

REGULAMENTO (CE) N.º 761/1999 DA COMISSÃO
de 12 de Abril de 1999
que altera o Regulamento (CEE) n.º 2676/90 que determina os métodos de análise
comunitários aplicáveis no sector do vinho

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 822/87 do Conselho, de 16 de Março de 1987, que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 1627/98⁽²⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 74.º,

Considerando que o Regulamento (CEE) n.º 2676/90 da Comissão⁽³⁾, com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 822/97⁽⁴⁾, descreve, no seu anexo, os métodos de análise comunitários aplicáveis no sector do vinho; que o método de análise previsto para o ácido D-málico, descrito no capítulo 20, se revelou pouco preciso, tendo sido desenvolvido um novo método mais exacto; que foi igualmente desenvolvido um novo método de análise, mais sensível e de mais fácil execução, para os derivados cianados; que foi desenvolvido a nível internacional um novo método para a determinação do carbamato de etilo nos vinhos; que os três novos métodos referidos foram validados segundo critérios reconhecidos internacionalmente; que a utilização desses métodos pode garantir um melhor controlo da qualidade e autenticidade dos vinhos e evitar os litígios decorrentes da aplicação de métodos de análise antigos e pouco fiáveis; que a descrição dos métodos em causa foi adoptada pelo *Office*

International de la Vigne et du Vin; que há que incorporar os referidos métodos no regulamento em questão;

Considerando que as medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Gestão dos Vinhos,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

O anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 é alterado do seguinte modo:

1. O capítulo 20, «Ácido D-málico», é substituído pelo anexo I do presente regulamento.
2. O capítulo 38, «Derivados cianados», é substituído pelo anexo II do presente regulamento.
3. É aditado o capítulo 44 constante do anexo III do presente regulamento.

Artigo 2.º

O presente regulamento entra em vigor no sétimo dia seguinte ao da sua publicação no *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*.

O presente regulamento é obrigatório em todos os seus elementos e directamente aplicável em todos os Estados-membros.

Feito em Bruxelas, em 12 de Abril de 1999.

Pela Comissão
Franz FISCHLER
Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 84 de 27.3.1987, p. 1.

⁽²⁾ JO L 210 de 28.7.1998, p. 10.

⁽³⁾ JO L 272 de 3.10.1990, p. 1.

⁽⁴⁾ JO L 117 de 7.5.1997, p. 10.

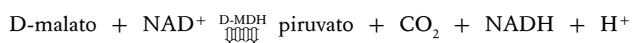
ANEXO I

20. ÁCIDO D-MÁLICO

(Determinação por via enzimática)

1. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Na presença de D-malato-desidrogenase (D-MDH), o ácido D-málico (D-malato) é oxidado em oxaloacetato pelo nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD). O oxaloacetato formado é transformado em piruvato e dióxido de carbono.



A formação de NADH, medida pelo aumento da absorvância nos comprimentos de onda de 334, 340 ou 365 nm, é proporcional à quantidade de D-malato presente.

2. REAGENTES

São comercializados conjuntos de reagentes para cerca de 30 determinações, constituídos por:

- Um frasco 1, com cerca de 30 ml de solução-tampão Hepes (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfónico) a pH 9,0 e estabilizadores;
- Um frasco 2, com cerca de 210 mg de liofilizado de NAD;
- Três frascos 3 com liofilizado de D-MDH (título: cerca de 8 unidades).

Preparação das soluções

- Utilizar o conteúdo do frasco 1 sem diluição. Levar a solução a 20-25 °C antes do seu emprego.
- Dissolver o conteúdo do frasco 2 em 4 ml de água bidestilada.
- Dissolver o conteúdo de um dos frascos 3 em 0,6 ml de água bidestilada. Levar a solução a 20-25 °C antes do seu emprego.

Estabilidade das soluções

O conteúdo do frasco 1 conserva-se pelo menos um ano a + 4 °C; a solução 2 conserva-se cerca de três semanas a + 4 °C e dois meses a - 20 °C; a solução 3 conserva-se cinco dias a + 4 °C.

3. APARELHAGEM

- Espectrofotómetro com capacidade de leitura a 340 nm, máximo de absorção do NADH. Na sua falta, utilizar um fotómetro de espectro descontínuo com capacidade de leitura a 334 nm e 365 nm. Se forem medidas absorvâncias absolutas (coeficiente de extinção do NADH, sem curva de calibração), verificar as escalas de comprimentos de onda e de absorvâncias do aparelho.
 - Células de vidro com 1 cm de percurso óptico ou células descartáveis (uma só utilização).
 - Micropipetas para volumes compreendidos entre 0,01 ml e 2 ml.

4. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A determinação do D-malato efectua-se, em geral, directamente no vinho, sem descoloração prévia.

Dado que a quantidade de D-malato presente na célula deve estar compreendida entre 2 e 50 µg, é necessário diluir o vinho de modo que a concentração de D-malato fique compreendida entre 0,02 e 0,5 g/l ou 0,02 e 0,3 g/l (conforme a aparelhagem utilizada).

Quadro de diluições

Quantidade estimada de D-malato/litro		Diluição com água	Factor de diluição F
Leitura a:			
340 ou 334 nm	365 nm		
< 0,3 g	< 0,5 g	—	1
0,3 – 3,0 g	0,5 – 5,0 g	1 + 9	10

5. MODO OPERATÓRIO

Com o espectrofotómetro regulado no comprimento de onda de 340 nm, efectua-se a leitura das absorvâncias em células com 1 cm de percurso óptico. O zero de absorvância é regulado com ar (sem célula no percurso óptico) ou com água.

Introduzir nas células com 1 cm de percurso óptico:

	Branco	Solução de teste
Solução 1	1,00 ml	1,00 ml
Solução 2	0,10 ml	0,10 ml
Água bidestilada	1,80 ml	1,70 ml
Amostra	—	0,10 ml

Misturar. Cerca de seis minutos depois, ler as absorvâncias (A_1) do branco e da solução de teste.

Adicionar:

	Branco	Solução de teste
Solução 3	0,05 ml	0,05 ml

Misturar. Depois de terminada a reacção (cerca de 20 minutos), ler as absorvâncias (A_2) do branco e da solução de teste.

Determinar as diferenças de absorvância ($A_2 - A_1$) do branco (ΔA_p) e da solução de teste (ΔA_E). Deduzir a diferença de absorvância do branco à diferença de absorvância da solução de teste: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_p$.

Nota: O tempo necessário à acção das enzimas pode variar de lote para lote, tendo sido referido apenas a título indicativo. É conveniente proceder à sua determinação para cada lote.

O ácido D-málico reage rapidamente. Dado que a enzima transforma igualmente o ácido L-tartárico, embora muito mais lentamente, existe uma ligeira reacção parasita, cujo efeito pode ser corrigido por extrapolação (ver o apêndice A).

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

A concentração em miligrama por litro é calculada pela seguinte fórmula geral:

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

em que:

V = volume utilizado na determinação, em ml (neste caso, 2,95 ml)

v = volume de amostra, em ml (neste caso, 0,1 ml)

PM = massa molecular da substância a determinar (neste caso, o ácido D-málico: 134,09)

d = percurso óptico na célula, em cm (neste caso, 1 cm)

ε = coeficiente de absorção do NADH:

a 340 nm = 6,3 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

a 365 nm = 3,4 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹)

a 334 nm = 6,18 (1 mmol⁻¹ cm⁻¹).

Se tiver havido diluições durante a preparação da amostra, multiplicar o resultado pelo factor de diluição.

A concentração de ácido D-málico é apresentada em miligrama por litro (mg/l), sem decimais.

7. FIABILIDADE

São apresentados no apêndice B os resultados do teste interlaboratorial da fiabilidade do método. Os dados extraídos do teste interlaboratorial podem não ser aplicáveis a concentrações de analito e matrizes distintas das indicadas no apêndice B.

7.1. REPETIBILIDADE

A diferença absoluta entre dois resultados individuais, obtidos o mais rapidamente possível um a seguir ao outro para uma mesma amostra, analisada pelo mesmo analista com a mesma aparelhagem, não excederá o valor da repetibilidade, r, em mais que 5 % dos casos.

O valor de r é 11 mg/l.

7.2. REPRODUTIBILIDADE

A diferença absoluta entre dois resultados individuais obtidos para uma mesma amostra analisada em dois laboratórios diferentes não excederá o valor da reprodutibilidade, R, em mais que 5 % dos casos.

O valor de R é 20 mg/l.

8. OBSERVAÇÕES

Atendendo à precisão do método, os teores de ácido D-málico inferiores a 50 mg/l devem, se necessário, ser confirmados por um método de análise baseado num princípio de medição diferente, por exemplo o de *Przyborski et al*, (Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218.1993).

A toma de vinho a analisar presente na célula não deve exceder 0,1 ml, para evitar qualquer inibição da actividade enzimática pelos polifenóis.

Apêndice A

Resolução do problema das reacções parasitas

As reacções parasitas devem-se, geralmente, a reacções secundárias da enzima, à presença de outras enzimas na matriz da amostra ou à interacção de um ou mais elementos da matriz com um co-factor da reacção enzimática.

Se a reacção decorrer normalmente, a absorvância atinge um valor constante ao fim de um certo tempo, em geral entre 10 e 20 minutos, conforme a velocidade da reacção enzimática específica. Verificando-se reacções secundárias, a absorvância não atinge, porém, um valor constante, antes aumentando regularmente à medida que o tempo passa. Este tipo de processo é vulgarmente designado por "reacção parasita".

Quando o problema se colocar, deve medir-se a absorvância da solução a intervalos regulares (2 a 5 minutos) depois de transcorrido o tempo necessário para que a solução-padrão atinja a sua absorvância final. Quando a absorvância começar a aumentar regularmente, efectuar cinco ou seis leituras, posto o que uma extrapolação gráfica ou através de cálculos para o momento (T_0) da adição da enzima final permitirá obter a absorvância que a solução teria apresentado sem a reacção parasita. Utilizar-se-á no cálculo da concentração do substrato a diferença de absorvâncias ($A_f - A_i$) obtida depois da extrapolação para esse momento.

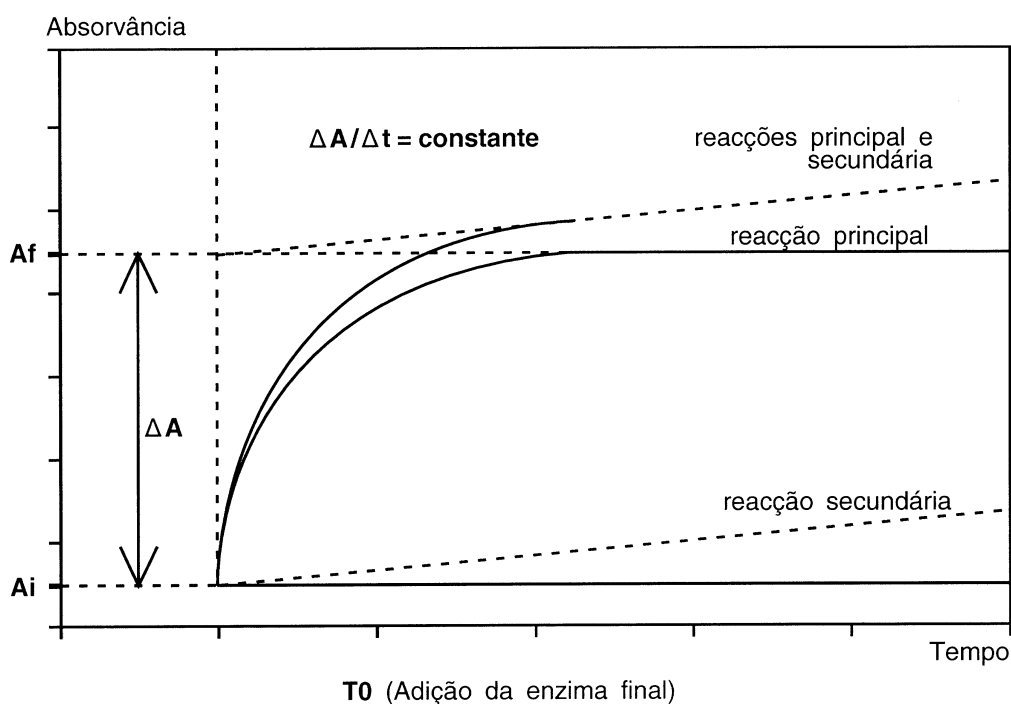


Figura 1: Reacção parasita

Apêndice B

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Ano do teste interlaboratorial: 1995

Número de laboratórios: 8

Número de amostras: 5, com adição de ácido D-málico

Amostra	A	B	C	D	E
Número de laboratórios, depois de eliminados os laboratórios com resultados aberrantes	7	8	7	8	7
Número de laboratórios com resultados aberrantes	1	—	1	—	1
Número de resultados aceite	35	41	35	41	36
Valor médio (\bar{x}) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Desvio-padrão da repetibilidade (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Limite de repetibilidade (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Desvio-padrão da reprodutibilidade (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Limite de reprodutibilidade (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Tipos de amostra:

A: vinho tinto; B: vinho tinto; C: vinho branco; D: vinho branco; E: vinho branco.*.

ANEXO II

«38. DERIVADOS CIANADOS

(Atenção: Respeitar as normas de segurança para a manipulação de produtos químicos (cloramina T, piridina, cianeto de potássio, ácido clorídrico e ácido fosfórico). Descartar os produtos usados de forma compatível com as regras e a regulamentação aplicáveis em matéria de protecção do ambiente. Tomar precauções especiais com o ácido cianídrico libertado na destilação do vinho acidificado.)

1. PRINCÍPIO

Obtenção por hidrólise ácida e separação por destilação do ácido cianídrico livre total do vinho. Reacção com cloramina T e piridina e determinação colorimétrica do dialdeído glutacónico formado, graças à coloração azul que este produz com o ácido 1,3-dimetilbarbitúrico.

2. APARELHAGEM

2.1. Aparelho de destilação

Utilizar o aparelho de destilação descrito para a determinação do título alcoométrico volúmico do vinho.

2.2. Balão de 500 ml com esmerilado normalizado.

2.3. Banho de água termostaticado a 20 °C.

2.4. Espectrofotómetro com capacidade para leituras de absorvância a 590 nm.

2.5. Células de vidro com 20 mm de percurso óptico ou células descartáveis (uma só utilização).

3. REAGENTES

3.1. Ácido fosfórico (H_3PO_4) a 25 % (m/v).

3.2. Solução de cloramina T ($C_7H_7ClNNaO_2S, 3H_2O$) a 3 % (m/v).

3.3. Solução do ácido 1,3-dimetilbarbitúrico: dissolver 3,658 g de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico ($C_6H_8N_2O_3$) em 15 ml de piridina e 3 ml de ácido clorídrico ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml) e completar o volume até 50 ml com água destilada.

3.4. Cianeto de potássio (KCN).

3.5. Solução de iodeto de potássio (KI) a 10 % (m/v).

3.6. Solução 0,1 M de nitrato de prata ($AgNO_3$).

4. MODO OPERATÓRIO

4.1. Destilação:

Introduzir 25 ml de vinho, 50 ml de água destilada, 1 ml de ácido fosfórico (3.1) e algumas esferas de vidro num balão de 500 ml (2.2) e colocá-lo imediatamente no aparelho de destilação. Por meio de um tubo afilado, conduzir o destilado para um balão aferido de 50 ml, já com 10 ml de água, imerso em água gelada. Recolher 30-35 ml de destilado (até um volume total de líquido no balão de cerca de 45 ml).

Lavar o tubo afilado do refrigerante com alguns mililitros de água destilada, elevar a temperatura do destilado até 20 °C e completar o volume com água até ao traço de aferição.

4.2. Medições:

Introduzir 25 ml de destilado num balão de fundo plano de 50 ml com tampa esmerilada, adicionar 1 ml de solução de cloramina T (3.2) e tapar hermeticamente. Transcorridos exactamente 60 segundos, adicionar 3 ml de solução de ácido 1,3-dimetilbarbitúrico (3.3), tapar hermeticamente e deixar em repouso durante 10 minutos. Fazer a leitura da absorvância em relação a um branco (25 ml de água destilada em vez de 25 ml de destilado) no comprimento de onda de 590 nm, em células de 20 mm de percurso óptico.

5. TRAÇADO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

5.1. Titulação argentimétrica do cianeto de potássio

Num balão aferido de 300 ml, dissolver cerca de 0,2 g de KCN (3.4), pesados com exactidão, em 100 ml de água destilada. Adicionar 0,2 ml de solução de iodeto de potássio (3.5) e titular com a solução 0,1 M de nitrato de prata (3.6) até à obtenção de uma coloração amarelada estável.

Calcular o título desta solução de KCN, sabendo que 1 ml de solução 0,1 M de nitrato de prata correspondem a 13,2 mg de KCN.

5.2. Curva de calibração

5.2.1. Preparação das soluções-padrão

Conhecido o título de KCN determinado em 5.1, preparar uma solução-padrão de ácido cianídrico com a concentração de 30 mg/l (30 mg de HCN \cong 72,3 mg de KCN). Diluir esta solução 1:10.

Introduzir 1,0/2,0/3,0/4,0/5,0 ml da solução-padrão diluída em balões aferidos de 100 ml e completar o volume com água destilada até ao traço de aferição. A concentração de ácido cianídrico nas soluções preparadas é, respectivamente, 30/60/90/120/150 μ g/l.

5.2.2. Determinação

Tomar 25 ml das soluções assim obtidas e prosseguir conforme descrito em 4.1. e 4.2.

Os valores de absorvância obtidos para estas soluções-padrão em função dos teores de ácido cianídrico correspondentes definem uma recta com ordenada na origem.

6. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

O teor de ácido cianídrico é apresentado em microgramas por litro (μ g/l), sem decimais.

6.1. Cálculo

Ler o teor de ácido cianídrico na curva de calibração. Se tiver havido diluições, multiplicar o resultado pelo factor de diluição.

Repetibilidade (r) e reprodutibilidade (R)

Vinho branco = $r = 3,1 \mu$ g/l, cerca de 6 % de x_i

$R = 12 \mu$ g/l, cerca de 25 % de x_i

Vinho tinto = $r = 6,4 \mu$ g/l, cerca de 8 % de x_i

$R = 23 \mu$ g/l, cerca de 29 % de x_i

em que:

x_i = concentração média de HCN no vinho;

$x_i = 48,4 \mu$ g/l para o vinho branco;

$x_i = 80,5 \mu$ g/l para o vinho tinto.*.

ANEXO III

44. DETERMINAÇÃO DO CARBAMATO DE ETILO NOS VINHOS: MÉTODO DE DETECÇÃO SELECTIVA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA/ESPECTROMETRIA DE MASSA

(Aplicável na determinação de concentrações de carbamato de etilo compreendidas entre 10 e 200 µg/l.)

(*Atenção:* Respeitar as normas de segurança para a manipulação de produtos químicos (etanol, acetona e os produtos cancerígenos carbamato de etilo e diclorometano). Descartar os solventes usados de forma compatível com as regras e a regulamentação aplicáveis em matéria de protecção do ambiente).

A. Princípio do método

Adiciona-se carbamato de propilo a uma amostra como padrão interno, dilui-se a solução com água e introduz-se a solução resultante numa coluna de extracção em fase sólida de 50 ml. Eluem-se o carbamato de etilo e o carbamato de propilo com diclorometano.

Concentra-se o eluato num evaporador rotativo sob vácuo. Na análise do concentrado, utiliza-se a cromatografia em fase gasosa (CG) como método separativo e a espectrometria de massa [fragmentometria em modo SIM (*selected ions monitoring*, detecção selectiva de iões)] como método de detecção.

B. Aparelhagem e condições cromatográficas (exemplo)

- a) Cromatógrafo de fase gasosa/espectrómetro de massa (CG/BM) e, eventualmente, um amostrador automático de amostras e um sistema de tratamento de dados ou equivalente.

Coluna capilar silicatada com 30 m (*) × 0,25 mm de diâmetro interno e um filme do tipo Carbowax 20M com 0,25 µm de espessura.

Modo operatório: injector a 180 °C; gás vector hélio (1 ml/minutos, 25 °C); injeção com e sem divisão da amostra (*splitless/split*).

Programa de temperaturas: 40 °C durante 0,75 minutos; depois programação de 10 °C/minutos até aos 60 °C; a seguir 3 °C/minutos até aos 150 °C (**), elevar a temperatura até 220 °C e mantê-la durante 4,25 minutos. O tempo de retenção específico do carbamato de etilo é de 23-27 minutos; o do carbamato de propilo de 27-31 minutos.

Interface do cromatógrafo de fase gasosa e do espectrómetro de massa: canal de transferência a 220 °C. Os parâmetros do espectrómetro de massa são acertados manualmente com perfluorotributilamina e optimizados para uma sensibilidade de massa mais baixa; modo de aquisição: SIM; tempo de espera devido ao solvente e de começo da aquisição: 22 minutos; tempo de manutenção/ião: 100 ms.

- b) Evaporador rotativo sob vácuo ou sistema de concentração do tipo Kuderna Danish.

(*Nota:* Durante o processo, a taxa de recuperação do carbamato de etilo da solução de teste, C(g), deve estar compreendida entre 90 % e 110 %.)

- c) Balão — de 300 ml, fundo plano e gargalo único com esmerilado.

- d) Tubo de concentração — 4 ml de capacidade, graduado, com junta de película de teflon e tampa.

C. Reagentes

- a) Acetona para cromatografia líquida (grau LC)

Nota: Antes da primeira utilização de um lote em CG/EM, comprovar a ausência de resposta para os iões de m/z 62, 74 e 89.

- b) Diclorometano

Nota: Antes da primeira utilização de um lote em CG/EM, proceder a uma concentração de 200 vezes e comprovar a ausência de resposta para os iões de m/z 62, 74 e 89.

- c) Etanol anidro

(*) No caso de alguns vinhos particularmente ricos, pode ser aconselhável utilizar uma coluna capilar com 50 m de comprimento.

(**) No caso de alguns vinhos particularmente ricos, pode ser aconselhável programar a variação de temperatura para 2 °C/minutos.

- d) Soluções-padrão de carbamato de etilo
1. Solução-mãe 1,00 mg/ml: pesar 100 mg de carbamato de etilo (pureza $\geq 99\%$) para um balão aferido de 100 ml e diluir com acetona.
 2. Solução-padrão de trabalho 10,0 $\mu\text{g/ml}$: transferir 1 ml da solução-mãe de carbamato de etilo para um balão aferido de 100 ml e diluir com acetona até ao traço de calibração.
- e) Soluções padrão de carbamato de propilo
1. Solução-mãe 1,00 mg/ml: pesar 100 mg de carbamato de propilo (grau de reagente) para um balão aferido de 100 ml e diluir com acetona até ao traço de calibração.
 2. Solução-padrão de trabalho 10,0 $\mu\text{g/ml}$: transferir 1 ml da solução-mãe de carbamato de propilo para um balão aferido de 100 ml e diluir com acetona até ao traço de calibração.
 3. Solução de padrão interno de carbamato de propilo 400 ng/ml: transferir 4 ml da solução de trabalho de carbamato de propilo para um balão aferido de 100 ml e diluir com água até ao traço de calibração.
- f) Soluções-padrão de calibração de carbamato de etilo e de carbamato de propilo
- Diluir as soluções-padrão de trabalho de carbamato de etilo (d.2) e de carbamato de propilo (e.2) com diclorometano de modo a obter:
1. (100 ng de carbamato de etilo e 400 ng de carbamato de propilo)/ml;
 2. (200 ng de carbamato de etilo e 400 ng de carbamato de propilo)/ml;
 3. (400 ng de carbamato de etilo e 400 ng de carbamato de propilo)/ml;
 4. (800 ng de carbamato de etilo e 400 ng de carbamato de propilo)/ml;
 5. (1 600 ng de carbamato de etilo e 400 ng de carbamato de propilo)/ml.
- g) Solução de teste de carbamato de etilo 100 ng/ml em etanol a 40 %:
- Transferir 1 ml da solução-padrão de trabalho de carbamato de etilo (d.2) para um balão aferido de 100 ml e diluir com etanol a 40 % até ao traço de calibração.
- h) Coluna de extracção em fase sólida — material descartável, pré-embalado com terra de diatomáceas, com 50 ml de capacidade.
- Nota:* Antes da primeira utilização de cada lote de colunas de extracção nas análises, verificar a recuperação do carbamato de etilo e do carbamato de propilo e comprovar a ausência de resposta para os iões de m/z 62, 74 e 89. Preparar a solução de teste de carbamato de etilo 100 ng/ml (g) e analisar 5,00 ml da mesma conforme descrito em D.a), E e F. Considera-se satisfatória uma recuperação de carbamato de etilo de 90-110 ng/ml. Os produtos absorventes de granulometria irregular podem gerar caudais muito baixos, o que afectará a recuperação do carbamato de etilo e do carbamato de propilo. Se, depois de várias tentativas, não forem obtidos 90-110 % da amostra de teste, mudar a coluna ou utilizar uma curva de calibração da recuperação corrigida para quantificar o carbamato de etilo. Para obter a curva de calibração corrigida, preparar soluções-padrão conforme descrito em f), utilizando etanol a 40 % em lugar de diclorometano.
- Analisar 1 ml da solução-padrão de calibração conforme descrito em D, E e F.
- Traçar uma nova curva de calibração utilizando a relação carbamato de etilo/carbamato de propilo dos padrões extraídos.

D. Preparação da amostra a analisar

Introduzir as quantidades a seguir indicadas do produto a analisar em dois copos de 100 ml:

- a) Vinhos com mais de 14 % vol. de álcool: 5,00 ml \pm 0,01 ml.
- b) Vinhos de teor alcoólico inferior ou igual a 14 % vol.: 20,00 ml \pm 0,01 ml.

Em cada copo, adicionar 1 ml da solução de padrão interno de carbamato de propilo, C.e.3, e a água necessária para obter um volume total de 40 ml (ou 40 g).

E. Extracção

Efectuar a extracção debaixo de um exaustor em funcionamento, com ventilação adequada.

Transferir a preparação produzida em D para a coluna de extracção.

Lavar o copo com 10 ml de água e transferir as águas de lavagem para a coluna.

Deixar que o líquido seja absorvido na coluna durante 4 minutos e eluir com 2×80 ml de diclorometano. Recolher o eluato num balão de fundo plano de 300 ml.

Evaporar o eluato até um volume de 2 a 3 ml no evaporador rotativo com banho de água a 30 °C. (*Nota:* Não deixar evaporar até à secura.)

Com uma pipeta de Pasteur, transferir o resíduo concentrado para um tubo graduado de 4 ml.

Lavar o balão com 1 ml de diclorometano e transferir o líquido de lavagem para o tubo. Concentrar o líquido obtido até ao volume de 1 ml sob ligeira corrente de azoto.

Se for caso disso, transferir o concentrado para um dos recipientes do injector automático de amostras para a análise por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa.

F. Análise por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa (sistema CG/EM)

a) Curva de calibração

Injectar 1 µl de cada solução-padrão de calibração, C.f), no sistema CG/EM. Traçar o gráfico respectivo, inscrevendo em ordenadas a razão das áreas CE/CP obtidas para o ião m/z 62 e em abcissas a concentração de carbamato de etilo em ng/ml (isto é, 100, 200, 400, 800 e 1 600 ng/ml).

b) Quantificação do carbamato de etilo

Injectar 1 µl do extracto concentrado obtido em E no sistema CG/EM e calcular a razão das áreas CE/CP para o ião m/z 62. Determinar a concentração (em ng/ml) de carbamato de etilo no extracto utilizando a curva de calibração obtida com o padrão interno. Calcular a concentração (em ng/ml) de carbamato de etilo na solução de teste dividindo a quantidade de carbamato de etilo (ng) no extracto pelo volume da solução de teste (ml).

c) Verificação da pureza do carbamato de etilo

Verificar se as respostas para os iões de m/z 62, 74 e 89 coincidem com o tempo de retenção do carbamato de etilo, pois trata-se das respostas características dos fragmentos principais $(M - C_2H_2)^+$ e $(M - CH_3)^+$ e do ião molecular (M), respectivamente. A presença de carbamato de etilo fica confirmada se as proporções relativas destes iões não se afastarem mais de 20 % das proporções relativas no padrão de carbamato de etilo. Para obter uma resposta satisfatória para o ião de m/z 89, pode ser necessário voltar a concentrar o extracto.

G. Teste interlaboratorial

O quadro reúne os resultados individuais obtidos para a amostra de treino e para os dois tipos de vinho.

Tanto no caso do vinho de teor alcoólico superior a 14 % vol., como no caso do vinho de teor alcoólico inferior ou igual a 14 % vol., a aplicação do teste de Cochran eliminou apenas um par de resultados, de laboratórios diferentes.

A reprodutibilidade relativa tende a diminuir com o aumento da concentração de carbamato de etilo.

Resultados obtidos com o método de determinação de carbamato de etilo (CE) em bebidas alcoólicas por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massa

Amostra	Média do carbamato de etilo determinado (ng/ml)	Recuperação do carbamato de etilo adicionado (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vinho com mais de 14 % vol.	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Vinho com menos de 14 % vol.	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86