nesta etapa.

4.2 Preparo do candidato a MRC

4.2.1 Caracterização de background

Como o objetivo almejado é a obtenção de um material que tenha os analitos especificados o mais próximo possível do valor da legislação, é necessário que o uísque seja avaliado primeiramente na forma bruta. A caracterização de background serve, portanto, como um guia para a fortificação do material.

Para a caracterização de background, retirou-se uma alíquota de cerca de 5 ml de uísque bruto, que foi pesada dentro de um balão volumétrico e adicionou-se a solução contendo os padrões (solução B) a uma concentração próxima da utilizada na curva.

A partir das massas de uísque e de solução B e utilizando-se os dados densidade e alcoometria do uísque, obteve-se as concentrações dos padrões adicionados de forma análoga à utilizada no preparo das soluções da curva.

A amostra de uísque com os padrões internos foi analisada no GC-FID por injeção direta em quintuplicata. Para melhorar a identificação dos os 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. A Figura 14 é referente à análise do uísque bruto.

Figura 14 - Cromatograma representativo referente à análise do uísque bruto em GC-FID

Fonte: própria

Para a determinação da concentração cada um desses analitos presentes na amostra de uísque, utiliza-se em cada uma das curvas de calibração a relação modificada de (5):

$$C_0 = \frac{\left(\frac{A_A}{A_{PI}} - b\right)}{a} \times C_{PI} \quad (40)$$

Em que:

C_0 é a concentração a ser determinada;

b é o intercepto com o eixo y (coeficiente linear);

a é o coeficiente angular;

A relação A_A/A_{PI} corresponde à média das áreas obtidas para o analito de interesse divididas pelas áreas do padrão interno nas replicatas;

C_{PI} é a concentração do padrão interno na amostra.

As concentrações dos analitos encontradas no uísque bruto e a comparação com os valores desejados de acordo com o objetivo propostos estão na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da caracterização de background

Analito	Uísque bruto (mg/100 ml de etanol anidro)	Concentração alvo (mg/100ml de etanol anidro)
Acetaldeído	9,3	20
Acetato de etila	7,1	150
Metanol	4,7	20
2-butanol	0	~ 60
1-propanol	58,5	~ 60
2-metil-1-propanol	68,2	~ 60
1-butanol	0	~ 60
3-metil-1-butanol	105,2	~ 60
Furfural	0,2	5

Esse resultado corrobora com as informações da literatura que destaca os analitos 1-propanol, 2-metil-1-propanol 3-metil-1-butanol como álcoois superiores principais. Além disso, salienta-se que a concentração elevada de 3-metil-1-butanol se deve ao fato de que este álcool superior é dominante em bebidas destiladas como o uísque devido ao processo de fermentação alcoólica.³⁹

4.2.2 Fortificação

Utilizando-se o resultado da caracterização de background como guia, foi realizada a fortificação do candidato a MRC com os analitos que não estavam presentes ou que estavam em quantidade menor que a concentração-alvo (baseada na legislação). Calculou-se utilizando-se a massa de uísque presente em um balão de 100 ml, da porcentagem de etanol presente do uísque e da densidade dos padrões, o volume a ser adicionado de cada um deles.

A Figura 15 demonstra em detalhes o procedimento utilizado para a fortificação do uísque que, após este processo, foi distribuído em vials identificados contendo 1,5ml cada e submetido aos ensaios de caracterização, homogeneidade e estabilidade.

Figura 15 - Esquemática do procedimento de fortificação do uísque bruto

Fonte: própria.

4.3 Ensaio de caracterização

4.3.1 GC-FID

Como a caracterização por GC-FID foi realizada no dia seguinte à calibração do equipamento e caracterização de background, foram utilizadas as mesmas curvas.

Uma amostra do MRC produzido, foi pesada e fortificada com a solução contendo os padrões internos de forma análoga à utilizada no preparo da amostra utilizada na caracterização

de background e foi avaliada em setuplicata. A Figura 16 apresenta um cromatograma representativo referente à análise.

Figura 16 - Cromatograma representativo referente ao ensaio de caracterização por GC-FID

Fonte: própria

Foram calculadas as concentrações de cada uma das sete replicatas e os resultados foram avaliados para a existência de “outliers” de forma análoga à utilizada na construção da curva de calibração. Após essa consideração, foram utilizadas as médias das replicatas para a designação dos valores de propriedade segundo essa técnica.

Os valores de concentração obtidos estão disponíveis na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de propriedade obtidos na caracterização por GC-FID

Analito	Concentração (mg/100 ml de etanol anidro)
Acetaldeído	18,8
Acetato de etila	168,2
Metanol	21,4
2-butanol	63,2
1-propanol	76,0
2-metil-1-propanol	71,3
1-butanol	66,5
3-metil-1-butanol	105,3
Furfural	5,9

4.3.1.1 Estimativa das incertezas relacionadas à caracterização por GC-FID

Para a avaliação das incertezas relacionadas à caracterização por GC-FID, construiu-se o diagrama de Ishikawa mostrado na Figura 17 para a identificação das fontes de incerteza desta etapa.

Figura 17 - Diagrama de Ishikawa utilizado para a identificação das principais fontes de incerteza relacionadas à caracterização do candidato a MRC por GC-FID

Fonte: própria.

É possível observar que no diagrama as três fontes principais de incerteza relacionadas ao ensaio de caracterização por GC-FID para cada analito são a incerteza associada à curva de calibração (u_{cur}), à precisão das sete replicatas utilizada para a determinação da concentração do analito na amostra (u_{pr}) e à concentração do padrão interno adicionado na amostra (u_{cpi}). Esse resultado se relaciona com a expressão (40) utilizada para a determinação de C_0 .

Para estimar a incerteza relacionada à concentração do padrão interno há a etapa de preparo da solução contendo o padrão interno (solução B) e a adição dessa solução à amostra caracterizada.

Dessa forma, cada um dos componentes foi avaliado separadamente e depois combinado em uma incerteza-padrão combinada da caracterização por GC-FID (u_{c_FID}).

Uma vez que a preparação da solução B contendo o padrão interno foi realizada gravimetricamente e não volumetricamente, a incerteza da preparação está relacionada às pesagens realizadas e à pureza dos padrões utilizados.

Para a pureza, utilizou-se as informações contidas nos certificados para estimar a incerteza máxima associada à pureza dos padrões internos. Como não há informações adicionais sobre a possibilidade de obtenção de valores extremos, utiliza-se uma distribuição retangular, assim, a componente da incerteza relacionada a pureza (u_{pur}) foi calculada por:

$$u_{pur} = \frac{\text{Pureza (\%)}}{\sqrt{3}} \quad (41)$$

Para o cálculo da incerteza relacionado às pesagens realizadas no preparo da solução estoque contendo os padrões internos e posterior adição à amostra analisada, visando a constante preocupação com a redução da incerteza final do produto, foi realizada a verificação da balança e determinação do desvio-padrão, s , relacionado à repetitividade da medição no ponto central do prato da balança.

A verificação da balança foi realizada em três pontos: 10 mg, 100 mg e 10 g e o formulário de verificação se encontra anexado ao trabalho como ANEXO C.

Como as pesagens foram realizadas sempre por diferença, o desvio-padrão utilizado foi o de 10 gramas, mais próximo em ordem de grandeza das massas pesadas. Além disso, como a balança foi tarada à cada adição o desvio-padrão foi considerado duas vezes: uma correspondendo à tara e uma à pesagem da massa em si e a combinação das duas contribuições foi realizada utilizando-se uma distribuição retangular.

Assim, a componente da incerteza relacionada à pesagem, u_m , é calculada por:

$$u_m = \frac{\sqrt{u_{tara}^2 + u_{bruta}^2}}{\sqrt{3}} = \frac{\sqrt{u_s^2 + u_s^2}}{\sqrt{3}} \quad (42)$$

A partir das incertezas-padrão obtidas, utiliza-se as incertezas padrão relativas dos resultados, dividindo-se a incerteza de cada pesagem pela massa pesada e a incerteza associada à pureza dos padrões pelas suas respectivas purezas.

A partir dos valores adimensionais é possível obter a incerteza padrão relacionada ao preparo da solução B, combinando a incerteza-padrão relativa da pesagem do padrão interno ($u_{m_rel_cpi}$), da pesagem da solução ($u_{m_rel_sol}$) e da pureza do padrão interno (u_{pur_rel}).

$$u_{solB} = \sqrt{u_{m_rel_cpi}^2 + u_{m_rel_sol}^2 + u_{pur_rel}^2} \quad (43)$$

O mesmo procedimento foi utilizado para a estimativa da incerteza relacionada ao preparo da amostra que foi analisada para caracterização do candidato a MRC, assim, de forma análoga, calculou-se as incertezas relacionadas à pesagem do uísque fortificado e da solução B a ele adicionada e combinou-se, as contribuições relacionadas as pesagens e ao preparo da solução B como mostrado acima, obtendo-se a incerteza-padrão relacionada à concentração do padrão interno na amostra de candidato a MRC que foi caracterizada, u_{cpi} .

Para a avaliação da precisão da análise, utilizou-se a expressão (32), uma vez que foram realizadas 7 medições para a obtenção de C_0 .

Utilizando-se a equação (13), calculou-se a incerteza associada à curva de calibração.

As componentes da incerteza relacionadas à precisão e à curva foram então transformadas em incertezas-padrão relativas pela divisão dos seus respectivos mensurandos e as três componentes da incerteza relacionadas ao estudo de caracterização foram combinadas para a obtenção da incerteza padrão combinada, u_{c_FID} , por

$$u_{c_FID} = \sqrt{u_{cpi_rel}^2 + u_{cur_rel}^2 + u_{pr_rel}^2} \quad (44)$$

A Tabela 7 apresenta os valores das fontes de incerteza relacionados à caracterização por GC-FID e as incertezas combinadas desta etapa para cada analito estudado.

Tabela 7 - Incertezas-padrão relativas associadas à caracterização por GC-FID e incertezas combinadas

Analito	u_{cpi_rel}	u_{pr_rel}	u_{cur_rel}	u_{c_FID}
Acetaldeído	0,0009	0,0050	0,0597	0,0599
Acetato de etila	0,0009	0,0058	0,0114	0,0128
Metanol	0,0009	0,0033	0,0339	0,0341
2-butanol	0,0009	0,0015	0,0118	0,0119
1-propanol	0,0009	0,0014	0,0092	0,0094
2-metil-1-propanol	0,0036	0,0008	0,0089	0,0096
1-butanol	0,0036	0,0005	0,0072	0,0081
3-metil-1-butanol	0,0036	0,0005	0,0059	0,0070
Furfural	0,0036	0,0111	0,0350	0,0369

Na Figura 18, é apresentado um gráfico comparativo que mostra a contribuição de cada fonte de incerteza para a incerteza combinada.

Figura 18 - Gráfico comparativo entre as fontes de incerteza que compõem a incerteza combinada da etapa de caracterização por GC-FID

Fonte: própria.

No gráfico, é possível observar que a incerteza combinada para a maioria dos analitos ficou em torno de 1%, sendo que os maiores valores foram encontrados para o acetaldeído e metanol, que possuem alta volatilidade (mais pronunciada no caso do acetaldeído) a uma concentração relativamente baixa em relação aos outros compostos, e para o furfural, a baixa concentração deste analito leva a uma incerteza maior, uma vez que os cálculos são baseados em incerteza-padrão relativa. Nota-se que para todos os analitos, a curva de calibração foi a maior contribuinte na incerteza combinada da caracterização pela técnica.

4.3.2 Caracterização por GC-MS

A caracterização por GC-MS foi realizada no laboratório da Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende sob supervisão da química responsável Maria Diva Landgraf.

Como orientado pelo Método Normatizado utilizado, as soluções para a construção das curvas foram preparadas novamente, já que a caracterização por GC-MS foi realizada mais de um mês após a caracterização por GC-FID.

As soluções foram preparadas de forma análoga às soluções utilizadas nas etapas anteriores.

A faixa de concentração utilizada foi de aproximadamente, 10-125 mg/100 ml de etanol para o metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol e 2-butanol; 20-240 mg/100ml de etanol para o acetato de etila; 10-105 mg/100 ml de etanol para o acetaldeído; 3-33 mg/100ml de etanol para o furfural.

Dividiu-se a concentração de cada analito pela concentração do padrão interno correspondente.

As condições cromatográficas referentes à volume de injeção, razão de split e rampa de aquecimento foram mantidas.

Optou-se pela utilização do modo SIM (Selected Íon Monitoring), sendo que foi evitada a região do pico do etanol, uma vez que sua alta concentração ocasionou a saturação do detector. Por esse motivo, foi utilizado somente o 1-pentanol como padrão analítico, já que o pico da acetonitrila se aproxima desta região. Os íons selecionados para o monitoramento⁴⁰, juntamente com os tempos de retenção de cada analito estão presentes na Tabela 8.

Tabela 8 - Íons monitorados para a caracterização por GC-MS e tempos de retenção médios avaliados

Analito	Íons monitorados (m/z)	tr (min)
Acetaldeído	29, 44, 15	1,4
Acetato de etila	43, 88, 70	2,2
Metanol	31, 32	2,4
2-butanol	45, 59, 74	4,6
1-propanol	31, 59, 60	4,8
2-metil-1-propanol	31, 43, 74	5,5
1-butanol	43, 56, 74	6,0
3-metil-1-butanol	42, 43, 55	6,4
1-pentanol	41, 42, 55	6,7
Furfural	39, 95, 96	7,7

Cada uma das soluções foi analisada em quadruplicata por GC-MS por injeção automática. A razão entre os tempos de retenção dos analitos e o padrão interno respectivo foram avaliadas para colaborar na identificação de interferentes e desvios.

Foram realizados os mesmos testes estatísticos para identificação de valores aberrantes e avaliação da linearidade da curva de calibração. Os coeficientes de correlação estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9 - Coeficientes de correlação referentes às curvas de calibração utilizadas para a caracterização por GC-MS

Analito	Coeficiente de correlação (r)
Acetaldeído	0,25992
Acetato de etila	0,70326
1-propanol	0,99256
2-metil-1-propanol	0,99635
1-butanol	0,99766
3-metil-1-butanol	0,99776
Furfural	0,99698

Pode-se notar que os analitos acetato de etila e acetaldeído não possuem linearidade o suficiente para que as curvas obtidas pudessem ser utilizadas.

Foi observada uma grande variabilidade entre as medições realizadas para a construção da curva de calibração para estes compostos, provavelmente, devido à sua alta volatilidade. Ensaio realizado previamente utilizando a técnica e os resultados do ensaio de homogeneidade realizado por GC-FID também demonstraram grande variabilidade analítica. Baseado nestes fatos e no trabalho utilizado como referência²¹, foi decidido que estes analitos não seriam certificados.

O 2-butanol e o metanol foram avaliados pela construção de outras duas curvas de calibração contendo somente estes compostos sem a utilização de padrão interno, uma vez que nas curvas contendo os demais componentes, os picos obtidos para estes compostos não tiveram

boa resolução em relação aos demais compostos, impedindo a quantificação destes componentes.

Para o metanol, foram utilizadas diferentes estratégias como a construção de curvas mais diluídas, mudança nos íons monitorados, monitoramento de apenas um íon ou mais de um, mudanças nas condições cromatográficas, mas as respostas obtidas nas condições disponíveis não foram satisfatórias. Dessa forma, o analito não pode ser certificado, porém, o valor de concentração obtido pela caracterização por GC-FID será adicionado ao certificado como valor informativo (não-certificado).

No caso do butanol, foi construída uma nova curva de calibração com faixa de 4 – 80 mg/100 ml de etanol e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,99155.

Para a caracterização dos analitos que obtiveram um coeficiente de correlação aprovado pelo guia de validação utilizado, com exceção do 2-butanol, uma amostra contendo o padrão interno foi analisada em sextuplicata e adotou-se o mesmo procedimento utilizado para a caracterização por background e por GC-FID para a determinação das concentrações.

Para a avaliação do 2-butanol a mesma amostra foi analisada em quintuplicata.

A Figura 19 mostra o cromatograma representativo referente à separação, onde são identificados os picos que foram efetivamente caracterizados.

Figura 19 - Cromatograma representativo referente à separação do candidato a MRC por GC-MS

Fonte: própria.

Foram calculadas as concentrações de cada uma das replicatas e os resultados foram avaliados para a existência de “outliers” e o valor de concentração fornecido pela caracterização por GC-MS foi dado como uma média das replicatas.

Os valores obtidos estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações obtidas no estudo de caracterização por GC-MS

Analito	Concentração (mg/100ml de etanol anidro)
2-butanol	52,9
1-propanol	83,0
2-metil-1-propanol	80,8
1-butanol	69,6
3-metil-1-butanol	103,1
Furfural	7,6

4.3.2.1 Estimativa das incertezas das medições relacionadas a caracterização por GC-MS

Para a avaliação das incertezas relacionadas à caracterização por GC-MS, avaliou-se as fontes de incertezas relacionadas a partir da construção de um diagrama de Ishikawa. O diagrama construído possui as mesmas componentes observados na caracterização por GC-FID (Figura 17): curva de calibração (u_{cur}), precisão (u_{pr}) e concentração do padrão interno adicionado à amostra (u_{cpi}), portanto, pode-se utilizar o mesmo diagrama.

No caso do 2-butanol que não foi caracterizado com o padrão interno, o diagrama é simplificado e tem somente duas fontes de incerteza: a curva de calibração e a precisão.

A determinação da incerteza relacionada à adição do padrão interno na amostra foi realizada de forma análoga, avaliando-se todas as etapas de preparo da solução contendo o padrão interno e, finalmente, o preparo da amostra analisada.

Para a avaliação da precisão da análise, utilizou-se a expressão (32), uma vez que foram realizadas 6 medições para a obtenção de C_0 para a maioria dos analitos e 5 medições para a obtenção da concentração do 2-butanol.

Utilizando-se a equação (13), calculou-se a incerteza associada à curva de calibração de cada analito.

As componentes da incerteza relacionadas à precisão e à curva foram então transformadas em incertezas-padrão relativas pela divisão dos seus respectivos mensurandos e as três componentes da incerteza relacionadas ao estudo de caracterização foram combinadas

para a obtenção da incerteza padrão combinada, u_{c_MS} , pela equação 44, como realizado anteriormente. A Tabela 11 apresenta os valores das fontes de incerteza relacionados à caracterização por GC-MS e as incertezas combinadas desta etapa para cada analito estudado.

Tabela 11 - Incertezas-padrão relativas associadas à caracterização por GC-MS e incertezas combinadas

Analito	u_{cpi_rel}	u_{pr_rel}	u_{cur_rel}	u_{c_MS}
2-butanol	-	0,0380	0,0374	0,0533
1-propanol	0,0045	0,0100	0,0310	0,0329
2-metil-1-propanol	0,0045	0,0042	0,0222	0,0231
1-butanol	0,0045	0,0038	0,0203	0,0211
3-metil-1-butanol	0,0045	0,0029	0,0140	0,0150
Furfural	0,0045	0,0374	0,0573	0,0686

A Figura 20, mostra a contribuição de cada fonte de incerteza para a incerteza combinada.

Figura 20 - Gráfico comparativo das as fontes de incertezas associadas à caracterização por GC-MS

Fonte: própria.

Pode-se observar que as maiores incertezas estão associadas à caracterização por GC-MS do furfural e do 2-butanol. No caso do furfural, a incerteza elevada se deve aos mesmos fatores que afetam a caracterização por GC-FID, já o 2-butanol, a caracterização sem utilização de padrão interno aumenta a variabilidade dos resultados, tanto na curva de calibração quanto na avaliação da precisão entre as medições.

4.3.3 Designação do valor de propriedade

Para a determinar o valor de concentração dos analitos caracterizados foi utilizada a média das concentrações obtidas pelas duas técnicas.

Na etapa de avaliação da incerteza da caracterização, foi utilizada a recomendação dada no item 10.3 da ISO Guia 35 de que a avaliação da discrepância entre os resultados pode ser realizada por meio de um componente adicional na incerteza da caracterização, e uma das formas que o Guia permite, indicado pelo item 10.8.1., é que essa avaliação do desvio-padrão entre os resultados seja realizada por meio de análise de variância.²⁴

Foi utilizada a ANOVA de um fator para a determinação do desvio-padrão 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 (45) para a utilização da equação (22).

$$n_0 = \frac{1}{a-1} \left[\sum_{i=1}^a n_i - \frac{\sum_{i=1}^a n_i^2}{\sum_{i=1}^a n_i} \right] \quad (45)$$

Onde,

n_i é o número de replicatas;

a é o número de técnicas utilizadas.

A Tabela 12 mostra o valor obtido pela média dos resultados, o desvio-padrão entre as técnicas obtido por meio da ANOVA e a componente adicional de incerteza relacionada a este desvio para cada um dos analitos caracterizados, dada pela divisão do desvio-padrão entre as técnicas calculado pela ANOVA dividido pela concentração de cada analito para a determinação de uma componente adimensional da incerteza-padrão combinada da etapa de caracterização.

Tabela 12 - Concentrações dos analitos presentes no candidato a MRC e a componente de incerteza relacionada à discrepância entre os resultados

Analito	Concentração (mg/100ml de etanol anidro)	Desvio-padrão entre as técnicas (mg/100ml de etanol anidro)	Componente da incerteza relacionado à discrepância ($u_{desv.pad}$)
2-butanol	58,0	6,31	0,1087
1-propanol	79,5	4,62	0,0581
2-metil-1-propanol	76,0	6,69	0,0879
1-butanol	68,0	2,15	0,0315
3-metil-1-butanol	104,2	1,36	0,0131
Furfural	6,75	1,04	0,1544

4.3.4 Incerteza relacionada à caracterização

A incerteza relacionada a caracterização (u_{car}), portanto, foi obtida por meio da combinação das incerteza-padrão obtidas para cada uma das técnicas e da componente da incerteza do desvio-padrão entre as técnicas utilizando-se a equação (46).

$$u_{car} = \sqrt{u_{FID}^2 + u_{MS}^2 + u_{desv.pad}^2} \quad (46)$$

A Tabela 13 apresenta os resultados da incerteza relacionada à caracterização.

Tabela 13 - Incertezas-padrão combinadas da etapa de caracterização para cada analito avaliado

Analito	u_{car}
2-butanol	0,1217
1-propanol	0,0677
2-metil-1-propanol	0,0916
1-butanol	0,0382
3-metil-1-butanol	0,0218
Furfural	0,1730

A Figura 21 mostra uma comparação entre as contribuições das incertezas das duas técnicas e da discrepância entre elas para o resultado final do estudo de caracterização.

Figura 21 - Gráfico comparativo das incertezas associadas ao estudo de caracterização

Fonte: própria

Os resultados obtidos permitem ao autor sugerir que a incerteza relacionada à caracterização por GC-MS foi maior que a incerteza relacionada à caracterização por GC-FID, uma vez que foi observado que o método apresenta menor repetibilidade que a caracterização

por GC-FID. De forma geral, o desvio-padrão entre as técnicas foi o maior contribuinte para a incerteza combinada da caracterização.

A componente da incerteza relacionada à unidade em que as concentrações finais dos analitos são apresentadas, que considera o conteúdo de etanol anidro no uísque, não foi considerada uma vez que a incerteza-padrão relativa calculada a partir do certificado de calibração do densímetro (ANEXO B) corresponde ao valor de 0,005, sendo desprezível em relação à incerteza relacionada ao estudo de caracterização.

4.4 Ensaio de homogeneidade

A avaliação da homogeneidade entre o lote de material produzido foi realizada por GC-FID. Como o estudo foi conduzido menos de um mês após a caracterização pela mesma técnica, foram realizados testes para avaliar a viabilidade de se utilizar as mesmas curvas de calibração do teste anterior. Foram avaliadas três das soluções de calibração (pontos 1, 3 e 5) e os resultados obtidos ficaram dentro da faixa de variação dos pontos dos pontos avaliados, dada pelo desvio-padrão entre as cinco replicatas de cada um desses pontos.

Dos 60 frascos de candidato a MRC produzidos, foram selecionados por amostragem aleatória 18 frascos utilizando-se a ferramenta RANDOM.ORG⁴¹. Estes frascos tiveram adicionados a cada um deles a mesma solução contendo o padrão interno utilizada na caracterização de forma gravimétrica para melhorar a repetitividade do método, uma vez que esta é uma exigência na escolha do método de análise. As concentrações dos padrões adicionados foram determinadas da mesma forma que para o ensaio de caracterização e foi determinada a concentração do padrão interno adicionado a cada frasco por meio da massa de solução B adicionada para a determinação da concentração do analito a cada medição.

As medições foram realizadas em triplicata. Para eliminar a possibilidade de tendências de medições os frascos foram analisados em ordem crescente na primeira replicata, depois em ordem decrescente e a terceira replicata foi realizada de forma aleatória como mostra a Figura 22.

Figura 22 - Esquematização do estudo de homogeneidade entre frascos

Fonte: própria.

Determinou-se por meio de uma ANOVA de um fator e das equações (21), (22) e (24), o nível de heterogeneidade em porcentagem das amostras, desvio-padrão entre os frascos (s_{bb}), o desvio-padrão da repetibilidade da análise e calculou-se a incerteza relativa associada à homogeneidade (u_{bb}) pela divisão de u_{bb} na unidade de concentração pela concentração dos analitos obtidas no ensaio de homogeneidade pela média das concentrações para que este valor se tornasse adimensional. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados do estudo de homogeneidade

Analito	u_{bb} (mg/100 ml de etanol)	S_r (mg/100 ml de etanol)	u_{bb} (relativa)	Nível de heterogeneidade (%)
Acetaldeído	0,86	0,88	0,050	5,03
Acetato de etila	15,78	4,59	0,098	9,83
Metanol	0,47	0,48	0,019	1,85
2-butanol	1,27	0,68	0,018	1,79
1-propanol	1,58	0,57	0,018	1,83
2-metil-propanol	1,12	0,71	0,016	1,58
1-butanol	1,02	0,38	0,015	1,52
3-metil-1-butanol	1,59	0,38	0,015	1,50
Furfural	0,04	0,41	0,006	0,57

Como mencionado anteriormente, os analitos acetato de etila e acetaldeído apresentam um nível de heterogeneidade acima do máximo permitido para amostras líquidas que é de 2%.

Todos os outros analitos, de acordo com este teste, 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.

4.5 Ensaio de estabilidade

4.5.1 Estabilidade à longo prazo

Como o teste de estabilidade foi realizado posteriormente em relação aos outros estudos, foram preparadas novas soluções e construída uma nova curva de calibração no GC-FID. Tanto o preparo das soluções quanto a construção da curva e avaliação dos parâmetros de validação foram realizados de forma análoga à utilizada nos outros estudos, porém foi utilizado somente o 1-pentanol como padrão interno, devido à indisponibilidade do padrão analítico de acetonitrila.

Para a aplicação do método isócrono visando a avaliação da estabilidade à longo prazo, no momento da produção, um dos frascos do candidato a MRC foi mantido a temperatura ambiente enquanto os outros foram refrigerados. A cada mês, um frasco foi escolhido de forma aleatória e acondicionado à temperatura ambiente juntamente com os anteriores até que fossem totalizados sete frascos.

Ao final do período de 7 meses, todos os frascos foram adicionados de solução contendo o padrão interno gravimetricamente como conduzido nos estudos anteriores e analisados em triplicata de forma análoga a utilizada no estudo de homogeneidade: em ordem crescente, decrescente e aleatória em relação ao mês que o frasco representa. A Figura 23 apresenta uma esquematização do estudo.

Figura 23 - Esquematização do estudo de estabilidade à longo prazo

Fonte: própria.

Utilizando-se a curva de calibração de cada analito, foram calculadas as concentrações para as replicatas de cada um dos sete meses avaliados e foi utilizado o método da regressão linear entre a concentração média de cada mês (em y) e o tempo transcorrido em meses (em x).

4.5.1.1 Avaliação de tendências

Para a avaliação de tendências à degradação, foram avaliadas as significâncias dos coeficientes angulares a partir da equação (27). A Tabela 15 apresenta os valores dos coeficientes angulares em módulo, em comparação com o erro-padrão do coeficiente angular (s_a) vezes o valor de t com probabilidade e graus de liberdade em relação ao números de pontos de regressão menos dois. No caso foi utilizada uma probabilidade de 95% e o n corresponde ao número de meses (7) menos 2, sendo assim, o t utilizado possui o valor de 2,57.

Tabela 15 - Avaliação de tendências à degradação

Analito	a	$t_{0,95, n-2} \cdot S_a$
Metanol	0,1736	0,7583
2-butanol	0,1268	0,6736
1-propanol	0,2986	0,9108
2-metil-1-propanol	0,1830	0,8625
1-butanol	0,2572	0,8518
3-metil-1-butanol	0,3614	1,4449
Furfural	0,0609	0,1565

Nota-se que não são observadas tendências para nenhum dos analitos estudados.

Para estimar a incerteza relacionada ao tempo de prateleira de 12 meses a partir do momento da certificação, foi utilizada a equação (31). A Tabela 16 apresenta a incerteza relativa relacionada à estabilidade a longo prazo durante o tempo de prateleira determinado dado por s_a multiplicado por 12 meses, e a incerteza relativa, obtida pela divisão entre o valor de u_{lts} obtido na unidade de concentração pela média das concentrações determinadas pelo estudo de estabilidade.

Tabela 16 - Incerteza relacionada à estabilidade durante o tempo de prateleira

Analito	s_a	u_{lts} (mg/100 ml de etanol)	u_{lts} (relativa)
Metanol	0,2950	3,54	0,1874
2-butanol	0,2620	3,14	0,0584
1-propanol	0,3543	4,25	0,0618
2-metil-1-propanol	0,3355	4,03	0,0603
1-butanol	0,3314	3,98	0,0643
3-metil-1-butanol	0,5621	6,75	0,0688
Furfural	0,0609	0,73	0,0968

Monteiro et al. (2013) apresentam a incerteza relacionada à estabilidade a longo prazo como sendo o contribuinte dominante para a incerteza final do MRC. De fato, a contribuição da estabilidade observada foi significativa, porém, no caso do trabalho desenvolvido, trata de uma estimativa com o intuito de estender o período de uso do produto em cinco meses em relação ao tempo em que o teste foi realizado, sendo assim, trata-se de uma estimativa relativamente superestimada desta contribuição, porém necessária, uma vez que, como previamente discutido na seção 3.7, quanto maior o tempo de prateleira, maior a incerteza em relação às concentrações dos analitos presentes.

4.5.2 Estudo de estabilidade a curto prazo

Para a avaliação da estabilidade a curto prazo, foi estipulado um período de 24 horas para transporte do material, sendo que o estudo foi realizado por um período de 42,4 horas.

A temperatura escolhida para o estudo, foi a temperatura de 40°C, pois é uma temperatura que pode ser alcançada durante o transporte e os frascos foram somente tampados, não sendo adicionado nenhum material para vedação adicional.

Neste período, portanto, os dois frascos foram mantidos por 8 horas à uma temperatura de 40°C, por 16 horas a 25°C, por mais 8 horas a 40°C e a 25°C pelo restante do período como mostrado na Figura 24, depois esses frascos foram adicionados da solução contendo o padrão interno de forma gravimétrica como foi conduzido nos estudos anteriores.

Figura 24 - Esquematização do estudo de estabilidade a curto prazo

Fonte: própria.

Foram estudados dois frascos de forma análoga à utilizada nos outros estudos por GC-FID. A partir dos resultados das análises do conteúdo dos frascos em triplicata foi observada uma redução de cerca de 10% nas concentrações dos analitos avaliados, de forma que o transporte a 40°C não é recomendado. No entanto, os estudos da estabilidade a longo prazo que foram conduzidos de forma que as amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente e sofreram as variações de temperatura conforme o clima da região, o qual, de acordo com dados meteorológicos, se enquadram entre 18 e 28°C durante este período, mostraram que nessas condições a redução das concentrações dos analitos estudados não é significativa. Sendo assim, recomenda-se que os frascos sejam bem selados para transporte utilizando-se parafilm e que

sejam refrigerados para que a amostra não ultrapasse os 30°C, cuidados que foram tomados nas situações em que o MRC foi transportado.

4.6 Estimativa da incerteza expandida do MRC

Para o cálculo das incertezas expandidas, U , calculadas pela equação (39), foi realizado primeiramente o cálculo das incertezas-padrão combinadas, u_c , de cada analito certificado pela combinação das contribuições das incertezas relacionadas aos estudos de caracterização, homogeneidade e estabilidade. As incertezas-padrão combinadas foram então multiplicadas por um fator k de abrangência calculado pela equação (38) 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 17 - Incertezas combinadas, fatores de abrangência e incertezas expandidas do MRC

Analito	u_c	k	U (%)
2-butanol	0,1361	2,10	28,6
1-propanol	0,0933	2,09	19,5
2-metil-1-propanol	0,1107	2,09	23,1
1-butanol	0,0766	2,03	15,6
3-metil-1-butanol	0,0735	2,06	15,1
Furfural	0,1982	2,08	41,2

A Figura 25 apresenta um comparativo de cada contribuição para a incerteza-padrão combinada do MRC.

Figura 25 - Gráfico comparativo da contribuição de cada estudo realizado para a incerteza combinada

Fonte: própria.

Os resultados obtidos permitem sugerir que a menor contribuição provém da homogeneidade, uma das condições que garantem a homogeneidade do lote. Como discutido em 4.5.1.1, a decisão de estender o período de uso do MRC, eleva a contribuição da estabilidade para a incerteza final do período, entretanto, mesmo considerando um aumento na incerteza relacionada à estabilidade, a incerteza da caracterização é o fator dominante na maioria dos casos. Destacando-se o estudo de caracterização, que foi o fator dominante para quatro dos resultados e uma contribuição significativa para os demais, a tecnologia relacionada a instrumentação analítica aplicada na determinação dos valores de propriedade foi um fator limitante.

Os valores certificados de concentração estão presentes na Tabela 18 acompanhados das incertezas expandidas e fatores de abrangência utilizados para cada um dos analitos certificados e para o metanol como valor informativo.

Tabela 18 - Valores certificados

Analito	Concentração (mg/100 ml de etanol anidro)	k (95%)	U (%)
Metanol	21	2,36	45
2-butanol	58	2,10	29
1-propanol	80	2,09	20
2-metil-1-propanol	76	2,09	23
1-butanol	68	2,03	16
3-metil-1-butanol	104	2,06	15
Furfural	7	2,08	41

5 CONCLUSÃO

O objetivo de produção de um MRC para uísque foi alcançado, uma vez que foi produzido um material com os analitos 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 3-metil-1-butanol e furfural certificados. No caso dos demais componentes, não foi possível a certificação uma vez que estes não foram aprovados nos testes estatísticos, indicando que seria necessário uma instrumentação analítica de melhor tecnologia para a certificação. Além de cromatógrafos com melhor tecnologia, no caso do metanol, uma coluna maior que permitisse a obtenção de uma separação com melhor resolução entre o metanol e o etanol poderia permitir a sua certificação. No caso do acetaldeído e acetato de etila, que são altamente voláteis, o uso de técnicas como análise por headspace poderiam ser adequados para a certificação de um material com todos os analitos inicialmente propostos. A falta da certificação destes três compostos somente caracteriza as limitações da produção de um MRC em relação aos equipamentos disponíveis. No trabalho desenvolvido, a disponibilidade de uma boa balança e de boas micropipetas proporcionaram o preparo de um excelente MRC, porém, a cromatografia foi um fator limitante, uma vez que os equipamentos utilizados são antigos (além de não serem considerados como uma marca de primeira linha), que apesar de atenderem os objetivos de

aprendizado, não são os mais indicados para os casos em que o produto final exige uma menor incerteza associada aos resultados, somado a isso, a injeção manual no caso do GD-FID também foi um dos fatores que impactaram nas incertezas do MRC. Apesar das limitações encontradas, o objetivo principal do trabalho foi atingido, uma vez que foi produzido um MRC para uísque, além de um método para a sua produção baseado em diferentes ferramentas estatísticas e normas internacionais. Todo o desenvolvimento teórico e prático realizado para a produção deste material poderá ser utilizado para a produção de outros materiais e o produto final do trabalho poderá ser utilizado por laboratórios que fazem o controle de qualidade de bebidas. De fato, foi realizada uma reunião dia 06 de março de 2017, na ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas), em que o material foi distribuído para os laboratórios que fazem o controle de qualidade interno de bebidas, alcançando todos os objetivos propostos. A utilização do ambiente universitário para o desenvolvimento de materiais de referência, além de fornecer produtos que podem ser imediatamente utilizados no mercado, contribuindo efetivamente com a sociedade, envolve os desafios e peculiaridades da análise de cada matriz e uma preocupação metrológica que se distingue da preocupação de um químico analítico nos processos que envolvem a preparação e a análise do material.

6 REFERÊNCIAS

- 1 OLIVARES, I. R. B. **Gestão de Qualidade em Laboratórios**. Campinas: Átomo, 2015.
- 2 International Organization for Standardization. **All about ISO**. Disponível em < www.iso.org/about-us.html >. Acesso em fev. 2017.
- 3 International Electrotechnical Commission. About the IEC Vision & mission. Disponível em < <http://www.iec.ch/about/?ref=menu> >. Acesso em fev 2017.
- 4 Associação Brasileira de Normas Técnicas. Conheça a ABNT Missão, visão e valores. Disponível em < <http://www.abnt.org.br/abnt/missao-visao-e-valores> >. Acesso em fev 2017.
- 5 OLIVARES, I. R. B., **Laboratory Quality Management**, Campinas: a ser lançado por Átomo, 2016.
- 6 International Laboratory Accreditation Cooperation. Facts & Figures. Disponível em < <http://ilac.org/about-ilac/facts-and-figures/> > acesso em mar 2017.
- 7 OLIVARES, I. R. B.; LOPES, F. A. Essential steps to providing reliable results using the Analytical Quality Assurance Cycle. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 109-121, 2012.
- 8 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT), **NBR ISO/IEC 17025**: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração Rio de Janeiro, 2005.
- 9 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Vocabulário Internacional de Metrologia**: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados, Duque de Caxias, 2012.

- 10 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **REMEQ-I: Rede de Metrologia Química do Inmetro**. Disponível em: <<http://www2.inmetro.gov.br/remeq-i>>. Acesso em: mar. 2015.
- 11 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **REMEQ-I - Workshop de Estruturação da REMEQ-I**, 2013. Disponível em: <<http://www2.inmetro.gov.br/remeq-i/wp-content/uploads/Apresentacao-do-Estudo-de-Prospeccao-Inmetro1.pdf>>. Acesso em: mar. 2015.
- 12 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa n.15 de 31 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 abril 2011. Seção 1, p.4.
- 13 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2009**. Disponível em: <<http://www.scotch-whisky.org.uk/media/16947/statisticalreport2009.pdf>>. Acesso em: mar. 2015.
- 14 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2010**. Disponível em: <http://www.scotch-whisky.org.uk/media/16927/statistical_report_2010.pdf>. Acesso em: mar. 2015.
- 15 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2011**. Disponível em: <http://www.scotch-whisky.org.uk/media/42042/2011_statistical_report.pdf>. Acesso em: mar. 2015.
- 16 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2012**. Disponível em: <http://www.scotch-whisky.org.uk/news-publications/publications/documents/statistical-report-2012/#.Vxt_2vkrLIU>. Acesso em: mar. 2015.
- 17 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2013**. Disponível em: <<http://www.scotch-whisky.org.uk/news-publications/publications/documents/statistical-report-2013/#.VxuDtPmDGko>>. Acesso em: mar. 2015.
- 18 Scotch Whisky Association. **Statistical Report 2014**. Disponível em: <http://www.scotch-whisky.org.uk/news-publications/publications/documents/statistical-report-2014/#.VxuDm_mDGko>. Acesso em: abr. 2016.
- 19 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Planilha dos principais produtos do Departamento de Qualidade em Alimentos e Bebidas**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/TOTAL%20PARA%20PORTAL%2021,JAN,14.rar>. Acesso em: mar. 2015.
- 20 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Brasil em Números**. Disponível em: <http://www.biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/brasilnumeros/Brasil_numeros_v20_2012.pdf>. Acesso em: mar 2015.
- 21 MONTEIRO, T.; RODRIGUES, J.; REGO, E.; ROCHA, W.; MATTOS, J.; NUNES, F.; CUNHA, V.; LA CRUZ, M.H.C.; SOUZA, V. Development of a certified reference material for cachaça: an effective material for quality assurance. **Accreditaion and Quality Assurance**, 18, p. 197-206, 2013.
- 22 FAPAS - Accredited Laboratory Proficiency Testing. **Available quality control materials**. Disponível em: <<http://fapas.com/quality-control-materials/Available-quality-control-materials.cfm>>. Acesso em: mar. 2015.
- 23 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ISO GUIA 34: Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência**, 2012.
- 24 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ISO GUIA 35: Materiais de Referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação**, 2012.
- 25 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ISO GUIA 31: Conteúdo de certificados e rótulos**, Rio de Janeiro, 2012.

- 26 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Instrução Normativa n.24 de 08 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 2005. Seção 1, p.11.
- 27 LANÇAS, F.M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta Eventos, 1993.
- 28 SKOOG, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. **Principles of Instrumental Analysis**. Canada: Thomson Brooks/Cole, 2007.
- 29 Olivares, Igor R. B., Pinhel, Maria F. M., Moser, Priscila. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica: Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Defesa Agropecuária; Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial; Divisão de Ensaios Químicos, 2015.
- 30 MILLER, J.N., MILLER, J.C., **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Harlow: Pearson Education Limited, 2010.
- 31 EURACHEM/CITAC Guide CG 4. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2012.
- 32 VAN DER VEEN, A.M.H.; LISINGER, T.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials: 2. Homogeneity study,. **Accreditation and Quality Assurance**, 6, p. 26-30, 2001.
- 33 VAN DER VEEN, A.M.H.; PAUWELS, J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials: 1.Principles of analysis of variance. **Accreditation and Quality Assurance**, 5, p. 464-469, 2000.
- 34 LISINGER, T.P.J.; PAUWELS, J.; VAN DER VEEN, A.M.H.; SCHIMMEL, H.; LAMBERTY, A. Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, 6, p. 20-25, 2001.
- 35 VAN DER VEEN; A.M.H., LISINGER; T.P.J., LAMBERTY; A., PAUWELS; J. Uncertainty calculations in the certification of reference materials: 3. Stability study. **Accreditation and Quality Assurance**, 6, p. 257-263, 2001.
- 36 LISINGER, T. P.J.; PAUWELS, J.; LAMBERTY, A.; SCHIMMEL, H.G.; VAN DER VEEN, A.M.H.; SIEKMANN, L. Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 370, p. 183-188, 2001.
- 37 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Guia para Expressão da Incerteza de Medição (ISO GUM), Rio de Janeiro, 2008.
- 38 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Norma n. NIT-DICLA-030**, Rev. 09, Rio de Janeiro, p.11, novembro de 2015.
- 39 Nóbrega, I.C.C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do “headspace” e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23 (2), p. 210-216, 2003.
- 40 National Institute of Standard and Technology (NIST). **Data Gateway**. Disponível em < <https://srdata.nist.gov/gateway> >. Acesso em julho de 2016.
- 41 Random.org. **True random number service**. Disponível em < <https://www.random.org/> > . Acesso em junho de 2016.

ANEXO A - Modelo do Certificado do MRC

ANEXO B - Certificado de calibração do densímetro Anton Paar DM 48

ANEXO C - Formulário de verificação da balança