Este documento constitui um instrumento de documentação e não vincula as instituições

►**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
►**M1**	Regulamento (CE) n.º 2091/2002 da Comissão de 26 de Novembro de 2002	L 322	11	27.11.2002

▼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

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta o Regulamento (CEE) n.º 1576/89 do Conselho, de 29 de Maio de 1989, que estabelece as regras gerais relativas à definição, à designação e à apresentação das bebidas espirituosas ([1]), com a última redacção que lhe foi dada pelo Acto de Adesão da Áustria, da Finlândia e da Suécia, e, nomeadamente, o n.º 8 do seu artigo 4.º,

Considerando o seguinte:

(1) O n.º 8 do artigo 4.º do Regulamento (CEE) n.º 1576/89 prevê a adopção de métodos de análise das bebidas espirituosas. Em caso de inspecção oficial ou litígio, devem ser utilizados métodos de referência que garantam a observância do Regulamento (CEE) n.º 1576/89 e do Regulamento (CEE) n.º 1014/90 da Comissão, de 24 de Abril de 1990, que estabelece as normas de aplicação para a definição, designação e apresentação das bebidas espirituosas ([2]), com a última redacção que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n.º 2140/98 ([3]).

(2) Sempre que possível, é conveniente adoptar como métodos de análise comunitários de referência métodos que beneficiem do reconhecimento geral, procedendo para o efeito à respectiva descrição.

(3) A fim de ter em conta os progressos científicos e as diferenças de equipamento dos laboratórios oficiais, é conveniente permitir, sob a responsabilidade do director do laboratório em questão, a aplicação de métodos baseados em princípios de medição diferentes dos utilizados nos métodos de referência descritos no anexo do presente regulamento, desde que tais métodos ofereçam garantias suficientes quanto a resultados e, em especial, satisfaçam os critérios estabelecidos no anexo da Directiva 85/591/CEE do Conselho, de 20 de Dezembro de 1985, relativa à introdução de modos de colheita de amostras e de métodos de análise comunitários para o controlo dos géneros destinados à alimentação humana ([4]), e que possa ser demonstrado que a exactidão, a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos por esses métodos não excedem os limites que caracterizam os resultados obtidos pelos métodos de referência descritos no presente regulamento. Desde que tal condição seja respeitada, pode ser autorizada a aplicação de outros métodos de análise. Todavia, é conveniente especificar que, em caso de litígio, os métodos alternativos em questão não substituem os métodos de referência.

(4) As medidas previstas no presente regulamento estão em conformidade com o parecer do Comité de Execução para as Bebidas Espirituosas,

ADOPTOU O PRESENTE REGULAMENTO:

Artigo 1.º

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

— em caso de controlo oficial, ou

([1]) JO L 160 de 12.6.1989, p. 1.
([2]) JO L 105 de 25.4.1990, p. 9.
([3]) JO L 270 de 7.10.1998, p. 9.
([4]) JO L 372 de 31.12.1985, p. 50.

▼B

— 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.

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) «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. Determinação do título alcoométrico volúmico

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 congéneres voláteis: aldeídos, álcoois superiores, acetato de etilo e metanol (cromatografia em fase gasosa)

III.3. Acidez volátil (p.m.)

IV. Ácido cianídrico (p.m.)

V. Anetol ►M1 ——— ◄

VI. Ácido glicirrízico ►M1 ——— ◄

VII. Calconas ►M1 ——— ◄

VIII. Açúcares totais (p.m.)

IX. Gema de ovo ►M1 ——— ◄

▼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 ºC.

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

3.2. *Densidade*

Entende-se por «massa volúmica» a massa por unidade de volume de uma bebida espirituosa no vácuo a 20 ºC. É expressa em quilograma por metro cúbico (símbolo ρ_{20} ºC ou ρ_{20}).

3.3. *Densidade relativa:*

Entende-se por «densidade relativa» a relação, expressa como número decimal, entre a densidade da bebida espirituosa a 20 ºC e a densidade da água à mesma temperatura. É utilizado o símbolo $d_{20\,°C/20\,°C}$ 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 ρ_{20} a 20 ºC:

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

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 ºC em função da densidade a 20 ºC 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).

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.

▼B

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

ρ_{20} (álcool) = 789,24 kg/m³

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 termostatizável entre 10 ºC e 15 ºC.

Banho de água termostatizável a 20 ºC (± 0,2 ºC).

4.2. Balões volumétricos aferidos de 100 ml ± 0,1 % e 200 ml ± 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.

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.

▼B

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 ºC).

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 ºC a 15 ºC 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 inícial do líquido ± 0,5 ºC, 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).

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.

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 ºC a 15 ºC 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 ± 0,5 ºC, 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 analise* 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 ºC e 30 ºC.

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 ºC,

— massa do picnómetro cheio de água a 20 ºC.

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 ºC,

— massa (T0) do frasco-tara.

▼B

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 × (P1 – P)

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

— Volume do picnómetro a 20 ºC:

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

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

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

— Massa da água contida no picnómetro a 20 ºC:

$M_{20\,°C} = V_{20\,°C} \times 0{,}998203$ em que 0,998203 é a densidade da água a 20 ºC.

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

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 ºC 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 × (p – p′).

— Volume do picnómetro a 20 ºC:

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

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

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

▼B

— Massa da água contida no picnómetro a 20 ºC:

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

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

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 ºC.

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 ºC:

= P2 – (P – m + dT).

— Densidade a t ºC em g/ml:

— $P_{t\,°C} = [P_2 - (P - m + dT)]/V_{20\,°C}$

— A densidade a t ºC (ρ_t) é expressa em kg/m³ multiplicando $\rho_{t\,°C}$ por 1 000.

— Corrigir ρ_t para ρ_{20} utilizando o quadro de densidades ρT para misturas hidroalcoólicas (quadro II do apêndice II do manual de métodos de análise da OIV, 1994, p. 17-29).

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

— Utilizando a linha correspondente a essa temperatura inteira, calcular a diferença entre a densidade ρ′ constante do quadro imediatamente superior a ρ_t e a densidade calculada ρ_t. Dividir essa diferença pela diferença constante do quadro à direita da densidade ρ′. 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 ρ′ (título alcoométrico Dt).

Nota 4: Outra possibilidade é manter o picnómetro num banho de água a 20 ºC ± 0,2 ºC 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 ρ_{20} e no quadro de título alcoométrico a seguir especificado:

Quadro internacional do título alcoométrico volúmico (% vol) de misturas hidroalcoólicas a 20 ºC em função da densidade a 20 ºC 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 ºC.

A.4.2.2.2. Cálculos

— Massa do líquido contido no picnómetro a t ºC:

= p + m – p″.

— Densidade a t ºC em g/ml:

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

— A densidade a t ºC é expressa em kg/m³ e corrigida em função da temperatura, calculando-se o título alcoométrico a 20 ºC conforme descrito para o caso da utilização de uma balança com um único prato.

▼B

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

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 analise* 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

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.

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 ± 0,02 ºC.

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

B.3.3. Seringas de injecção 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 ρ_{20} ou o título alcoométrico indicado pelo densímetro.

B.4.3. Resultados

Quando for utilizada a densidade ρ_{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 ºC em função da densidade a 20 ºC 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
Número de resultados aceite	22	26	30	32	28	26

▼B

Amostras	A	B	C	D	E	F
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
Limite 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
Limite 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 VOLÚMICO 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 analise* 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.

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

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 volúmica e densidade relativa», do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2676/90 (p. 7).

▼B

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 ºC e 25 ºC, de preferência a 20 ºC.

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 ºC e 25 ºC, de preferência a 20 ºC.

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 (ρ_t) for determinada a t ºC, registar a temperatura.

C.4.4.3. Corrigir ρ_t para ρ_{20} utilizando o quadro de densidades ρT 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.

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 ρ_{20} e no quadro de título alcoométrico a seguir especificado.

Quadro internacional do título alcoométrico volúmico (% vol) de misturas hidroalcoólicas a 20 ºC em função da densidade a 20 ºC 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

▼B

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_r) (%)	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_R) (%)	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

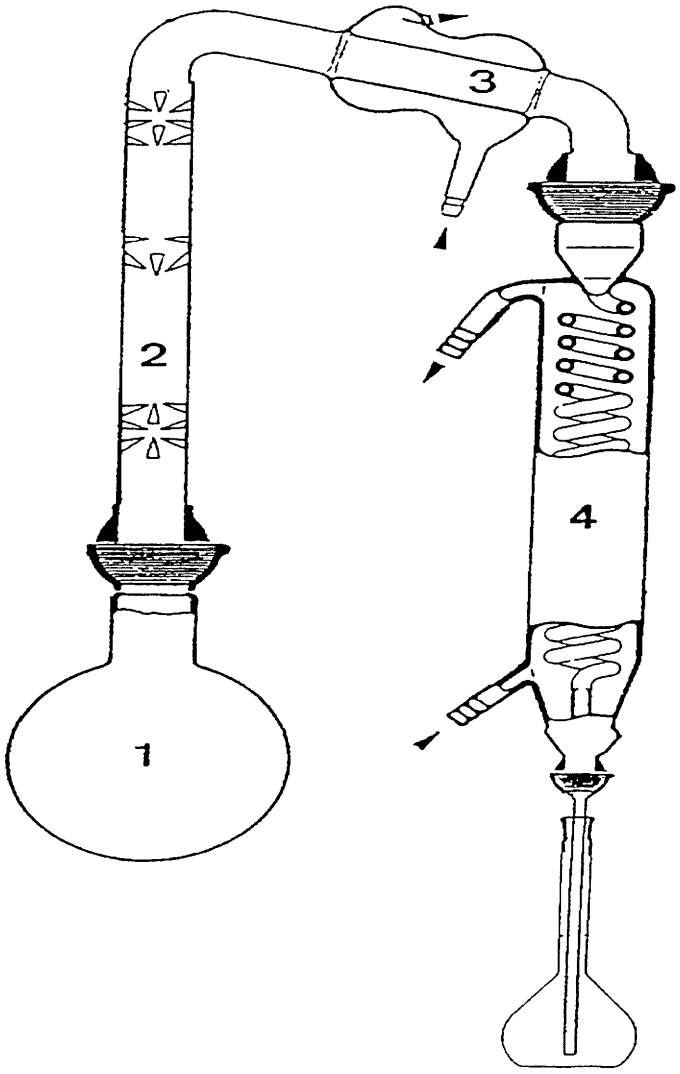


Figura 1. Aparelho de destilação para a determinação do título alcoométrico volúmico de bebidas espirituosas

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 ºC ± 3 ºC 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 etanálicas 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 CROMATOGRAFIA 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).

3. **Definição**

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

▼B

4. **Princípio**

A determinação dos compostos aparentados presentes numa bebida espirituosa é efectuada por injecção directa da mesma, eventualmente diluída, num sistema de cromatografia em fase gasosa. Antes da injecção 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 injecção 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 ºC; 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.

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

As soluções-padrão serão conservadas a uma temperatura inferior a 5 ºC 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. Registar 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

▼B

Componente	Volume (ml)
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.

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.

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

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.

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 compo-

▼B

nentes 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 gás:	Hélio (135 kPa)
Temperatura na coluna:	35 ºC durante 17 minutos, aumento de 35 ºC para 70 ºC à razão de 12 ºC/ /minuto, manutenção a 70 ºC durante 25 minutos
Temperatura no injector:	150 ºC
Temperatura no detector:	250 ºC
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 gás:	Hélio (65 kPa)
Temperatura na coluna:	35 ºC durante 10 minutos, aumento de 35 ºC para 110 ºC à razão de 5 ºC/ /minuto, aumento de 110 ºC para 190 ºC à razão de 30 ºC/minuto, manutenção a 190 ºC durante 2 minutos
Temperatura no injector:	260 ºC
Temperatura no detector:	300 ºC
Volume injectado:	1 µl (divisão da amostra: 55:1).

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

Temperatura na coluna:	65 ºC durante 4 minutos, aumento de 65 ºC para 140 ºC à razão de 10 ºC/ /minuto, manutenção a 140 ºC durante 5 minutos, aumento de 140 ºC para 150 ºC à razão de 5 ºC/minuto, manutenção a 150 ºC durante 3 minutos
Temperatura no injector:	65 ºC
Temperatura no detector:	200 ºC
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.

▼B

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 ºC, 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 ºC, 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 integrador para cada injecção, 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.

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

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

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 injecção da solução-padrão C (5.14.3), calcular os factores de resposta de cada composto aparentado através da equação (1).

▼B

(1) Factor da resposta =

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

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 (µg/g) =

$$\frac{\text{Área ou altura do pico do composto aparentado}}{\text{Área ou altura do pico do padrão interno}} \; 1\times \frac{M_{PI}\,(g)}{M_{AMOSTRA}\,(g)} \times \text{Concentração do PI (µg / g)} \times FR$$

em que:

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

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) 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 µg/g para grama por 100 l de álcool absoluto é efectuada através da equação (4)

(4) Concentração em grama por 100 l de álcool absoluto =

Concentração µg / g) × ρ × 10/[título (% vol) × 1 000)

em que

ρ = densidade em kg/m³.

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).

▼B

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
Número de resultados aceite	56	52	54	54	56
Valor médio ($\bar{x}$) µg/g	63,4	71,67	130,4	38,4 13,8 (*)	28,6 52,2 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	9,3	5,3	19,1	11,6	10,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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

▼B

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 ($\bar{x}$) µg/g	96,8	1 046	120,3	112,5 91,8 (*)	99,1 117,0 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	6,2	40,7	7,2	5,8	7,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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 (*).

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

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 6,60 (*)	15,1 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_r) (%)	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_R) (%)	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

▼B

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 15,8 (*)	32,7 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_r) (%)	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
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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 ($\bar{x}$) µg/g	319,8	2 245	1 326	83,0 61,5 (*)	18,6 28,9 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/g	4,4	27	22	1,5	1,3

▼B

Amostras	A	B	C	D	E
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) (%)	1,4	1,2	1,7	2,1	5,6
Limite de repetibilidade (r) µg/g	12,3	74,4	62,5	4,3	3,8
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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

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 ($\bar{x}$) µg/g	5,88	250,2	27,57	5,83 14,12 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	1,1	6,1	2,5	1,8
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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

▼B

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 ($\bar{x}$) µg/g	86,4	3 541	159,1	272,1 229,3 (*)	177,1 222,1 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	8,3	68,5	10,0	6,4	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/g	5,3	150	6,5	9,0	8,1
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	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_r) µg/g	0,43	0,20	0,43
Desvio-padrão relativo da repetibilidade (RSD_r) (%)	11,2	3,6	5,6
Limite de repetibilidade (r) µg/g	1,1	0,6	1,2
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/g	0,59	0,55	0,82
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	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 (*).

▼B

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
Valor médio ($\bar{x}$) µg/g	174,2	111,7	185,0	291,0 246,8 (*)	115,99 133,87 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	6,4	4,5	6,9	5,0	2,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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-mettil-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 ($\bar{x}$) µg/g	113,0	48,3	91,6	72,1 45,2 (*)	39,5 61,5 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	6,0	4,2	4,7	6,4	6,3
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/g	7,4	3,8	6,6	4,7	4,5

▼B

Amostras	A	B	C	D	E
Desvio-padrão relativo da reprodutibilidade (RSD_R) (%)	6,6	7,9	7,2	8,1	8,8
Limite de reprodutibilidade (R) µg/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 (*).

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 ($\bar{x}$) µg/g	459,4	242,7	288,4	142,2 120,4 (*)	212,3 245,6 (*)
Desvio-padrão da repetibilidade (S_r) µg/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) µg/g	13,9	6,6	9,6	6,6	9,1
Desvio-padrão da reprodutibilidade (S_R) µg/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) µg/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 (*).

▼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-alilanisol (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; injecção 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 ºC), 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 ºC.

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-alilanisol (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 ºC-35 ºC), 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-alilanisol 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.

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.

▼M1

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 injecção manual das amostras.

5.2. Injector 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):

6.1. Gás vector: hélio *pro analise*

6.2. Caudal: 2 ml/minuto

6.3. Temperatura no injector: 250 ºC

6.4. Temperatura no detector: 250 ºC

6.5. Condições de temperatura da fornalha: isotérmica a 180 ºC; 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.

▼M1

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 injecção, 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.

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_i)

O factor de resposta é calculado do seguinte modo:

RFi = (Ci/área ou alturai)*(área ou altura pi/Cpi)

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)

$área_i$ é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

$área_{pi}$ é a área (ou altura) do pico do padrão interno

O RF_i 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:

ci = Cpi * (área ou alturai/área ou alturapi)*RFi

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)

$área\ ou\ altura_i$ é a área (ou altura) do pico do trans-anetole

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

▼M1

RF_i 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_i é calculado a partir dos resultados das cinco injecções 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_i será aceitável.

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.

▼M1

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

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:

$Ci = (mpi/V)* (áreai/áreapi) *RFi$

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)

$área_i$ é a área do pico do trans-anetole

$área_{pi}$ 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

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	—	—

▼**M1**

Amostras	A	B	C	D	E	F
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 cegos

B *Pastis*, duplicados cegos

C *Pastis*, duplicados cegos

D *Pastis*, duplicados cegos

E *Pastis*, amostra singela

F *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 injecção 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, $C_{42}H_{62}O_{16}.NH_3$ (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_3COOH (CAS 64-19-7)

4.4. Metanol, CH_3OH (CAS 67-56-1)

4.5. Etanol a 50 % vol.

Para preparar 1 000 ml, a 20 ºC:

— 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).

Filtrar com um filtro para solventes orgânicos.

▼M1

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).

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:

▼**M1**

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

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 glicirrizinato 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 glicirrizinato de amónio de referência

823 é a massa de uma mole de ácido glicirrízico

840 é a massa de uma mole de glicirrizinato 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_r) g/l	0,001	0,001	0,001	0,002	0,003
Desvio-padrão da repetibilidade (RSD_r) (%)	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_R) g/l	0,004	0,007	0,004	0,006	0,013
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_3CN (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_3COONa (CAS 127-09-3)

4.5. Ácido acético glacial, CH_3COOH (CAS 64-19-7)

4.6. Preparação das soluções

4.6.1. Etanol a 50 % vol

Para preparar 1 000 ml, a 20 ºC:

— 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.

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.

▼M1

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 ºC ± 0,1 ºC.

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,

— estabilização da coluna entre as injecções,

— 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).

▼M1

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).

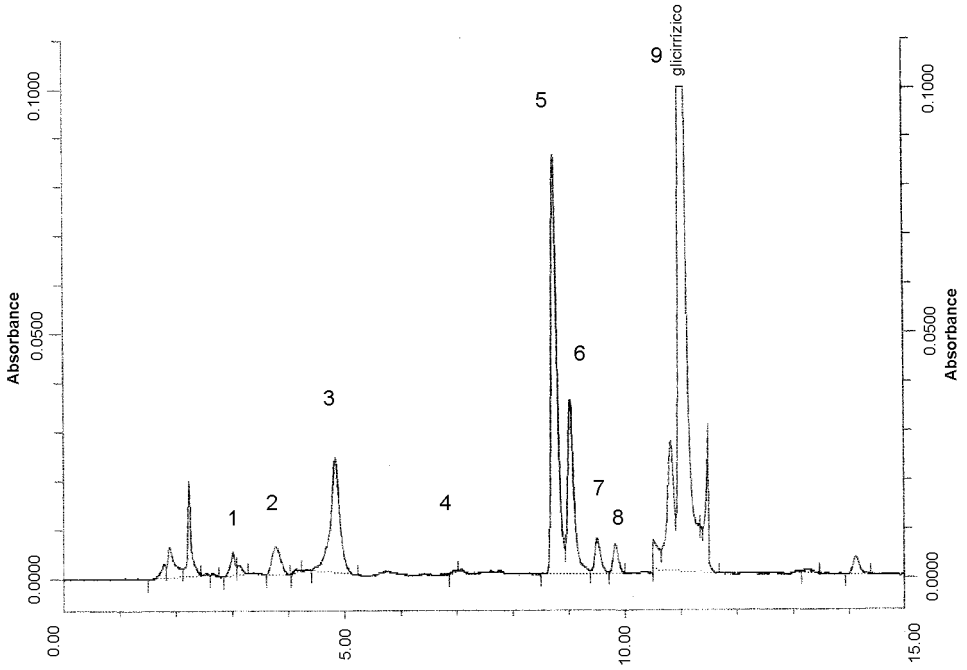
7.3.2. Injectar 20 µl da amostra (7.1) da bebida espirituosa anisada. Efectuar a análise nas condições cromatográficas acima descritas (6.5).

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.



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

▼**M1**

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

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

▼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, KH_2PO_4 (CAS 778-77-0).

4.8. Reagente para a determinação dos fosfatos:

Dissolver 20 g de molibdato de amónio, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ (CAS 12054-85-2), em 400 ml de água a 50 ºC.

Dissolver, noutro recipiente, 1 g de vanadato de amónio, NH_4VO_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 ºC.

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.

6. Amostras

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

▼M1

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 ºC (5.4). Completar o volume até ao traço de aferição, a 20 ºC.

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 ºC, 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 ºC (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).

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 ºC (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).

▼M1

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 ºC (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_2O_5 (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:

$$\text{gema de ovo (g/L)} = \text{mg } P_2O_5 \times \frac{110 \times \text{densidade}}{E/40}$$

Em que:

110	factor de conversão em P_2O_5 total, em g por 100 g de gema de ovo,
mg de P_2O_5	valor determinado pela curva de calibração,
densidade	massa por unidade de volume (g/ml) do licor à base de gema de ovo, a 20 ºC,
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

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

▼**M1**

Amostras	A	B	C	D	E
Limite de reprodutibilidad (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,Duplicadoscegos