

Este texto constitui um instrumento de documentação e não tem qualquer efeito jurídico. As Instituições da União não assumem qualquer responsabilidade pelo respetivo conteúdo. As versões dos atos relevantes que fazem fé, incluindo os respetivos preâmbulos, são as publicadas no Jornal Oficial da União Europeia e encontram-se disponíveis no EUR-Lex. É possível aceder diretamente a esses textos oficiais através das ligações incluídas no presente documento

► **B**

**REGULAMENTO (CE) N.º 2870/2000 DA COMISSÃO**

**de 19 de Dezembro de 2000**

**que estabelece métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas**

(JO L 333 de 29.12.2000, p. 20)

Alterado por:

		Jornal Oficial		
		n.º	página	data
► <b><u>M1</u></b>	Regulamento (CE) n.º 2091/2002 da Comissão de 26 de Novembro de 2002	L 322	11	27.11.2002
► <b><u>M2</u></b>	Regulamento de Execução (UE) 2016/635 da Comissão de 22 de abril de 2016	L 108	1	23.4.2016
► <b><u>M3</u></b>	Regulamento de Execução (UE) 2023/383 da Comissão de 16 de fevereiro de 2023	L 53	3	21.2.2023

**B****REGULAMENTO (CE) N.º 2870/2000 DA COMISSÃO****de 19 de Dezembro de 2000****que estabelece métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas***Artigo 1.º*

Os métodos de análise comunitários de referência aplicáveis no sector das bebidas espirituosas:

— em caso de controlo oficial, ou

— em caso de litígio,

a fim de garantir a observância do Regulamento (CEE) n.º 1576/89 e do Regulamento (CEE) n.º 1014/90 figuram no anexo do presente regulamento.

**M3***Artigo 1.º-A*

1. O presente regulamento é aplicável ao álcool etílico de origem agrícola na aceção do artigo 5.º do Regulamento (UE) 2019/787 do Parlamento Europeu e do Conselho <sup>(1)</sup>.

2. Os métodos de análise de referência da União aplicáveis ao álcool etílico de origem agrícola são os estabelecidos no anexo do presente regulamento.

3. Para efeitos do presente regulamento, o álcool etílico de origem agrícola é considerado um destilado cujo título alcoométrico volúmico é medido diretamente, em conformidade com o capítulo I, apêndice II, do anexo.

Não obstante, caso a amostra de álcool não seja límpida ou apresente partículas visíveis em suspensão, deve ser destilada.

4. Para a determinação de substâncias voláteis, é necessária uma calibração com a solução-padrão C preparada em etanol absoluto, para obter uma correspondência de matrizes adequada entre as amostras e as soluções-padrão descritas no capítulo III.2 do anexo.

<sup>(1)</sup> Regulamento (UE) 2019/787 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 17 de abril de 2019, relativo à definição, designação, apresentação e rotulagem das bebidas espirituosas, à utilização das denominações das bebidas espirituosas na apresentação e rotulagem de outros géneros alimentícios e à proteção das indicações geográficas das bebidas espirituosas, à utilização de álcool etílico e de destilados de origem agrícola na produção de bebidas alcoólicas, e que revoga o Regulamento (CE) n.º 110/2008 (JO L 130 de 17.5.2019, p. 1).

**▼M3**

5. Para a determinação de furfural, tal como descrito no capítulo X do anexo, o álcool etílico de origem agrícola deve ser diluído para metade por adição de água, de modo a duplicar o seu volume inicial e atingir um título alcoométrico volúmico compatível com as soluções de calibração. Os resultados da análise de furfural devem ser convertidos em gramas por hectolitro de álcool a 100 % vol., em conformidade com a equação «Concentração de furfural, em gramas por hectolitro de álcool a 100 % vol. = Concentração do furfural em mg/l × 10/título alcoométrico volúmico (% vol.)», em que o título alcoométrico volúmico (% vol.) é o título alcoométrico volúmico da amostra medida, tal como determinado no capítulo I do anexo.

6. Para a determinação do teor de <sup>14</sup>C do etanol, utiliza-se o método descrito no capítulo XI do anexo.

**▼B***Artigo 2.º*

Em derrogação do primeiro travessão do artigo 1.º, são admitidos outros métodos de análise, sob a responsabilidade do director do laboratório, desde que a exactidão e a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) dos mesmos sejam pelo menos equivalentes às dos métodos de análise de referência correspondentes, constantes do anexo.

*Artigo 3.º*

Quando não estiverem previstos métodos de análise comunitários de referência para a detecção e quantificação de substâncias presentes numa determinada bebida espirituosa, serão aplicáveis os métodos a seguir indicados:

- a) Métodos de análise validados por processos reconhecidos internacionalmente que satisfaçam, em especial, os critérios estabelecidos no anexo da Directiva 85/591/CEE;
- b) Métodos de análise conformes com as normas recomendadas pela Organização Internacional de Normalização (ISO);
- c) Métodos de análise reconhecidos pela Assembleia Geral da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e publicados por iniciativa desta;
- d) Na falta dos métodos referidos nas alíneas a), b) ou c), e com base em critérios de exactidão, repetibilidade e reprodutibilidade:
  - um método de análise aprovado pelo Estado-Membro em causa,
  - se necessário, qualquer outro método de análise apropriado.

*Artigo 4.º*

Para efeitos do disposto no presente regulamento, entende-se por:

- a) «Limite de repetibilidade», o valor abaixo ou ao nível do qual se situa, com uma probabilidade de 95 % {ISO 3534-1}, a diferença absoluta entre dois resultados experimentais obtidos em condições de repetibilidade (mesmo operador, mesma aparelhagem, mesmo laboratório, num curto intervalo de tempo);

**▼B**

- b) «Limite de reprodutibilidade», o valor abaixo ou ao nível do qual se situa, com uma probabilidade de 95 % {ISO 3534-1}, a diferença absoluta entre dois resultados experimentais obtidos em condições de reprodutibilidade (operadores diferentes, aparelhagem diferente e laboratórios diferentes);
- c) «Exactidão», o grau de acordo entre o resultado experimental e o valor de referência reconhecido {ISO 3534-1}.

*Artigo 5.º*

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

É aplicável a partir de 1 de Janeiro de 2001.

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

**▼ B***ANEXO***DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE DE REFERÊNCIA A SEGUIR INDICADOS**

- I. Apêndice I: Preparação do destilado
  - Apêndice II: Determinação da densidade do destilado
    - Método A = picnometria
    - Método B = densimetria electrónica
    - Método C = densimetria com balança hidrostática
- II. Determinação do extracto seco total (por gravimetria)
- III. Determinação das substâncias voláteis e do metanol
  - III.1. Observações gerais
  - III.2. Compostos congêneres voláteis: aldeídos, álcoois superiores, acetato de etilo e metanol (cromatografia em fase gasosa)
  - III.3. Acidez volátil ► **M2** ————— ◀
- IV. Ácido cianídrico (p.m.)
- V. Anetol ► **M1** ————— ◀
- VI. Ácido glicirrízico ► **M1** ————— ◀
- VII. Calconas ► **M1** ————— ◀
- VIII. Açúcares totais ► **M2** ————— ◀
- IX. Gema de ovo ► **M1** ————— ◀

**▼ M2**

- X. Determinação dos compostos de madeira: furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico e escopoletina

**▼ M3**

- XI. Determinação do teor de <sup>14</sup>C do etanol

**▼ B****I. MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DO TÍTULO ALCOOMÉTRICO VOLÚMICO DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS****Introdução**

O método de referência inclui dois apêndices:

Apêndice I: Preparação do destilado

Apêndice II: Determinação da densidade do destilado

**1. Âmbito**

O método é adequado para a determinação do título alcoométrico volúmico real de bebidas espirituosas.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987: Water for analytical use — Specifications and test methods (Água para fins analíticos — Especificações e métodos de ensaio)

**3. Termos e definições****3.1. Temperatura de referência:**

A temperatura de referência para a determinação do título alcoométrico volúmico, da densidade e da densidade relativa de bebidas espirituosas é 20 °C.

Nota 1: O termo «a t °C» é reservado para todas as determinações (de densidade ou título alcoométrico volúmico) expressas a temperaturas diferentes da temperatura de referência de 20 °C.

**3.2. Densidade**

Entende-se por «massa volúmica» a massa por unidade de volume de uma bebida espirituosa no vácuo a 20 °C. É expressa em quilograma por metro cúbico (símbolo  $\rho_{20\text{ °C}}$  ou  $\rho_{20}$ ).

**3.3. Densidade relativa:**

Entende-se por «densidade relativa» a relação, expressa como número decimal, entre a densidade da bebida espirituosa a 20 °C e a densidade da água à mesma temperatura. É utilizado o símbolo  $d_{20\text{ °C}/20\text{ °C}}$  ou  $d_{20/20}$  ou, quando não houver riscos de confusão, simplesmente d. A característica medida será obrigatoriamente especificada no certificado de análise através dos símbolos indicados.

Nota 2: A densidade relativa pode ser obtida a partir da densidade  $\rho_{20}$  a 20 °C:

$\rho_{20} = 998,203 \times d_{20/20}$  ou  $d_{20/20} = \rho_{20}/998,203$  em que 998,203 é a densidade da água a 20 °C.

**3.4. Título alcoométrico volúmico real:**

Entende-se por «título alcoométrico volúmico real» de uma bebida espirituosa o número de litros de álcool etílico contido em 100 l de uma mistura hidroalcoólica de densidade idêntica à da bebida espirituosa após destilação. Os valores de referência de título alcoométrico volúmico (% vol) a 20 °C em função da densidade a 20 °C a utilizar para diversas misturas hidroalcoólicas figuram no quadro internacional adoptado pela Organização Internacional de Metrologia Legal na sua Recomendação n.º 22.

A equação geral que relaciona o título alcoométrico volúmico e a densidade de uma mistura hidroalcoólica a uma dada temperatura figura na página 40, no capítulo 3, «Título alcoométrico volúmico», do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 da Comissão (JO L 272 de 3.10.1990, p. 1) ou no manual de métodos de análise da OIV (1994, p. 17).

**▼B**

Nota 3: No caso dos cremes e licores, cujos volumes é difícil medir com exactidão, pesa-se a amostra e começa-se por calcular o título alcoométrico mássico.

Fórmula de conversão:

$$\text{Título alcoométrico volúmico (\% vol)} = \frac{\text{TAM (\% m/m)} \times P_{20} (\text{amostra})}{P_{20} (\text{álcool})}$$

em que:

TAM = título alcoométrico mássico

$\rho_{20} (\text{álcool}) = 789,24 \text{ kg/m}^3$

**4. Princípio**

Destilação e determinação do título alcoométrico volúmico do destilado por picnometria, densimetria electrónica ou densimetria com uma balança hidrostática.

**▼B**

## APÊNDICE I: PREPARAÇÃO DO DESTILADO

1. **Âmbito**

Este método é adequado para a preparação de destilados destinados à determinação do título alcoométrico volúmico real de bebidas espirituosas.

2. **Princípio**

Destilação da bebida espirituosa para separar o álcool etílico e outros compostos voláteis das substâncias que não destilam.

3. **Material e reagentes**

3.1. Grânulos regularizadores da ebulição.

3.2. Emulsão antiespumante concentrada (para os licores cremosos).

4. **Aparelhagem e equipamento**

Aparelhagem corrente de laboratório, em particular:

4.1. Banho de água termostaticável entre 10 °C e 15 °C.

Banho de água termostaticável a 20 °C ( $\pm 0,2$  °C).

4.2. Balões volumétricos aferidos de 100 ml  $\pm 0,1$  % e 200 ml  $\pm 0,15$  % (classe A).

4.3. Aparelho de destilação:

## 4.3.1. Generalidades

O aparelho de destilação utilizado deve respeitar as seguintes especificações:

- minimização do número de uniões, com garantia de estanquidade do sistema,
- inclusão de um dispositivo destinado a evitar o arrastamento do líquido em ebulição pelo vapor e a regularizar a destilação dos vapores ricos em álcool,
- condensação rápida e total dos vapores alcoólicos,
- recolha das primeiras fracções de destilado num meio aquoso.

A fonte de calor deve estar equipada com um difusor de calor apropriado, para evitar reacções de tipo pirogénico por parte das matérias não destiladas.

4.3.2. A figura 1 representa um exemplo adequado de aparelho de destilação, constituída pelas seguintes partes:

- balão de fundo redondo de 1 litro, com junta de vidro esmerilado normalizada,
- coluna de rectificação com pelo menos 20 cm de altura (modelo Vigreux, por exemplo),
- elemento de união com condensador directo (tipo West) de aproximadamente 10 cm de comprimento, aplicado verticalmente,
- condensador de serpentina com 40 cm de comprimento,
- alonga de recolha do destilado com descarga no fundo de um balão graduado no qual foi introduzida uma pequena quantidade de água,

Nota: O aparelho acima descrito está previsto para amostras de, pelo menos, 200 ml. Pode, porém, ser adaptado a uma amostra mais pequena, desde que se utilize um balão de destilação mais pequeno munido de uma cabeça antiprojecções ou de outro dispositivo que evite arrastamentos.

**▼ B****5. Conservação da amostra a analisar**

As amostras são mantidas à temperatura ambiente antes da análise.

**6. Técnica**

Observação preliminar:

A destilação pode ser igualmente efectuada pelo método publicado pela IUPAC (1968).

**6.1. Verificação do aparelho de destilação.**

O aparelho utilizado deve permitir que:

A destilação de 200 ml de uma solução hidroalcoólica de concentração conhecida próxima de 50 % vol não origine perdas de álcool superiores a 0,1 % vol.

**6.2. Bebidas espirituosas de título alcoométrico inferior a 50 % vol.**

Medir 200 ml da bebida espirituosa num balão volumétrico.

Registar a temperatura do líquido ou manter o mesmo à temperatura normalizada (20 °C).

Vazar a amostra para o balão de fundo redondo do aparelho de destilação e lavar o balão volumétrico com três volumes de aproximadamente 20 ml de água destilada. Juntar as águas de lavagem ao conteúdo do balão de destilação.

Nota: Esta diluição de 60 ml é suficiente para as bebidas espirituosas com menos de 250 g de extracto seco por litro. Caso contrário, para evitar reacções de pirólise, o volume das águas de lavagem deve ser, no mínimo, de 70 ml, se a concentração de extracto seco for de 300 g/l, 85 ml, para 400 g de extracto seco por litro, ou 100 ml, para 500 g de extracto seco por litro (caso de alguns cremes ou licores de frutos). Estes volumes serão ajustados proporcionalmente se o volume da amostra for diferente.

Introduzir alguns grânulos regularizadores da ebulição (3.1) (e antiespumante no caso dos licores cremosos).

Introduzir 20 ml de água destilada no balão volumétrico de 200 ml inicial, que será utilizado para recolher o destilado. Colocar o balão num banho de água fria (4.1) (10 °C a 15 °C no caso das bebidas espirituosas anisadas).

Proceder à destilação, evitando os fenómenos de arrastamento e de carbonização e agitando de vez em quando o conteúdo do balão, até que o nível de destilado se situe alguns milímetros abaixo do traço de aferição do balão volumétrico.

Quando a temperatura do destilado recolhido tiver baixado para a temperatura inicial do líquido  $\pm 0,5$  °C, completar o volume com água destilada até ao traço de aferição e homogeneizar.

Este destilado será utilizado na determinação do título alcoométrico volumétrico (apêndice II).

**6.3. Bebidas espirituosas de título alcoométrico superior a 50 % vol.**

Medir 100 ml da bebida espirituosa com um balão volumétrico de 100 ml e vazar o líquido para o balão de fundo redondo do aparelho de destilação.

Lavar várias vezes o balão volumétrico com água destilada e juntar as águas de lavagem ao conteúdo do balão de destilação de fundo redondo. Utilizar água suficiente para que o conteúdo do balão atinja cerca de 230 ml.

**▼B**

Introduzir 20 ml de água destilada num balão volumétrico de 200 ml, que será utilizado para recolher o destilado. Colocar o balão num banho de água fria (4.1) (10 °C a 15 °C no caso das bebidas espirituosas anisadas).

Proceder à destilação, agitando de vez em quando o conteúdo do balão, até que o nível de destilado se situe alguns milímetros abaixo do traço de aferição do balão volumétrico de 200 ml.

Quando a temperatura do destilado recolhido tiver baixado para a temperatura inicial do líquido  $\pm 0,5$  °C, completar o volume com água destilada até ao traço de aferição e homogeneizar.

Este destilado será utilizado na determinação do título alcoométrico volúmico (apêndice II).

Nota: O título alcoométrico volúmico da bebida espirituosa é o dobro do título alcoométrico volúmico do destilado.

**▼B**

## APÊNDICE II: DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DO DESTILADO

**MÉTODO A: DETERMINAÇÃO DO TÍTULO ALCOOMÉTRICO VOLÚMICO REAL DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR PICNOMETRIA****A.1. Princípio**

Determinação do título alcoométrico volúmico a partir da densidade do destilado, medida por picnometria.

**A.2. Material e reagentes**

Salvo indicação em contrário, utilizar na análise apenas reagentes *pro analyse* reconhecidos e água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696:1987).

**A.2.1. Solução de cloreto de sódio (2 % m/v).**

Para preparar 1 litro de solução, pesar 20 g de cloreto de sódio e dissolver com água até completar 1 litro.

**A.3. Aparelhagem e equipamento**

Aparelhagem corrente de laboratório, em particular:

**A.3.1. Balança analítica com leitura mínima de 0,1 mg.****A.3.2. Termómetro certificado ou verificado com um termómetro certificado, com junta de vidro esmerilado, calibrado em décimas de grau entre 10 °C e 30 °C.****A.3.3. Picnómetro de vidro Pyrex, com cerca de 100 ml de capacidade, dotado de um termómetro amovível com junta de vidro esmerilado (A.3.2). O picnómetro deve dispor de um tubo lateral com 25 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno máximo com extremidade em junta cónica esmerilada. Em caso de necessidade, poderão ser utilizados outros picnómetros descritos na norma ISO 3507, por exemplo de 50 ml.****A.3.4. Frasco-tara com volume exterior idêntico ao do picnómetro (aproximação de 1 ml) e massa igual à do picnómetro cheio com um líquido de densidade 1,01 (solução de cloreto de sódio A.2.1).****A.3.5. Camisa termicamente isolada à qual o picnómetro seja perfeitamente adaptável.**

Nota 1: O método de determinação da densidade de bebidas espirituosas no vácuo requer a utilização de uma balança de dois pratos, de um picnómetro e de um frasco-tara com o mesmo volume exterior, para cancelar permanentemente o efeito da impulsão do ar. Esta técnica simples pode ser aplicada utilizando uma balança de prato único, desde que o frasco-tara seja pesado a seguir, para atender às variações de impulsão do ar ao longo do tempo.

**A.4. Técnica**

Observações preliminares:

Esta técnica descreve a utilização de um picnómetro de 100 ml na determinação do título alcoométrico, para melhor exactidão. Pode, porém, ser utilizado um picnómetro mais pequeno, por exemplo de 50 ml.

**A.4.1. Calibração do picnómetro**

A calibração do picnómetro implica a determinação dos seguintes parâmetros:

- tara do picnómetro vazio,
- volume do picnómetro a 20 °C,
- massa do picnómetro cheio de água a 20 °C.

**▼B**

## A.4.1.1. Calibração com uma balança de prato único

Determinar:

- massa (P) do picnómetro limpo e seco,
- massa (P1) do picnómetro cheio de água a t °C,
- massa (T0) do frasco-tara.

## A.4.1.1.1. Pesar o picnómetro limpo e seco, determinando P.

## A.4.1.1.2. Encher cuidadosamente o picnómetro com água destilada à temperatura ambiente e adaptar o termómetro.

Secar cuidadosamente o exterior do picnómetro e colocá-lo na camisa termicamente isolada. Agitar, por inversões, até obter uma leitura de temperatura constante.

Regular o nível do picnómetro pela extremidade superior do seu tubo lateral. Ler cuidadosamente a temperatura e, se necessário, corrigir esta última de eventuais inexactidões da escala de temperaturas.

Pesar o picnómetro cheio de água, determinando P1.

## A.4.1.1.3. Pesar o frasco-tara, determinando T0.

## A.4.1.1.4. Cálculos

- Tara do picnómetro vazio = P – m

em que m é a massa do ar contido no picnómetro.

$$m = 0,0012 \times (P1 - P)$$

Nota 2: 0,0012 é a densidade do ar seco a 20 °C à pressão de 760 mm Hg.

- Volume do picnómetro a 20 °C:

$$V_{20\text{ °C}} = [P1 - (P - m)] \times F_t$$

em que  $F_t$  é o factor correspondente à temperatura t °C constante do quadro I do capítulo 1, «Massa volúmica e densidade relativa», do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 (p. 10).

$V_{20\text{ °C}}$  será obrigatoriamente conhecido com uma aproximação de 0,001 ml.

- Massa da água contida no picnómetro a 20 °C:

$$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$$

em que 0,998203 é a densidade da água a 20 °C.

Nota 3: Se necessário, pode utilizar-se o valor de 0,99715 para a densidade no ar e calcular o título alcoométrico com base na densidade correspondente no ar constante dos quadros utilizados pelos serviços aduaneiros e de impostos especiais sobre o consumo do Reino Unido; nesse caso, não será feita qualquer correcção pela massa de ar deslocada do picnómetro.

## A.4.1.2. Calibração com uma balança de dois pratos

## A.4.1.2.1. Colocar o frasco-tara no prato do lado esquerdo e o picnómetro limpo e seco, com a tampa de expansão, no prato do lado direito. Equilibrar os pratos colocando pesos no lado do picnómetro: p gramas

**▼ B**

A.4.1.2.2. Encher cuidadosamente o picnómetro com água destilada à temperatura ambiente e adaptar o termómetro. Secar cuidadosamente o exterior do picnómetro e colocá-lo na camisa termicamente isolada. Agitar, por inversões, até obter uma leitura de temperatura constante.

Regular o nível do picnómetro pela extremidade superior do seu tubo lateral. Limpar o tubo lateral e colocar a tampa de expansão. Ler cuidadosamente a temperatura  $t$  °C e, se necessário, corrigir esta última de eventuais inexactidões da escala de temperaturas.

Pesar o picnómetro cheio de água, determinando a massa ( $p'$ ), em grama, necessária para estabelecer o equilíbrio.

A.4.1.2.3. Cálculos

— Tara do picnómetro vazio =  $p + m$

em que  $m$  é a massa do ar contido no picnómetro.

$$m = 0,0012 \times (p - p')$$

— Volume do picnómetro a 20 °C:

$$V_{20\text{°C}} = (p + m - p') \times F_t$$

em que  $F_t$  é o factor correspondente à temperatura  $t$  °C constante do quadro I do capítulo 1, «Massa volúmica e densidade relativa», do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 (p. 10).

$V_{20\text{°C}}$  será obrigatoriamente conhecido com uma aproximação de 0,001 ml.

— Massa da água contida no picnómetro a 20 °C:

$$M_{20\text{°C}} = V_{20\text{°C}} \times 0,998203$$

em que 0,998203 é a densidade da água a 20 °C.

A.4.2. Determinação do título alcoométrico da amostra em análise

A.4.2.1. Utilização de uma balança de prato único.

A.4.2.1.1. Pesar o frasco-tara, determinando T1.

A.4.2.1.2. Pesar o picnómetro com o destilado preparado (ver o apêndice I), determinando a sua massa, P2, a  $t$  °C.

A.4.2.1.3. Cálculos

—  $dT = T1 - T0$ .

— Massa do picnómetro vazio no momento da medição:

$$= P - m + dT.$$

— (Massa do líquido contido no picnómetro a  $t$  °C:

$$= P2 - (P - m + dT).$$

— Densidade a  $t$  °C em g/ml:

$$P_{t\text{°C}} = [P2 - (P - m + dT)] / V_{20\text{°C}}$$

— A densidade a  $t$  °C ( $\rho_t$ ) é expressa em kg/m<sup>3</sup> multiplicando  $\rho_{t\text{°C}}$  por 1 000.

— Corrigir  $\rho_t$  para  $\rho_{20}$  utilizando o quadro de densidades  $\rho_T$  para misturas hidroalcoólicas (quadro II do apêndice II do manual de métodos de análise da OIV, 1994, p. 17-29).

**▼B**

Localizar no quadro, na linha horizontal correspondente à temperatura inteira T imediatamente inferior a  $t$  °C, a densidade imediatamente superior a  $\rho_t$ . Utilizar a diferença constante do quadro situada abaixo dessa densidade para calcular a densidade  $\rho_t$  da bebida espirituosa a essa temperatura inteira T.

- Utilizando a linha correspondente a essa temperatura inteira, calcular a diferença entre a densidade  $\rho'$  constante do quadro imediatamente superior a  $\rho_t$  e a densidade calculada  $\rho_t$ . Dividir essa diferença pela diferença constante do quadro à direita da densidade  $\rho'$ . O quociente constitui a parte decimal do título alcoométrico; a parte inteira do título alcoométrico encontra-se no topo da coluna em que figura a densidade  $\rho'$  (título alcoométrico Dt).

Nota 4: Outra possibilidade é manter o picnómetro num banho de água a  $20\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$  quando se estiver a completar o volume até ao traço de aferição.

## A.4.2.1.4. Resultado

Calcular o título alcoométrico real com base na densidade  $\rho_{20}$  e no quadro de título alcoométrico a seguir especificado:

Quadro internacional do título alcoométrico volúmico (% vol) de misturas hidroalcoólicas a  $20\text{ °C}$  em função da densidade a  $20\text{ °C}$  adoptado pela Organização Internacional de Metrologia Legal na sua Recomendação n.º 22.

## A.4.2.2. Utilização de uma balança com um único prato

A.4.2.2.1. Pesar o picnómetro com o destilado preparado (ver a parte I), determinando a sua massa,  $p''$ , a  $t$  °C.

## A.4.2.2.2. Cálculos

- Massa do líquido contido no picnómetro a  $t$  °C:

$$= p + m - p''.$$

- Densidade a  $t$  °C em g/ml:

$$P_{t\text{ °C}} = (p + m - p'')/V_{20\text{ °C}}$$

- A densidade a  $t$  °C é expressa em  $\text{kg/m}^3$  e corrigida em função da temperatura, calculando-se o título alcoométrico a  $20\text{ °C}$  conforme descrito para o caso da utilização de uma balança com um único prato.

A.5. **Características operacionais do método (precisão)**

## A.5.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

Ano de realização do teste interlaboratorial	1997
Número de laboratórios participantes	20
Número de amostras	6

▼ **B**

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	19	20	17	19	19	17
Número de casos anómalos (laboratórios)	1	—	2	1	1	3
Número de resultados aceite	38	40	34	38	38	34
Valor médio ( $\bar{x}$ ) % vol	23,77	40,04	40,29	39,20	42,24	57,03
	26,51 (*)			42,93 (*)	45,73 (*)	63,03 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) % vol	0,106	0,176	0,072	0,103	0,171	0,190
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	0,42	0,44	0,18	0,25	0,39	0,32
Limite de repetibilidade ( $r$ ) % vol	0,30	0,49	0,20	0,29	0,48	0,53
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) % vol	0,131	0,236	0,154	0,233	0,238	0,322
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	0,52	0,59	0,38	0,57	0,54	0,53
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) % vol	0,37	0,66	0,43	0,65	0,67	0,90

Tipos de amostra:

- A Licor de frutos; duplicados com teores diferentes (\*).  
 B Brandy; duplicados cegos.  
 C Whisky; duplicados cegos.  
 D Grappa; duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Aquavit; duplicados com teores diferentes (\*).  
 F Rum; duplicados com teores diferentes (\*).

**MÉTODO B: DETERMINAÇÃO DO TÍTULO ALCOOMÉTRICO VOLÚMICO REAL DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR DENSIMETRIA ELECTRÓNICA (BASEADO NA FREQUÊNCIA DE OSCILAÇÃO DE RESSONÂNCIA DA AMOSTRA NUMA CÉLULA DE OSCILAÇÃO)**

**B.1. Princípio**

Determinação da densidade do líquido por medição electrónica das oscilações de um tubo em U sujeito a vibração. Esta medição baseia-se na alteração, pela massa da amostra adicionada, da frequência específica de oscilação de um sistema em oscilação.

**B.2. Material e reagentes**

Salvo indicação em contrário, utilizar na análise apenas reagentes *pro analyse* reconhecidos e água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696:1987).

B.2.1. Acetona (CAS 666-52-4) ou álcool absoluto.

B.2.2. Ar seco.

**B.3. Aparelhagem e equipamento**

Aparelhagem corrente de laboratório, em particular:

B.3.1. Densímetro de visor digital

O densímetro electrónico utilizado nas medições deve ser tal que a densidade possa ser expressa em g/ml com cinco casas decimais.

**▼B**

Nota 1: O densímetro deve ser colocado numa posição perfeitamente estável, isolado de qualquer vibração.

## B.3.2. Regulação da temperatura

As leituras do densímetro só serão validadas se a célula de medição estiver ligada a um regulador de temperatura incorporado que garanta, pelo menos, uma estabilidade de temperatura de  $\pm 0,02$  °C.

Nota 2: Uma regulação e um controlo precisos da temperatura na célula de medição assumem grande importância, pois um erro de 0,1 °C pode originar uma variação de densidade da ordem de 0,1 kg/m<sup>3</sup>.

## B.3.3. Seringas de injeção de amostras ou injector automático de amostras.

B.4. **Técnica**

## B.4.1. Calibração do densímetro

Calibrar o aparelho de acordo com as instruções de funcionamento do fabricante quando da primeira colocação em serviço. Proceder à sua recalibração regular e ao confronto com um padrão de referência certificado ou com uma solução de referência interna do laboratório aferida por um padrão de referência certificado.

## B.4.2. Determinação da densidade da amostra

B.4.2.1. Se necessário, limpar a célula com acetona ou álcool absoluto e secar com ar seco antes da medição. Lavar a célula com a amostra.

B.4.2.2. Injectar a amostra na célula com uma seringa ou um injector automático, enchendo-a completamente. Eliminar todas as bolhas de ar durante o enchimento. A amostra deve apresentar-se homogénea e não deve conter partículas sólidas. As matérias em suspensão eventualmente presentes devem ser removidas por filtração antes da análise.

B.4.2.3. Logo que a leitura estabilizar, registar a densidade  $\rho_{20}$  ou o título alcoométrico indicado pelo densímetro.

## B.4.3. Resultados

Quando for utilizada a densidade  $\rho_{20}$ , calcular o título alcoométrico real com base nos quadros de título alcoométrico a seguir especificados.

Quadro internacional do título alcoométrico volúmico (% vol) de misturas hidroalcoólicas a 20 °C em função da densidade a 20 °C adoptado pela Organização Internacional de Metrologia Legal na sua Recomendação n.º 22.

B.5. **Características operacionais do método (precisão)**

## B.5.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

Ano de realização do teste interlaboratorial	1997
Número de laboratórios participantes	16
Número de amostras	6

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	11	13	15	16	14	13
Número de casos anómalos (laboratórios)	2	3	1	—	1	2

## ▼ B

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de resultados aceite	22	26	30	32	28	26
Valor médio ( $\bar{x}$ ) % vol	23,81	40,12	40,35	39,27	42,39	56,99
	26,52 (*)			43,10 (*)	45,91 (*)	63,31 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) % vol	0,044	0,046	0,027	0,079	0,172	0,144
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	0,17	0,12	0,07	0,19	0,39	0,24
Límite de repetibilidade ( $r$ ) % vol	0,12	0,13	0,08	0,22	0,48	0,40
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) % vol	0,054	0,069	0,083	0,141	0,197	0,205
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	0,21	0,17	0,21	0,34	0,45	0,34
Límite de reprodutibilidade ( $R$ ) % vol	0,15	0,19	0,23	0,40	0,55	0,58

Tipos de amostra:

- A Licor de frutos; duplicados com teores diferentes (\*).
- B Brandy; duplicados cegos.
- C Whisky; duplicados cegos.
- D Grappa; duplicados com teores diferentes (\*).
- E Aquavit; duplicados com teores diferentes (\*).
- F Rum; duplicados com teores diferentes (\*).

### MÉTODO C: DETERMINAÇÃO DO TÍTULO ALCOOMÉTRICO VOLUMICO REAL DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR DENSIMETRIA COM UMA BALANÇA HIDROSTÁTICA

#### C.1. Princípio

Determinação, por densimetria, com base no princípio de Arquimedes (segundo o qual um corpo imerso num líquido está sujeito a uma impulsão vertical do líquido, dirigida para cima, igual ao peso do líquido deslocado), do título alcoométrico de bebidas espirituosas com uma balança hidrostática.

#### C.2. Material e reagentes

Salvo indicação em contrário, utilizar na análise apenas reagentes *pro analyse* reconhecidos e água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696:1987).

##### C.2.1. Solução de lavagem do flutuador (hidróxido de sódio a 30 %, m/v)

Para preparar 100 ml, pesar 30 g de hidróxido de sódio e completar o volume com etanol a 96 % (v/v).

#### C.3. Aparelhagem e equipamento

Aparelhagem corrente de laboratório, em particular:

##### C.3.1. Balança hidrostática de prato único com sensibilidade de 1 mg.

##### C.3.2. Flutuador com volume mínimo de 20 ml, especialmente adaptado à balança, suspenso por um fio de diâmetro não superior a 0,1 mm.

##### C.3.3. Proveta cilíndrica de medição com uma marca de nível. A proveta deve ser tal que o flutuador caiba completamente no volume localizado abaixo da marca de nível. A superfície do líquido só pode ser atravessada pelo fio de suspensão. O diâmetro interno da proveta deve exceder em pelo menos 6 mm o diâmetro do flutuador.

**▼ B**

C.3.4. Termómetro (ou sonda de medição da temperatura) graduado em graus e décimas de grau entre 10 °C e 40 °C, calibrado com uma exactidão de 0,05 °C.

C.3.5. Pesos calibrados por um organismo de certificação reconhecido.

Nota 1: Também pode ser utilizada uma balança de dois pratos, cujo princípio de aplicação é descrito no capítulo 1, «Massa volumica e densidade relativa», do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 (p. 7).

**C.4. Técnica**

Entre cada medição, lavar o flutuador e a proveta com água destilada, secar com um papel macio de laboratório que não liberte fibras e enxaguar com a solução cuja densidade se pretende determinar. Proceder às medições logo que a aparelhagem estabilize, para limitar as perdas de álcool por evaporação.

**C.4.1. Calibração da balança**

Embora as balanças possuam, em geral, um sistema de calibração interno, a balança hidrostática utilizada deve poder ser calibrada com pesos certificados por um organismo oficial.

**C.4.2. Calibração do flutuador**

C.4.2.1. Encher a proveta até à marca com água bidestilada (ou água de pureza equivalente, por exemplo microfiltrada, com uma condutividade de 18,2 MΩ/cm), a uma temperatura compreendida entre 15 °C e 25 °C, de preferência a 20 °C.

C.4.2.2. Mergulhar o flutuador e o termómetro, agitar, efectuar a leitura da densidade do líquido no aparelho e, se necessário, corrigir a leitura, de modo que seja igual à da água à temperatura de medição.

**C.4.3. Verificação de controlo com uma solução hidroalcoólica**

C.4.3.1. Encher a proveta até à marca com uma mistura hidroalcoólica de título conhecido a uma temperatura compreendida entre 15 °C e 25 °C, de preferência a 20 °C.

C.4.3.2. Mergulhar o flutuador e o termómetro, agitar e efectuar a leitura da densidade do líquido no aparelho (ou do título alcoométrico, se o aparelho o permitir). O título alcoométrico assim determinado deve ser idêntico ao anterior.

Nota 2: Esta solução de título alcoométrico conhecido pode ser utilizada para calibrar o flutuador, em vez de água bidestilada.

C.4.4. Determinação da densidade do destilado (ou do título alcoométrico, se o aparelho o permitir)

C.4.4.1. Verter a amostra em análise para a proveta até ao traço de graduação.

C.4.4.2. Mergulhar o flutuador e o termómetro, agitar e efectuar a leitura da densidade do líquido no aparelho (ou do título alcoométrico, se tal for possível). Se a densidade ( $\rho_t$ ) for determinada a  $t$  °C, registar a temperatura.

C.4.4.3. Corrigir  $\rho_t$  para  $\rho_{20}$  utilizando o quadro de densidades  $\rho_T$  para misturas hidroalcoólicas (quadro II do apêndice II do manual de métodos de análise da OIV, 1994, p. 17-29).

**C.4.5. Lavagem do flutuador e da proveta de medição**

C.4.5.1. Mergulhar o flutuador na solução de limpeza do mesmo contida na proveta.

**▼ B**

C.4.5.2. Manter o flutuador mergulhado durante uma hora, rodando-o de vez em quando.

C.4.5.3. Enxaguar com quantidades generosas de água da torneira, seguida de água destilada.

C.4.5.4. Secar com um papel macio de laboratório que não liberte fibras.

Proceder desta forma antes da primeira utilização do flutuador e depois, regularmente, sempre que necessário.

C.4.6. Resultados

Calcular o título alcoométrico real com base na densidade  $\rho_{20}$  e no quadro de título alcoométrico a seguir especificado.

Quadro internacional do título alcoométrico volúmico (% vol) de misturas hidroalcoólicas a 20 °C em função da densidade a 20 °C adoptado pela Organização Internacional de Metrologia Legal na sua Recomendação n.º 22.

**C.5. Características operacionais do método (precisão)**

C.5.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 12

Número de amostras 6

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	12	10	11	12	11	9
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	2	1	—	1	2
Número de resultados aceite	24	20	22	24	22	18
Valor médio ( $\bar{x}$ ) % vol	23,80	40,09	40,29	39,26	42,38	57,16
	26,51 (*)			43,09 (*)	45,89 (*)	63,44 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) % vol	0,048	0,065	0,042	0,099	0,094	0,106
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	0,19	0,16	0,10	0,24	0,21	0,18
Limite de repetibilidade (r) % vol	0,13	0,18	0,12	0,28	0,26	0,30
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) % vol	0,060	0,076	0,073	0,118	0,103	0,125
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD <sub>R</sub> ) (%)	0,24	0,19	0,18	0,29	0,23	0,21
Limite de reprodutibilidade (R) % vol	0,17	0,21	0,20	0,33	0,29	0,35

Tipos de amostra:

A Licor de frutos; duplicados com teores diferentes (\*).

B Brandy; duplicados cegos.

C Whisky; duplicados cegos.

D Grappa; duplicados com teores diferentes (\*).

E Aquavit; duplicados com teores diferentes (\*).

F Rum; duplicados com teores diferentes (\*).

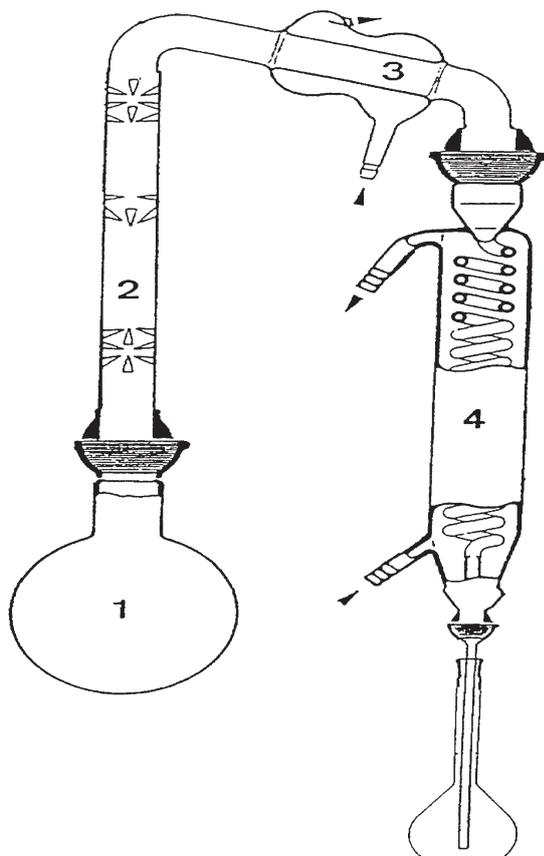
**▼B**

Figura 1. Aparelho de destilação para a determinação do título alcoométrico volúmico de bebidas espirituosas

1. Balão de fundo redondo de 1 litro com junta esférica de vidro esmerilado normalizada.
2. Coluna de rectificação de Vigreux com 20 cm.
3. Condensador directo (tipo West) de 10 cm.
4. Condensador de serpentina de 40 cm.

**▼B****II. DETERMINAÇÃO DO EXTRACTO SECO TOTAL DE BEBIDAS  
ESPIRITUOSAS POR GRAVIMETRIA****1. Âmbito**

O Regulamento (CEE) n.º 1576/89 só prevê a aplicação deste método à aquavit, cujo extracto seco não poderá exceder 15 g/l.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987 Water for analytical use — Specifications and test methods (Água para fins analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**3. Definição**

O extracto seco total ou matéria seca total inclui todas as matérias não voláteis em condições físicas especificadas.

**4. Princípio**

Evaporação da bebida espirituosa num banho de água em ebulição, secagem em estufa e pesagem do extracto.

**5. Aparelhagem e equipamento**

5.1. Placa de evaporação cilíndrica de fundo plano com 55 mm de diâmetro.

5.2. Banho de água em ebulição.

5.3. Pipeta de 25 ml da classe A.

5.4. Estufa.

5.5. Exsicador.

5.6. Balança analítica com exactidão de 0,1 mg.

**6. Colheita de amostras e amostras**

Antes da análise conservar as amostras à temperatura ambiente.

**7. Técnica**

7.1. Pipetar 25 ml da bebida espirituosa, cujo extracto seco deve ser inferior a 15 g/l, para uma placa de evaporação cilíndrica de fundo plano com 55 mm de diâmetro, previamente tarada. Durante a primeira hora de evaporação, a placa deve permanecer sobre a tampa do banho de água, para evitar que o líquido entre em ebulição, o que poderia provocar perdas por projecção. Seguidamente, deixar a placa mais uma hora em contacto directo com o vapor produzido pelo banho de água.

7.2. Colocar a placa numa estufa regulada para  $105\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  e completar a secagem durante duas horas. Colocar a placa de evaporação num exsicador, deixar arrefecer e pesar a placa com o seu conteúdo.

**8. Cálculos**

A massa do extracto multiplicada por 40 corresponde ao extracto seco da bebida espirituosa, sendo este expresso em g/l, com uma casa decimal.

**9. Características operacionais do método (precisão)****9.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial**

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

Ano de realização do teste interlaboratorial	1997
Número de laboratórios participantes	10
Número de amostras	4

**▼ B**

Amostras	A	B	C	D
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	9	9	8	9
Número de casos anómalos (laboratórios)	1	1	2	—
Número de resultados aceite	18	18	16	18
Valor médio ( $\bar{x}$ ) g/l	9,0	9,1	10,0	11,8
		7,8	9,4	11,1
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) g/l	0,075	0,441	0,028	0,123
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	0,8	5,2	0,3	1,1
Limite de repetibilidade ( $r$ ) g/l	0,2	1,2	0,1	0,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) g/l	0,148	0,451	0,058	0,210
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	1,6	5,3	0,6	1,8
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) g/l	0,4	1,3	0,2	0,6

Tipos de amostra:

A Brandy; duplicados cegos.

B Rum; duplicados com teores diferentes.

C Grappa; duplicados com teores diferentes.

D Aquavit; duplicados com teores diferentes.

**▼B****III. DETERMINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS E DE METANOL DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS****III.1. OBSERVAÇÕES GERAIS****1. Definições**

O Regulamento (CEE) n.º 1576/89 estabelece teores mínimos de compostos voláteis, além do etanol e do metanol, para uma série de bebidas espirituosas (rum, bebidas espirituosas de origem vitícola, bebidas espirituosas derivadas de frutos, etc.). Por convenção, e apenas para essas bebidas, considera-se que os teores em questão equivalem à soma das seguintes concentrações:

1. Ácidos voláteis, expressos em ácido acético;
2. Aldeídos, expressos em etanal através do somatório do etanal (acetaldeído) e das fracções etanálticas do 1,1-dietoxietano (acetal);
3. Os seguintes álcoois superiores: 1-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 2-metil-1-propanol, expressos enquanto álcoois individualizados, e 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, determinados enquanto álcoois individualizados ou os dois em conjunto;

4. Acetato de etilo.

Os métodos convencionados para a determinação dos compostos voláteis são os seguintes:

— ácidos voláteis: acidez volátil,

— aldeídos (etanal e acetal), acetato de etilo e álcoois: cromatografia em fase gasosa.

**2. Análise de compostos voláteis por cromatografia em fase gasosa**

A pesquisa por cromatografia em fase gasosa de compostos voláteis distintos dos acima indicados poderá ser um método particularmente interessante para determinar a origem das matérias-primas utilizadas na destilação e das condições reais em que esta última decorreu.

Algumas bebidas espirituosas contêm outros compostos voláteis, nomeadamente compostos aromáticos, característicos das matérias-primas utilizadas na obtenção do álcool, dos aromatizantes da bebida e de aspectos específicos da preparação desta. Esses compostos são importantes para avaliar a satisfação dos requisitos do Regulamento (CEE) n.º 1576/89.

**III.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS APARENTADOS EM BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR CROMATOLOGRAFIA EM FASE GASOSA: ALDEÍDOS, ÁLCOOIS SUPERIORES, ACETATO DE ETILO E METANOL****1. Âmbito**

Este método é adequado para a determinação de 1,1-dietoxietano (acetal), 2-metil-1-butanol (álcool amílico), 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), metanol (álcool metílico), etanoato de etilo (acetato de etilo), 1-butanol (n-butanol), 2-butanol (sec-butanol), 2-metil-1-propanol (álcool isobutílico), 1-propanol (n-propanol) e etanal (acetaldeído) em bebidas espirituosas por cromatografia em fase gasosa. O método recorre a um padrão interno, por exemplo o 3-pentanol. As concentrações dos analitos são expressas em grama por 100 litros de álcool absoluto. Antes da análise é necessário determinar o título alcoométrico do produto. Entre as bebidas que podem ser analisadas por este método contam-se o whisky, o brandy, o rum, a aguardente de vinho, as aguardentes de frutos e a aguardente de bagaço de uvas.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987: Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**▼ B****3. Definição**

Entende-se por «compostos aparentados» as substâncias voláteis formadas juntamente com o etanol durante a fermentação, destilação ou maturação de bebidas espirituosas.

**4. Princípio**

A determinação dos compostos aparentados presentes numa bebida espirituosa é efectuada por injeção directa da mesma, eventualmente diluída, num sistema de cromatografia em fase gasosa. Antes da injeção é adicionado à bebida espirituosa um padrão interno adequado. A separação dos compostos aparentados é efectuada por programação da temperatura numa coluna apropriada e a detecção é efectuada com um detector de ionização de chama. A concentração de cada composto aparentado em relação ao padrão interno é determinada com base nos factores de resposta obtidos durante uma calibração efectuada em condições cromatográficas idênticas às seguidas na análise da bebida espirituosa.

**5. Material e reagentes**

Salvo indicação em contrário, utilizar apenas reagentes de pureza superior a 97 % adquiridos a um fornecedor acreditado (ISO) e acompanhados de um certificado de pureza, isentos de outros compostos aparentados na diluição utilizada nas análises (a confirmar por injeção de padrões de cada composto aparentado, à diluição utilizada nas análises, nas condições especificadas no ponto 6.4 para a cromatografia em fase gasosa), e exclusivamente água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696). O acetal e o acetaldeído serão conservados ao abrigo da luz e a temperatura inferior a 5 °C; os restantes reagentes podem ser mantidos à temperatura ambiente.

- 5.1. Etanol absoluto (CAS 64-17-5).
- 5.2. Metanol (CAS 67-56-1).
- 5.3. 1-Propanol (CAS 71-23-8).
- 5.4. 2-Metil-1-propanol (CAS 78-33-1).
- 5.5. Padrões internos aceitáveis: 3-pentanol (CAS 584-02-1), 1-pentanol (CAS 71-41-0), 4-metil-1-pentanol (CAS 626-89-1) ou nonanoato de metilo (CAS 1731-84-6).
- 5.6. 2-Metil-1-butanol (CAS 137-32-6).
- 5.7. 3-Metil-1-butanol (CAS 123-51-3).
- 5.8. Acetato de etilo (CAS 141-78-6).
- 5.9. 1-Butanol (CAS 71-36-3).
- 5.10. 2-Butanol (CAS 78-92-2).
- 5.11. Acetaldeído (CAS 75-07-0).
- 5.12. Acetal (CAS 105-57-7).
- 5.13. Solução a 40 % (v/v) de etanol.

Para preparar uma solução de etanol 400 ml/l, deitar 400 ml de etanol (5.1) num balão volumétrico de 1 litro, completar o volume com água e homogeneizar bem.

**▼ M3**

- 5.13.-A. Apenas para o álcool etílico de origem agrícola: etanol absoluto (CAS 64-17-5).

**▼ B**

- 5.14. Preparação e conservação das soluções-padrão (processo utilizado no método validado)

As soluções-padrão serão conservadas a uma temperatura inferior a 5 °C e preparadas de fresco todos os meses. As massas dos componentes e soluções serão registadas com uma aproximação de 0,1 mg.

- 5.14.1. Solução-padrão A

Pipetar os reagentes a seguir indicados para um balão volumétrico de 100 ml que contenha já cerca de 60 ml da solução de etanol (5.13), para minimizar a evaporação de componentes, completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar. Registrar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

Componente	Volume (ml)
Metanol (5.2)	3,0
1-Propanol (5.3)	3,0
2-Metil-1-propanol (5.4)	3,0
2-Metil-1-butanol (5.6)	3,0
3-Metil-1-butanol (5.7)	3,0
Acetato de etilo (5.8)	3,0
1-Butanol (5.9)	3,0
2-Butanol (5.10)	3,0
Acetaldeído (5.11)	3,0
Acetal (5.12)	3,0

Nota 1: Para minimizar as perdas por evaporação, é preferível adicionar o acetal e o acetaldeído em último lugar.

**▼ M3**

- 5.14.1-A. Apenas para o álcool etílico de origem agrícola: a solução-padrão A deve ser preparada pipetando os reagentes com volumes reduzidos de álcoois superiores, com o objetivo de obter soluções-padrão com concentrações próximas dos limites legais para o álcool etílico de origem agrícola.

**▼ B**

- 5.14.2. Solução-padrão B

Pipetar 3 ml de 3-pentanol (ou de outro padrão interno adequado) (5.5) para um balão volumétrico de 100 ml que contenha já cerca de 80 ml da solução de etanol (5.13), completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar.

Registrar a massa do balão e de 3-pentanol (ou outro padrão interno adicionado) e a massa total final do conteúdo.

**▼ M3**

- 5.14.2-A. Apenas para o álcool etílico de origem agrícola: a solução-padrão B deve ser preparada pipetando um padrão interno adequado com os volumes reduzidos, com o objetivo de obter soluções-padrão com concentrações próximas dos limites legais para o álcool etílico de origem agrícola.

**▼B**

## 5.14.3. Solução-padrão C

Pipetar 1 ml de solução A (5.14.1) e 1 ml de solução B (5.14.2) para um balão volumétrico de 100 ml que contenha já cerca de 80 ml da solução de etanol (5.13), completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar.

Registar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

## 5.14.4. Solução-padrão D

Para manter a continuidade analítica, preparar um padrão de controlo de qualidade utilizando o padrão A anteriormente preparado (5.14.1). Pipetar 1 ml de solução A (5.14.1) para um balão volumétrico de 100 ml que contenha já cerca de 80 ml da solução de etanol (5.13), completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar.

Registar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

## 5.14.5. Solução-padrão E

Pipetar 10 ml de solução B (5.14.2) para um balão volumétrico de 100 ml que contenha já cerca de 80 ml da solução de etanol (5.13), completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar.

Registar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

## 5.14.6. Soluções-padrão utilizadas para verificar a linearidade da resposta do detector de ionização de chama

Pipetar 0, 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 ml de solução A (5.14.1) e 1 ml de solução B (5.14.2) para uma série de balões volumétricos de 100 ml que contenham já cerca de 80 ml da solução de etanol (5.13), completar o volume com a mesma solução de etanol e homogeneizar.

Registar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

## 5.14.7. Solução-padrão de controlo de qualidade

Pipetar 9 ml de solução-padrão D (5.14.4) e 1 ml de solução-padrão E (5.14.5) para um balão de pesagem e homogeneizar.

Registar a massa do balão e de cada componente adicionado e a massa total final do conteúdo.

**▼ B****6. Aparelhagem e equipamento**

- 6.1. Aparelhagem preparada para a determinação da densidade e do título alcoométrico.
- 6.2. Balança analítica com uma aproximação de quatro casas decimais.
- 6.3. Cromatógrafo de fase gasosa com programação de temperatura equipado com um detector de ionização de chama e um integrador ou outro sistema de tratamento de dados para a medição das áreas ou alturas dos picos.
- 6.4. Coluna(s) para cromatografia em fase gasosa capaz(es) de efectuar a separação dos analitos com uma resolução mínima entre componentes individuais (excepto o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol) de 1,3.

Nota 2: Foram consideradas adequadas as seguintes colunas e condições cromatográficas em fase gasosa exemplificativas:

1. Pré-coluna com 1 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno ligada a uma coluna CP-WAX 57 CB com 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme (polietilenoglicol estabilizado), seguida de uma coluna Carbowax 400 com 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme. (Ligação entre as colunas a estabelecer com elementos de encaixe forçado).

Gás vector e pressão de Hélio (135 kPa)  
gás:

Temperatura na coluna: 35 °C durante 17 minutos, aumento de 35 °C para 70 °C à razão de 12 °C/minuto, manutenção a 70 °C durante 25 minutos

Temperatura no injector: 150 °C

Temperatura no detector: 250 °C

Volume injectado: 1 µl (divisão da amostra: 20 a 100:1).

2. Pré-coluna com 1 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno ligada a uma coluna CP-WAX 57 CB com 50 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura de filme (polietilenoglicol estabilizado). (Ligação da pré-coluna a estabelecer com um elemento de encaixe forçado).

Gás vector e pressão de Hélio (65 kPa)  
gás:

Temperatura na coluna: 35 °C durante 10 minutos, aumento de 35 °C para 110 °C à razão de 5 °C/minuto, aumento de 110 °C para 190 °C à razão de 30 °C/minuto, manutenção a 190 °C durante 2 minutos

Temperatura no injector: 260 °C

Temperatura no detector: 300 °C

Volume injectado: 1 µl (divisão da amostra: 55:1).

**▼ B**

3. Coluna de enchimento (5 % de CW 20M, Carbowpak B) com 2 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno.

Temperatura na coluna: 65 °C durante 4 minutos, aumento de 65 °C para 140 °C à razão de 10 °C/minuto, manutenção a 140 °C durante 5 minutos, aumento de 140 °C para 150 °C à razão de 5 °C/minuto, manutenção a 150 °C durante 3 minutos

Temperatura no injector: 65 °C

Temperatura no detector: 200 °C

Volume injectado 1 µl.

7. **Colheita de amostras e amostras**

7.1. Amostra remetida ao laboratório

Determina-se (6.1) o título alcoométrico da cada amostra recebida.

8. **Técnica (processo utilizado no método validado)**

8.1. Toma para análise

8.1.1. Pesar um recipiente de pesagem adequado, devidamente rolhado, e registar a sua massa.

8.1.2. Pipetar 9 ml da amostra remetida ao laboratório para o recipiente e registar a sua massa ( $M_{AMOSTRA}$ ).

8.1.3. Adicionar 1 ml da solução-padrão E (5.14.5) e registar a sua massa ( $M_{PI}$ ).

8.1.4. Agitar vigorosamente a amostra (pelo menos 20 inversões). Antes das análises, conservar as amostras a temperatura inferior a 5 °C, para minimizar as perdas de matérias voláteis.

8.2. Branco

8.2.1. Utilizando uma balança com aproximação de quatro casas decimais (6.2), pesar um recipiente de pesagem adequado, devidamente rolhado, e registar a sua massa.

8.2.2. Pipetar 9 ml da solução 400 ml/l de etanol (5.13) para o recipiente e registar a sua massa.

8.2.3. Adicionar 1 ml da solução-padrão E (5.14.5) e registar a sua massa.

8.2.4. Agitar vigorosamente o conteúdo em análise (pelo menos 20 inversões). Antes das análises, conservar as amostras a temperatura inferior a 5 °C, para minimizar as perdas de matérias voláteis.

8.3. Teste preliminar

Injectar solução-padrão C (5.14.3) para confirmar a separação de todos os analitos (excepto o 2-metil-1-butanol e o 3-metil-1-butanol) com uma resolução mínima de 1,3.

8.4. Calibração

Verificar o estado de calibração conforme descrito a seguir. Confirmar a linearidade da resposta analisando sucessivamente, em triplicado, cada uma das soluções-padrão (5.14.6) com padrão interno utilizadas para o efeito. Com base nas áreas ou alturas dos picos obtidos pelo

**▼B**

integrador para cada injeção, calcular a relação R correspondente a cada composto aparentado e representar graficamente R em função da relação (C) entre as concentrações do composto aparentado e do padrão interno. O traçado obtido deve ser linear, com um coeficiente de correlação não inferior a 0,99.

$$R = \frac{\text{Área ou altura do pico do composto aparentado}}{\text{Área ou altura do pico do padrão interno}}$$

$$C = \frac{\text{Concentração do composto aparentado } (\mu\text{g / g})}{\text{Concentração do padrão interno } (\mu\text{g / g})}$$

## 8.5. Determinação

Injectar solução-padrão C (5.14.3) e duas soluções-padrão de controlo de qualidade (5.14.7). Prosseguir com as amostras desconhecidas (preparadas conforme descrito nos pontos 8.1 e 8.2), intervalando cada 10 amostras com um padrão de controlo de qualidade, para garantir estabilidade analítica. Injectar uma solução-padrão C (5.14.3) após cada conjunto de cinco amostras.

## 9. Cálculos

Pode recorrer-se a um sistema automático de tratamento de dados, desde que estes possam ser verificados com base nos princípios a seguir descritos.

Medir as áreas ou as alturas dos picos dos compostos aparentados e do padrão interno.

## 9.1. Cálculo dos factores de resposta

A partir do cromatograma resultante da injeção da solução-padrão C (5.14.3), calcular os factores de resposta de cada composto aparentado através da equação (1).

(1) Factor da resposta =

$$\frac{\text{Área ou altura do pico do PI}}{\text{Área ou altura do pico do composto aparentado}} \times \frac{\text{Concentração do composto aparentado } (\mu\text{g / g})}{\text{Concentração do PI } (\mu\text{g / g})}$$

em que:

PI = padrão interno

Concentração do composto aparentado = concentração do composto aparentado na solução C (5.14.3)

Concentração do PI = concentração do padrão interno na solução C (5.14.3).

## 9.1.2. Análise das amostras

Calcular a concentração de cada composto aparentado nas amostras através da equação (2).

(2) Concentrações dos compostos aparentados ( $\mu\text{g/g}$ ) =

$$\frac{\text{Área ou altura do pico do composto aparentado}}{\text{Área ou altura do pico do padrão interno}} \times \frac{M_{\text{PI}} (\text{g})}{M_{\text{AMOSTRA}} (\text{g})} \times \text{Concentração do PI } (\mu\text{g / g}) \times \text{FR}$$

em que:

$M_{\text{AMOSTRA}}$  = massa da amostra (8.1.2)

$M_{\text{PI}}$  = massa do padrão interno (8.1.3)

Concentração do PI = concentração do padrão interno na solução E (5.14.5)

FR = factor de resposta calculado através da equação (1).

**▼ B**

## 9.1.3. Análise da solução-padrão de controlo de qualidade

Calcular a percentagem de recuperação do valor-alvo de cada composto aparentado presente nos padrões de controlo de qualidade (5.14.7) através da equação (3).

$$(3) \text{ Percentagem de recuperação da amostra de controlo de qualidade} = \frac{\text{concentração do analito no padrão de controlo de qualidade}}{\text{concentração do analito na solução D}} \times 100$$

A concentração do analito no padrão de controlo de qualidade é calculada através das equações (1) e (2).

## 9.2. Apresentação final dos resultados

A conversão dos resultados obtidos para as amostras de  $\mu\text{g/g}$  para grama por 100 l de álcool absoluto é efectuada através da equação (4)

$$(4) \text{ Concentração em grama por 100 l de álcool absoluto} = \text{Concentração } \mu\text{g / g} \times \rho \times 10 / [\text{título (\% vol)} \times 1\,000]$$

em que

$\rho$  = densidade em  $\text{kg/m}^3$ .

Os resultados são apresentados com três algarismos significativos e um máximo de uma casa decimal (por exemplo: 11,4 g por 100 l de álcool absoluto).

10. **Garantia de qualidade e controlo de qualidade (no método validado)**

Através da equação (2), calcular a concentração de cada composto aparentado nas soluções-padrão de controlo de qualidade preparadas conforme descrito nos pontos 8.1.1 a 8.1.4. Através da equação (3), calcular a percentagem de recuperação do valor-alvo. A análise poderá prosseguir se os resultados analisados relativamente a cada composto aparentado não se afastarem mais de 10 % dos valores teóricos respectivos. Caso contrário, será necessário investigar a origem da inexactidão e tomar medidas correctivas apropriadas.

11. **Características operacionais do método (precisão)**

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial: os quadros seguintes reúnem os valores referentes aos seguintes compostos: etanal, acetato de etilo, acetal, etanal total, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito etanal

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	28	26	27	27	28
Número de casos anómalos (laboratórios)	2	4	3	3	2

## ▼ B

Amostras	A	B	C	D	E
Número de resultados aceite	56	52	54	54	56
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	63,4	71,67	130,4	38,4	28,6
				13,8 (*)	52,2 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	3,3	1,9	6,8	4,1	3,6
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	5,2	2,6	5,2	15,8	8,9
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	12	14	22	6,8	8,9
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	18,9	19,4	17,1	26,2	22,2
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	33,5	38,9	62,4	19,1	25,1

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito Acetato de etilo

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	24	24	25	24	24
Número de casos anómalos (laboratórios)	2	2	1	2	2
Número de resultados aceite	48	48	50	48	48
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	96,8	1 046	120,3	112,5	99,1
				91,8 (*)	117,0 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	2,2	15	2,6	2,1	2,6
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	2,3	1,4	2,1	2,0	2,4
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	6,4	79	8,2	6,2	7,1
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	6,6	7,6	6,8	6,2	6,6
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	17,9	221,9	22,9	17,5	20,0

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

## ▼B

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997  
 Número de laboratórios participantes 32  
 Número de amostras 5  
 Analito acetil

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	20	21	22	17	21
Número de casos anómalos (laboratórios)	4	3	2	4	3
Número de resultados aceite	40	42	44	34	42
Valor médio ( $\bar{x}$ ) µg/g	35,04	36,46	68,5	20,36	15,1
				6,60 (*)	28,3 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) µg/g	0,58	0,84	1,6	0,82	1,9
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	1,7	2,3	2,3	6,1	8,7
Limite de repetibilidade (r) µg/g	1,6	2,4	4,4	2,3	5,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) µg/g	4,2	4,4	8,9	1,4	3,1
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD <sub>R</sub> ) (%)	12,1	12,0	13,0	10,7	14,2
Limite de reprodutibilidade (R) µg/g	11,8	12,2	25,0	4,0	8,7

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997  
 Número de laboratórios participantes 32  
 Número de amostras 5  
 Analito etanal total

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	23	19	22	21	22
Número de casos anómalos (laboratórios)	1	5	2	3	2
Número de resultados aceite	46	38	44	42	44
Valor médio ( $\bar{x}$ ) µg/g	76,5	85,3	156,5	45,4	32,7
				15,8 (*)	61,8 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) µg/g	3,5	1,3	6,5	4,4	3,6
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	4,6	1,5	4,2	14,2	7,6
Limite de repetibilidade (r) µg/g	9,8	3,5	18,3	12,2	10,0

## ▼B

Amostras	A	B	C	D	E
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	13	15	24,1	7,3	9,0
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	16,4	17,5	15,4	23,7	19,1
Limite de reprodutibilidade (R) $\mu\text{g/g}$	35,2	41,8	67,4	20,3	25,2

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferente (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito metanol

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	26	27	27	28	25
Número de casos anómalos (laboratórios)	4	3	3	1	4
Número de resultados aceite	52	54	54	56	50
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	319,8	2 245	1 326	83,0	18,6
				61,5 (*)	28,9 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	4,4	27	22	1,5	1,3
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limite de repetibilidade (r) $\mu\text{g/g}$	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	13	99	60	4,5	2,8
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	3,9	4,4	4,6	6,2	11,8
Limite de reprodutibilidade (R) $\mu\text{g/g}$	35,2	278,3	169,1	12,5	7,9

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 4

Analito 2-butanol

## ▼ B

Amostras	A	B	C	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	21	27	29	22
Número de casos anómalos (laboratórios)	4	3	1	3
Número de resultados aceite	42	54	58	44
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	0,40	2,2	0,87	0,64
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	6,8	0,9	3,2	6,4
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	1,1	6,1	2,5	1,8
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	0,89	13	3,2	0,87
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	15,2	5,1	11,5	8,7
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	2,5	35,5	8,9	2,4

Tipos de amostra:

A Brandy, duplicados cegos.

B Kirsch, duplicados cegos.

C Grappa, duplicados cegos.

E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito 1-propanol

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	29	27	27	29	29
Número de casos anómalos (laboratórios)	2	4	3	2	2
Número de resultados aceite	58	54	54	58	58
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	3,0	24	3,6	2,3	3,3
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	3,4	0,7	2,3	0,9	1,6
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	5,3	150	6,5	9,0	8,1

## ▼B

Amostras	A	B	C	D	E
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD <sub>R</sub> ) (%)	6,1	4,1	4,1	3,6	4,1
Limite de reprodutibilidade (R) µg/g	14,8	407,2	18,2	25,2	22,7

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos.  
 D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).  
 E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito 1-butanol

Amostras	A	B	C
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	20	22	22
Número de casos anómalos (laboratórios)	4	4	6
Número de resultados aceite	40	44	44
Valor médio ( $\bar{x}$ ) µg/g	3,79	5,57	7,54
Desvio-padrão da repetibilidade (S <sub>r</sub> ) µg/g	0,43	0,20	0,43
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	11,2	3,6	5,6
Limite de repetibilidade (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S <sub>R</sub> ) µg/g	0,59	0,55	0,82
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD <sub>R</sub> ) (%)	15,7	9,8	10,8
Limite de reprodutibilidade (R) µg/g	1,7	1,5	2,3

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.  
 B Kirsch, duplicados cegos.  
 C Grappa, duplicados cegos (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito 2-metil-1-propanol

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	28	31	30	26	25
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	0	1	5	6
Número de resultados aceite	56	62	60	52	50

## ▼ B

Amostras	A	B	C	D	E
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	174,2	111,7	185,0	291,0	115,99
				246,8 (*)	133,87 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	2,3	1,6	2,5	1,8	0,74
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	1,3	1,4	1,3	0,7	0,6
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	8,9	8,9	9,7	6,0	6,2
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	5,1	8,0	5,2	2,2	5,0
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	24,9	24,9	27,2	16,9	17,4

Tipos de amostra:

A Brandy, duplicados cegos.

B Kirsch, duplicados cegos.

C Grappa, duplicados cegos.

D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).

E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

Ano de realização do teste interlaboratorial 1997

Número de laboratórios participantes 32

Número de amostras 5

Analito 2-metil-1-butanol

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	25	26	25	27	25
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	2	3	1	2
Número de resultados aceite	50	52	50	54	50
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	113,0	48,3	91,6	72,1	39,5
				45,2 (*)	61,5 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	2,1	1,5	1,7	2,3	2,3
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	1,9	3,1	1,8	3,9	4,5
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	20,8	10,7	18,4	13,3	12,5

Tipos de amostra:

A Brandy, duplicados cegos.

B Kirsch, duplicados cegos.

C Grappa, duplicados cegos.

D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).

E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

**▼ B**

Ano de realização do teste interlaboratorial	1997
Número de laboratórios participantes	32
Número de amostras	5
Analito	3-metil-1-butanol

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	23	23	24	27	21
Número de casos anómalos (laboratórios)	5	5	4	1	6
Número de resultados aceite	46	46	48	54	42
Valor médio ( $\bar{x}$ ) $\mu\text{g/g}$	459,4	242,7	288,4	142,2	212,3
				120,4 (*)	245,6 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) $\mu\text{g/g}$	5,0	2,4	3,4	2,4	3,2
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	1,1	1,0	1,2	1,8	1,4
Limite de repetibilidade ( $r$ ) $\mu\text{g/g}$	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) $\mu\text{g/g}$	29,8	13	21	8,5	6,7
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	6,5	5,2	7,3	6,5	2,9
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) $\mu\text{g/g}$	83,4	35,4	58,8	23,8	18,7

Tipos de amostra:

- A Brandy, duplicados cegos.
- B Kirsch, duplicados cegos.
- C Grappa, duplicados cegos.
- D Whisky, duplicados com teores diferentes (\*).
- E Rum, duplicados com teores diferentes (\*).

**▼ M2**

### III.3. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ VOLÁTIL DE BEBIDAS ESPIRITUOSAS

#### 1. Âmbito

O método foi validado num estudo interlaboratorial relativo a rum, brandy, bagaço e aguardentes de frutos, a níveis que variam entre 30 mg/l e 641 mg/l.

#### 2. Referências normativas

ISO 3696: 1987 Água para fins analíticos — Especificações e métodos de ensaio.

#### 3. Definições

- 3.1. A acidez volátil é calculada deduzindo a acidez fixa da acidez total.
- 3.2. A acidez total é a acidez titulável.
- 3.3. A acidez fixa é a acidez do resíduo após evaporação da bebida espirituosa até à secura.

#### 4. Princípio

A acidez total e a acidez fixa são determinadas por titulação ou por potenciometria.

#### 5. Material e reagentes

Salvo indicação em contrário, utilizar na análise apenas reagentes pro análise reconhecidos e água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696:1987).

**▼ M2**

- 5.1. Solução 0.01 M de hidróxido de sódio (NaOH)
- 5.2. Indicador misto.

Pesar 0,1 g de carmim de índigo e 0,1 g de vermelho de fenol.

Dissolver em 40 ml de água, completando com etanol até perfazer 100 ml.
6. **Aparelhagem e equipamento**

Aparelhagem indireta de laboratório, material de vidro de grau A e os seguintes elementos:
- 6.1. Bomba de água
- 6.2. Evaporador rotativo ou banho de ultrassons
- 6.3. Equipamento para a titulação potenciométrica (facultativo)
7. **Colheita de amostras e amostras**

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente até às análises.
8. **Procedimento**
- 8.1. Acidez total
- 8.1.1. Preparação da amostra

A bebida espirituosa é irradiada com ultrassons (dispersão ultrassónica) ou agitada durante dois minutos sob vácuo para eliminar o dióxido de carbono, se necessário.
- 8.1.2. Titulação

Pipetar 25 ml da bebida espirituosa num balão Erlenmeyer de 500 ml.

Adicionar cerca de 200 ml de água destilada, fervida e arrefecida (preparada diariamente), e 2 a 6 gotas de indicador misto (5.2).

Titular com a solução 0.01 M de hidróxido de sódio (5.1) até a cor amarelo-esverdeada se alterar para violeta, no caso das bebidas espirituosas incolores, e de amarelo-acastanhada para vermelho-acastanhada, no caso de bebidas de cor castanha.

A titulação pode ser igualmente efetuada por potenciometria, a pH 7,5.

Seja  $n_1$  ml o volume da solução 0.01 M de hidróxido de sódio adicionada.
- 8.1.3. Cálculos

O teor de acidez total (AT), expresso em miliequivalentes por litro de álcool, é igual a  $0,4 \times n_1$ .

O teor de acidez total (AT'), expresso em mg de ácido acético por litro de álcool, é igual a  $24 \times n_1$ .
- 8.2. Acidez fixa
- 8.2.1. Preparação da amostra

Evaporar até à secura 25 ml da bebida espirituosa:

Pipetar 25 ml da bebida espirituosa numa placa de evaporação cilíndrica de fundo plano com 55 mm de diâmetro. Durante a primeira hora de evaporação, a placa deve permanecer sobre a tampa do banho de água, para evitar que o líquido entre em ebulição, o que poderia provocar perdas por projeção.

Colocar a placa de evaporação num forno de secagem a 105 °C durante duas horas para completar a secagem. Deixar a placa arrefecer num exsiccador.
- 8.2.2. Titulação

Dissolver o resíduo remanescente após evaporação com água destilada, fervida e arrefecida (preparada diariamente), perfazer um volume de cerca de 100 ml e adicionar 2 a 6 gotas de indicador misto (5.2).

▼ **M2**

Titular com a solução 0.01 M de hidróxido de sódio (ponto 5.1).

A titulação pode ser igualmente efetuada por potenciometria, a pH 7,5.

Seja  $n_2$  ml o volume da solução 0.01 M de hidróxido de sódio adicionada.

## 8.2.3. Cálculos

A acidez total (AT), expressa em miliequivalentes por litro de álcool, é igual a  $0,4 \times n_2$ .

A acidez fixa (AF), expressa em mg de ácido acético por litro de bebida espirituosa, é igual a  $24 \times n_2$ .

9. **Cálculo da acidez volátil**

## 9.1. Expressa em miliequivalentes por L:

Sejam:

AT = acidez total em miliequivalentes por L

AF = acidez fixa em miliequivalentes por L

Acidez volátil, AV, em miliequivalentes por L é igual a:

$$AT - AF$$

## 9.2. Expressa em mg de ácido acético por L:

Sejam:

AT' = acidez total expressa em mg de ácido acético por L

AF' = acidez fixa expressa em mg de ácido acético por L

Acidez volátil, AV, expressa em mg de ácido acético por L é igual a:

$$AT' - AF'$$

## 9.3. Expresso em g de ácido acético por hectolitro de álcool puro a 100 % vol. é igual a:

$$\frac{AT' - AF'}{A} \times 10$$

em que A é o título alcoométrico volúmico da bebida espirituosa.

10. **Características do desempenho do método (precisão)**

## 10.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efetuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

**Ano de realização do teste interlaboratorial - 2000**

Número de laboratórios 18

Número de amostras 6

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	16	18	18	14	18	18
Número de casos anómalos (laboratórios)	2			4		
Número de resultados aceites	32	36	36	28	36	36
Mean value ( $\bar{x}$ ) [mg/L]	272* 241*	30	591* 641*	46	107	492
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	8,0	3,6	15,0	3,7	6,7	8,5

▼ M2

Amostras	A	B	C	D	E	F
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, RSD <sub>r</sub> [%]	3,1	11,8	2,4	8,0	6,2	1,7
Limite de repetibilidade, r [mg/l]	23	10	42	10	19	24
Desvio-padrão da repetibilidade, S <sub>R</sub> [mg/l]	8,5	8,4	25,0	4,55	13,4	24,4
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, RSD <sub>R</sub> [%]	3,3	27,8	4,1	9,9	12,5	5,0
Limite de reprodutibilidade, R [mg/l]	24	23	70	13	38	68

Tipos de amostra:

A Aguardente de ameixa; duplicados com teores diferentes \*

B Rum I; duplicados cegos

C Rum II; duplicados com teores diferentes\*

D *Slibovitz*; duplicados cegos

E *Brandy*; duplicados cegos

F Bagaço; duplicados cegos

[1] «Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studie», Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) «Analytical Chemistry 54, 67A-76A».

**▼ M1****V. ANETOLE. DETERMINAÇÃO DO TRANS-ANETOLE EM BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA****1. Âmbito**

Este método é adequado para a determinação do trans-anetole em bebidas espirituosas anisadas por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**3. Princípio**

Determinação da concentração de trans-anetole na bebida espirituosa por cromatografia em fase gasosa. Adição da mesma quantidade de um padrão interno — por exemplo 4-alilanol (estragol), se não estiver naturalmente presente na amostra — à toma para análise e a uma solução de referência de trans-anetole de concentração conhecida e diluição de ambas com uma solução a 45 % de etanol; injeção directa de ambas no sistema de cromatografia em fase gasosa. No caso dos licores com teor de açúcares elevado, é necessária uma extracção antes da preparação e análise da amostra.

**4. Material e reagentes**

O grau de pureza mínimo dos reagentes a utilizar nas análises é de 98 %. Utilizar exclusivamente água de grau não inferior a 3 (escala da norma ISO 3696).

Os produtos químicos de referência serão conservados no frio (cerca de 4 °C), ao abrigo da luz, em recipientes de alumínio ou garrafas de reagentes de vidro ambarizado. As tampas devem, de preferência, ser dotadas de uma vedação de alumínio. Se o trans-anetole se encontrar no estado cristalino, será necessário liquefazê-lo antes de o utilizar, mas sem que a temperatura exceda 35 °C.

**4.1. Etanol a 96 % vol. (CAS 64-17-5)****4.2. 1-metoxi-4-(1-propenil) benzeno (trans-anetole) (CAS 4180-23-8)****4.3. 4-alilanol (estragol) (CAS 140-67-0), padrão interno sugerido****4.4. Etanol a 45 % vol.**

Adicionar 560 g de água destilada a 378 g de etanol a 96 % vol.

**4.5. Preparação das soluções-padrão**

Todas as soluções-padrão serão conservadas à temperatura ambiente (15 °C-35 °C), ao abrigo da luz, em recipientes de alumínio ou garrafas de reagentes de vidro ambarizado. As tampas devem, de preferência, ser dotadas de uma vedação de alumínio.

O trans-anetole e o 4-alilanol são praticamente insolúveis em água, pelo que é necessário dissolvê-los numa pequena quantidade de etanol a 96 % vol. (4.1) antes de adicionar o etanol a 45 % vol (4.4).

As soluções de reserva devem ser preparadas de fresco todas as semanas.

**4.5.1. Solução-padrão A**

Solução de reserva de trans-anetole (concentração: 2 g/l)

Pesar 40 mg de trans-anetole (4.2) num balão volumétrico de 20 ml (ou 400 mg num balão de 200 ml, etc.). Juntar uma pequena quantidade de etanol a 96 % vol. (4.1), completar o volume com etanol a 45 % vol (4.4) e homogeneizar bem.

**▼ M1**

## 4.5.2. Solução do padrão interno, B

Solução de reserva do padrão interno, por exemplo estragol (concentração: 2 g/l)

Pesar 40 mg de estragol (4.3) num balão volumétrico de 20 ml (ou 400 mg num balão de 200 ml, etc.). Juntar uma pequena quantidade de etanol a 96 % vol (4.1), completar o volume com etanol a 45 % vol (4.4) e homogeneizar bem.

## 4.5.3. Soluções utilizadas para verificar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama

É necessário verificar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama na análise para uma gama de concentrações de trans-anetole em bebidas espirituosas compreendida entre 0 g/l e 2,5 g/l. Na análise, as amostras de teor desconhecido de bebidas espirituosas a analisar devem ser diluídas dez vezes (8.3). Para as condições analíticas descritas no método, preparam-se como segue soluções de reserva correspondentes às concentrações de 0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 e 0,25 g/l de trans-anetole na amostra a analisar: pipetar 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 ml da solução de reserva A (4.5.1) para uma série de balões volumétricos de 20 ml; pipetar para cada balão 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

Para solução de concentração 0 g/l é utilizado o branco (8.4).

## 4.5.4. Solução-padrão C

Pipetar 2 ml da solução-padrão A (4.5.1) para um balão volumétrico de 20 ml, adicionar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

**5. Aparelhagem e equipamento**

5.1. Cromatógrafo de fase gasosa de coluna capilar equipado com um detector de ionização de chama e um integrador ou outro sistema de tratamento de dados para a medição das áreas ou alturas dos picos e um amostrador automático ou os dispositivos necessários para a injeção manual das amostras.

5.2. Injetor com/sem divisor da amostra (*split/splitless*)

5.3. Coluna capilar, por exemplo:

Comprimento: 50 m

Diâmetro interno: 0,32 mm

Espessura do filme: 0,2 µm

Fase estacionária: FFAP — polímero poroso reticulado de ácido tereftálico e polietilenoglicol, modificado

5.4. Material corrente de laboratório: material de vidro volumétrico da classe A, balança analítica (precisão: ± 0,1 mg).

**6. Condições cromatográficas**

O tipo e dimensões da coluna e as condições cromatográficas em fase gasosa devem permitir separar o anetole do padrão interno e ambos das substâncias interferentes eventualmente presentes. Condições típicas da coluna indicada como exemplo (5.3):

**▼ M1**

- 6.1. Gás vector: hélio *pro analyse*
- 6.2. Caudal: 2 ml/minuto
- 6.3. Temperatura no injector: 250 °C
- 6.4. Temperatura no detector: 250 °C
- 6.5. Condições de temperatura da fornalha: isotérmica a 180 °C; tempo de funcionamento: 10 minutos.
- 6.6. Volume injectado: 1 µl, com divisão (*split*) de 1:40

**7. Amostras**

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e de baixas temperaturas.

**8. Técnica****8.1. Pesquisa de estragol na amostra**

Para garantir que o estragol não está naturalmente presente na amostra, proceder-se-á a uma análise em branco, sem adição do padrão interno. Se o estragol estiver naturalmente presente, será necessário escolher outro padrão interno (por exemplo mentol).

Pipetar 2 ml da amostra para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

**8.2. Preparação das amostras de teor desconhecido**

Pipetar 2 ml da amostra para um balão volumétrico de 20 ml, adicionar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

**8.3. Branco**

Pipetar 2 ml da solução do padrão interno, B (4.5.2), para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

**8.4. Teste de linearidade**

Antes de iniciar as análises, é necessário confirmar a linearidade de resposta do detector de ionização de chama, analisando, para o efeito, em triplicado, cada solução-padrão de verificação da linearidade (4.5.3).

Com base nas áreas ou alturas dos picos obtidas pelo integrador para cada injeção, representar graficamente a concentração da solução-mãe respectiva, em g/l, em função da relação R correspondente.

$R$  = altura ou área do pico do trans-anetole dividida pela altura ou área do pico do estragol.

Deve ser obtido um traçado linear.

**8.5. Determinação**

Injectar sucessivamente o branco (8.3), a solução-padrão C (4.5.4), um dos padrões de verificação da linearidade (4.5.3), que agirá como amostra de controlo de qualidade (a escolher em função da concentração provável de trans-anetole na amostra de teor desconhecido), e cinco amostras de teor desconhecido (8.2). Para garantir estabilidade analítica, injectar uma amostra de verificação da linearidade (controlo de qualidade) após cada conjunto de cinco amostras de teor desconhecido.

**▼ M1****9. Cálculo do factor de resposta**

Medir as áreas (com um integrador ou outro sistema de tratamento de dados) ou as alturas (por integração manual) dos picos do trans-anetole e do padrão interno.

**9.1. Cálculo do factor de resposta (RF<sub>i</sub>)**

O factor de resposta é calculado do seguinte modo:

$$RF_i = (C_i/\text{área ou altura}_i) * (\text{área ou altura}_{pi}/C_{pi})$$

Em que:

$C_i$  é a concentração de trans-anetole na solução-padrão A (4.5.1)

$C_{pi}$  é a concentração de padrão interno na solução B (4.5.2)

$\text{área}_i$  é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

$\text{área}_{pi}$  é a área (ou altura) do pico do padrão interno

O RF<sub>i</sub> é calculado a partir das cinco amostras de solução C (4.5.4).

**9.2. Análise das soluções de verificação da linearidade de resposta**

Injectar as soluções de verificação da linearidade de resposta (4.5.3).

**9.3. Análise da amostra**

Injectar a amostra de teor desconhecido (8.2).

**10. Cálculo dos resultados**

A fórmula de cálculo da concentração de trans-anetole é a seguinte:

$$c_i = C_{pi} * (\text{área ou altura}_i/\text{área ou altura}_{pi}) * RF_i$$

Em que:

$c_i$  é a concentração desconhecida de trans-anetole

$C_{pi}$  é a concentração de padrão interno na amostra de teor desconhecido (4.5.2)

$\text{área ou altura}_i$  é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

$\text{área ou altura}_{pi}$  é a área (ou altura) do pico do padrão interno

RF<sub>i</sub> é o factor de resposta (calculado conforme indicado em 9.1)

A concentração de trans-anetole é expressa em grama por litro, com uma casa decimal.

**11. Garantia de qualidade e controlo de qualidade**

Os cromatogramas devem evidenciar a separação do anetole e do padrão interno entre si e de ambos de qualquer substância interferente. O valor de RF<sub>i</sub> é calculado a partir dos resultados das cinco injeções de solução C (4.5.4). Se o coeficiente de variação [CV (%) = desvio padrão/média\*100] não exceder mais ou menos 1 %, o valor médio de RF<sub>i</sub> será aceitável.

**▼ M1**

O cálculo anterior será utilizado para determinar a concentração de trans-anetole na amostra seleccionada para o controlo de qualidade entre as soluções de verificação da linearidade (4.5.3).

Se os resultados médios calculados a partir da análise da solução de verificação da linearidade seleccionada para amostra de controlo de qualidade interno não se afastarem mais ou menos 2,5 % do valor teórico respectivo, os resultados obtidos para as amostras de teor desconhecido serão aceitáveis.

12. **Tratamento de amostras de bebidas espirituosas com teores de açúcares elevados e de amostras de licores antes da análise por cromatografia em fase gasosa**

Extracção do álcool da bebida espirituosa com teor de açúcares elevado, para possibilitar a determinação da concentração de trans-anetole por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

12.1. Princípio

Toma-se uma alíquota da amostra de licor e adiciona-se-lhe o padrão interno, de modo a obter uma concentração semelhante à do analito (trans-anetole) no licor. Adiciona-se em seguida fosfato de sódio dodeca-hidratado e sulfato de amónio anidro. Agita-se bem a mistura resultante, arrefece-se, obtém-se a separação de duas fases e retira-se a fase (alcoólica) superior. Toma-se uma alíquota da fase alcoólica e dilui-se com solução de etanol a 45 % vol. (4.4) (nota: neste caso, não se adiciona padrão interno, por já ter sido anteriormente adicionado). Analisa-se a solução resultante por cromatografia em fase gasosa.

12.2. Material e reagentes

O grau de pureza mínimo dos reagentes a utilizar na extracção é de 99 %.

12.2.1. Sulfato de amónio anidro (CAS 7783-20-2)

12.2.2. Fosfato dibásico de sódio dodeca-hidratado (CAS 10039-32-4)

12.3. Aparelhagem e equipamento

*Erlenmeyers*, ampolas de decantação, frigorífico.

12.4. Técnica

12.4.1. Pesquisa de estragol na amostra

Para garantir que o estragol não está naturalmente presente na amostra, proceder-se-á a uma extracção em branco (12.6.2) e a análise será efectuada sem adição do padrão interno. Se o estragol estiver naturalmente presente, será necessário escolher outro padrão interno.

12.4.2. Extracção

Pipetar 5 ml de etanol a 96 % vol. (4.1) para um *erlenmeyer* e adicionar 50 mg do padrão interno (4.3), pesados no *erlenmeyer*, e 50 ml de amostra. Adicionar 12 g de sulfato de amónio anidro (12.2.1) e 8,6 g de fosfato dibásico de sódio dodeca-hidratado (12.2.2). Rolhar o *erlenmeyer*.

Agitar o *erlenmeyer* durante, pelo menos, 30 minutos. Pode ser utilizado um agitador mecânico, mas não uma barra de agitação magnética revestida a teflon, que absorveria parte do analito. Os sais adicionados não se dissolverão completamente.

Colocar o *erlenmeyer* tapado no frigorífico, a temperatura inferior a 5 °C, durante pelo menos duas horas.

**▼ M1**

Devem separar-se duas fases líquidas distintas e um resíduo sólido. A fase alcoólica deve ser límpida; caso não seja, recolocar o recipiente no frigorífico até a separação dar lugar a uma fase límpida.

Quando a fase alcoólica se apresentar límpida, tomar cuidadosamente uma alíquota (por exemplo, 10 ml), sem perturbar a fase aquosa, colocá-la num frasco de vidro ambarizado e fechar bem este último.

## 12.4.3. Preparação da amostra extraída a analisar

Deixar o extracto (12.4.2) em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Pipetar 2 ml da fase alcoólica da amostra extraída à temperatura ambiente para um balão volumétrico de 20 ml, completar o volume com etanol a 45 % vol. (4.4) e homogeneizar bem.

## 12.5. Determinação

Proceder como indicado em 8.5.

## 12.6. Cálculo dos resultados

Os resultados são calculados pela seguinte fórmula:

$$C_i = (m_{pi}/V) * (\text{área}_i/\text{área}_{pi}) * RF_i$$

Em que:

$m_{pi}$  é a massa (em miligrama) de padrão interno (4.3) tomada (12.4.2)

$V$  é o volume da amostra de teor desconhecido (50 ml)

$RF_i$  é o factor de resposta (9.1)

$\text{área}_i$  é a área do pico do trans-anetole

$\text{área}_{pi}$  é a área do pico do padrão interno

Os resultados são expressos em grama por litro, com uma casa decimal.

## 12.7. Garantia de qualidade e controlo de qualidade

Proceder como indicado em 11.

13. **Características operacionais do método (precisão)**

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:

Os quadros seguintes reúnem os valores referentes ao anetole.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial	1998
Número de laboratórios	16
Número de amostras	10
Analito	anetole

▼ M1

Pastis:

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	15	15	15	13	16	16
Número de casos anómalos (laboratórios)	1	1	1	3	—	—
Número de resultados aceite	30	30	30	26	16	16
Valor médio g/l	1,477	1,955	1,940	1,833	1,741	1,754
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) g/l	0,022	0,033	0,034	0,017	—	—
Desvio-padrão relativo da repetibilidade $RSD_r$ (%)	1,5	1,7	1,8	0,9	—	—
Limite de repetibilidade ( $r$ ) g/l	0,062	0,093	0,096	0,047	—	—
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) g/l	0,034	0,045	0,063	0,037	0,058	0,042
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	2,3	2,3	3,2	2,0	3,3	2,4
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) g/l	0,094	0,125	0,176	0,103	0,163	0,119

Tipos de amostra:

A *Pastis*, duplicados cegosB *Pastis*, duplicados cegosC *Pastis*, duplicados cegosD *Pastis*, duplicados cegosE *Pastis*, amostra singelaF *Pastis*, amostra singela

Outras bebidas espirituosas anisadas:

Amostras	G	H	I	J
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	16	14	14	14
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	2	1	1
Número de resultados aceite	32	28	28	28
Valor médio g/l	0,778 0,530 (*)	1,742	0,351	0,599
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) g/l	0,020	0,012	0,013	0,014
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	3,1	0,7	3,8	2,3
Limite de repetibilidade ( $r$ ) g/l	0,056	0,033	0,038	0,038
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) g/l	0,031	0,029	0,021	0,030
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	4,8	1,6	5,9	5,0
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) g/l	0,088	0,080	0,058	0,084

Tipos de amostra:

G Ouzo, duplicados com teores diferentes (\*)

H Anis, duplicados cegos

I Licor anisado, duplicados

J Licor anisado, duplicados

**▼ M1****VI. ÁCIDO GLICIRRÍZICO. DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO GLICIRRÍZICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA****1. Âmbito**

Este método é adequado para a determinação do ácido glicirrízico em bebidas espirituosas anisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O Regulamento (CEE) n.º 1576/89 especifica que a bebida espirituosa anisada denominada «*pastis*» deve conter entre 0,05 g e 0,5 g de ácido glicirrízico por litro.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**3. Princípio**

Determinação da concentração de ácido glicirrízico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção no ultravioleta. Filtração de uma solução-padrão e da toma para análise e injeção directa de ambas, separadamente, no sistema cromatográfico de HPLC.

**4. Material e reagentes**

Utilizar nas análises apenas reagentes para HPLC, etanol absoluto e água de grau 3 (escala da norma ISO 3696).

**4.1. Etanol a 96 % vol. (CAS 64-17-5)****4.2. Glicirrizinato de amónio, C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>.NH<sub>3</sub> (sal de amónio do ácido glicirrízico)**

Massa molecular: 839,98; CAS 53956-04-0; grau de pureza mínimo: 90 %.

Massa molecular do ácido glicirrízico: 822,94.

**4.3. Ácido acético glacial, CH<sub>3</sub>COOH (CAS 64-19-7)****4.4. Metanol, CH<sub>3</sub>OH (CAS 67-56-1)****4.5. Etanol a 50 % vol.**

Para preparar 1 000 ml, a 20 °C:

— 521 ml de etanol a 96 % vol. (4.1),

— 511 ml de água (2.0).

**4.6. Preparação das soluções de eluição para a HPLC****4.6.1. Solvente de eluição A (exemplo)**

80 partes (por volume) de água (2.0)

20 partes (por volume) de ácido acético (4.3)

Desgasificar o solvente de eluição durante cinco minutos.

*Nota:* Se a água utilizada não tiver sido microfiltrada, é conveniente filtrar o solvente de eluição preparado com um filtro para solventes orgânicos, de porosidade igual ou inferior a 0,45 µm.

**4.6.2. Solvente de eluição B**

Metanol (4.4).

**4.7. Preparação das soluções-padrão**

Todas as soluções-padrão devem ser preparadas de fresco após dois meses.

**4.7.1. Solução de referência C**

Pesar, com a aproximação de 0,1 mg, 25 mg de glicirrizinato de amónio (4.2) num balão volumétrico de 100 ml. Adicionar um pouco de etanol a 50 % vol (4.5) e dissolver o glicirrizinato de amónio. Uma vez dissolvido, completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol (4.5).

**▼ M1**

Filtrar com um filtro para solventes orgânicos.

4.7.2. Soluções-padrão (utilizadas para verificar a linearidade de resposta dos aparelhos)

Preparar uma solução de reserva de 1,0 g/l, pesando, com a aproximação de 0,1 mg, 100 mg de glicirrizinato de amónio num balão volumétrico de 100 ml. Adicionar um pouco de etanol a 50 % vol (4.5) e dissolver o glicirrizinato de amónio. Uma vez dissolvido, completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol. (4.5).

Preparar, pelo menos, quatro outras soluções de 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,25 g/l e 0,5 g/l de glicirrizinato de amónio, pipetando, respectivamente, 5 ml, 10 ml, 25 ml e 50 ml da solução de reserva de 1,0 g/l para uma série de balões volumétricos de 100 ml. Completar o volume até ao traço de aferição com etanol a 50 % vol. (4.5) e homogeneizar bem.

Filtrar todas as soluções com um filtro para solventes orgânicos.

5. **Aparelhagem e equipamento**

5.1. Sistema de separação

5.1.1. Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência

5.1.2. Sistema de bombagem que permita obter e manter um caudal constante ou programado com grande precisão

5.1.3. Sistema espectrofotométrico de detecção no ultravioleta, regulado para 254 nm

5.1.4. Sistema de desgasificação do solvente

5.2. Integrador ou registador informatizado, de características compatíveis com o resto do sistema

5.3. Coluna (exemplo):

Material: aço inoxidável ou vidro

Diâmetro interno: 4 mm a 5 mm

Comprimento: 100 mm a 250 mm

Fase estacionária: sílica reticulada com um grupo funcional octadecílico (C18, de preferência esférico) e granulometria máxima de 5 µm.

5.4. Equipamento de laboratório

5.4.1. Balança analítica com a precisão de 0,1 mg

5.4.2. Material de vidro volumétrico da classe A

5.4.3. Dispositivo de membranas microfiltrantes para volumes pequenos

6. **Condições cromatográficas**

6.1. Eluição (exemplo):

— Caudal: 1 ml/minuto,

— solvente A = 30 %,

— solvente B = 70 %.

6.2. Detecção:

— UV = 254 nm

7. **Técnica**

7.1. Preparação da amostra de bebida espirituosa

Se necessário, filtrar com um filtro para solventes orgânicos (porosidade de 0,45 µm).

▼ **M1**

## 7.2. Determinação

Depois de estabilizadas as condições cromatográficas:

- injectar 20 µl da solução de referência C (4.7.1),
- injectar 20 µl da solução da amostra,
- comparar os dois cromatogramas. Identificar os picos do ácido glicirrízico a partir dos tempos de retenção respectivos. Medir as áreas (ou alturas) desses picos e calcular a concentração em g/l, com duas casas decimais, utilizando a seguinte equação:

$$c = C \times \frac{h \times P \times 823}{H \times 100 \times 840}$$

Em que:

- c é a concentração, em grama por litro, de ácido glicirrízico na bebida espirituosa analisada;
- C é a concentração, em grama por litro, de glicirrinato de amónio na solução de referência,
- h é a área (ou altura) do pico do ácido glicirrízico da bebida espirituosa analisada,
- H é a área (ou altura) do pico do ácido glicirrízico da solução de referência
- P é o grau de pureza, em percentagem, do glicirrinato de amónio de referência
- 823 é a massa de uma mole de ácido glicirrízico
- 840 é a massa de uma mole de glicirrinato de amónio

8. **Características operacionais do método (precisão)**

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:

O quadro seguinte reúne os valores referentes ao ácido glicirrízico.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial	1998
Número de laboratórios	16
Número de amostras	5
Analito	ácido glicirrízico

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	13	14	15	16	16
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	2	1	—	—
Número de resultados aceite	26	28	30	32	32
Valor médio g/l	0,046	0,092 (*) 0,099	0,089	0,249	0,493
Desvia-padrão da repetibilidade (S <sub>r</sub> ) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Desvio-padrão da repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	1,5	1,3	0,7	1,0	0,6
Limite de repetibilidade (r) g/l	0,002	0,004	0,002	0,007	0,009
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S <sub>R</sub> ) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013

▼ **M1**

Amostras	A	B	C	D	E
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	8,6	7,2	4,0	2,5	2,7
Limite de reprodutibilidade (R) g/l	0,011	0,019	0,010	0,018	0,037

Tipos de amostra:

- A *Pastis*, duplicados cegos
- B *Pastis*, duplicados com teores diferentes (\*)
- C *Pastis*, duplicados cegos
- D *Pastis*, duplicados cegos
- E *Pastis*, duplicados cegos

▼ **M1****VII. CALCONAS. MÉTODO DE VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CALCONAS EM PASTIS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA****1. Âmbito**

Este método é adequado para a pesquisa de calconas em bebidas espirituosas anisadas. As calconas são corantes da família dos flavonóides naturalmente presentes na raiz do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*).

Uma bebida espirituosa só poderá ser designada por «*pastis*» se contiver calconas [Regulamento (CEE) n.º 1576/89].

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**3. Princípio**

Preparação de uma solução de referência de extracto de alcaçuz. Determinação da presença ou ausência de calconas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção no ultravioleta.

**4. Material e reagentes**

Utilizar nas análises apenas reagentes para HPLC. Utilizar etanol a 96 % vol. Utilizar exclusivamente água de grau 3 (escala da norma ISO 3696).

**4.1. Etanol a 96 % vol. (CAS 64-17-5)****4.2. Acetonitrilo, CH<sub>3</sub>CN (CAS 75-05-8)****4.3. Substância de referência: *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz)**

Raízes de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) trituradas. Dimensões médias dos fragmentos: 10-15 mm de comprimento; 1-3 mm de espessura.

**4.4. Acetato de sódio, CH<sub>3</sub>COONa (CAS 127-09-3)****4.5. Ácido acético glacial, CH<sub>3</sub>COOH (CAS 64-19-7)****4.6. Preparação das soluções****4.6.1. Etanol a 50 % vol**

Para preparar 1 000 ml, a 20 °C:

— etanol a 96 % vol. (4.1): 521 ml,

— água (2.0): 511 ml.

**4.6.2. Solvente A: acetonitrilo**

Acetonitrilo (4.2) para HPLC.

Desgasificar.

**4.6.3. Solvente B: solução tampão 0,1 M de acetato de sódio, pH 4,66**

Pesar 8,203 g de acetato de sódio (4.4), juntar 6,005 g de ácido acético glacial (4.5) e completar o volume até 1 000 ml com água (2) num balão volumétrico.

**5. Preparação do extracto de referência de *glycyrrhiza glabra* (4.3)****5.1. Pesar 10 g de raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*) (4.3) triturada para um balão de destilação de fundo plano.**

— Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1).

— Manter em ebulição sob refluxo durante uma hora.

— Filtrar.

— Guardar o filtrado para mais tarde.

**▼ M1**

- 5.2. Recuperação do extracto de alcaçuz do filtro
  - Colocar o filtro num balão de destilação de fundo plano.
  - Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1).
  - Manter em ebulição sob refluxo durante uma hora.
  - Filtrar. Guardar o filtrado para mais tarde.
- 5.3. Efectuar a extracção da raiz de alcaçuz por três vezes, sucessivamente
- 5.4. Juntar os três filtrados
- 5.5. Evaporar o solvente (de 5.4) num evaporador rotativo
- 5.6. Adicionar 100 ml de etanol a 50 % vol. (4.6.1) ao resíduo do extracto (de 5.5)
6. **Aparelhagem e equipamento**
  - 6.1. Sistema de separação
    - 6.1.1. Equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência
    - 6.1.2. Sistema de bombagem que permita obter e manter um caudal constante ou programado a alta pressão.
    - 6.1.3. Sistema espectrofotométrico de detecção no ultravioleta/visível, regulável para 254 nm e 370 nm.
    - 6.1.4. Sistema de desgasificação do solvente.
    - 6.1.5. Fornalha da coluna, regulável a 40 °C ± 0,1 °C.
  - 6.2. Integrador ou registador informatizado, de características compatíveis com o resto do sistema de separação.
  - 6.3. Coluna

Material: aço inoxidável ou vidro

Diâmetro interno: 4 mm a 5 mm

Fase estacionária: sílica reticulada com um grupo funcional octadecílico (C18) e granulometria máxima de 5 µm (fase reticulada).
  - 6.4. Equipamento corrente de laboratório, nomeadamente:
    - 6.4.1. Balança analítica (precisão ± 0,1 mg).
    - 6.4.2. Dispositivo de destilação com condensador de refluxo, incluindo, por exemplo:
      - um balão de fundo plano de 250 ml com junta de vidro esmerilado normalizada,
      - um condensador de refluxo de 30 cm, e
      - uma fonte de calor (tomar as providências necessárias para evitar qualquer reacção pirogénica das matérias em extracção).
    - 6.4.3. Evaporador rotativo
    - 6.4.4. Dispositivo de filtração (funil de *Büchner*)
  - 6.5. Condições cromatográficas (exemplo)
    - 6.5.1. Condições de eluição dos solventes A (4.6.2) e B (4.6.3):
      - gradiente de variação de 20/80 (v/v) para 50/50 (v/v) em 15 minutos,
      - gradiente de variação de 50/50 (v/v) para 75/25 (v/v) em cinco minutos,
      - manutenção a 75/25 (v/v) durante cinco minutos,

▼ **M1**

- estabilização da coluna entre as injeções,
- manutenção a 20/80 (v/v) durante cinco minutos.

6.5.2. Caudal: 1 ml/minuto

6.5.3. Regulação do detector de UV:

Regular o detector para 370 nm para a detecção da presença de calconas e, em seguida, para 254 nm, para a detecção do ácido glicirrízico.

*Nota:* A mudança de comprimento de onda (de 370 nm para 254 nm) deve ser efectuada 30 segundos antes do início do pico de eluição do ácido glicirrízico.

## 7. Técnica

7.1. Preparação da amostra de bebida espirituosa

Filtrar com um filtro para solventes orgânicos (porosidade de 0,45 µm).

7.2. Preparação do extracto residual de alcaçuz (5.6)

Preparar uma diluição 1:10 com etanol a 50 % vol. (4.6.1) antes da análise.

7.3. Determinação.

7.3.1. Injectar 20 µl do extracto de alcaçuz preparado (7.2). Efectuar a análise nas condições cromatográficas acima descritas (6.5).

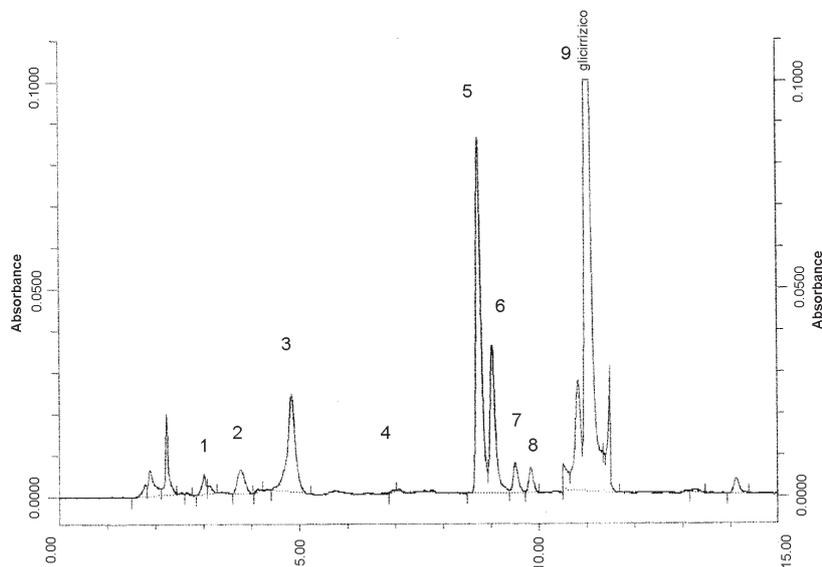
7.3.2. Injectar 20 µl da amostra (7.1) da bebida espirituosa anisada. Efectuar a análise nas condições cromatográficas acima descritas (6.5).

7.3.3. Comparar os dois cromatogramas. Devem ser muito semelhantes na zona de saída das calconas, durante a detecção a 370 nm nas condições cromatográficas acima descritas (ver a figura 1).

## 8. Cromatograma característico de um *pastis*

*Figura 1:*

Cromatograma obtido pelo método acima descrito, revelador da presença de calconas num *«pastis»*. Os picos 1 a 8 correspondem às calconas; o pico 9 ao ácido glicirrízico.



▼ **M1**9. **Características operacionais do método (precisão)**

Resultados do teste interlaboratorial:

O quadro seguinte apresenta as características operacionais do método de reconhecimento da presença ou ausência de calconas em «*pastis*» e bebidas espirituosas anisadas.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial	1998
Número de laboratórios	14
Número de amostras	11
Analitos	calconas

Amostras	A	B	C	D	E	F
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	14	14	14	14	14	13
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	—	—	—	—	1 (*)
Número de resultados aceite	28	14	14	28	28	26
Número de confirmações da presença de calconas	28	14	14	0	28	0
Número de confirmações da ausência de calconas	0	0	0	28	0	26
Percentagem de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100	100

(\*) Incoerência dos resultados de dois duplicados, atribuída a um erro de constituição da amostra.

Amostras	G	H	I	J	K
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	14	14	14	14	14
Número de casos anómalos (laboratórios)	—	—	—	—	—
Número de resultados aceite	28	14	14	28	28
Número de confirmações da presença de calconas	0	0	0	0	0
Número de confirmações da ausência de calconas	28	14	14	28	28
Percentagem de resultados correctos (%)	100	100	100	100	100

Tipos de amostra:

- A *Pastis*, duplicados cegos
- B *Pastis*, amostra singela
- C *Pastis*, amostra singela
- D «*Pastis*» (sem calconas), duplicados cegos
- E «*Pastis*» (sem calconas), duplicados cegos
- F Licor anisado (sem calconas), duplicados cegos

▼ **M1**

- G Licor anisado (sem calconas), duplicados cegos
- H Ouzo (sem calconas), amostra singela
- I Ouzo (sem calconas), amostra singela
- J Anis (sem calconas), duplicados cegos
- K «*Pastis*» (sem calconas), duplicados cegos

▼ **M2****VIII. AÇÚCARES TOTAIS****1. Âmbito**

O método de HPLC-IR é aplicável no que se refere à determinação dos açúcares totais (expressos em açúcar invertido) das bebidas espirituosas, com exceção dos licores que contêm ovos e produtos lácteos.

O método foi validado num estudo interlaboratorial relativo a *pastis*, anis destilado, licor de cereja, *crème de* (seguido do nome do fruto ou da matéria-prima utilizados) e *crème de cassis*, a níveis que variam entre 10,86 g/l e 509,7 g/l. No entanto, a linearidade da resposta do instrumento foi demonstrada em relação ao intervalo de concentração entre 2,5 g/l e 20,0 g/l.

Este método não se destina a determinar baixos níveis de açúcares.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1987 Água para fins analíticos — Especificações e métodos de ensaio.

**3. Princípio**

Análises de cromatografia líquida de alta resolução de soluções de açúcar, a fim de determinar a sua concentração de glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose.

Este método utiliza uma fase estacionária alquilamina e deteção refratométrica diferencial, sendo utilizado apenas como exemplo. A utilização de resinas de permuta aniónica como fase estacionária seria igualmente possível.

**4. Material e reagentes**

- 4.1. Glicose (CAS 50-99-7), pelo menos 99 % pura.
- 4.2. Frutose (CAS 57-48-7), pelo menos 99 % pura.
- 4.3. Sacarose (CAS 57-50-1), pelo menos 99 % pura.
- 4.4. Lactose (CAS 5965-66-2), pelo menos 99 % pura.
- 4.5. Maltose mono-hidratada (CAS 6363-53-7), pelo menos 99 % pura.
- 4.6. Acetonitrilo puro (CAS 75-05-8) para análise por HPLC.
- 4.7. Água destilada ou desmineralizada, de preferência microfiltrada.
- 4.8. Solventes (exemplo)

O solvente de eluição é composto por:

75 partes por volume de acetonitrilo (4.6),

25 partes por volume de água destilada (4.7.).

Passar o hélio a baixo ritmo durante 5 a 10 minutos antes de o utilizar para eliminar o gás.

Se a água utilizada não tiver sido microfiltrada, o solvente deve ser filtrado com um filtro para solventes orgânicos, com um poro de dimensão inferior ou igual a 0,45 µm.

- 4.9. Etanol absoluto (CAS 64-17-5).
- 4.10. Solução de etanol (5 %, v/v).
- 4.11. Preparação da solução-mãe padrão (20 g/l)

Introduzir 2 g de cada um dos açúcares a analisar (4.1. a 4.5.) e transferi-los sem perdas para um balão volumétrico de 100 ml. (NB: 2,11 g de maltose mono-hidratada é equivalente a 2 g de maltose).

**▼ M2**

Adaptar para 100 ml com uma solução com 5 % vol. de álcool (4.10.), agitar e armazenar a cerca de + 4 °C. Preparar uma nova solução-mãe, uma vez por semana.

4.12. Preparação das soluções-padrão de trabalho (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0 g/l)

Diluir a solução-mãe, 20 g/l, (4.11) de forma adequada, com uma solução com 5 % vol. de álcool (4.10) para obter cinco padrões de trabalho de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0 g/l. Filtrar com um filtro de poro inferior ou igual a 0,45 µm (5.3.).

5. **Aparelhagem e equipamento**

5.1. Sistema de HPLC capaz de alcançar uma resolução de base do conjunto dos açúcares.

5.1.1. Cromatografia líquida de alta resolução com uma válvula de injeção de seis vias equipada com um circuito de 10 µL ou qualquer outro dispositivo, quer automático, quer manual, para uma injeção fiável de microvolumes.

5.1.2. Sistema de bombagem que permita obter e manter um caudal constante ou programado com grande precisão

5.1.3. Refratómetro diferencial.

5.1.4. Integrador ou registador informatizado, cujo desempenho seja compatível com o restante sistema.

5.1.5. Pré-coluna:

Recomenda-se a anexação de uma pré-coluna adequada à coluna analítica.

5.1.6. Coluna (exemplo):

Descrição:	aço inoxidável ou vidro.
Diâmetro interno:	2-5 mm.
Comprimento:	100-250 mm (dependendo da granulometria), por exemplo, 250 mm, caso as partículas tenham 5 µm de diâmetro.
Fase estacionária:	grupos funcionais de alquilamina ligados a sílica, granulometria máxima de 5 µm.

5.1.7. Condições cromatográficas (exemplo)

Solvente de eluição (4.8), taxa de fluxo: 1 ml/minuto.

Deteção: Refratometria diferencial.

A fim de assegurar que o detetor se encontra perfeitamente estável, este deve ser ligado algumas horas antes da utilização. A célula de referência deve ser preenchida com o solvente de eluição.

5.2. Balança analítica com exatidão de 0,1 mg.

5.3. Instalação de filtragem para pequenos volumes utilizando uma micromembrana de 0,45 µm.

6. **Armazenamento da amostra**

Após receção, as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente até ao momento das análises.

7. **Procedimento**

7.1. PARTE A: Preparação das amostras

7.1.1. Agitar a amostra.

▼ **M2**

7.1.2. Filtrar a amostra através de um filtro com um poro de dimensão inferior ou igual a 0,45 µm (5.3).

## 7.2. PARTE B: HPLC

## 7.2.1. Determinação

Injetar 10 µL das soluções-padrão (4.12) e das amostras (7.1.2). Efetuar a análise nas devidas condições cromatográficas, nomeadamente as descritas *supra*.

7.2.2. Caso um pico de uma amostra apresente uma área (ou altura) maior do que a do pico correspondente da solução-padrão mais concentrada, a amostra deve ser diluída com água destilada e novamente analisada.

## 8. Cálculos

Comparar os dois cromatogramas obtidos para a solução-padrão e para a bebida espirituosa. Identificar os picos pelos seus tempos de retenção. Medir a sua área (ou altura) para calcular as concentrações pelo método do padrão externo. Ter em conta as diluições a que a amostra foi sujeita.

O resultado final é a soma de sacarose, lactose, maltose, glicose e frutose, expressa em açúcar invertido em g/l.

O teor de açúcar invertido é calculado como a soma dos mono e dissacáridos redutores presentes e da quantidade estequiométrica de glicose e frutose, calculada a partir da sacarose presente.

$$\text{Açúcar invertido (g/l)} = \text{glicose (g/l)} + \text{frutose (g/l)} + \text{maltose (g/l)} + \text{lactose (g/l)} + (\text{sacarose (g/l)} \times 1,05)$$

$$1,05 = (\text{Peso Molecular de frutose} + \text{Peso Molecular de glicose}) / \text{Peso Molecular de sacarose}$$

## 9. Características do desempenho do método (precisão)

## 9.1. Resultados estatísticos do teste interlaboratorial

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método efetuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada [1] [2].

Ano de realização do teste interlaboratorial 2000

Número de laboratórios 24

Número de amostras 8

[1] «Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method- Performance Studies», Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) «Analytical Chemistry 54, 67A-76A».

## Quadro 1

## Frutose, Glicose, Maltose

Analitos	Frutose		Glicose			Maltose	
	Crème de Cassis	De compra padrão (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Crème de Cassis	De compra padrão (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	De compra padrão (10 g/l)
Valor médio [g/l]	92,78	50,61	15,62	93,16	50,06	15,81	9,32
Número de laboratórios sem casos anómalos	21	22	21	23	19	21	22

## ▼ M2

Analitos	Frutose		Glicose			Maltose	
	Crème de Cassis	De compra padrão (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	Crème de Cassis	De compra padrão (50 g/l)	Bebida espirituosa anisada	De compra padrão (10 g/l)
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [g/l]	2,34	2,12	0,43	3,47	1,01	0,48	0,54
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	2,53	4,2	2,76	3,72	2,03	3,02	5,77
Limite de repetibilidade, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	6,56	5,95	1,21	9,71	2,84	1,34	1,51
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	7,72	3,13	0,84	9,99	2,7	0,88	1,4
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	8,32	6,18	5,37	10,72	5,4	5,54	15,06
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	21,62	8,76	2,35	27,97	7,57	2,45	3,93

## Quadro 2

## Sacarose

Analitos	Sacarose					
	Pastis	Ouzo	Licor de cereja	Crème de menthe	Crème de Cassis	De compra padrão (100 g/l)
Valor médio [g/l]	10,83	29,2 19,7 (*)	103,33	349,96	319,84	99,83
Número de laboratórios sem casos anómalos	19	19	20	18	18	18
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [g/l]	0,09	0,75	2,17	5,99	4,31	1,25
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	0,81	3,07	2,1	1,71	1,35	1,25
Limite de repetibilidade, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,25	2,1	6,07	16,76	12,06	3,49
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,79	0,92	4,18	9,94	16,11	4,63
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	7,31	3,76	4,05	2,84	5,04	4,64
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,22	2,57	11,7	27,84	45,12	12,97

(\*) duplicados com teores diferentes

## ▼ M2

## Quadro 3

## Açúcares totais

(Nota: estes dados foram calculados para os açúcares totais, e não para o açúcar invertido, tal como definido na Secção 8 supra.)

Amostras	Pastis	Ouzo	Bebida espirituosa anisada	Licor de cereja	Crème de ment- he	Crème de Cas- sis	De com- pra pa- drão (220 g/l)
Valor médio [g/l]	10,86	29,2 19,7 (*)	31,59	103,33	349,73	509,69	218,78
Número de laboratórios sem casos anómalos	20	19	20	20	18	18	19
Desvio-padrão da repeti- bilidade, $s_r$ [g/l]	0,13	0,75	0,77	2,17	5,89	5,59	2,71
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	1,16	3,07	2,45	2,1	1,69	1,1	1,24
Limite de repetibilidade, $r$ [g/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,35	2,1	2,17	6,07	16,5	15,65	7,59
Desvio-padrão da repeti- bilidade, $S_R$ [mg/l]	0,79	0,92	1,51	4,18	9,98	14,81	8,53
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	7,25	3,76	4,79	4,04	2,85	2,91	3,9
Limite de reprodutibili- dade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	2,21	2,57	4,24	11,7	27,94	41,48	23,89

(\*) duplicados com teores diferentes

**▼ M1****IX. GEMA DE OVO. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO EM BEBIDAS ESPIRITUOSAS — MÉTODO FOTOMÉTRICO****1. Âmbito**

Este método é adequado para a determinação de concentrações de gema de ovo entre 40 g/l e 250 g/l em licores de ovos e licores à base de ovos.

**2. Referências normativas**

ISO 3696:1897 Water for analytical laboratory use — Specifications and test methods (Água para fins laboratoriais analíticos — Especificações e métodos de ensaio).

**3. Princípio**

Extracção dos compostos de fósforo solúveis em etanol existentes na gema de ovo e determinação fotométrica dos mesmos na forma de um complexo de fosfomolibdato.

**4. Material e reagentes**

4.1. Água bidestilada.

4.2. Terra de diatomáceas.

4.3. Etanol a 96 % vol (CAS 64-17-5).

4.4. Solução a 15 % de acetato de magnésio (CAS 16674-78-5).

4.5. Ácido sulfúrico a 10 % (CAS 7664-93-9).

4.6. Ácido sulfúrico 1 N.

4.7. Solução 0,16 g/l de di-hidrogenofosfato de potássio,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (CAS 778-77-0).

4.8. Reagente para a determinação dos fosfatos:

Dissolver 20 g de molibdato de amónio,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (CAS 12054-85-2), em 400 ml de água a 50 °C.

Dissolver, noutro recipiente, 1 g de vanadato de amónio,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (CAS 7803-55-6), em 300 ml de água quente; deixar arrefecer e adicionar 140 ml de ácido nítrico concentrado (CAS 7697-37-2). Juntar as soluções arrefecidas num balão volumétrico de 1 000 ml e completar o volume até ao traço de aferição.

**5. Aparelhagem e equipamento**

5.1. *Erlenmeyer* de 100 ml.

5.2. Banho de ultra-sons (ou agitador magnético).

5.3. Balão volumétrico de 100 ml.

5.4. Banho de água a 20 °C.

5.5. Filtro (Whatman n.º 4 ou equivalente).

5.6. Cadinho de porcelana (ou de platina).

5.7. Banho de água fervente.

5.8. Placa de aquecimento.

5.9. Mufla.

5.10. Balão volumétrico de 50 ml.

5.11. Balão volumétrico de 20 ml.

5.12. Espectrofotómetro regulado para 420 nm.

5.13. Célula de 1 cm.

**▼ M1****6. Amostras**

As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente até às análises.

**7. Técnica****7.1. Preparação da amostra**

7.1.1. Pesar 10 g da amostra num *erlenmeyer* de 100 ml (5.1).

7.1.2. Adicionar gradualmente, em pequenas quantidades, 70 ml de etanol (4.3), agitando após cada adição; colocar o recipiente num banho de ultra-sons (5.2) durante 15 minutos (ou agitar a mistura com um agitador magnético (5.2), durante 10 minutos, à temperatura ambiente).

7.1.3. Transferir o conteúdo do *erlenmeyer* para um balão volumétrico de 100 ml (5.3), lavando com etanol (4.3). Completar o volume com etanol (4.3) até ao traço de aferição e colocar o balão num banho de água a 20 °C (5.4). Completar o volume até ao traço de aferição, a 20 °C.

7.1.4. Adicionar uma pequena quantidade de terra de diatomáceas (4.2) e filtrar (5.5), rejeitando os primeiros 20 ml.

7.1.5. Transferir 25 ml do filtrado para um cadinho de porcelana (ou de platina) (5.6). Concentrar, em seguida, o filtrado por evaporação suave num banho de água fervente (5.7), adicionando 5 ml da solução a 15 % de acetato de magnésio (4.4).

7.1.6. Colocar o cadinho numa placa de aquecimento (5.8) e aquecer até à secura.

7.1.7. Incinerar o resíduo, por aquecimento até à incandescência, a 600 °C, numa mufla (5.9), até as cinzas ficarem brancas, no mínimo durante 1,5 horas (mas podendo ser deixado de um dia para o outro).

7.1.8. Juntar 10 ml de ácido sulfúrico a 10 % (4.5) às cinzas e transferir a solução resultante, com lavagens sucessivas de água destilada (4.1), para um balão volumétrico de 50 ml (5.10); completar o volume até ao traço de aferição, à temperatura ambiente, com água destilada (4.1). Utilizar uma alíquota de 5 ml desta solução de cinzas na preparação da solução-amostra para a determinação fotométrica dos fosfatos.

**7.2. Determinação fotométrica dos fosfatos.****7.2.1. Solução de comparação.**

7.2.1.1. Deitar 10 ml de ácido sulfúrico a 10 % (4.5) num balão volumétrico de 50 ml (5.10) e completar o volume com água destilada até ao traço de aferição (4.1).

7.2.1.2. Num balão volumétrico de 20 ml (5.11), juntar a uma alíquota de 5 ml desta solução (7.2.1.1) 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8); completar o volume até 20 ml com água destilada (4.1).

7.2.1.3. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer o balão num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos.

7.2.1.4. Encher uma célula de 1 cm (5.13) com esta solução de comparação.

**7.2.2. Solução-amostra.**

7.2.2.1. Num balão volumétrico de 20 ml (5.11), juntar a uma alíquota de 5 ml da solução de cinzas (7.1.8) 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8); completar o volume até 20 ml com água destilada (4.1).

**▼ M1**

7.2.2.2. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer o balão num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos.

7.2.2.3. Analisar de imediato, por espectrofotometria (5.12), a solução amarela formada, numa célula de 1 cm (5.13), a 420 nm, em relação à solução de comparação (7.2.1.4).

7.2.3. Curva de calibração.

7.2.3.1. Para traçar a curva de calibração, juntar alíquotas de 2 ml do reagente para a determinação dos fosfatos (4.8) a uma série de balões volumétricos de 20 ml (5.11) que já contenham 1 ml de ácido sulfúrico 1 N (4.6) e, respectivamente, 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml da solução de di-hidrogenofosfato de potássio (4.7); completar os volumes até ao traço de aferição de 20 ml com água destilada (4.1).

7.2.3.2. Tapar, mantendo a tampa solta, agitar e aquecer os balões num banho de água fervente (5.7), durante 10 minutos, arrefecendo depois num banho de água a 20 °C (5.4), durante 20 minutos; efectuar a análise espectrofotométrica (5.12), numa célula de 1 cm (5.13), a 420 nm, em relação à solução de comparação (7.2.1.4).

7.2.3.3. Traçado da curva de calibração:

Solução de di-hidrogenofosfato (ml)	0	2	4	6	8	10
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg)	0	0,167	0,334	0,501	0,668	0,835

## 8. Expressão dos resultados

O teor de gema de ovo, em g/l, é calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{gema de ovo (g/L)} = \text{mg P}_2\text{O}_5 \times \frac{110 \times \text{densidade}}{E/40}$$

Em que:

110 factor de conversão em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> total, em g por 100 g de gema de ovo,

mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> valor determinado pela curva de calibração,

densidade massa por unidade de volume (g/ml) do licor à base de gema de ovo, a 20 °C,

E massa, em g, do licor à base de gema de ovo,

40 factor de diluição da alíquota de 5 ml da solução de cinzas.

## 9. Características operacionais do método (precisão)

Resultados estatísticos do teste interlaboratorial:

O quadro seguinte reúne os valores referentes à gema de ovo.

Os dados a seguir discriminados foram obtidos com base num estudo internacional das características operacionais do método, efectuado segundo uma metodologia internacionalmente acordada.

Ano de realização do teste interlaboratorial: 1998

Número de laboratórios: 24

Número de amostras: 5

Analito: Gema de ovo

▼ M1

Amostras	A	B	C	D	E
Número de laboratórios considerado após eliminação dos casos anómalos	19	20	22	20	22
Número de casos anómalos (laboratórios)	3	4	2	4	2
Número de resultados aceite	38	40	44	40	44
Valor médio	147,3	241,1	227,4	51,9 (*) 72,8 (*)	191,1
Desvio-padrão da repetibilidade ( $S_r$ ) g/l	2,44	4,24	3,93	1,83	3,25
Desvio-padrão relativo da repetibilidade ( $RSD_r$ ) (%)	1,7	1,8	1,8	2,9	1,7
Limite de repetibilidade ( $r$ ) g/l	6,8	11,9	11,0	5,1	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade ( $S_R$ ) g/l	5,01	6,06	6,66	3,42	6,87
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) (%)	3,4	2,5	2,9	5,5	3,6
Limite de reprodutibilidade ( $R$ ) g/L	14,0	17,0	18,7	9,6	19,2

Tipos de amostra:

- A Advocaat, Duplicados cegos
- B Advocaat, Duplicados cegos
- C Advocaat, Duplicados cegos
- D Advocaat (diluído), Duplicados com teores diferentes (\*)
- E Advocaat, Duplicados cegos

▼ **M2****X. DETERMINAÇÃO DOS SEGUINTES COMPOSTOS DE MADEIRA NAS BEBIDAS ESPIRITUOSAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC): FURFURAL, 5-HIDROXIMETILFURFURAL, 5-METILFURFURAL, VANILINA, SIRINGALDEÍDO, CONIFERALDEÍDO, SINAPALDEÍDO, ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO, ÁCIDO VANÍLICO, ÁCIDO SIRÍNGICO E ESCOPOLETINA****1. Âmbito**

O método diz respeito à determinação de furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico e escopoletina, por cromatografia líquida de alta resolução.

**2. Referências normativas**

Método de análise reconhecido pela Assembleia-Geral da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) e publicado pela OIV sob a referência *OIV-MA-BS-16: R2009*.

**3. Princípio**

Determinação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), com deteção por espectrofotometria ultravioleta a vários comprimentos de onda e por espectrofluorimetria.

**4. Reagentes**

Os reagentes devem ser de qualidade analítica. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza pelo menos equivalente. É preferível utilizar águas microfiltradas com uma resistividade de 18,2 M  $\Omega$ .cm.

## 4.1. Álcool a 96 % vol.

## 4.2. Metanol para HPLC (Solvente B).

## 4.3. Ácido acético diluído em 0,5 % vol. (Solvente A).

## 4.4. Fases móveis: (a título de exemplo, apenas).

Solvente A (0,5 % de ácido acético) e Solvente B (metanol puro). Filtrar através de uma membrana (porosidade 0,45  $\mu$ m). Eliminar o gás num banho de ultrassons, se necessário.

## 4.5. Padrões de referência com uma pureza mínima de 99 %: furfural, 5-hidroximetilfurfural, 5-metilfurfural, vanilina, siringaldeído, coniferaldeído, sinapaldeído, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, ácido siríngico e escopoletina.

## 4.6. Solução-padrão: as substâncias padrão são dissolvidas numa solução aquoso-alcoólica com 50 % vol. de álcool. As concentrações finais na solução de referência devem estar na ordem de:

furfural: 5 mg/l; 5-hidroximetil furfural: 10 mg/l; 5-metilfurfural 2 mg/l; vanilina: 5 mg/l; siringaldeído: 10 mg/l; coniferaldeído: 5 mg/l; sinapaldeído: 5 mg/l; Ácido gálico: 10 mg/l; ácido elágico: 10 mg/l; ácido vanílico: 5 mg/l; ácido siríngico: 5 mg/l; escopoletina: 0,5 mg/l.

**5. Utensílios**

Material corrente de laboratório

## 5.1. Um cromatógrafo de fase líquida de alta resolução capaz de funcionar em modo de gradiente binário e equipado com:

## 5.1.1. Um detetor espectrofotométrico capaz de medir a comprimentos de onda de 260 a 340 nm. No entanto, é preferível trabalhar com um detetor de vários comprimentos de onda com sistema de díodos, ou similar, a fim de confirmar a pureza dos picos.

▼ **M2**

- 5.1.2. Um detetor espectrofluorimétrico — comprimento de onda de excitação: 354 nm, comprimento de onda emitido: 446 nm (para a determinação de escopoletina; que é também detetável por espectrofotometria a 313 nm).
- 5.1.3. Um dispositivo de injeção com capacidade para introduzir 10 ou 20 µL (por exemplo) da amostra em análise.
- 5.1.4. Uma coluna para cromatografia líquida de alta resolução, tipo RP C18, dimensão máxima das partículas de 5 µm.
- 5.2. Seringas para HPLC.
- 5.3. Dispositivo para filtração por membrana de pequenos volumes.
- 5.4. Computador integrador ou registador de desempenho compatível com toda a aparelhagem, devendo ter, em especial, vários canais de aquisição.

**6. Procedimento**

## 6.1. Preparação da solução a injetar

A solução de referência e a bebida espirituosa são filtradas, se necessário, através de uma membrana com um poro com 0,45 µm diâmetro máximo.

- 6.2. Condições de funcionamento da cromatografia: efetuar a análise à temperatura ambiente, seguindo as indicações fornecidas em 5.1, utilizando as fases móveis (4.4) com um fluxo de aproximadamente 0,6 ml por minuto de acordo com o seguinte gradiente (a título de exemplo, apenas)

Hora: 0 minutos 50 minutos 70 minutos 90 minutos

Solvente A (água-ácido): 100 % 60 % 100 % 100 %

Solvente B (metanol): 0 % 40 % 0 % 0 %

Importa salientar que, em certos casos, o gradiente deve ser alterado a fim de evitar coeluições.

## 6.3. Determinação

- 6.3.1. Injetar os padrões de referência separadamente, e posteriormente combinados.

Adaptar as condições de funcionamento de modo a que os fatores de resolução dos picos de todos os compostos sejam iguais a, pelo menos, 1.

- 6.3.2. Injetar a amostra preparada em conformidade com o ponto 6.1.
- 6.3.3. Medir a área dos picos na solução de referência e na bebida espirituosa, calculando igualmente as concentrações.

**7. Expressão dos resultados**

A concentração de cada componente deve ser expressa em mg/l.

**8. Características de desempenho do método (precisão)**

Os dados a seguir discriminados foram obtidos em 2009, com base num estudo internacional sobre o desempenho do método relativamente a uma série de bebidas espirituosas, tendo aquele sido efetuado segundo uma metodologia acordada a nível internacional [1], [2].

## 8.1. Furfural

Analitos	Furfural					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Número de laboratórios participantes	15	15	15	15	15	15
Número de resultados aceites (laboratórios)	14	12	13	14	13	13

## ▼ M2

Analitos	Furfural					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	2,9	1,2	1,7	10,6	15,3	13,9
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,04	0,05	0,04	0,18	0,23	0,20
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_r$ [%]	1,4	4,5	2,3	1,7	1,5	1,5
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,2	0,1	0,5	0,6	0,6
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,24	0,18	0,09	1,4	0,49	0,69
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_R$ [%]	8	15	5	13	3	5
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,7	0,5	0,3	3,8	1,4	1,9

## 8.2. 5-Hidroximetilfurfural

Analitos	5-Hidroximetilfurfural					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	16	16	16	16	16	16
Número de resultados aceites (laboratórios)	14	14	14	14	14	14
Valor médio [mg/l]	5,0	11,1	9,4	33,7	5,8	17,5
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,09	0,09	0,09	0,42	0,07	0,13
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_r$ [%]	1,7	0,8	1,0	1,3	1,2	0,8
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,39	1,01	0,50	4,5	0,4	1,6
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_R$ [%]	8	9	5	13	7	9
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,1	2,8	1,4	12,5	1,1	4,6

## 8.3. 5-Metilfurfural

Analitos	5-Metilfurfural					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	11	11	11	11	11	11
Número de resultados aceites (laboratórios)	11	11	8	11	10	11

## ▼ M2

Analitos	5-Metilfurfural					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	0,1	0,2	0,1	0,5	1,7	0,8
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03	0,07
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	10,7	6,1	13,6	4,7	2,0	10,0
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,18	0,20	0,26
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	35	18	22	39	12	35
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,1	0,5	0,6	0,7

## 8.4. Vanilina

Analitos	Vanilina					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceites (laboratórios)	16	15	16	16	16	16
Valor médio [mg/l]	0,5	0,2	1,2	1,2	3,2	3,9
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,11	0,11	0,09
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	6,8	9,6	4,6	8,9	3,5	2,3
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,09	0,06	0,18	0,27	0,41	0,62
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	19	25	15	22	13	16
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,3	0,2	0,5	0,8	1,2	1,7

## 8.5. Siringaldeído

Analitos	Siringaldeído					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceites (laboratórios)	13	13	13	12	14	13

## ▼ M2

Analitos	Siringaldeído					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	1,0	0,2	4,8	3,2	10,5	9,7
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,02	0,04	0,08	0,10	0,09
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_r$ [%]	2,6	8,1	0,8	2,6	0,9	0,9
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,08	0,07	0,23	0,19	0,39	0,43
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_R$ [%]	8	33	5	6	4	4
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,7	0,5	1,1	1,2

## 8.6. Coniferaldeído

Analitos	Coniferaldeído					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	13	12	13	12	13	13
Número de resultados aceites (laboratórios)	12	12	13	12	13	13
Valor médio [mg/l]	0,2	0,2	0,6	0,8	4,6	1,3
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,02	0,02	0,03	0,03	0,09	0,06
Desvio-padrão relativo da repetibilidade, $RSD_r$ [%]	9,2	9,8	4,6	4,3	1,9	4,5
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,04	0,04	0,07	0,09	0,24	0,16
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,04	0,04	0,11	0,18	0,38	0,25
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	23	27	21	23	8	19
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,1	0,1	0,3	0,5	1,1	0,7

## 8.7. Sinapaldeído

Analitos	Sinapaldeído					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	14	14	14	14	15	14
Número de resultados aceites (laboratórios)	14	13	12	13	13	12

## ▼ M2

Analitos	Sinapaldeído					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	0,3	0,2	0,2	1,6	8,3	0,3
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,02	0,01	0,02	0,06	0,14	0,03
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	7,5	4,6	11,2	3,7	1,6	11,4
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,06	0,03	0,06	0,17	0,38	0,08
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,09	0,05	0,08	0,20	0,81	0,18
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	31	27	46	13	10	73
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,2	0,2	0,6	2,3	0,5

## 8.8. Ácido gálico

Analitos	Ácido gálico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostra						
Número de laboratórios participantes	16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceites (laboratórios)	15	14	16	16	16	16
Valor médio [mg/l]	1,2	0,4	2,0	6,1	7,3	21,8
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,07	0,04	0,06	0,18	0,18	0,60
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	6,1	8,1	2,9	3,0	2,4	2,8
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,2	0,1	0,2	0,5	0,5	1,7
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,43	0,20	0,62	3,3	2,2	7,7
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	36	47	31	53	30	35
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	1,2	0,6	1,7	9,1	6,2	21,7

## 8.9. Ácido elágico

Analitos	Ácido elágico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	7	7	7	7	7	7
Número de resultados aceites (laboratórios)	7	7	7	7	7	6

## ▼ M2

Analitos	Ácido elágico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	3,2	1,0	9,5	13	13	36
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,20	0,16	0,30	0,41	0,95	0,34
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	6,3	16	3,2	3,2	7,4	1,0
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,6	0,4	0,9	1,1	2,7	1,0
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	1,41	0,42	4,0	5,0	4,9	14
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	44	43	42	39	39	40
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	4,0	1,2	11	14	14	40

## 8.10. Ácido vanílico

Analitos	Ácido vanílico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	15	15	15	15	15	15
Número de resultados aceites (laboratórios)	12	11	14	14	15	14
Valor médio [mg/l]	0,2	0,2	1,5	0,8	2,4	2,7
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,04	0,03	0,10	0,13	0,21
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	14,2	16,5	2,3	12,6	5,3	7,7
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,1	0,3	0,4	0,6
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,06	0,05	0,51	0,2	1,22	0,70
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	28	20	35	31	51	26
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,1	1,4	0,7	3,4	2,0

## 8.11. Ácido siríngico

Analitos	Ácido siríngico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	16	15	16	16	16	16
Número de resultados aceites (laboratórios)	16	15	15	15	16	15

## ▼ M2

Analitos	Ácido siríngico					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Valor médio [mg/l]	0,4	0,2	2,5	1,4	3,4	4,8
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,03	0,02	0,06	0,13	0,08	0,11
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	6,7	12,6	2,3	9,0	2,3	2,3
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,3
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,08	0,05	0,29	0,26	0,43	0,67
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	19	29	11	18	13	14
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,2	0,1	0,8	0,7	1,2	1,9

## 8.12. Escopoletina

Analitos	Escopoletina					
	Whisky	Conhaque	Rum	Conhaque 1	Bourbon	Conhaque 2
Amostras						
Número de laboratórios participantes	10	10	10	10	10	10
Número de resultados aceites (laboratórios)	9	8	9	8	8	8
Valor médio [mg/l]	0,09	0,04	0,11	0,04	0,65	0,15
Desvio-padrão da repetibilidade, $s_r$ [mg/l]	0,0024	0,0008	0,0018	0,0014	0,0054	0,0040
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_r$ [%]	2,6	2,2	1,6	3,3	0,8	2,7
Limite de repetibilidade, $r$ [mg/l] ( $r = 2,8 \times s_r$ )	0,007	0,002	0,005	0,004	0,015	0,011
Desvio-padrão da repetibilidade, $S_R$ [mg/l]	0,01	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade, $RSD_R$ [%]	15	16	23	17	15	15
Limite de reprodutibilidade, $R$ [g/l] ( $R = 2,8 \times s_R$ )	0,04	0,02	0,07	0,02	0,26	0,06

[1] «Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies», Horwitz, W. (1995) Pure and Applied Chemistry 67, 332-343.

[2] Horwitz, W. (1982) «Analytical Chemistry 54, 67A-76A».

▼ **M3****XI. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE <sup>14</sup>C DO ETANOL****1. Introdução**

A determinação do teor de <sup>14</sup>C do etanol permite estabelecer a distinção entre o álcool proveniente de matérias-primas fósseis (denominado álcool de síntese) e o álcool proveniente de matérias-primas não fósseis (denominado álcool de fermentação).

**2. Definição**

Por teor de <sup>14</sup>C entende-se o teor de <sup>14</sup>C determinado pelo método presentemente descrito ou pelo método descrito no método C da norma EN 16640.

O teor natural de <sup>14</sup>C proveniente da atmosfera (valor de referência) assimilado pelas plantas vivas não é constante. Por isso, o valor de referência é, de cada vez, determinado a partir do etanol proveniente de matérias-primas dos últimos períodos de crescimento. Este valor de referência anual é determinado de acordo com a norma EN 16640. Todavia, pode aceitar-se outro valor de referência desde que seja certificado por um organismo acreditado.

**3. Princípio**

O teor de <sup>14</sup>C de amostras que contenham uma percentagem-massa de etanol não inferior a 85 % é determinado diretamente num contador de cintilação líquida.

**4. Reagentes****4.1. Cintilador à base de tolueno**

5,0 g de 2,5-difeniloxazole (PPO)

0,5 g de *p*-bis-[4-metil-5-feniloxazol-2-il]-benzeno (dimetil-POPOP) em 1 litro de tolueno de qualidade analítica.

Podem também utilizar-se cintiladores à base de tolueno de origem comercial, prontos a utilizar, que possuam uma composição idêntica.

**4.2. Norma <sup>14</sup>C**

*n*-Hexadecano marcado com <sup>14</sup>C, com uma atividade aproximada de  $1 \times 10^6$  dpm/g (cerca de  $1,67 \times 10^6$  cBq/g) e uma precisão de atividade garantida de  $\pm 2$  %

**4.3. Etanol isento de <sup>14</sup>C**

Álcool de síntese, proveniente de matérias-primas fósseis, com uma percentagem-massa de etanol não inferior a 85 %, para a determinação do ruído de fundo.

**4.4. Álcool de matérias-primas não fósseis do último período de crescimento, com uma percentagem-massa de etanol não inferior a 85 %, como material de referência.****5. Equipamento****5.1. Contador de cintilação líquida de vários canais, equipado com um sistema de cálculo e com possibilidade de padronização automática externa, bem como indicação da distribuição dos canais (na maioria dos casos, utilizam-se três canais de medida e dois canais externos de padronização).****5.2. Frascos de contagem com baixo teor de hidróxido de potássio, adequados para o aparelho em causa e munidos de tampas roscadas revestidas internamente com polietileno.****5.3. Pipetas de 10 ml.****5.4. Sistema automático de dosagem, adequado para amostras de 10 ml.****5.5. Balões de fundo redondo de 250 ml, com rolha esmerilhada.****5.6. Dispositivo para a destilação do álcool, munido de um sistema de aquecimento.****5.7. Microsseringa de 50 µl.**

**▼ M3**

- 5.8. Picnómetros de 25 e 50 ml, munidos de funil. Em alternativa, devem ser permitidos equipamentos equivalentes, como a densimetria eletrónica.
- 5.9. Termóstato com uma temperatura constante de  $\pm 0,01$  °C.

**6. Procedimento****6.1. Otimização do aparelho**

O ajuste do aparelho deverá efetuar-se de acordo com as instruções do fabricante. As condições ótimas de operação correspondem a um valor máximo do quociente  $E_2/B$ , em que:

$E$  = eficiência eletrónica,

$B$  = ruído de fundo do aparelho (*background*).

Proceder-se-á à otimização de dois canais, destinando-se o terceiro às operações de controlo.

**6.2. Seleção dos frascos de contagem**

Encher um número de frascos de contagem superior ao necessário com 10 ml de álcool de síntese isento de  $^{14}\text{C}$  e 10 ml de cintilador à base de tolueno, procedendo às determinações de cintilação num intervalo de tempo mínimo de 4 ciclos  $\times$  100 minutos. Os frascos que exibam um desvio superior a  $\pm 1$  % relativamente ao valor médio deverão ser rejeitados. No processo de seleção, devem utilizar-se apenas frascos de contagem novos e provenientes do mesmo lote.

**6.3. Determinação da relação de canais para o padrão externo (ESKV)**

A par do ajuste dos canais referido no ponto 6.1, o cálculo do valor correspondente à distribuição dos canais externos de padronização (ESKV) é efetuado por intermédio do respetivo programa de cálculo, aquando da determinação da eficiência de contagem. Como padrão externo, deve-se utilizar céσιο-137, que se encontra já incorporado no aparelho.

**6.4. Preparação da amostra**

As amostras a analisar deverão possuir um teor de etanol não inferior a 85 %, encontrar-se isentas de impurezas suscetíveis e apresentar uma absorvância inferior a 450 nm. A pequena fração de ésteres e aldeídos eventualmente presente no destilado não interfere no processo posterior. Determina-se previamente o teor alcoólico da amostra com uma aproximação de 0,1 %.

**7. Medição das amostras com o padrão externo**

- 7.1. As amostras que possuam um coeficiente de extinção mais baixo, preparadas de acordo com o processo descrito em 6.4, que apresentem um valor de ESKV da ordem de 1,8, podem ser medidas por recurso à distribuição dos canais externos de padronização, de acordo com a eficiência de contagem:

**7.2. Medição**

Pipetar  $10\text{ cm}^3$  de amostra preparada de acordo com o método descrito no ponto 6.4, para cada frasco de contagem anteriormente selecionado. Adicionar  $10\text{ cm}^3$  de cintilador à base de tolueno, por recurso a um dispositivo de dosagem automática. Proceder à homogeneização das amostras, agitando os frascos de modo a que o conteúdo não atinja a camada de polietileno das tampas. Do mesmo modo, pipetar para um frasco de contagem etanol de origem fóssil, isento de  $^{14}\text{C}$ , para a determinação do ruído do aparelho. Para controlar o valor anual de referência de  $^{14}\text{C}$ , preparar um duplicado de etanol do último período de crescimento, a adicionar a um frasco de contagem que contenha o padrão interno referido no ponto 8.

As primeiras determinações devem abranger as amostras para controlo do valor de referência, bem como as amostras destinadas à determinação do ruído do aparelho. Não se deve proceder a mais de dez determinações em cada série de amostras. O tempo de análise total para cada amostra é de, pelo menos,  $2 \times 100$  minutos, repartidos em frações de 100 minutos, com vista a prever eventuais oscilações do aparelho ou outras perturbações (cada ciclo compreende, assim, um intervalo de medida de 100 minutos por amostra).

As amostras destinadas às determinações do ruído e controlo do valor de referência devem renovar -se de 4 em 4 semanas.

▼ **M3**

Nas amostras com coeficiente de extinção mais baixo (valor de ESKV da ordem de 1,8), a alteração deste valor não tem consequências significativas, no que se refere à eficiência de contagem. Assim, se esta alteração for da ordem de  $\pm 5\%$  rel., pode-se utilizar nos cálculos o mesmo valor de eficiência de contagem. Nas amostras com um coeficiente de extinção superior, nomeadamente amostras que contenham álcool desnaturado, a eficiência de contagem pode ser verificada por recurso à curva de correção relativa àqueles coeficientes. No caso de não se ter acesso a um programa de cálculo, deve determinar-se a eficiência de contagem com rigor, por recurso a um padrão interno.

## 8. Medição das amostras com um padrão interno de $^{14}\text{C}$ hexadecano

### 8.1. Procedimento

As medições referentes às amostras de controlo (álcool de origem não fóssil), bem como às amostras em estudo devem efetuar-se em duplicado. Deve introduzir-se um duplicado de cada amostra nos frascos de contagem não selecionados, juntando uma quantidade rigorosa (30  $\mu\text{l}$ ) de hexadecano marcado com  $^{14}\text{C}$  (padrão interno), que fornece uma atividade adicional de cerca de 26 269 dpm/gC (43 782 cBq/gC, aproximadamente). No que se refere à preparação das restantes amostras e aos respetivos tempos de medida, procede-se de acordo com a descrição fornecida no ponto 7.2, devendo-se, no caso das amostras que contenham o padrão interno, limitar o tempo de medida a cerca de 5 minutos, regulando a pré-contagem para  $10^5$  impulsos. Por cada série de determinações, devem preparar-se duplicados para controlo do valor de referência e determinação do ruído de fundo, a efetuar no início da referida série.

### 8.2. Manuseamento do padrão interno e dos frascos de contagem

Com vista a evitar quaisquer contaminações durante o processo de medição com o padrão interno, a preparação das amostras e as determinações devem efetuar-se num local afastado dos locais de armazenagem e manuseamento das restantes amostras. Após as determinações, os frascos selecionados na determinação do ruído de fundo poderão ser utilizados de novo. As tampas de rosca e os frascos utilizados nas medições com o padrão interno devem ser rejeitados.

## 9. Expressão dos resultados

### 9.1. A unidade de atividade de uma substância radioativa é o becquerel (1 Bq = 1 desintegração/s).

A indicação da radioatividade específica é fornecida em becquerel por grama de carbono (Bq/gC).

Com vista a obter valores fiáveis, os resultados devem ser apresentados em centibecquerel (cBq/gC).

As definições e fórmulas de cálculo apresentadas na bibliografia menos recente, expressas em dpm, também podem ser utilizadas. Para converter a centibecquerel os valores expressos em dpm, basta multiplicá-los pelo fator 100/60.

### 9.2. Cálculo com o padrão externo

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot 1,918 \cdot 100}{V \cdot F \cdot Z \cdot 60}$$

### 9.3. Cálculo com o padrão interno

$$\text{cBq/g C} = \frac{(\text{cpm}_{\text{pr}} - \text{cpm}_{\text{NE}}) \cdot \text{dpm}_{\text{IS}} \cdot 1,918 \cdot 100}{(\text{cpm}_{\text{IS}} - \text{cpm}_{\text{pr}}) \cdot V \cdot F \cdot 60}$$

### 9.4. Abreviaturas

$\text{cpm}_{\text{pr}}$  = taxa de contagem relativa à amostra, obtida através da média das determinações totais.

**▼ M3**

cpmNE = taxa de impulso correspondente ao ruído do aparelho, determinada de modo idêntico.

cpmIS = taxa de contagem relativa às amostras, com padrão interno.

dpmIS = quantidade de padrão interno adicionado (radioatividade de calibração, expressa em dpm).

V = volume de amostra, expresso em cm<sup>3</sup>.

F = teor de álcool puro, expresso em gramas por cm<sup>3</sup>.

Z = eficiência de contagem correspondente ao valor de ESKV.

1,918 = gramas de álcool/g de carbono.

**10. Precisão do método****10.1. Repetibilidade (r)**

$$r = 0,632 \text{ cBq/gC}; S_{(r)} = \pm 0,223 \text{ cBq/g C}$$

**10.2. Reprodutibilidade (R)**

$$R = 0,821 \text{ cBq/gC}; S_{(R)} = \pm 0,290 \text{ cBq/g C.}$$