

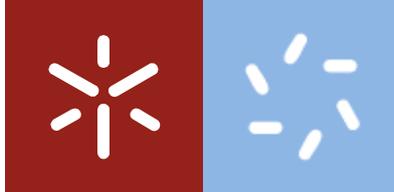


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Marta Adriana Félix Forte

**Desenvolvimento de métodos analíticos  
para controlo de qualidade de resinas naturais**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Marta Adriana Félix Forte

**Desenvolvimento de métodos analíticos  
para controlo de qualidade de resinas naturais**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação do

**Professor Doutor Pier Parpot**

e do

**Doutor Nuno Costa**

Nome: Marta Adriana Félix Forte

Endereço eletrónico: martadrianaff@gmail.com

Título: Desenvolvimento de métodos analíticos para controlo de qualidade de resinas naturais

Orientadores:

Doutor Nuno Costa, empresa Eurochemicals Portugal, S.A;

Doutor Pier Parpot, docente Departamento de Química.

Ano de Conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Este trabalho é fruto de todos os meus anos de aprendizagem, ao longo destes anos aprendi tudo e por isso queria agradecer:

Ao Dr. Pier Parpot, Dr. Nuno Costa e à Mestre Helena Costa por proporcionarem este projeto, me transmitirem todos os conhecimentos, toda a orientação e por me esclarecerem todas as minhas mil e uma dúvidas;

A todas as pessoas da EuroChemicals Portugal SA por me receberem tão bem, pelo carinho que me deram, por todos os ensinamentos e por me despertarem a curiosidade para esta indústria;

Aos meus amigos por caminharem comigo durante estes anos, pois são um dos motivos da felicidade e um grande apoio. Estiveram sempre comigo em todos os momentos da minha vida e acompanharam todas as ansiedades e alegrias durante a realização deste projeto.

À minha família que fez de mim a pessoa que sou hoje, deu-me a possibilidade de estudar, compreenderam todos os meus medos, ajudaram-me sem nunca hesitar, mesmo que isso custasse perder a paciência. Obrigada por tudo.

*“Ohana quer dizer família e na família ninguém  
é deixado para trás, ou é esquecido...”*

Chris Sanders e Dean DeBlois

# Desenvolvimento de métodos analíticos para controlo de qualidade de resinas naturais

## Resumo

A extração da resina vem dos tempos primórdios, mas só a partir do século XV é que se começou a comercializar. Atualmente, este sector é muito forte e muito importante para o quotidiano do Homem, pois com esta matéria-prima é pode-se obter produtos para diferentes indústrias. O objetivo principal deste estudo foi implementar e validar um método utilizando a técnica de análise, cromatografia gasosa com um detetor de ionização de chama (GC-FID). Um método foi otimizado para a análise de ácidos gordos e ácidos resínicos presentes em amostras de colofónia e *tall oil* e outro método foi otimizado para identificar e quantificar terpenos em amostras provenientes de terpenos. A análise foi acompanhada de tratamento estatístico utilizado para validação de métodos utilizando o método do padrão interno. Os parâmetros de estudo da validação consistiram na análise da curva de calibração, gama de trabalho, teste de Mandel e precisão. Os ensaios de recuperação apenas foram realizados para a análise de compostos monoterpénicos existentes na aguarrás.

Palavras-chave: GC-FID, validação, resinas, terbenquina, ácidos gordos, ácidos resínicos, terpenos



# Development of analytical methods for quality control of natural resins

## Summary

The resins extraction started in the prehistory, but the productivity in large scale has been initiated of the 15th century. Currently, this sector is very strong and very important for the everyday life, because the outcome provide products for different industries. This study aims to implement and validate an analytical method which is for by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID). One method was been optimized for the analysis of fatty and resinic acids present in samples of rosin and tall oil. The other method was been optimized for the identification and quantification of terpenes in samples of turpentine. For both methods the parameters of validation were calibration curve, accuracy, working range, and Mandel test. The recovery was only evaluated for terpenic compounds.

Key words: GC-FID, validation, resin, turpentine, fatty acids, resin acids, terpen



## Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Summary .....	vii
Lista de abreviaturas .....	xiii
Lista de ilustrações.....	xiv
Lista de tabelas .....	xiv
Capítulo 1. Introdução e Revisão bibliográfica.....	17
1.    Introdução.....	17
1.1.    Empresa .....	18
1.2.    Resina e resinagem .....	19
1.2.1.    Resina .....	19
1.2.2.    História da resinagem.....	19
1.2.3.    Fatores que influenciam a resinagem.....	20
1.2.4.    Técnicas de resinagem .....	21
1.2.5.    Consequências da resinagem .....	23
1.3.    Colofónia .....	23
1.3.1.    Composição química .....	24
1.3.2.    Análises.....	25
1.3.2.1.    Cor.....	26
1.3.2.2.    Número de ácido .....	26
1.3.2.3.    Ponto de amolecimento .....	27
1.3.2.4.    Número de saponificação.....	28
1.3.2.5.    Viscosidade .....	28
1.3.3.    Aplicações .....	29
1.4. <i>Tall oil</i> .....	29
1.4.1.    Processamento <i>tall oil</i> .....	30
1.4.2.    Composição química .....	31
1.4.3.    Análises.....	33

1.4.3.1.	Cor.....	33
1.4.3.2.	Insaponificáveis .....	33
1.4.3.3.	Número de ácido .....	33
1.4.4.	Aplicações .....	34
1.5.	Aguarrás.....	34
1.5.1.	Composição química .....	35
1.5.2.	Análises.....	36
1.5.3.	Aplicações .....	36
Capítulo 2.	Materiais e métodos.....	37
2.1.	Cromatografia.....	39
2.1.1.	Equipamento .....	40
2.1.1.1.	Injetor.....	40
2.1.1.2.	Coluna.....	41
2.1.1.3.	Detetores.....	43
2.1.2.	Derivatização .....	43
2.2.	Validação do método .....	44
2.2.1.	Seletividade/especificidade .....	45
2.2.2.	Calibração e linearidade.....	45
2.2.3.	Valores suspeitos/ <i>Outliers</i> .....	48
2.2.4.	Limiares analíticos .....	48
2.2.4.1.	Limite de deteção .....	49
2.2.4.2.	Limite de quantificação .....	50
2.2.5.	Gama de trabalho.....	51
2.2.6.	Teste de Mandel .....	52
2.2.7.	Precisão .....	53
2.2.7.1.	Reprodutibilidade .....	55
2.2.7.2.	Repetibilidade .....	56

2.2.7.3.	Reprodutibilidade intralaboratorial/intermédia ou precisão interna .....	57
2.2.8.	Exatidão .....	58
2.2.8.1.	Material de referência certificado.....	58
2.2.8.2.	Método proposto vs método utilizado.....	59
2.2.8.3.	Ensaio colaborativos.....	59
2.2.8.4.	Ensaio de recuperação.....	59
2.3.	Materiais e reagentes.....	61
Capítulo 3. Tratamento de resultados e discussão .....		63
3.1.	Análise das soluções e misturas padrão de ácidos gordos e resínicos em resinas e <i>tall oil</i> .....	65
3.1.1.	Curvas de calibração .....	66
3.1.1.1.	Ácido palmítico .....	67
3.1.1.2.	Ácido linoleico.....	68
3.1.1.3.	Ácido oleico .....	69
3.1.1.4.	Ácido esteárico .....	70
3.1.1.5.	Ácido abiético .....	71
3.1.2.	Teste de Mandel .....	73
3.1.3.	Gama de trabalho.....	74
3.1.4.	Amostras.....	76
3.1.5.	Precisão .....	76
<i>i.</i>	Ensaio de recuperação.....	78
3.2.	Análise das soluções e misturas padrão de terpenos em aguarrás.....	78
3.2.1.	Curva de calibração .....	80
3.2.1.1.	$\alpha$ – pineno .....	80
3.2.1.2.	Canfeno.....	81
3.2.1.3.	$\beta$ -pineno .....	82
3.2.1.4.	Limoneno .....	83
3.2.2.	Teste De Mandel.....	85

3.2.3.	Gama de trabalho.....	86
3.2.4.	Amostras.....	87
3.2.5.	Precisão .....	88
3.2.6.	Ensaio de recuperação.....	89
Capítulo 4.	Conclusão.....	93
4.	Conclusão .....	95
Capítulo 5.	Bibliografia.....	97
5.	Bibliografia .....	99
Anexos	.....	110

## Lista de abreviaturas

ASTM - Sociedade Americana de Testes e Materiais (*American Society for Testing and Materials*)

BSTFA - N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (*N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide*)

CV – Coeficiente de Variação (*Coefficient of Variation*)

CTO – *tall oil* bruto (*crude tall oil*)

DTO – Tall Oil Destilado(*Distilled Tall Oil*)

GC-FID – Cromatografia Gasosa – Detetor De ionização de chama Chama Iônica (*Gas Chromatography – Flame Ionic Detector*)

ISO - Organização Nacional de Padronização (*International Organization for Standardization*)

IUPAC – União internacional de química pura e aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)

RSD – Desvio Padrão Relativo (*Relative Standard Deviation*)

TMCS - Trimetilclorosilano (*Trimethylchlorosilane*)

TOFA – Ácidos Gordos de *Tall Oil* (*Tall oil fatty acids*)

TOP – *Tall Oil* de *pitch* (*Tall Oil pitch*)

TOR – Colofónia de *Tall Oil* (*Tall Oil Rosin*)

## Índice de figuras

Figura 1 Espécimes de Pinus Pinaster Aiton. ....	17
Figura 2. Resina em várias partes de pinheiro. ....	19
Figura 3. Métodos de resinagem. ....	22
Figura 4. Estruturas químicas de ácidos do tipo abiético e pimárico. ....	25
Figura 5. Montagem para a análise do ponto de amolecimento c) em que a) é o disco onde se coloca a resina, b) corresponde ao disco que se coloca por cima da resina com esfera no seu interior. ....	27
Figura 6. Viscosímetro Brookfield de leitura em disco. ....	28
Figura 7. Estrutura química do ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico ....	32
Figura 8. Estrutura química de terpenos encontrados na aguarrás. ....	36
Figura 9. Esquema de um equipamento de GC-FID. ....	40
Figura 10. Coluna WCOT. ....	41
Figura 11. Contribuição dos termos A, B e C da Equação de Van Deemter. ....	42
Figura 12. Cromatograma de uma solução de 10 ppm de ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico e ácido abiético obtido num GC-FID sob o método especificado nas condições da tabela 6. ....	66
Figura 13. Fragmento de um cromatograma de uma amostra de aguarrás. ....	88

## Índice de tabelas

Tabela 1. Espécies de pinheiros que são vantajosas para a extração de resina. ....	21
Tabela 2. Classificação das cores da colofónia e os nomes atribuídos a cada cor da mesma ....	26
Tabela 3. Tabela de número de ácido, número de saponificação e percentagem de ácidos gordos e resínicos de CTO em alguns países. ....	32
Tabela 4. Percentagem de desvio padrão relativo máximo aceitável para diversas concentrações. ....	54
Tabela 5. Taxa de analito e a respetiva percentagem de recuperação. ....	60
Tabela 6. Condições de operação, de GC-FID Clarus 580 e especificações da coluna capilar BP-5, utilizadas para as análises das soluções padrão, mistura de soluções padrão de ácidos gordos e resínicos, resinas, colofónia, tall oil. ....	65
Tabela 7. Tabela do tempo de retenção dos ácidos em estudo, quando analisados nas condições cromatográficas mencionadas na tabela 6. ....	66
Tabela 8. Valores dos parâmetros calculados e tabelados a partir da construção da curva de calibração para cada ácido em estudo pelo método cromatográfico apresentado na tabela 6. ....	72
Tabela 9. Gamas de trabalho utilizadas para os restantes processos de validação de cada ácido. ....	73

Tabela 10. Valores de desvio padrão residual e diferença das variâncias para uma curva de calibração de segundo grau, mais valores calculados de PG e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em $F_{n-1^a, n-1^b}$ , $n-1^a$ é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e $n-1^b$ é o número de graus de liberdade da variância do denominador. ....	73
Tabela 11. Valores calculados de PG e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em $F_{n-1^a, n-1^b}$ , $n-1^a$ é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e $n-1^b$ é o número de graus de liberdade da variância do denominador. ....	75
Tabela 12. Maiores, M, e menores, m, valores de repetibilidade, r, calculados para cada ácido na análise de amostras e na análise de soluções elaboradas para a gama de trabalho.....	77
Tabela 13. Condições de operação, de GC-FID Clarus 580, com uma coluna capilar DB-5, utilizadas para as análises das soluções padrão, mistura de soluções padrão de terpenos e aguarrás. ....	79
Tabela 14. Valores dos parâmetros calculados e tabelados a partir da construção da curva de calibração para cada terpeno em estudo pelo método cromatográfico apresentado na tabela 13. ....	84
Tabela 15. Gamas de concentração teóricas utilizadas para os restantes processos de validação de cada terpeno. ....	85
Tabela 16. Valores de desvio padrão residual e diferença das variâncias para uma curva de calibração de segundo grau, mais valores calculados de PG e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em $F_{n-1^a, n-1^b}$ , $n-1^a$ é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e $n-1^b$ é o número de graus de liberdade da variância do denominador. ....	85
Tabela 17. Valores calculados de PG e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada terpeno. Em $F_{n-1^a, n-1^b}$ , $n-1^a$ é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e $n-1^b$ é o número de graus de liberdade da variância do denominador. ....	87
Tabela 18. Maiores, M, e menores, m, valores de repetibilidade, r, calculados para cada terpeno na análise de amostras e na análise de soluções elaboradas para a gama de trabalho.....	89
Tabela 19. Valores de fortificação dos terpenos em estudo, F, e respetiva recuperação percentual, R (%), inseridos em uma gama de trabalho. ....	91
Tabela 22. Concentração de ácido palmítico, $C_{\text{palmítico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx0$ , para amostras, A, e limiares analíticos.....	110
Tabela 23. Concentração de ácido linoleico, $C_{\text{linoleico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx0$ , para amostras, A e limiares analíticos .....	111
Tabela 24. Concentração de ácido oleico, $C_{\text{oleico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx0$ , para amostras, A e limiares analíticos .....	112
Tabela 25. Concentração de ácido oleico, $C_{\text{esteárico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx0$ , para amostras, A e limiares analíticos. ....	113

Tabela 26. Concentração de ácido oleico, $C_{\text{abiético}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx_0$ , para amostras, A e limiares analíticos. ....	114
Tabela 27. Concentração de $\alpha$ -pineno, $C_{\alpha\text{-pineno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx_0$ , para amostras, T e limiares analíticos. ....	115
Tabela 28. Concentração de canfeno, $C_{\text{canfeno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx_0$ , para amostras, T e limiares analíticos. ....	116
Tabela 29. Concentração de $\beta$ -pineno, $C_{\beta\text{-pineno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx_0$ , para amostras, T e limiares analíticos. ....	117
Tabela 30. Concentração de limoneno, $C_{\text{limoneno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão, $sx_0$ , para amostras, T e limiares analíticos. ....	118

# **Capítulo 1. Introdução e Revisão bibliográfica**



## 1. Introdução

As coníferas são as plantas pertencentes à ordem Coniferales<sup>1,2</sup>. Uma das famílias que pertence a esta ordem é a *Pinaceae*, inclusive o género *Pinus*, vulgarmente conhecido por pinheiro (figura 1), que existe abundantemente nas florestas, locais com climas temperados e tropicais, e em locais onde as condições climatéricas são severas<sup>1-5</sup>. No total a área florestada é cerca de um terço da Terra e os pinheiros fazem parte de 20% do total, mas, para além desta elevada percentagem, também têm uma grande longevidade, tal como a maior parte das coníferas<sup>1,2,6</sup>.



Figura 1 Espécimes de *Pinus Pinaster* Aiton<sup>7</sup>.

A urbanização, a revolução industrial e agrícola geradas pelo Homem ao longo dos séculos, assim como incêndios, pragas e alterações climatéricas contribuíram para a desflorestação<sup>6</sup>. Uma forma de lidar com os solos degradados, erodidos e abandonados é recupera-los cultivando os pinheiros, pois diminuem a erosão, há fixação das dunas e o vento não é tão agressivo para o solo<sup>3,8</sup>. A primeira reflorestação foi feita no sudoeste europeu plantando a espécie *Pinus Pinaster* ou pinheiro marítimo<sup>6</sup>. A florestação de pinheiros tem ainda como vantagens não precisar de elevada manutenção, o crescimento é rápido e os espécimes tem elevada longevidade, logo é uma mais valia por ser barato e prático<sup>8,9</sup>. A longevidade do pinheiro deve-se à resina, que apesar de atrair as pragas pelo odor da terbentina (que depois volatiliza), estas ficam retidas na resina e o pinheiro não fica debilitado, ou até mesmo morto<sup>1-3,8,10</sup>.

A resina é constituída por uma ampla variedade de produtos naturais<sup>8</sup>. A partir da destilação da resina obtêm-se a terbentina e a colofónia<sup>1,2,5,8,11-17</sup>. A terbentina é a fração volátil constituída por mono e sesquiterpenos, enquanto que a colofónia é constituída por ácidos gordos e ácidos diterpenos resínicos<sup>8,10,15</sup>.

O número de aplicações para a resina e derivados é enorme, atualmente é utilizada em tintas e colas<sup>14,18,19</sup>, vernizes, adesivos<sup>19</sup>, produtos cosméticos<sup>19,20</sup>, alimentares<sup>14,19</sup>, farmacêuticos<sup>15</sup>. Recentemente estão a decorrer estudos para adicionar esta seiva a combustíveis, com o objetivo de diminuir o impacto dos combustíveis fósseis<sup>3</sup>.

Os escandinavos criaram um método de produção de papel, a partir do pinheiro, denominado de *Kraft*<sup>1-25</sup>. A partir deste processo pode-se obter *Tall oil* bruto, que é constituído essencialmente por ácidos gordos, resínicos, *pitch* e terpentina<sup>21,23,24</sup>.

A validação é um modo de mostrar que o método analítico é adequado ao propósito a partir de vários testes<sup>26-29</sup> e que pode ser utilizado para análises de rotina<sup>26</sup>. Quanto maior o número de testes realizados, maior é o controlo de qualidade das amostras<sup>28</sup>.

## 1.1. Empresa

A Eurochemicals Portugal SA situa-se em São Romão do Neiva pertencente à cidade de Viana do Castelo e é uma empresa criada em 1970 denominada de Sociedade Portuguesa Resina Dismutada SA, em que só se produzia resina dismutada. Na década de 90 começou a alargar a sua variedade de compostos e iniciou a produção de derivados resínicos. No ano de 2000 obtém o certificado ISO 9001:2000 e passado oito anos consegue cumprir os requisitos da certificação ISO 14001:2004 e em 2013 obteve a certificação OHSAS 18001. Hoje, a Eurochemicals produz vários produtos, tendo como matéria-prima principal a colofónia. A partir desta produzem colofónia não cristalizada, ésteres, principalmente para a indústria dos adesivos, colofónia dismutada, adutos de maleico esterificados com aplicação em tintas e vernizes, também fazem dispersões de ácidos resínicos que podem ser utilizados na indústria papeleira. Para além destes compostos estão decorrer estudos para desenvolver novos produtos. A produção de qualquer produto está acompanhada de várias análises físicas e químicas, segundo normas seguidas mundialmente, que garantem o controlo de qualidade. Atualmente a capacidade de produção da fábrica é de 25 000 toneladas.

## 1.2. Resina e resinagem

### 1.2.1. Resina

No tronco das coníferas, mais precisamente nos canais de resina é onde se conseguem armazenar e sintetizar a resina que é uma mistura de terpenos bastante viscosa (Figura 2)<sup>18,30,31</sup>. As oleorresinas ou *soft resin* tem elevada percentagem de componentes voláteis, por isso é mais líquida que a resina comum<sup>18,30-32</sup>.

Os canais das plantas do género *Pinus* estão distribuídos no tronco verticalmente e radialmente<sup>30,33</sup>. Os canais verticais contem xilema e podem atingir até 50 cm, e os canais radiais são incorporados em raios denominados de raios fusiformes e tem vários anéis compostos por xilema e floema<sup>30,33</sup>. De acordo com um estudo realizado em 27 espécimes de pinheiro-da-escócia verificou-se que há maior quantidade de resina perto do centro e conforme se aproxima do exterior da árvore o teor de resina diminui cerca de 1%<sup>18</sup>.



Figura 2. Resina em várias partes de pinheiro<sup>34</sup>.

### 1.2.2. História da resinagem

Uma das primeiras referências da resina de pinheiro aparece na bíblia, mais precisamente na famosa história da arca de Noé. Já nos tempos da era romana, o imperador Ausónio ditou que os pinheiros do sul de França tinham de ser perfurados, para extrair a goma<sup>1,5</sup>. No século XV e XVI os ingleses colonizaram a América, e, pelo contacto com os povos indígenas aprenderam a arte de obter resina, das espécies *Pinus elliotii* e *Pinus palustris*<sup>1,5,35</sup>. Este novo produto foi logo comercializado nos portos marítimos, em Inglaterra e em colónias de Carolina e Geórgia, devido à

sua elevada qualidade para selar e remendar fendas dos barcos. Também era utilizada para iluminar os barcos<sup>1,5,8,35</sup>.

Nas primeiras décadas do século XVII, a Europa começou a trabalhar com resina, e na segunda metade do mesmo século, em Carolina do Norte, atingiu-se um novo patamar com a extração de *tall oil* bruto e colofónia. Em 1840 havia uma vasta plantação de pinheiros e a maior parte da população colaborava para o sucesso desta indústria<sup>13</sup>. Passado 15 anos, França também apostou na plantação de árvores e ainda hoje parte dessa plantação existe<sup>13</sup>. Em 1862, a Espanha começou a extrair colofónia e terebentina, a partir da goma, e a guerra civil dos Estados Unidos contribuiu para o crescimento europeu. De tal modo que, entre 1870 e 1898 os produtores de resina juntam-se e formaram a União Resineira Espanhola, para competir com a França<sup>13</sup>. No outro lado do globo, em 1896, Índia começou a comercializar a resina após observar os indígenas dos Himalaias a retirar a goma dos pinheiros. A alguns quilómetros de distância os habitantes de Butão combinavam a extração de resina com a extração de óleos naturais<sup>1,5,14,35</sup>.

Em 1960 os Estados Unidos da América tinham 50% da produção de resina e a restante parte, pertencia a Portugal, Espanha, Grécia e à antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, URSS<sup>36</sup>. Nas últimas décadas do século XX, Nepal começou a industrializar-se na área da resinagem ajudando a Índia e posteriormente, o governo fundou *Nepal Rosin and turperntine in geta of Kailali district of Nepal*<sup>35</sup>. Desde a década de 80 que Brasil é um exportador e importador de pinheiros do género *Pinus Elliotti*, e atualmente, é o segundo produtor mundial desta espécie, estando em primeiro lugar a China, com um total de 20 espécies de pinheiros<sup>13,36</sup>.

### 1.2.3. Fatores que influenciam a resinagem

A recolha da resina dos pinheiros tem o nome de resinagem. Este processo é feito desde a antiguidade e grande parte dos pinheiros podem ser utilizados para este fim. No entanto, é necessário ter em conta se é favorável recorrer à extração, quer por motivos económicos, quer pela qualidade e quantidade de resina que se pode obter, uma vez que depende intrinsecamente da genética de cada espécie<sup>1,5,8,14,15,35-38</sup>. A tabela 1 mostra as várias espécies que são utilizadas para a resinagem e a sua localização geográfica<sup>5,14</sup>.

Tabela 1. Espécies de pinheiros que são vantajosas para a extração de resina<sup>5,14,15</sup>.

Espécie de Pinus	Local
<i>Brútia</i>	Turquia, Creta, Chipre
<i>Caribaea</i>	Quênia, África do Sul, Venezuela, Brasil, China
<i>Elliottii</i>	Argentina, Brasil, Quênia, África do Sul, Zimbabué, Estados Unidos da América, China
<i>Halapensis</i>	Grécia
<i>Kesiya</i>	China
<i>Massaoniana</i>	China
<i>Merkusii</i>	China, Indonésia, Vietnam, Tailândia
<i>Oocarpa</i>	Honduras, México
<i>Pinaster</i>	Portugal, Espanha, França
<i>Radiata</i>	Quênia
<i>Roxburghii</i>	Índia, Paquistão, Nepal
<i>Sylvestris</i>	Lituânia, Polónia, Rússia
<i>Yunnanensis</i>	China

Existe um leque de fatores que influenciam a qualidade e a quantidade da resina, tal como a espécie de pinheiro e o meio envolvente<sup>1,3,5,8,14</sup>. Além da espécie a morfologia de cada espécime é importante, ou seja, o diâmetro do tronco e a altura deste tem dimensões para se obter maior quantidade de resina. A resina encontra-se mais do tronco do que nos ramos<sup>8,38,39</sup>. O solo, o ar a precipitação, a humidade e o clima influenciam a produção da goma de pinheiro, sendo maior em condições mais quentes, secas, do que, em frias e duras<sup>5,8,15,38,40</sup>. Por fim, a técnica de resinagem utilizada no pinheiro influencia as próximas resinagens<sup>5,14,38,40</sup>.

#### 1.2.4. Técnicas de resinagem

Existem vários métodos para extrair resina com diferentes técnicas. O método mais antigo consiste em colocar um recipiente no tronco e com um objeto afiado corta-se em profundidade o tronco, uma ou mais vezes, acima do recipiente. Lentamente, a resina escorre e após encher o recipiente, este é retirado. O recipiente pode ser feito de plástico ou metal, a variedade de materiais e formas para cortar o tronco é muito vasta e diversificada<sup>1,5,13,14,35,40</sup>. O período de resinagem a partir de um canal de resina, existente no pinheiro, pode demorar até 5 anos, e nesse caso o processo tem o nome de resinagem leve. Contrariamente, existe a extração de resina exaustiva, em que se abrem vários canais de resina e extrai-se toda a resina do pinheiro<sup>5,14,35</sup>. É comum deixar um espaçamento de 10 cm entre cada canal de resina<sup>5</sup>.

Há um outro método para obter a resina dos pinheiros, em que, após retirar uma porção de casca mais externa da árvore, espalham-se químicos irritantes na madeira, de modo a estimular a extração da resina. Em regra, o químico irritante mais utilizado é uma pasta de ácido sulfúrico,

apesar de existirem mais produtos este é o mais utilizado, por ser mais barato e mais eficiente a estimular a produção de goma<sup>1,3,5,8,13,35,36,38,40</sup>. Esta pasta sulfúrica tem capacidade estimulante até quatro semanas<sup>13</sup>.

A figura 3 mostra os vários métodos de corte utilizados em resinagem com ou sem estimulantes para a extração resínica. O primeiro método é mais utilizado na China e não precisa de estimulantes. O corte em V faz com que a resina se concentre no meio formando um fio fino. Como o recipiente não está perto do corte, este é exposto ao xilema secundário e a recolha é feita diariamente. A versão americana deste método difere na medida em que, o púcaro está perto dos cortes em V ou horizontais, que são maiores, há remoção da casca de duas em duas semanas e recorre-se ao uso de pasta sulfúrica. Neste método o corte não influencia a quantidade de produto natural extraído. O terceiro método é conhecido por método francês ou de *Hugues* (Pierre Hugues), em que se retira a casca até atingir o xilema secundário dos troncos<sup>8,14</sup>. O último procedimento foi elaborado em 1950. É conhecido por método de *Mazek* (Mazek Fialla) ou *Rill*. O formato dos cortes é em V, com uma espessura muito fina, fazem-se mais cortes a cada um, três ou mais durante oito meses. É considerado dos melhores métodos porque não há cortes muito profundos, assim, a madeira do pinheiro mantém o seu valor; o período de recolha de resina é longo e com o uso de estimulantes, cortes contínuos faz com que o rendimento de cada árvore durante o tempo de resinagem seja maior e conseqüentemente há mais postos de trabalho<sup>8,14</sup>.

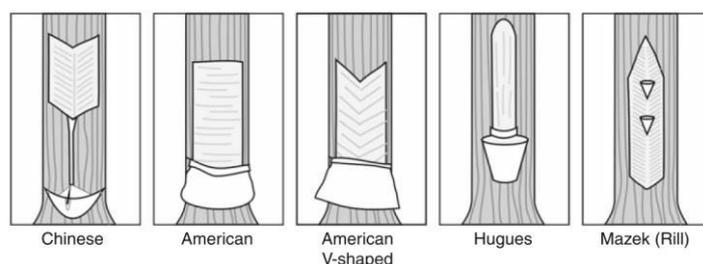


Figura 3. Métodos de resinagem<sup>8</sup>.

Após aplicar os processos de resinagem os canais libertam a goma natural do pinheiro<sup>1,3,18,30,41,42</sup>. Esta seiva é um dos produtos madeireiros mais importantes do pinheiro<sup>1,15</sup>. A indústria encarregue dos produtos resínicos é chamada de *Naval Stores*, devido à época em que os trabalhadores da marítima britânica utilizavam produtos não madeireiros para consertar os navios<sup>1,14,21,41,43</sup>. Existe a *Gum Naval Stores* que trata da resina obtida do processo de resinagem intensiva enquanto as árvores estão vivas e corresponde a 60% da indústria; a *Sulphate Naval Stores* trata da colofónia de *tall oil* que é a transformação das lascas de madeira em polpa de

madeira pelo processo de *Kraft*, que depois é destilado. O rendimento deste processo de produção de colofónia corresponde a 35%<sup>1,14,21,41</sup>. Este produto também tem elevados teores de ácidos gordos, resínicos e colofónia de *tall oil*. A última indústria tem o nome de *Gum Naval Stores* e encarrega-se da última resinagem do pinheiro, assim como do seu abate<sup>1,14</sup>. Depois de recolher a resina esta é sujeita a um processo de destilação a vapor, obtendo duas frações<sup>3</sup>. A primeira fração destilada é denominada de aguarrás ou terbentina, a sua constituição é maioritariamente terpénica e a fração não volátil e ácida é a colofónia sólida ou pez<sup>1-3,5,15,41</sup>.

### 1.2.5. Consequências da resinagem

As técnicas atuais de resinagem são favoráveis, na medida em que, não há abate dos pinheiros para extrair resina, e assim, pode-se efetuar estes métodos por mais anos, dado que a produção de resina é contínua<sup>1,3,5</sup>. Mas, se durante a resinagem houver elevada remoção dos tecidos mais externos do tronco há formação de cicatrizes nas árvores e estas vão diminuir a capacidade de produzir resina. O mesmo acontece quando há extrações contínuas e muito agressivas para o pinheiro, que pode resultar num atrofiamento do crescimento do tronco<sup>1,5,35</sup>. Por entre as feridas, o pinheiro liberta resina e o aroma característico desta atrai espécies do género *Dendroctonus*, *Ips* e *Scolytus*. De seguida, os insetos atacam em massa o pinheiro, penetrando até à medula do tronco, pois precisam de um local para se reproduzirem. Decorre a penetração há inoculação de fungos patogénicos, e supõe-se que eles é que provocam a morte do pinheiro, por destruição do floema e diminuindo o fluxo de água do xilema<sup>1-5</sup>.

## 1.3. Colofónia

A colofónia é o produto que existe em maiores quantidades na resina e dos mais valiosos, para a indústria, com uma produção anual que ultrapassa 1 milhão de toneladas<sup>1,41,43</sup>. Existem três processos de obtenção de colofónia: goma de colofónia (*Gum Rosin*), a colofónia da madeira (*Wood Rosin*) e a colofónia do *tall oil* (*Tall Oil Rosin*). A goma de colofónia é a que se vende mais e é obtida a partir dos processos de resinagem dos pinheiros enquanto vivos. Quando se abatem os pinheiros os seus cepos são cortados e mergulhados num solvente para extrair a colofónia proveniente da madeira. A colofónia de *tall oil* é obtida a partir da destilação do *tall oil bruto* obtido no processo de *kraft*<sup>21,41</sup>.

### 1.3.1. Composição química

Apesar da colofónia estar desde os tempos mais antigos só durante a segunda metade do século XX é que se começou a estudar a química deste produto natural<sup>21</sup>. Uma das razões da sua importância é por ser recurso renovável, outra é a sua vasta diversidade ao nível da composição química que resulta em diferentes produtos finais lançados no mercado<sup>43</sup>. A colofónia é não volátil a sua forma comum é sólida vítrea e quebra-se com facilidade<sup>1,5,14,21,41</sup>. É semi-transparente e insolúvel em água e apenas solúvel em alguns solventes orgânicos<sup>1,5,14,21</sup>. Tem um cheiro bastante característico que se intensifica quando aquecido ou acima dos 70°C pois a resina evapora facilitando a mobilidade e a evaporação dos compostos voláteis<sup>43</sup>. Na sua composição química existe maioritariamente ácidos resínicos pertencentes aos diterpenos com anéis de hidrofenantreno cicloalifáticos e aromáticas<sup>8,20,44,45</sup> e aproximadamente 10% de materiais neutros<sup>21,41,43,46</sup>. Na colofónia o ácido resínico que existe em maiores quantidades é o abiético e os restantes ácidos do grupo resínico têm funcionalizações adicionais provocadas pelas ligações duplas, são isómeros, diastereoisómeros do ácido abiético<sup>2,41,43,44,47</sup>. Ou seja, os ácidos resinosos são uma classe de estereoisómeros com 3 ou 4 centros de quiralidade que são constituídos quatro isoprenos<sup>41,47</sup>. Têm pesos moleculares baixos e uma viscosidade baixa<sup>43,21</sup>. A sua temperatura de transição vítrea é maior que 100 °C<sup>21</sup>. Estes compostos são metabolitos secundários da cicloisomerização do difosfato de geranylgeralino<sup>8,31,44,48</sup>.

Os ácidos abiético, neoabiético, palustrico e levopimárico tem a estrutura similar, a diferença entre eles é posição do sistema de ligação dupla conjugada e um grupo isopropil ou isoprenil no carbono da posição 13.<sup>20,21,43,45</sup> A ligação dupla conjugada torna os ácidos quimicamente reativos, o que é bastante atrativo para diversas aplicações industriais<sup>2,20,21,49</sup>. Este grupo de ácidos estão mais sujeitos a polimerizações oxidativas<sup>2,21</sup>. A polimerização aumenta o peso molecular e faz com que haja um aumento do ponto de amolecimento e um abaixamento da solubilidade compostos não aromáticos<sup>43</sup>.

O ácido dehidroabiético é o produto da desidrogenação do ácido abiético<sup>2,21,49</sup>. O terceiro anel do ácido abiético tem carácter aromático<sup>44,49</sup> e está sujeito a reações de nitração, sulfonação, reações de *Friedel-Crafts* e halogenação<sup>21,49</sup>. O ácido dehidroabiético é principal composto que torna a colofónia bastante cristalina e com um ponto de amolecimento inferior<sup>2,21</sup>.

Os ácidos pimárico, isopimárico e sandaracopimárico tem todos os mesmo esqueleto e o

carbono da posição 13 não tem ligações duplas, mas sim grupos metil ou vinil. O fato de não terem uma dupla conjugada faz com que estes ácidos não sejam reativos, sendo menos procurados para as aplicações<sup>20,21</sup>

Os ácidos estão em equilíbrio uns com os outros. A resina do pinheiro no estado natural contém 30 a 50% do ácido levopimárico<sup>43</sup>. Durante o procedimento para obter a colofónia, por ação de calor ou adição de ácidos sem seres resínicos, há isomerização do ácido levopimárico a ácido abiético que é mais estável que o ácido levopimárico<sup>43,50</sup>. No processo da colofónia da madeira ou da colofónia do *tall oil* a quantidade de ácido levopimárico é muito baixa, existe em maiores quantidades ácidos do tipo abiético e ácido dehidroabiético<sup>43</sup>. Como há praticamente um isômero a capacidade que a colofónia tem para cristalizar é muito maior. O número de substâncias insaponificáveis também faz com que a cristalinidade do composto diminua, como exemplo há a colofónia proveniente da América do Norte, das Honduras e a colofónia da madeira (*Wood Rosin*) (figura 4)<sup>43</sup>.

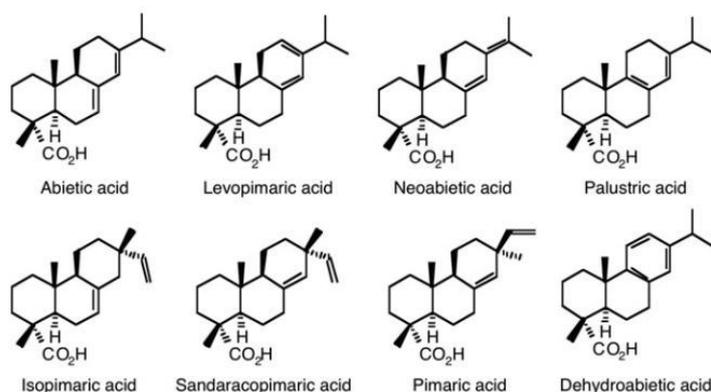


Figura 4. Estruturas químicas de ácidos do tipo abiético e pimárico<sup>44</sup>.

### 1.3.2. Análises

A quantidade dos ácidos resínicos depende de vários fatores como as espécies de pinheiros e origem geográfica<sup>21</sup>. Outros fatores que influenciam muito a composição da resina é o modo como se manuseia e processa a amostra, pois pode alterar o pH e a temperatura. Estas mudanças fazem com que as ligações duplas dos ácidos resínicos isomerizem. Existem várias análises físico-químicas que são utilizadas com bastante frequência e revelam a qualidade da colofónia<sup>21</sup>. As principais análises a fazer à colofónia são: a cor, o número de ácido, insaponificáveis<sup>3,21</sup>. A viscosidade é aplicada a derivados de colofónia<sup>3,21</sup>. Antes de efetuar cada

análise as amostras tem procedimentos de amostragens que devem ser seguidos rigorosamente<sup>21,51-53</sup>.

### 1.3.2.1. Cor

A classificação da cor é seguida pelos procedimentos da norma ASTM D 1544-98 (tabela 2). O teste consiste em comparar a cor da amostra de colofónia com a cor de amostras padrão. A amostra de colofónia é recolhida, aquecida e quando estiver fundida é vertida para um molde. Após o arrefecimento é retirada do molde colocada num equipamento específico e compara-se a cor<sup>52</sup>. As cores estão associadas a letras, sendo que as letras mais claras são XA, XB, ..., WW e WG e as mais escuras são N, M e K<sup>43,52,54</sup>. A cor da colofónia é muito importante a nível industrial pois mostra quão oxidada está. O grau de oxidação está indiretamente relacionado com a qualidade, logo colofónias menos oxidadas têm maior valor comercial<sup>21</sup>.

**Tabela 2. Classificação das cores da colofónia e os nomes atribuídos a cada cor da mesma\***

<b>Letra</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Designação oficial</b>
X	<i>Extra waterwhite</i>	<i>Extra</i>
WW	<i>Waterwhite</i>	<i>White</i>
WG	<i>Window glass</i>	<i>Glass</i>
N	<i>Nancy</i>	<i>Extra Pale</i>
M	<i>Mary</i>	<i>Pale</i>
K	<i>Kate</i>	<i>Low Pale</i>
I	<i>Isaac</i>	<i>Good No. 1</i>
H	<i>Harry</i>	<i>No. 1</i>
G	<i>George</i>	<i>Low No. 1</i>
F	<i>Frank</i>	<i>Good No. 2</i>
E	<i>Edward</i>	<i>No. 2</i>
D	<i>Dolly</i>	<i>Good Strained</i>
B	<i>Betty</i>	<i>Common Strained</i>

### 1.3.2.2. Número de ácido

O número de ácido é determinado como consta na norma ASTM D 465 -82. Se as cores forem claras usa-se o método da titulação com um indicador de fenolftaleína, mas para colofónias escuras utiliza-se o método potenciométrico efetuando na mesma uma titulação. A amostra é dissolvida numa solução alcoólica, adiciona-se um indicador de pH (fenolftaleína ou azul timol) e

vai-se adicionando lentamente a solução de hidróxido de sódio (KOH) até a solução corar. No método potenciométrico dissolve-se a amostra em um álcool neutro. Seguidamente, mergulha-se o elétrodo de pH e adiciona-se a mesma solução de KOH até obter o ponto de viragem (pH de 10,8). Através dos mililitros de solução de KOH utilizada, da normalidade da mesma solução, da massa molar de hidróxido de potássio, 56,1 g/mol e das gramas de amostra utilizada obtém-se um número de ácido em mg de KOH/g de amostra (equação 1)<sup>53</sup>. Este resultado é indicador da quantidade de grupos carboxílicos livres<sup>21,53</sup>.

$$n^{\circ} \text{ de ácido} = \frac{56,1AN}{B} \quad (\text{equação 1})$$

### 1.3.2.3. Ponto de amolecimento

O ponto de amolecimento é feito aquecendo a colofónia e colocando-a num molde em forma de anel. Por cima do anel coloca-se outra estrutura anelar onde se põe uma esfera. Estas duas peças e um termómetro são postas numa estrutura que é mergulhada num copo com solvente e aquecida a 80 °C numa placa de aquecimento. Aumenta-se 5 °C por minutos e com o passar do tempo e com o aquecimento a resina vai amolecendo e a bola passa pelos dois moldes anelares ficando envolvida na amostra. Regista-se a temperatura e o tempo que demorou a tocar no fundo da estrutura (figura 5)<sup>51</sup>. O valor de temperatura obtido é o valor de amolecimento<sup>21,51</sup>.

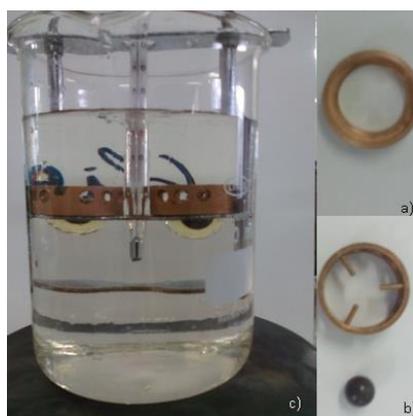


Figura 5. Montagem para a análise do ponto de amolecimento c) em que a) é o disco onde se coloca a resina, b) corresponde ao disco que se coloca por cima da resina com esfera no seu interior.

#### 1.3.2.4. Número de saponificação

O número de saponificação também pode ser com um indicador, quando se trata de amostras de tom claro ou médio e para colofónias de tom mais escura recorre-se ao método potenciométrico<sup>55</sup>. Este parâmetro indica o número total de grupos carboxílicos<sup>21,55</sup>. Dissolve-se a amostra em álcool e adiciona-se uma solução de KOH<sup>55</sup>. Deixa-se a mistura em refluxo durante uma hora e deixa-se arrefecer. Titula-se com um solução de ácido sulfúrico a solução arrefecida com indicador de fenolftaleína ou timol azul até e obter o ponto de viragem<sup>55</sup>. A titulação também deve ser feita para 3 ensaios de amostras em branco. No método potenciométrico elaboram-se dos mesmo modo as soluções de branco e a de amostra, deixa-se refluxar por 1h e espera-se até arrefecer. Depois de arrefecer verte-se a solução para um copo, mergulha-se o elétrodo e titula-se com um padrão de ácido sulfúrico até se obter um pH entre 12,5 e 13. Repete-se o mesmo para os brancos. O índice de saponificação é calculado pela equação 2 em que *A* e *B* são o volume para a titulação da amostra e do branco, respetivamente, *N* é a normalidade de ácido sulfúrico, 56, 1 é o valor da massa molar de KOH em g/mol *C* são as gramas da amostra. O resultado é fornecido nas unidades de mg de KOH/g de amostra<sup>55</sup>.

$$n^{\circ} \text{ de saponificação} = \frac{(B-A)56,1N}{C} \quad (\text{equação 2})$$

#### 1.3.2.5. Viscosidade

Os dados necessários fornecidos pelo viscosímetro fornecem informação suficiente para se efetuar a análise. Usa-se 1 mL de amostra. Consoante a gama de viscosidades, é escolhido o *spindle* (Figura 6). O valor lido no disco da parte superior do equipamento é o valor da viscosidade, no entanto já há viscosímetros digitais<sup>56</sup>.



Figura 6. Viscosímetro *Brookfield* de leitura em disco.

### 1.3.3. Aplicações

A composição química da colofónia faz com que tenha inúmeras aplicações<sup>3</sup> pois a têm estabilidade química e térmica de excelência, assim como as inúmeras possibilidades destes ácidos reagirem com muitos compostos<sup>1,41,57</sup>. A colofónia tem compostos variados e estes é que são utilizados para as aplicações industriais<sup>21,57</sup>: sais, ésteres, aductos anidridos maleicos, colofónia desproporcionada, hidrogenada<sup>21,41</sup>. É uma fonte de monómeros e de aditivos na indústria polimérica<sup>20,21,31,50</sup>. Está presente na produção papel para criar compostos que impermeabilizem as folhas de papel<sup>3,8,14,21,31,41</sup> e consegue impermeabilizar<sup>3,50,58</sup> e/ou endurecer<sup>57</sup> outros materiais. Obtem-se produtos do dia-a-dia como adesivos<sup>3,14,18,20,21,41,50</sup>, plásticos<sup>114</sup>, borrachas<sup>14</sup>, revestimentos<sup>3,41</sup>, por exemplo de chãos<sup>1,14</sup>, óleos e gorduras<sup>1,3,14</sup>, graxa dos sapatos<sup>1,3,14</sup> e vernizes<sup>1,8,57</sup>. Também se pode obter ceras<sup>1,8,58</sup>, sabões<sup>1,14,18</sup>, tintas de impressão<sup>1,3,14,21,31,41,50</sup>, componentes de equipamento elétrico<sup>14,41</sup>, da construção de materiais<sup>14,41</sup>, processamento de metal<sup>14</sup>, chicletes<sup>41</sup>. Os derivados de colofónia também existem na indústria da química fina<sup>14</sup> e cosmética<sup>3</sup>. No ramo farmacêutico<sup>188</sup> produzem-se películas em medicamentos com derivados de colofónia<sup>3</sup> e terebentina. Tem propriedades repelentes<sup>18</sup>, antitumores<sup>3</sup> e bactericidas<sup>14,57</sup>, a título de exemplo existem sais quaternários de amónio de colofónia catiónica que para além de ser bactericida é antistático e tem a capacidade de expurgar feridas<sup>57</sup>.

### 1.4. *Tall oil*

Tal como a colofónia e a aguarrás, o *tall oil* provém da mesma matéria-prima e existem vários fatores que podem alterar a sua composição e a pureza de cada tipo de *tall oil*, como exemplo têm-se o tipo da madeira e as condições de processamento a que esta é sujeita<sup>23,25,59,60</sup>. É um subproduto da indústria do processo de *Kraft* estabelecido no século XIX, na Europa<sup>59,60</sup>. Do *tall oil* também se pode obter colofónia e aguarrás<sup>23,60</sup>. Este processo de obtenção de colofónia equilibra os mercados de colofónia produzida pelo processo de resinagem<sup>25</sup>. Em 1930 a produção de colofónia proveniente do pinheiro vivo era da ordem das 300 000 toneladas anuais, na década de 90, a goma de colofónia atingiu o pico de 700 000 toneladas anuais e depois foi decaindo drasticamente<sup>25</sup>. Para contrabalançar esta descida houve uma maior procura *tall oil* bruto que já tinha sido verificado na década de 60 quando a produção anual de toneladas métricas aumentou

de 450 000 para 680 000<sup>61</sup>. Em 1991, a Europa produziu 443 000 toneladas de *tall oil* bruto, CTO<sup>23</sup>, no ano de 1995 produziu 1 700 000 toneladas métricas e o preço do CTO atingiu os 200 dólares para o mesmo tipo de tonelada<sup>61</sup>. Este preço foi dos mais altos registados<sup>61</sup>.

#### 1.4.1. Processamento *tall oil*

O *tall oil* é um subproduto da indústria do papel. De um modo geral a produção do papel está dividida em várias etapas. A primeira etapa consiste em remover a casca da madeira e usar lascas do restante, com dimensões aproximadas para depois ocorrer a segunda fase: a digestão<sup>24,62-65</sup>. Neste processo aplicam-se condições de pressão e temperatura elevadas, e no processo de *Kraft* adiciona-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio e de sulfito de sódio em água<sup>23,62-66</sup>. A função deste composto é desintegrar o material fibroso, provocando uma diminuição da pressão<sup>62-64</sup>. Os sais de sódio sofrem uma reação com causticação e são reutilizados no processo<sup>23,62-64,66</sup>. A terceira etapa é a lavagem da polpa saponificada. Nesta fase há separação e recuperação dos químicos por lavagem, porque são bastante dispendiosos e nefastos para o ambiente<sup>62</sup>. A penúltima fase consiste em retirar materiais fibrosos que não foram reduzidos a polpa na totalidade, para isso passa-se por telas com fendas e o resultado é uma pasta de papel castanha e homogênea<sup>62,63</sup>. A última fase nem sempre é realizada e consiste na remoção da cor do papel por branqueamento com cloro, retira-se a humidade e aplica-se um tratamento até se obter a textura pretendida<sup>62-64</sup>.

A adição de hidróxido e sulfito de sódio nas condições reacionais de digestão descritas faz com que haja a separação das fibras de celulose dos restantes compostos, denominado de *black liquor*<sup>66</sup>. Os ácidos gordos são saponificados e a componente resínica é convertida em sais de sódio<sup>23,25,61-63</sup>. Este composto tem o nome de sabão de *tall oil*<sup>3</sup>. Posteriormente lava-se, filtra-se, evapora-se o sabão. Em seguida adiciona-se ácido sulfúrico até se obter um pH de 3 e obtém-se uma mistura constituída por três fases: uma constituída por ácido, outra por lignina e uma última que tem o nome de crude *tall oil* (CTO)<sup>23-25,60-62,66</sup>. O *tall oil* bruto é constituído por ácidos gordos, resínicos mas também *pitch* e compostos neutros. Estes compostos têm de ser destilados para se obter produtos de valor comercial com vasta aplicabilidade<sup>23,25,60,61,67</sup>. O *pitch* é a fração mais pesada porque é constituído por compostos com massa molecular elevada<sup>61</sup>, seguidamente são os ácidos resínicos e por fim, a fração mais leve é composta por ácidos gordos e compostos

neutros<sup>60,61</sup>. O produto destilado com uma percentagem de ácidos gordos menor que 90% é denominado de *tall oil* destilado (DTO)<sup>23,60,61,68,69</sup>. O *tall oil* de *pitch* (TOP) corresponde à fração do *pitch* destilado<sup>23,60,61,68,69</sup>, pode-se destilar e obter ácidos gordos do *tall oil* (TOFA) ou ácidos resínicos do *tall oil* (TOR)<sup>23,25,59,60,68</sup>. As percentagens de ácidos gordos e de ácidos resínicos do seu respetivo *tall oil* corresponde a 90%<sup>23,68</sup>. Existe outra fração do DTO que é denominada de *tall oil head*<sup>359</sup>. Esta fração é constituída por compostos neutros ou insaponificáveis que são álcoois e alguns ácidos gordos de cadeia curta, como por exemplo o ácido palmítico<sup>23,59,67</sup>. É a primeira fração a sair da coluna de fracionamento e que pode ter 40 % de ácido palmítico<sup>23</sup>.

### 1.4.2. Composição química

De um modo geral o aspeto do *tall oil* é uma composto viscoso, com coloração entre castanho e negro e tem um cheiro muito característico<sup>25,60,69</sup>. Apenas 3% da árvore corresponde a este composto<sup>4</sup>. Em regra o *tall oil* é armazenado e transportado entre 50 a 80 °C para evitar a cristalização e sedimentação dos ácidos resínicos garantindo a homogeneidade da amostra<sup>60,61</sup>.

O processo de destilação do *tall oil* tem sido cada vez mais aperfeiçoado para se conseguir separar melhor as frações e o processo de eleição é destilação a vácuo<sup>23,25,60,61</sup>. A fração de *tall oil* de *pitch* é obtida por uma destilação a vácuo (2 a 8 mmHg) a temperaturas são de 220 a 270 °C. Para a fração da colofónia a destilação a vácuo tem com pressão maior (3 a 9 mmHg) e as temperaturas dos compostos são de 204 a 260 °C<sup>23</sup>. No *tall oil* existem três grupos de compostos: os ácidos gordos, os ácidos resínicos e os compostos insaponificáveis<sup>24,60,67</sup>. O último grupo contém ésteres, álcoois, esteróis vegetais e hidrocarbonetos<sup>24,67</sup>. A fração de *TOP* contem insaponificáveis pesados tais como  $\beta$ -sitosterol, estéres, dímeros e anidridos formados, para além de outros produtos formados durante o processo de fracionamento<sup>23,25,60</sup>.

Os ácidos gordos provem das reservas alimentares das árvores<sup>23</sup>. TOFA contem maioritariamente ácidos gordos<sup>24,25,59,68,70</sup> e o restante, é constituído por ácidos resínicos e compostos neutros<sup>23,24,61,70</sup>. Dentro dos ácidos gordos, cerca de 90% são ácido oleico,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ , linoleico,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  e uma porção muito baixa de ácido linolénico, o restante contem ácido palmítico,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ , esteárico  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$  (figura 7)<sup>23,24,59,61,70</sup>.

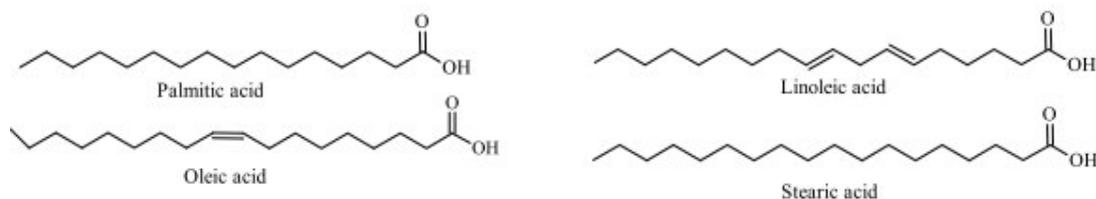


Figura 7. Estrutura química do ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico<sup>39</sup>

No estado natural os ácidos gordos podem ser líquidos ou sólidos e são mais reconhecidos pelos nomes comuns<sup>71</sup>. A sua estrutura química é composta por uma cadeia hidrocarbonada e o último carbono tem um grupo carboxílico<sup>23,59,67,71</sup>. Estes ácidos podem ser saturados ou insaturados com configuração *cis* ou *trans*<sup>23,59,71</sup>. Numera-se o número de carbonos e o número de insaturações ao longo da cadeia. O aumento do tamanho da cadeia e das saturações faz com que haja um aumento do ponto de ebulição, do calor de combustão, a densidade e a viscosidade<sup>71</sup>. Ácidos gordos tendem a diminuir a densidade dos óleos crude e são solúveis em solventes orgânicos<sup>71</sup>.

A colofónia de *tall oil* é constituída por ácidos do tipo abiético, pimárico e dehidroabiético. Difere da colofónia extraída por resinagem porque tem uma maior porção de ácido gordos e percentagens maiores de compostos neutros (tabela 3)<sup>23,61</sup>. Têm um ponto de amolecimento de 80°C e um número ácido de 178-180<sup>23</sup>.

Tabela 3. Tabela de número de ácido, número de saponificação e percentagem de ácidos gordos e resínicos de CTO em alguns países<sup>60</sup>.

Característica	Escandinávia	Estados Unidos da América	Canadá	França
<b>Número de ácido</b>	145	165	140	165
<b>Número de saponificação</b>	160	172	165	172
<b>Ácidos gordos %</b>	45	45	42	40
Palmítico	1,5	3	2	2
Esteárico	0,5	1	1	1
Oleico	10	20	10	15
Linoleico%	17	13	15	11
Outros	16	8	14	11
<b>Ácidos resínicos %</b>	30	42	30	50
Pimárico	2	3	2	5
Palústrico	4	7	5	7
Isopimárico	2	4	4	4
Abiético	12	15	10	18
Dehidroabiético	5	4	4	5
Neoabiético	4	6	3	6
outros	1	3	2	5
<b>Neutros %</b>	25	13	28	10

### 1.4.3. Análises

Ao TOP analisam-se as propriedades físicas, como a viscosidade, ponto de amolecimento<sup>69</sup>. No CTO analisam-se o número de ácido e o número de saponificação<sup>60,69</sup>. O índice de saponificação é sempre maior que o número de ácido e a diferença entre eles aumenta para quantidades de amostra maior. Isto significa que há menos ácidos gordos e ácidos resínicos<sup>60,69</sup>.

#### 1.4.3.1. Cor

A cor é avaliada pela norma ASTM D6166 e o método de análise de cor é semelhante ao da norma utilizada para saber a cor da colofónia<sup>72,73</sup>.

#### 1.4.3.2. Insaponificáveis

O número de insaponificáveis é medido por processos de extração<sup>74</sup>. Pesa-se 5 gramas de amostra num frasco adiciona-se 25 mL de hidróxido de potássio e dissolve-se a amostra. Esta solução é colocada em refluxo por 45 minutos. Depois de arrefecer adiciona-se de água e transfere-se para uma ampola de decantação. Lava-se com uma solução de 50 % de etanol e de éter de petróleo. Extrai-se a primeira fração e a mesma vai para outro funil. Repete-se o procedimento várias vezes e por fim adiciona-se éter de petróleo num frasco e deixa-se em refluxo. Após evaporar todo o éter adiciona-se 2 mL de acetona e deixa-se secar a cerca de 100 °C por uma hora. Pesa-se a amostra. Deixa-se secar por mais 30 minutos e pesa-se outra vez. O número de insaponificáveis é obtido a partir do produto da diferença da amostra seca, *a*, com a amostra do frasco sem amostra, *b*, pela massa de amostra pesada no início, *m* (equação 3)<sup>74</sup>.

$$n^{\circ} \text{ de insaponificáveis} = \frac{100(a-b)}{m} \quad (\text{equação 3})$$

#### 1.4.3.3. Número de ácido

O número de ácido é obtido a partir da norma SCAN-T 11:72<sup>72</sup>. E o procedimento também é semelhante ao procedimento mencionado para a colofónia. A diferença é que o elétrodo é de calomelanos e faz-se uma padronização com dehidrogenoftalato. Após a solução arrefecer

adiciona-se 100 mL de etanol. Calibra-se o eletrodo com água e etanol. Em seguida, titula-se a solução anterior com uma solução de hidróxido de potássio até se obter o ponto de viragem (pH  $\approx$  12).

A molaridade,  $m$ , é calculada a partir de  $a$  é a massa, em mg, de hidróxido de potássio e  $b$  é o volume de hidróxido de potássio gasto em mL (equação 4).

$$m = \frac{a}{204,2b} \quad (\text{equação 4})$$

Agita-se o recipiente da amostra e pesam-se 4 gramas de amostra. Aquece-se a amostra para ficar homogênea, deixa-se arrefecer e depois titula-se do mesmo modo que a amostra padronizada até se atingir o ponto de viragem. O número de ácido relaciona a molaridade,  $m$ , calculada anteriormente, com o volume de hidróxido de potássio titulado,  $c$ , em mL, com a massa de amostra pesada,  $d$ , em mg <sup>75</sup>.

$$n^{\circ} \text{ de ácido} = \frac{56,1cm}{d} \quad (\text{equação 5})$$

#### 1.4.4. Aplicações

Para cada aplicação é necessário saber a porção de ácidos gordos e de ácidos resínicos<sup>23,59</sup>. A primeira fração, constituída por ácidos gordos saturados é utilizada para produzir combustíveis e emulsificadores de asfalto<sup>60,67</sup> TOFA contem muitos ácidos e está suscetível a reações de esterificação<sup>24</sup> utilizadas para produzir desinfetantes e detergentes<sup>23,60,67</sup>, epoxidação criar resinas epóxi<sup>23-25,60</sup>, lubrificantes, graxas, óleos industriais, espumas<sup>67</sup>. Tanto TOFA como TOR podem ser utilizados para elaborar adesivos, revestimentos, tintas e sabões<sup>23,25,60,61,67</sup>. Do TOR pode-se frabricar vernizes<sup>23,60,61</sup>, colas<sup>23</sup>, papel<sup>23,60,67</sup>, gomas<sup>23</sup>, lubrificantes<sup>23,61</sup>, lacas<sup>67</sup> borrachas<sup>23,60</sup>, cola quente<sup>60</sup>, agentes de flutuação<sup>23</sup>, resinas para impressão tipográfica e de gravuras<sup>23</sup>, indústrias electrónica<sup>23</sup>, alimentar<sup>23</sup>, farmacêutica<sup>23</sup>. O TOP está presente no asfalto como aditivo<sup>23,67,69</sup>, é considerado um combustível sem sulfatos<sup>60,67</sup> e também pode ser utilizado como uma proteção anticorrosiva<sup>67</sup>.

### 1.5. Aguarrás

Os povos da Mesopotâmia e do Paquistão já tinham conhecimentos da aguarrás<sup>76</sup> e os egípcios utilizavam este produto no processo de embalsamento<sup>21,76</sup>. Um dos primeiros livros que

abordava a aguarrás foi publicado no século XIII<sup>76</sup>, passado 200 anos Paracelsus estudou óleos essenciais que eram utilizados para fins medicinais e mais tarde Kekulé isolou e identificou os componentes da essência de terbentina<sup>21</sup>. No século XVI alguns países da Europa (Polónia, Alemanha, países escandinavos e Rússia) iniciaram a produção de aguarrás a partir da resina extraída das árvores e este processo alastrou-se pelo mundo<sup>76</sup>. A quantidade de resina extraída de coníferas varia entre 0,3 e 1,1 Kg<sup>47</sup> e da destilação da gema aproximadamente 18% é aguarrás<sup>1,3,8,14,19,50,76</sup>. A qualidade aumenta o preço da aguarrás<sup>14,77</sup>. No ano de 1979 a produção de aguarrás era aproximadamente 250 000 toneladas, em que um pouco mais de metade era aguarrás extraída por resinagem e as restantes toneladas correspondiam à aguarrás sulfatada<sup>76,77</sup>. Nos anos 90 a exportação de aguarrás aumentou de 140 000 para 330 000 toneladas<sup>14,21,77,78</sup>, 70% das 330 000 eram aguarrás sulfatada<sup>21</sup>. Os maiores produtores de aguarrás são Estados Unidos<sup>76,79</sup>. Em 2005 produziram de 100 000 toneladas de aguarrás e o preço era quase 0,58 dólares por litro<sup>79</sup>. O segundo maior produtor é a China que, no mesmo ano produziu cerca de 50 000 toneladas, Portugal produziu cerca de 10 000 toneladas anuais<sup>79</sup>. A Finlândia e a Suécia apenas produzem de aguarrás sulfatada a partir do processo de *Kraft*<sup>6,78</sup>. Neste processo as lascas de madeira são colocadas no digestor e temperaturas elevadas e a terbentina é evaporada com outros compostos, tais como compostos sulfurados<sup>76,79</sup>. Em seguida oxida-se com uma solução de hipoclorito de sódio a 60 °C e por lavagem com água há remoção dos compostos sulfurados<sup>79</sup>. Os compostos com enxofre mesmo em quantidades residuais fornecem um odor característico à aguarrás<sup>76,79</sup>.

### 1.5.1. Composição química

A aguarrás é um líquido com um odor bastante forte e amargo<sup>1,14,80</sup> essencialmente constituído por compostos orgânicos voláteis denominados terpenos<sup>1,2,8,14,21,50,81,82</sup>. Os terpenos são metabolitos secundários sintetizados por plantas, fungos e alguns insetos<sup>78,82</sup>. Os terpenos provem todos do isopreno e o precursor é geranyl pirofosfatase<sup>78</sup>. Os monoterpenos são compostos constituídos por dez carbonos<sup>1,2,8,21,76,78</sup> e podem ser cíclicos ou bicíclicos<sup>2,76,78</sup>. Na composição da aguarrás também existem compostos terpénicos de carácter alcoólico e sesquiterpenos<sup>8,21,76</sup>. Os principais compostos são o  $\alpha$  e  $\beta$  – pineno<sup>1,3,8,21,50,76,78-81,83</sup>, limoneno<sup>3,76,78-81,83</sup>, 3 – careno<sup>3,80,83</sup>, canfeno<sup>3,76,79</sup>  $\alpha$  - terpineol (figura 8)<sup>76</sup>.

A composição química varia de acordo com a espécie de árvore, idade e localização geográfica<sup>3,78,79</sup>. Por exemplo, a percentagem de  $\alpha$  – careno da aguarrás indiana é de 60 %, já na aguarrás dos Estados Unidos da América oscila de 12 a 43%, mas nestas duas espécies a percentagem de longifolene é 15 %<sup>12</sup>. É solúvel em éteres e álcoois e quase insolúvel em água<sup>80</sup>.

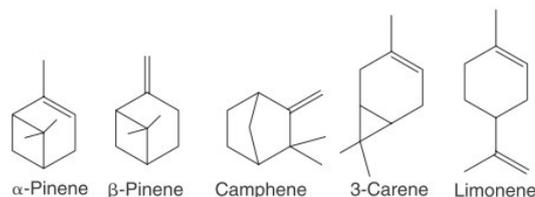


Figura 8. Estrutura química de terpenos encontrados na aguarrás<sup>8</sup>.

### 1.5.2. Análises

A aguarrás é sujeita a análises físicas e químicas<sup>3</sup>. Como geralmente é aplicada como solvente, as análises mais frequentes são a cor, NP-73<sup>3,84</sup>, densidade, NP-74<sup>3,85</sup>, índice de refração, NP-66<sup>3,86</sup>, destilação, NP-78<sup>3,87</sup>, índice de acidez, NP-65<sup>3,88</sup>, o ponto de inflamação, NP-76<sup>3,89</sup>, teor em resíduo de evaporação, NP-75<sup>3,90</sup>.

### 1.5.3. Aplicações

Apesar da percentagem de  $\alpha$  – pineno ser maior,  $\beta$  – pineno tem maior valor comercial<sup>8</sup>. Os maiores consumidores de aguarrás são Estados Unidos da América e França<sup>8</sup>. As aplicações da aguarrás são muito diversificadas. É aplicada na indústria da cosmética em fragâncias, perfumes<sup>3,8,78,79</sup> com uma produção de 30 000 toneladas<sup>3</sup>. As suas propriedades antivirais, antimicrobiais<sup>3,918</sup>, analgésicas e antioxidantes torna a aguarrás um produto a ser aplicado na indústria farmacêutica<sup>3,8</sup>. É utilizada para o fabrico de solventes<sup>3,14,80</sup>, pesticidas e repelentes<sup>3,8,14,78</sup>, produtos de limpeza<sup>3,8,14,79</sup>. No sector alimentar pode ser utilizado com aditivo alimentar<sup>3,8,78</sup>, como por exemplo em chá<sup>8</sup>. Também se pode formar plasticizantes<sup>3,8,14,83</sup> e explosivos<sup>3</sup>, como fogo de artifício<sup>83</sup>.

## **Capítulo 2. Materiais e métodos**



## 2.1. Cromatografia

Existem várias técnicas cromatográficas, mas este estudo debruçou-se apenas na cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama.

A cromatografia é uma técnica que foi desenvolvida no século XIX<sup>92-94</sup>. Mikhail Tswett iniciou os estudos sobre cromatografia. Na década de 50 a equipa liderada por Martin é que colocou em prática a cromatografia gasosa, criando o primeiro equipamento<sup>92,93,95</sup>. A partir daí começou-se a aperfeiçoar cada parte do cromatógrafo originando uma variedade de equipamentos adequados para imensas análises<sup>92</sup>. Apesar das suas vantagens tem a sua limitação que só pode ser utilizada para compostos gasosos ou voláteis<sup>92,93</sup>.

A separação entre picos têm o nome técnico de resolução<sup>93,96-98</sup>. Este parâmetro é avaliado quando os compostos tempos de retenção muito próximos<sup>98</sup>. A resolução entre picos pode ser calculada a partir do tempo de retenção do composto A,  $t_{R,A}$ , e do composto B,  $t_{R,B}$ , e o somatório da largura dos picos A,  $W_A$ , e B,  $W_B$  (equação 6)<sup>92,96,97,99,100</sup>.

$$R_S = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{W_B + W_A} \quad (\text{equação 6})$$

Os valores de resolução mínimos aceites são entre 1 e 1,5<sup>96,99,100</sup>. Pode-se aumentar a resolução diminuindo o número de partículas, diminuindo o fluxo e/ou aumentando o comprimento da coluna<sup>94,96,99</sup>. A resolução depende da seletividade ou fator de separação,  $\alpha$ , fator de capacidade ou fator de retenção,  $k$ , e da eficiência da coluna,  $N$  (equação 7)<sup>92,97,101</sup>.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \times \left( \frac{k}{k+1} \right) \times (\alpha - 1) \quad (\text{equação 7})$$

A seletividade numa análise com cromatografia gasosa pode ser alterada modificando a temperatura ou selecionando outra fase estacionária<sup>93,100</sup>. O fator de capacidade é a razão entre o tempo de retenção ajustado para um pico e o tempo da fase móvel<sup>96,98,101,102</sup>. Pode-se diminuir  $k$  aumentando a temperatura da coluna e a espessura do filme da coluna para reter a espécie, no entanto não se pode aumentar muito  $k$  porque senão o pico irá alargar, aumentando a resolução<sup>99,101</sup>. A eficiência é medida a partir da altura dos pratos teóricos<sup>96-99</sup>. É a medida que a coluna tem de ter para haja um equilíbrio entre a fase móvel, estacionária e o soluto<sup>96,98</sup>. Quanto menor for a altura do prato teórico mais estreita é a banda do picos<sup>96,97</sup>.

## 2.1.1. Equipamento

O equipamento de cromatografia tem o nome de cromatógrafo e tem vários elementos. O primeiro elemento é o injetor e é onde se introduz a amostra utilizando uma seringa. Depois de injetada, os componentes da mistura vão percorrer uma coluna cromatográfica, aí as espécies presentes na solução são separadas e depois são detetadas no detetor. Os sinais resultantes são convertidos e registados em função do tempo num computador obtendo um cromatograma. Este equipamento tem um sistema de gases. Existe uma fonte de calor no injetor, no detetor e a coluna cromatográfica encontra-se num forno<sup>94,96,99,103</sup>. Durante este processo é necessário ter precauções para assegurar a volatilização da amostra (Figura 9)<sup>103</sup>.

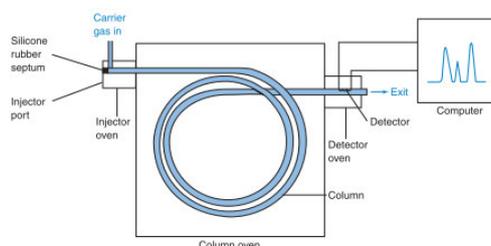


Figura 9. Esquema de um equipamento de GC-FID<sup>96</sup>.

### 2.1.1.1. Injetor

O injetor é onde se introduz a amostra com uma microseringa<sup>94</sup>. A agulha da seringa perfura o septo, a solução é imediatamente vaporizada e atravessa o *liner*<sup>94,96,103</sup>. O método de injeção é considerado com base na coluna cromatográfica, na natureza química das espécies a analisar na matriz e no tipo de análises, ou seja, se é quantitativa ou qualitativa<sup>92,96,103</sup>. Os métodos mais utilizados são: o método *split* e o método *splitless*<sup>92,94,95,98,99,103</sup>. No primeiro método parte da amostra vai para a coluna e outra porção sai do injetor a partir de uma válvula, no segundo método todo o volume injetado vai para a coluna<sup>92,99,103</sup>. O método *split* é o método mais antigo, simples e permite fazer uma diluição, a razão *split* é programada<sup>13</sup>. Em regra utiliza-se lã de vidro para amostras com muitas impurezas<sup>94,103</sup>.

### 2.1.1.2. Coluna

Em cromatografia a separação é conseguida a partir da interação do soluto com a fase móvel e a fase estacionária<sup>97</sup>. O tipo de cromatografia é ditado pelo estado físico da fase móvel, podendo ser líquido, gasoso ou um fluido supercrítico<sup>92,97,102</sup>. No caso de GC, a fase móvel é um gás de arraste inerte (árgon, hélio, nitrogénio ou hidrogénio) que circula com um fluxo contante, programável e faz com que os compostos percorram toda a coluna<sup>92,97,98,103</sup> e interagem a fase estacionária<sup>97,98,103</sup>. No caso de GC a fase estacionária é um líquido que na forma de um filme muito fino vai revestir as paredes internas da coluna, composta por sílica. As paredes externas da sílica estão revestidas<sup>96</sup>. As paredes externas da sílica estão revestidas por um polímero q protege da humidade atmosférica<sup>96</sup>.

As primeiras colunas cromatográficas eram empacotadas e mais recentemente começaram a existir as colunas capilares<sup>92,95,103</sup>. As primeiras colunas eram constituídas por materiais, como plásticos e metais por exemplo *nylon*, *tygon*, cobre, ouro e níquel<sup>93</sup>. Entretanto estes foram modificados pelo para vidro, alumina, e em 1979 Dandeneau and Zerenner criaram uma coluna composta por sílica fundida revestida polímero<sup>95,97,103</sup>. As mais comuns são de sílica fundida revestida por um filme e pertencem às colunas WCOT (figura 10)<sup>92-94,97,103</sup>. A parede interior da coluna cromatográfica é constituída por uma camada porosa constituída por grupos silanol (SiOH) e siloxano (SiOSi) e os compostos a analisar interagem com a coluna de acordo com a afinidade que tem com esta coluna<sup>96,97,99</sup>. Neste tipo de colunas existe um interior oco por onde flui o gás<sup>96,99</sup>. Deste modo a fase estacionária tem menor altura e menor número de pratos teóricos que resulta numa maior separação<sup>99</sup>.

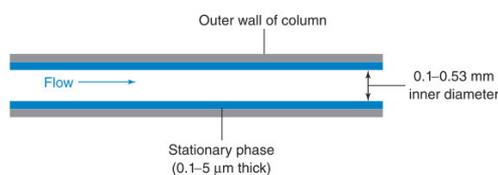


Figura 10. Coluna WCOT<sup>96</sup>.

A altura equivalente de um prato teórico,  $H$ , avalia a eficiência da coluna cromatográfica e é definida pela equação de Van Deemter. Esta equação relaciona os seguintes parâmetros relativos à fase estacionária da coluna, para um fluxo de gás de arraste,  $u_x$ : caminhos múltiplos,

$A$ , a difusão longitudinal,  $B$ , e transferência de massa,  $C$ <sup>93,96,97,99,100</sup>. A eficiência é maior para uma altura menor do prato teórico (equação 8)<sup>96,99</sup>.

$$H = A + \frac{B}{u_x} + Cu_x \quad (\text{equação 8})$$

Em GC as colunas WCOT tem um interior liso, ou seja, não existe enchimento com partículas sólidas e por isso o termo  $A$  da equação de Van Deemter é zero (figura 11)<sup>92,99,100</sup>. O resultado é uma diminuição da largura dos picos cromatográficos, que por sua vez aumenta a resolução<sup>100</sup>. O termo  $B$  mede a velocidade a que a substância se move pela coluna do local com maior concentração para um local com menor concentração de soluto<sup>96,99</sup>. O transporte de massa pode ser minimizado reduzindo a espessura do filme que constitui<sup>100</sup>. Também pode ser minimizado reduzindo a fase estacionária gerando menos interações entre ela e massa, conseqüentemente há uma diminuição do tempo de análise<sup>93,96,99</sup>. Outra alternativa é selecionando uma fase estacionária com maior afinidade aos compostos a analisar<sup>99</sup>.

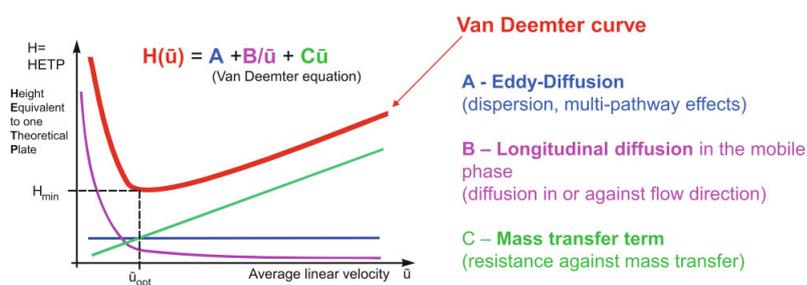


Figura 11. Contribuição dos termos A, B e C da Equação de Van Deemter<sup>100</sup>.

Comparando com as colunas empacotadas, as colunas de sílica fundida tem maior estabilidade térmica<sup>94,95,99</sup> e superfícies inertes da fase estacionária<sup>93,95,98,99</sup>. O diâmetro interno é menor que 1 mm<sup>92,94,99,103</sup>, a espessura é da ordem dos micrometros<sup>93,99</sup> e são bastante maiores em comprimento, logo tem um maior número de pratos teóricos, garantindo assim uma maior separação e melhor formato dos picos relativos a cada espécie em estudo<sup>92-95</sup>.

Desde o momento da injeção até ao momento em que o composto sai da coluna cromatográfica há um intervalo. Em regra é dado em minutos e tem o nome de tempo de retenção. O tempo de retenção de cada composto varia com o tipo de coluna, a fase estacionária, fase móvel e fluxo de gases. Por exemplo, se o fluxo do gás da fase móvel baixar os compostos demoram mais tempo a atravessar a coluna, logo o tempo de retenção é maior.

### 2.1.1.3. Detetores

Depois de a amostra atravessar coluna vai ser introduzido no detetor e vai fornecer um sinal de acordo com as propriedades físicas e químicas e conforme concentração de cada composto<sup>98,102,103</sup>. Em regra geral os detetores de ionização de chama necessitam de um gás *make up* que permite uma chama mais estável ao longo da análise e em regra este gás é nitrogénio<sup>102,103</sup>.

FID é classificado como um detetor destrutivo<sup>103</sup>, seletivo<sup>93,102-104</sup> e é dos detetores mais usados<sup>93,103,105</sup>. As temperaturas de FID tem de ser elevadas para ter uma combustão completa<sup>102,103,105</sup>. Para cada detetor há um tipo de gás de arraste adequado, e no caso do GC-FID o gás é hélio ou hidrogénio e também tem como função diminuir o ruído provocado pela chama<sup>95,102,105</sup>. Neste tipo de detetor há uma chama que queima os componentes da amostra e há produção de iões durante a combustão<sup>102,104,105</sup>. Os iões agrupam-se vão para os elétrodos e formam uma corrente que é enviada para um sistema de dados<sup>102</sup>. A chama é constituída por ar, gás de arraste e hidrogénio<sup>102,104,105</sup>. No caso do GC-FID utilizado, o gás de arraste é hidrogénio. O FID tem a capacidade de detetar grande parte de compostos orgânicos, mais precisamente os que contem carbonos ativos capazes de reagir com oxigénio da chama<sup>102,104,105</sup>. É um equipamento com uma boa estabilidade, limite de deteção  $10^{-12}$  g de carbono/s, linearidade da ordem de  $10^7$  mas requer uma variedade de gases que outros detetores não necessitam<sup>102,104,105</sup>. Além disso a possibilidade de fuga de gases é maior e deve estar num local onde não haja variações de temperatura ou suscetível a exposição solar<sup>105</sup>.

### 2.1.2. Derivatização

Em GC é comum aumentar a volatilidade e estabilidade de compostos orgânicos com a remoção de hidrogénios ativos<sup>39,45,106-108</sup>. O reagente tem de ter uma capacidade de derivatização muito forte uma vez que os ácidos resínicos tem grupo carboxílico estericamente impedido<sup>45</sup>. Uma técnica de derivatização é ocorrendo uma reação de metilação, mas esta técnica apesar de ser muito utilizada no passado tinha perigos graves para a saúde e a probabilidade de explosão também era grande<sup>39,45</sup>. Atualmente a derivatização mais usual para este tipo de compostos é a derivatização recorrendo a uma reação a sililação<sup>39,45</sup>. Desde a experiência de Gerhke, em 1968, imensos estudos foram desenvolvidos utilizando os mesmos reagentes<sup>107</sup>: BSTFA e TMCS<sup>39,45,59,65,106,107,109-111</sup>.

Exemplificando existem estudos baseados em amostras como: madeiras<sup>109</sup>, leite<sup>107</sup>, petróleo<sup>110</sup>, produtos de *tall oil*<sup>9,65,111</sup>. A derivatização ocorre a partir de uma reação de sililação em que o BSTFA reage com os compostos e os TMCS é o catalisador, garantindo que todos os grupos reajam<sup>107,108</sup>. No mecanismo de sililação os hidrogénios ativos são substituídos por grupos trimetilsilil<sup>107,108</sup>. Neste processo a presença de água faz com que a reação ocorra no sentido contrário, ou seja, os compostos derivatizados são hidrolisados, voltando ao seu estado natural. Outra desvantagem deste processo é a capacidade de os compostos, solventes e reagentes derivatizantes gerarem derivados e reagirem. O resultado final são picos múltiplos para um só composto que podem comprometer os resultados<sup>106,108,112</sup>.

## 2.2. Validação do método

A validação de um método consiste na elaboração de raiz, adaptação ou implementação de um processo analítico que demonstra a consistência do método interno de ensaio, e quando posto em prática é possível obter resultados de qualidade<sup>26,113-116</sup>. Há que ter em conta que é necessário equipamento apropriado, material calibrado, o operador tem de ter boas práticas laboratoriais e conhecimento suficiente para saber o que fazer quer para a elaboração do método, quer para a elaboração do mesmo<sup>113</sup>. É importante validar um método porque mostra resultados corretos e é capaz que mostrar a razão de estarem corretos, garantindo assim a resultados de qualidade, consistentes e de confiança<sup>28,113,116,117</sup>. No entanto, é um processo bastante dispendioso porque é preciso um elevado número de análises, consequentemente é demorado também porque requer um tratamento estatístico muito completo, mas é um custo que será compensado face aos possíveis prejuízos obtidos a partir de resultados errados<sup>113,116</sup>. Há vários critérios de avaliação para a validação, e o laboratório tem de seleciona-los mediante o tipo de análise<sup>26,113-116</sup>. Por exemplo, em análises qualitativas não é preciso determinar os valores de limite de quantificação (LDQ), linearidade/gama de trabalho, robustez, precisão e exatidão<sup>115</sup>. No caso deste trabalho, o desenvolvimento da validação do método debruçou-se sobre a análise quantitativa dos ácidos resínicos, ácidos gordos e compostos terpénicos, recorrendo à utilização de um padrão interno. Os critérios são: seletividade/especificidade, calibração e linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, sensibilidade, precisão, exatidão e recuperação<sup>26,115-117</sup>.

### 2.2.1. Seletividade/especificidade

O termo especificidade é regularmente sinônimo de seletividade, no entanto, diz-se que um método é específico quando é 100% seletivo<sup>26,113,116,117</sup>. A especificidade é a capacidade do método detetar o analito numa matriz, de modo a que estes não interfiram na mensuranda, quando analisado sob as condições do método<sup>26,113,115,117</sup>. Na especificidade, a análise de interferentes pode ser analisada, recorrendo a testes de recuperação e será específico ou seletivo quando os valores de percentagem de recuperação forem concordantes com os valores da gama de concentração<sup>114,115</sup>. A Seletividade é a capacidade de um método identificar, distinguir e quantificar o analito na presença de interferentes, tais como espécies ativas, excipientes, impurezas e produtos de degradação<sup>113,114,116</sup>. Esta característica da seletividade é essencialmente em função do princípio de medida utilizado, mas depende no entanto do tipo de compostos a analisar<sup>115,116</sup>. Em ambos os casos os valores das mensurandas são independentes dos outros compostos<sup>27</sup>.

No caso das técnicas cromatográficas, a seletividade passa pela escolha de acoplar detetores à cromatografia, seleccionar a composição e tipo de colunas, composição da fase móvel da coluna, o programa de análise constituído por rampas de temperatura, fluxo do gás de arraste, entre outros<sup>28,113,116,117</sup>. A separação dos picos cromatográficos, a preparação da amostra, a comparação do analito com o composto puro são fatores que influenciam positivamente a seletividade, pois há eliminação de grande parte dos interferentes<sup>28,116,117</sup>. Também se pode utilizar várias técnicas para garantir a selectividade, tais como espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de massa e bioensaios específicos<sup>116</sup>.

### 2.2.2. Calibração e linearidade

Em análises quantitativas, a calibração mostra que a resposta de um processo, no eixo do  $y$ , está relacionada com a concentração ou quantidade de composto conhecido, no eixo do  $x$  <sup>26-</sup>

<sup>28,115,116</sup>.

O primeiro passo é a preparação de pelo menos cinco soluções padrão com concentração conhecida, analisam-se as soluções no equipamento pretendido, no programa e no método a querer validado<sup>26,115</sup>. No fim de todas as análises elabora-se o gráfico da resposta obtida em função da concentração e por substituição na curva de calibração obtêm-se a concentração do analito nas amostras<sup>115,116</sup>. As soluções padrão devem estar distribuídas pela gama de trabalho e por vezes o branco é diferente de zero, por isso deve ser utilizado como o primeiro ponto da curva de calibração<sup>115</sup>. Há que ter em consideração que quando a curva de calibração é uma função polinomial de primeiro grau, e o método utilizado para descrever a curva é o método dos mínimos quadrados, então, conclui-se que os erros não estão distribuídos de igual modo pela reta, e que há homogeneidade da variância ao longo da reta<sup>115</sup>.

A linearidade é a capacidade, dentro de uma dada gama, para se obter resultados do método diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra ou numa matriz, quando enquadrados na gama de concentrações em estudo<sup>26,28,113</sup>. Pode ser demonstrada diretamente diluindo uma solução mãe ou fazendo pelo menos 5 soluções separadamente<sup>28,29,113</sup>. As concentrações tem de ser compreendidas entre 80 a 120% ou de 50 a 150% da gama de concentrações<sup>28,113</sup>.

A equação da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados aplicada aos resultados, segundo a norma ISO 8466-1, deve ter uma interceção não significativamente diferente de zero, e se isto não ocorrer, verifica-se que há efeito na exatidão do método<sup>28,29,115</sup>. Em cromatografia a linearidade é avaliada visualmente, observando um gráfico da razão da área do pico do analito com a área do pico do padrão interno em função da concentração de analito<sup>28,113</sup>. A forma algébrica da reta linear, formada a partir de pontos  $(x, y)$ , é vista na equação 9 e relaciona os valores de resposta,  $y$ , com o valor da ordenada na origem ou valor médio do branco,  $a$ , declive ou sensibilidade,  $b$ , e valores de concentração do analito na amostra ou na matriz,  $x$ <sup>26,114,115,118</sup>.

$$y = a + bx \quad \text{(equação 9)}$$

Cada componente da curva de calibração e a curva de calibração tem uma incerteza associada. O declive tem uma incerteza denominada de  $S_B$  (equação 11) e a ordenada na origem tem como incerteza  $S_A$  (equação 12)<sup>29</sup>. Estas incertezas são calculadas em função da incerteza da curva de calibração,  $S_{y_x}$ , calculada a partir do quadrado da diferença de  $y_i$  e  $\hat{y}_i$ , e  $N$  é o número de pontos da curva de calibração (equação 13)<sup>115,118</sup>. Para a incerteza do declive e da ordenada na

origem usam a média das concentrações,  $\bar{x}$ , e para a incerteza da ordenada na origem também se utiliza o quadrado do valor de cada concentração,  $x_i^2$ .

$$S_b = \frac{S_y}{\bar{x}} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (\text{equação 10})$$

$$S_a = S_y \cdot \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N}}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}}} \quad (\text{equação 11})$$

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} \quad (\text{equação 12})$$

A partir da incerteza associada à curva de calibração e ao declive pode-se obter o desvio padrão do método,  $S_m$ . De acordo com o resultado obtido o analista pode saber a qualidade do seu trabalho (equação 13)<sup>115</sup>.

$$S_m = \frac{S_y}{b} \quad (\text{equação 13})$$

A incerteza do valor interpolado de uma concentração,  $x_0$ , é uma medida absoluta da precisão para a calibração, pois depende do somatório da incerteza relacionada à inclinação e interseção da curva de calibração, da incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão e dos erros aleatórios relativos ao procedimento instrumental<sup>115,118,119</sup>. Cada valor de concentração  $x_0$ , tem um intervalo de confiança do verdadeiro valor de  $y_0$ , que é o valor experimental de  $y$  para o qual se determina o valor da concentração  $x_0$  (equação 14)<sup>115,119</sup>.

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{equação 14})$$

No mesmo gráfico com os valores de resposta e concentração aparece também a reta, a equação da mesma reta e o respetivo coeficiente de correlação,  $r$  ou  $R$ <sup>26,115</sup>. O coeficiente de correlação determina a linearidade da curva de calibração e pode ter valores compreendidos de -1 a 0 ou de 0 a 1, para declives negativos ou positivos, respetivamente<sup>26,115</sup>. Os valores de 1 ou -1 têm uma correlação perfeita ou seja, não há dispersão dos pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão é nula. Os valores compreendidos entre 0,91 e 0,995 ou -0,91 e -0,995 têm uma correlação fortíssima, diz-se que o método é linear quando o coeficiente de correlação é superior a 0,995 ou 0,90, dependendo das fontes bibliográficas<sup>26,115,116</sup>.

O coeficiente de correlação é calculado pela equação 15, em que  $x_i$ , são todos as concentrações marcados na reta,  $\bar{x}$  corresponde à média dos valores da concentração. Os valores de  $y_i$  são as respostas obtidas, e  $\bar{y}$  corresponde à média das mesmas respostas<sup>115</sup>.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2] \cdot [\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (\text{equação 15})$$

### 2.2.3. Valores suspeitos/ *Outliers*

Um conjunto de resultados pode ter valores que aparentam ser suspeitos e esses valores são chamados de valores suspeitos<sup>117,118,120-122</sup>. Para confirmar a presença de valores suspeitos aplicam-se testes estatísticos a fim de saber se é necessário excluir os valores ou utiliza-los no tratamento de resultados da validação do método<sup>118,122</sup>. Após definir o modelo da curva de calibração aplica-se o teste de valores suspeitos, que consiste na análise de valores residuais calculados pela diferença entre o valor de resposta,  $y$ , e o valor da resposta interpolada na reta,  $\hat{y}$ . Seguidamente, compara-se com o valor de desvio padrão residual entre os valores do sinal do equipamento em torno da curva de calibração,  $S_{\frac{y}{x}}$ <sup>115,118</sup>. Se o módulo da diferença da resposta obtida e interpolada for maior que o dobro do valor de  $S_{\frac{y}{x}}$  rejeita-se o ponto, caso a equação 16 não se verificar o ponto não é rejeitado. Se algum valor for rejeitado tem de se refazer a curva de calibração e verificar novamente se há algum valor suspeito, recalculando o valor do desvio padrão residual da nova curva de calibração, assim como todos os componentes da curva de calibração e respetivos erros<sup>118</sup>.

$$|y - \hat{y}| > 2 S_{\frac{y}{x}} \quad (\text{equação 16})$$

Também se pode utilizar o teste de F e/ou o teste de t, que os resultados serão idênticos, mas para esta validação apenas se utilizou o teste da linearidade da equação 16.

### 2.2.4. Limiares analíticos

Os limiares analíticos são constituídos pelo limite de deteção e pelo limite de quantificação e no processo de validação de um método devem ser atualizados quando se muda de analista, reagentes, equipamento ou local, ou então sempre que se refaz a curva de calibração<sup>115</sup>.

### 2.2.4.1. Limite de detecção

O limite de detecção, LDD, é o valor para o qual a menor concentração de substância pode ser diferenciada do sinal de fundo ou sinal do branco (detetada), a um nível de confiança, geralmente de 95%<sup>26-28,114-117,119,122,123</sup>. Este valor provem dos dois tipos de erros estatísticos. O erro do tipo I é a probabilidade de concluir que há um composto ou analito quando na realidade não há ( $\alpha$ ), e o erro do tipo II é o contrário, ou seja, é a probabilidade de concluir que o composto está ausente quando existe na realidade ( $\beta$ )<sup>28,115,119</sup>. Segundo a IUPAC os erros são minimizados quando  $\alpha$  e  $\beta$  são iguais ou inferiores 5%<sup>28,113,115</sup>.

Os valores abaixo do LDD não são necessariamente quantificados pelo método, pois a incerteza associada ao valor é sempre maior do que o respetivo valor de concentração<sup>28,115,122,123</sup>. Na maior parte das vezes a incerteza aumenta devido à instabilidade da linha de base ou ao ruído, à existência de matrizes complexas, interferentes ou brancos que podem influenciar a resposta obtida ou devido a pré-tratamento de amostras<sup>113,122</sup>.

Um dos métodos utilizados para determinar o LDD é o método do sinal/ruído, que é mais utilizado em procedimentos analíticos, tais como análises cromatográficas<sup>28,29,114,116,123</sup>. Só pode ser aplicado quando o ruído é detetado e quantificado<sup>26,116</sup>. A relação sinal/ruído é determinada por comparação do sinal de soluções de amostra conhecidas de concentrações mínimas com soluções de branco de amostra<sup>26,28,29,113,114,116,117,119</sup>. Recomenda-se que se façam pelo menos seis análises independentes de cada tipo de solução, automaticamente o LDD depende da precisão ao nível das condições de repetibilidade, logo para poucas amostras os resultados podem não ser realistas<sup>114,113</sup>. Assim estabelece-se uma razão entre o sinal da concentração mínima com o sinal da solução do branco, sendo por norma o coeficiente três o mais utilizado<sup>26,29,113,114,116,117,119</sup>. No entanto, também se pode utilizar um coeficiente de dois<sup>114,116,122</sup>.

O segundo método consiste na determinação do LDD a partir de uma curva de calibração de primeiro grau. Inicialmente, constrói-se uma curva de calibração constituída pela matriz e pelos analitos<sup>28,116,119</sup>. Um dos valores da curva de calibração deve ter um valor de concentração menor que o LDD<sup>28</sup>. Seguidamente, calcula-se o valor do declive,  $b$ , e o valor do desvio padrão residual,  $S_y$ <sup>28,116,119</sup>. Nesta equação 17 o produto de 3,3 com  $S_y$  consiste no resultado em que os erros do tipo I e II são de 5%<sup>119</sup>.

$$LDD = \frac{3,3S_y}{b} \quad (\text{equação 17})$$

### 2.2.4.2. Limite de quantificação

Entre o LDD e LDQ a incerteza é maior que o valor obtido da resposta, e, a partir do limite de quantificação já é possível obter respostas em que a incerteza associada é menor que o valor de concentração calculado, obtendo um resultado com uma precisão aceitável<sup>113,114,123</sup>. O limite de quantificação é a concentração mínima de analito presente numa amostra ou solução que pode ser determinada quantitativamente com uma precisão, repetibilidade e exatidão específica, sob as condições experimentais que estão a ser usadas<sup>26,28,113,116-118,123</sup>. Usualmente, é calculado quando se trabalha com matrizes que contem produtos de degradação ou impurezas<sup>28</sup>.

A determinação do LDQ é calculada a partir do método sinal/ruído e ou pelo método da curva de calibração<sup>26,28,29,113-117,119,123</sup>.

Em LDQ o método do sinal-ruído é mais utilizado para técnicas analíticas, mas em técnicas de separação, tal como a cromatografia a contribuição do ruído difere com a área do composto, sendo menor para picos com áreas muito elevadas e o tipo de matriz<sup>116,123</sup>, a coluna cromatográfica e o uso dado a esta também alteram muito a relação sinal/ruído<sup>116</sup>. Por isso, valores muito baixos de LDQ tem uma precisão menor<sup>116</sup>. Com um sinal baixo há um risco do ruído ter uma maior contribuição. No LDD a proporção é de 3:1, no LDQ é de 5:1, 6:1 ou 10:1, a última proporção é a mais usual<sup>26,28,113,117</sup>.

A determinação do LDQ também pode ser feita a partir do cálculo da média de análises do branco,  $x_0$ , com o desvio padrão de análises de uma solução de amostra, branco ou soluções padrão (equações 18-20)<sup>115,119,123</sup>. O desvio padrão,  $s_0$ , deve ter entre 6 a 15 réplicas<sup>123</sup> ou 10 a 20 soluções independentes<sup>115</sup>, no entanto recomendam-se 10 análises e convém ser medido em condições de repetibilidade, por cálculo do desvio padrão residual, RSD, mas também pode-se obter o desvio padrão em condições precisão intermédia<sup>115,123</sup>. O RSD é definido pela IUPAC em 10%<sup>114</sup>, mas para a equação 19. e 20, multiplicadores de 5 e 6 os RSD são de 20% e 17%, respectivamente<sup>114,123</sup>.

$$LDQ = x_0 + 10s_0 \quad \text{(equação 18)}$$

$$LDQ = x_0 + 6s_0 \quad \text{(equação 19)}$$

$$LDQ = x_0 + 5s_0 \quad \text{(equação 20)}$$

O método recorrendo a dados a partir da curva de calibração é o mais utilizado e o que fornece o valor do limiar analítico mais confiável/fidedigno<sup>115,116,119</sup>. Uma vez que, é necessário fazer várias análises para obter resultados estatisticamente válidos, estes dois procedimentos tornam-se muito demorados e a determinação pela curva de calibração o desvio padrão residual da curva de calibração que é mais rápido<sup>119</sup>. A curva de calibração fornece os valores de  $b$  e de  $S_{\frac{y}{x}}$ , que em vez de se multiplicar por 3, como no LDD, multiplica-se por 10 (equação 21)<sup>115,119</sup>.

$$LDQ = \frac{10S_{\frac{y}{x}}}{b} \quad (\text{equação 21})$$

### 2.2.5. Gama de trabalho

A análise da gama de trabalho é um melhor indicador da linearidade do que a inspeção visual da curva de calibração e do coeficiente de correlação da curva de calibração<sup>120</sup>. A gama de trabalho pode ser diferente da gama linear, pois o equipamento ou até mesmo o método podem não ser os mais adequados, mas tem de ser garantir a repetibilidade dos resultados. A linearidade também pode ser comprometida com a existência de interferentes na matriz, que são capazes de alterar os resultados do analito<sup>120</sup>. Para a análise de modelos lineares deve-se utilizar a norma ISO 8466-1 e para modelos polinomiais de 2º grau deve-se utilizar a norma ISO 8466-2<sup>115,120</sup>. Como à partida, o modelo é linear os dados serão aplicados de acordo com norma ISO 8466-1<sup>115,120</sup>. Inicialmente é necessário fazer 5 a 10 soluções padrão de analito ao longo das concentrações da curva de calibração<sup>115</sup>, sendo que o desfasamento das soluções seja no máximo de 10 unidades de concentração<sup>120</sup>. Seguidamente, recorre-se ao teste da homogeneidade das variâncias, em que se calcula a variância,  $S_i^2$ , de cada concentração,  $i$  (equação 22). A variância consistente no quociente do somatório da subtração dos valores de resposta,  $y_{i,j}$ , em que  $j$  é o numero de réplica de um a dez, com os valores médios de resposta,  $\bar{y}_{i,j}$ , ao quadrado, para o numero total de respostas,  $n_i$ . Em que,  $n_i-1$  é o número de graus de liberdade das respostas obtidas. O número partir da razão das variâncias obtêm-se o valor de PG<sup>115</sup>.

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_{i,j})^2}{n_i - 1} \quad (\text{equação 22})$$

A razão das variâncias varia. Recorre-se à equação 23 quando a variância da concentração superior,  $S_{10}^2$  é maior que a variância relativa à concentração inferior,  $S_1^2$ , e quando  $S_{10}^2$  é menor que  $S_1^2$  usa-se a equação 24.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad (\text{equação 23})$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad (\text{equação 24})$$

Por sua vez, este valor de PG é comparado com o valor de F tabelado para 95% de nível de confiança e  $\alpha$  de 0,05, para n-1 graus de liberdade de cada solução padrão elaborada para cada concentração<sup>115</sup>. Se o valor de PG for menor ou igual ao valor de F tabelado, então a gama de trabalho está ajustada. Caso aconteça o contrário e o valor de PG é maior, tem de se estreitar o intervalo de concentrações e repetir o procedimento todo até se obter um PG menor ou igual ao valor de F tabelado<sup>115</sup>. No guia EURACHEM também se podem encontrar outros métodos para verificar a gama de trabalho, tais como a utilização de branco com materiais de referência, ou então materiais de referência ou amostras fortificadas. O procedimento é tal e qual o mencionado anteriormente<sup>120</sup>.

### 2.2.6. Teste de Mandel

Depois de verificar a linearidade de uma curva de calibração do primeiro grau e de saber se existem valores suspeitos ou não, aplica-se o teste de Mandel. Este teste é elaborado seguindo as orientações da norma. Supõe-se que os desvios da curva de calibração são originados pela ausência da linearidade e podem ser diminuídos se a curva for ajustada para um modelo polinomial de 2º grau (equação 25), em  $a$  é a ordenada na origem,  $b$  é o declive e que  $c$  é a curvatura da reta.  $x$  e  $x^2$  são os valores de concentração ao quadrado<sup>118</sup>.

$$y = a + bx + cx^2 \quad (\text{equação 25})$$

Associada à curva de calibração do primeiro grau existe o desvio padrão residual  $S_{y/x}$  e a curva de calibração polinomial do segundo grau tem o desvio padrão residual  $S_{y2}$  (equação 26). Para calcular o  $S_{y2}$  assume-se que as respostas obtidas por cromatografia,  $y$  e as concentrações elaboradas tem uma linha de tendência polinomial de segundo grau. Calcula-se o valor de resposta para a curva de calibração do segundo grau e obtêm-se os valores de  $\hat{y}$ . Este parâmetro é calculado para  $n - 3$  graus de liberdade, em que  $n$  são os pontos da curva de calibração.

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}} \quad (\text{equação 26})$$

Para saber se a curva é do 1º ou 2º grau faz-se um teste de f em que o valor de  $PG$  é calculado a partir da equação 27, em que,  $DS^2$  é a diferença das variâncias, calculada a partir da equação 28.

$$DS^2 = (n - 2)S_{\bar{y}}^2 - (n - 3)S_{y^2}^2 \quad (\text{equação 27})$$

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (\text{equação 28})$$

A curva de calibração é do 2º grau quando o valor de  $PG$  é maior ou igual ao valor de  $F$  tabelado. De modo a tornar a calibração linear deve-se repetir o procedimento, se voltar a ocorrer o mesmo deve-se reduzir a gama de trabalho para que o valor de  $PG$  seja menor que o valor de  $F$ , obtendo assim, uma reta<sup>118,124</sup>.

### 2.2.7. Precisão

Para garantir que há precisão existem dois testes estatísticos: o teste de *Grubbs* que é o mais utilizado, e o teste de *Dean e Dixon*. Ambos verificam se um valor dito como suspeito pode pertencer ou não ao conjunto dos resultados, e em ambos os testes só se pode fazer para um conjunto de pelo menos três valores<sup>119</sup>.

O teste de *Grubbs*,  $G$ , verifica se o valor suspeito,  $x$ , é um valor suspeito através da subtração, em módulo, do mesmo valor com a média do conjunto de resultados,  $\bar{x}$ , dividindo pelo desvio padrão do conjunto de resultados,  $s$ , (equação 29). Depois de determinar  $G$  compara-se o valor crítico para uma probabilidade de 0,05, de um teste bicaudal. Se o valor de  $G$  for maior que o valor tabelado, então encontrou-se um *valor suspeito* que é retirado do conjunto de resultados. O teste de *Grubbs* tem de ser repetido até não haver mais *outliers*<sup>119</sup>.

$$G = \frac{|x - \bar{x}|}{s} \quad (\text{equação 29})$$

O teste de *Dean e Dixon*, ou teste de  $Q$  é aplicado a um conjunto constituído com no mínimo três resultados. O teste consiste no quociente entre o módulo da subtração do valor suspeito,  $S$ , com o valor mais próximo,  $P$ , com a subtração do valor maior,  $M$ , com o valor menor do conjunto dos resultados,  $m$ . Neste teste assume-se que a população tem uma distribuição do erro normal. O valor de  $Q$  é calculado e se for maior que o valor tabelado para uma probabilidade

de 0,05 de um teste bicaudal  $Q$  é rejeitado. Se houver rejeição do valor suspeito tem de se repetir o teste até não existir mais qualquer *valor suspeito* (equação 30)<sup>119</sup>.

$$Q = \frac{|S-P|}{M-m} \quad (\text{equação 30})$$

A precisão é um ponto da validação do método essencial, pois pode ser constituído por variações individuais ou por todo o método que está em desenvolvimento<sup>122</sup>.

Para análises quantitativas, a precisão mostra a dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma amostra ou qualquer tipo de solução, analisada sob as mesmas condições experimentais<sup>28,29</sup>. O cálculo é através do desvio padrão ou desvio padrão relativo, *RSD*, também conhecido como coeficiente de variação, *CV*, que mede a proximidade entre as medidas efetuando a precisão relativa da medição (equação 31)<sup>26,114,116,118,122</sup>. *RSD* é o desvio padrão do método,  $S_m$ , dividido pelo valor médio das amostras concentrações,  $\bar{x}$ , e em regra o resultado é dado em forma de percentagem<sup>115,116,122</sup>. O cálculo de  $S_m$  é a razão entre desvio padrão residual da curva de calibração,  $s_{y/x}$ , e o declive da mesma curva,  $b$ .

$$RSD \text{ ou } CV (\%) = 100 * \frac{S_m}{\bar{x}} \quad (\text{equação 31})$$

Quando o método é aplicado para quantidades da ordem macro, os valores de *RSD* tem de estar entre 1 e 2%, mas para amostras com bastantes impurezas, resíduos ou amostras complexas, o valor de *RSD* é maior (tabela 4)<sup>26,28,116,117</sup>. Se não se obtiver os valores de percentagem pretendidos pode-se aumentar o número de réplicas de cada análise até se atingir esse valor<sup>116</sup>.

**Tabela 4. Percentagem de desvio padrão relativo máximo aceitável para diversas concentrações<sup>26</sup>.**

Taxa de analito (%)	RSD (%) <sup>26</sup>	RSD (%) <sup>117</sup>
100%	2	1,3
10%	2,8	2,8
1%	4	2,7
0,1%	5,6	3,7
100 ppm	8	5,3
10 ppm	11	7,3
1 ppm	16	11
100 ppb	23	15
10 ppb	32	21
1 ppb	45	30

A precisão pode ser analisada a partir da reprodutibilidade,  $S_R$ , repetibilidade,  $S_r$ , e precisão intermédia ou intralaboratorial,  $S_{ri}$ , em que  $i$  são as variáveis<sup>28,29,122</sup>. É mais comum medir a precisão através da repetibilidade que corresponde à menor precisão esperada. A reprodutibilidade, correspondente à maior medição da precisão encontrada, que exclui a variação ao longo do tempo e só pode ser estimada colaborando um ensaio interlaboratorial colaborativo<sup>29,113</sup>.

### 2.2.7.1. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma medida da precisão realizada entre laboratórios, na qual se analisa a mesma amostra ou solução, com diferentes concentrações, em laboratórios diferentes, com diferentes analistas mas as condições ambientais (temperatura, humidade do laboratório) e operacionais (equipamento e/ou respetivos componentes) podem variar estando-se dentro das especificações do método<sup>27-29,113,115-117,122</sup>. A escolha dos laboratórios é mediante as condições para realizar os ensaios e se tem operadores com qualificações similares para realizar a análise<sup>116</sup>. Segundo a União Nacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC o número de laboratórios tem de ser superior a cinco, sendo o ideal mais de oito laboratórios, porque, apesar de a amostra ser a mesma os resultados variam muito, quando o objetivo é que os resultados sejam similares<sup>28,116,117</sup>.

O limite de reprodutibilidade,  $R$ , é utilizado para ver se a diferença entre análises em duplicado é significativa ou não e está associado a uma probabilidade de 95% e à variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório,  $S_{Ri}^2$  (equação 32). (Dado que não foram feitos ensaios para a análise da reprodutibilidade, as deduções matemáticas para obter a variância da reprodutibilidade podem ser visualizadas no Guia Relacre número 13<sup>115</sup>).

$$R = 2,8 \sqrt{S_{Ri}^2} \quad (\text{equação 32})$$

A variância da reprodutibilidade é determinada pela soma da variância interlaboratorial,  $S_{Li}^2$  e da variância da repetibilidade,  $S_{di}^2$ . A variância dos ensaios interlaboratoriais que corresponde à variância dos erros sistemático e a variância da repetibilidade corresponde aos erros aleatórios (equação 33).

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{di}^2 \quad (\text{equação 33})$$

### 2.2.7.2. Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância dos resultados de medições sucessivas, da mesma amostra sob condições de repetibilidade: mesmo laboratório, mesmo método, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e mesmas condições ambientais. Uma distinção da repetibilidade face à reprodutibilidade é o curto espaço de tempo das análises realizadas, e por isso é muitas vezes chamada de precisão intraensaio<sup>26-28,113,115-117</sup>.

A repetibilidade, em ensaios intralaboratoriais, pode ser avaliada preparando amostras brancas com 2 ou 3 fortificações e cada concentração tem de ter 3 réplicas<sup>26,29,115,116</sup>, ou pode-se analisar 3 concentrações e fazer 6 réplicas de cada concentração<sup>117</sup>. Contudo, encontrar amostras brancas é difícil e pode ser dispendioso, mas, se o laboratório não conseguir obtê-las tem como alternativa realizar o método adição de padrão, com 5 ou mais níveis de concentração e cada concentração tem de ter no mínimo seis réplicas independentes<sup>29</sup>.

Outro método para avaliar a repetibilidade é preparar várias réplicas de somente uma concentração<sup>26,29,115-117</sup>. O número de réplicas é varia de acordo com as fontes bibliográficas: pelo menos 6<sup>26,116,117</sup>, 7 ou no mínimo 9<sup>116</sup> ou mais de 10 réplicas<sup>115</sup>. Para ensaios interlaboratoriais pode-se realizar a análise de pelo menos 2 réplicas<sup>115</sup>.

Depois se decidir o procedimento para analisar a repetibilidade e de saber a concentração de cada amostra, em cada réplica efetua-se os testes estatísticos para eliminar potenciais valores suspeitos seguindo as normas da Organização Nacional de Padronização, ISO 5725-2 e a Sociedade Americana de Testes e Materiais, ASTM E178<sup>29,115</sup>. E, por fim calcula-se os parâmetros da repetibilidade que são constituídos pelo desvio padrão da repetibilidade,  $S_{ri}$ , coeficiente de variação da repetibilidade,  $CV_{r_i}$ , também em percentagem e o limite de repetibilidade,  $r$ <sup>29,115-117</sup>.

A variância da repetibilidade para cada laboratório,  $S_{ri}^2$ , associada a cada concentração,  $i$ , está relacionada com a variância dos resultados para cada laboratório,  $S_{wi}^2$ , com os graus de liberdade de cada conjunto de réplicas para cada concentração,  $(n_{wi} - 1)$  e com cada laboratório que colaborou no ensaio,  $p$  (equação 34)<sup>115</sup>. Com esta fórmula, a ordem da concentração do composto não influencia os resultados<sup>115</sup>. Tendo em conta que a repetibilidade pode variar com o teor do elemento a dosear, esta última condição assegura, em princípio, a

igualdade estatística das variações de  $w$  séries de análises<sup>115</sup>. Assim, a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível  $i$  de concentração<sup>115</sup>. É uma medida de dispersão da distribuição dos resultados teste sobre as condições de repetibilidade. Similarmente, a variância da repetibilidade e o  $CV_r$  podem ser definidos e usados como medidas da dispersão dos resultados teste sob condições de repetibilidade<sup>113</sup>.

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad (\text{equação 34})$$

O limite de repetibilidade,  $r$ , é o valor abaixo ou igual, para uma probabilidade, em regra de 95%, para o qual se aceita, que a diferença absoluta dos valores de dois resultados em duplicado,  $x_i$  e  $x_{i-1}$  é significativa equação 35<sup>113,115</sup>. Se  $r$  for maior que a diferença absoluta dos duplicados deve-se fazer repetir análises de acordo com as normas ISO 5725-2 e ISO 5725-6<sup>115</sup>

$$|x_i - x_{i-1}| \leq r \quad (\text{equação 35})$$

O valor de  $r$  é obtido a partir do produto desvio padrão de cada laboratório associado a cada concentração com 2,8, que provem da constante *t-student*, para a probabilidade de 95% 1,96 multiplicado pela raiz de 2, originando a constante 2,8 (equação 36)<sup>113,115</sup>.

$$r = 2,8 \sqrt{S_{ri}^2} \quad (\text{equação 36})$$

Após se obter o valor do limite de reprodutibilidade já se pode calcular o valor do coeficiente de variação relativo à repetibilidade,  $CV_r$  (equação 31)<sup>29,115,116</sup>.

### 2.2.7.3. Reprodutibilidade intralaboratorial/intermédia ou precisão interna

Reprodutibilidade intralaboratorial/intermédia ou precisão interna é o estudo em que se observa a variação dos resultados obtidos quando se variam fatores dentro do mesmo laboratório e verifica se durante o desenvolvimento do método os resultados serão coerentes com os resultados do método depois de terminado. Estes fatores são chamados de condições de precisão intermédia, e, podem ser o tempo de análise, que em regra é intermédio, o equipamento e o operador, equipamentos distintos, padrões e reagentes de fornecedores diferentes ou de lotes diferentes. Deve-se sempre mencionar qual ou quais os fatores que são considerados constantes<sup>28,113,117,122</sup>. Enquanto que na repetibilidade a análise é no mesmo dia e na reprodutibilidade é em dias diferentes, na precisão intermédia o período de tempo é mais que um dia mas não

chega a ser tão desfasado como na reprodutibilidade<sup>115,117</sup>. Por exemplo, quatro analistas analisam a mesma amostra em quatro dias diferentes, ou três operadores injetarem três soluções durante 15 dias úteis utilizando três colunas cromatográficas diferentes<sup>28,115,117</sup>. Maioritariamente, os ensaios são realizados no mesmo laboratório, mas também podem ser interlaboratoriais<sup>122</sup>.

A análise da reprodutibilidade intermédia começa com a fortificação de amostras brancas, em três concentrações diferentes, com os analitos e seguidamente, fazem-se no mínimo 5 réplicas independentes, duplicados, ou até um único ensaio de cada concentração<sup>28,29</sup>. Repete-se o procedimento pelo menos mais duas vezes, em dias diferentes e variando cada vez mais os fatores inseridos nas condições de precisão intermédia<sup>28,29</sup>. Se não houver amostras brancas, realiza-se o procedimento alternativo que está escrito na repetibilidade<sup>29</sup>. Depois de verificar se há ou não valores suspeitos de concentração, que foi obtida por interpolação da curva de calibração, calcula-se o desvio padrão da precisão intermédia  $S_i$  ( ) e o respetivo CV <sup>115,117</sup>.

## 2.2.8. Exatidão

A exatidão de um método analítico é descrita como a amplitude/concordância entre um resultado obtido a partir do procedimento e um valor aceite como verdadeiro ou como referência<sup>26,28,29,114,117</sup>. Existem diferentes formas de determinar o valor aceite como verdadeiro. Uma delas é comparar o método em utilização com um método com os materiais de referência, efetuar ensaios de recuperação, participar em ensaios colaborativos e o uso de materiais de referência certificados, MRC<sup>26,117</sup>.

### 2.2.8.1. Material de referência certificado

Os MRC são materiais relacionados com padrões internacionais utilizados para determinar a justeza e tem todos os detalhes dados pelo fabricante dado que foram previamente caracterizados por um laboratório e possuem uma incerteza declarada<sup>26,28,29,114,116</sup>. A concentração do MRC e a incerteza associada devem estar de acordo com a gama de concentrações do estudo<sup>114</sup>. O estudo intensivo para a caracterização destes compostos faz com que o custo seja muito elevado e muito restrito, havendo pouca diversidade de matrizes e analitos<sup>26,28</sup>. Em alternativa pode-se

fortificar um branco de matriz ou uma amostra com uma concentração conhecida de peso ou volume e obter a percentagem de analito que foi recuperada<sup>26,28,114,116,117</sup>.

A análise é feita com várias réplicas do MRC e compara-se o resultado de uma amostra, com concentração conhecida, obtida pelo método com o valor médio das réplicas do MRC<sup>26,28,114</sup>. Também se pode fazer por ensaios de recuperação<sup>29</sup>. O erro do MRC é dado na forma de concentração e pode ser aplicado em qualquer tipo de ensaio (laboratorial, interlaboratorial)<sup>114</sup>.

### **2.2.8.2. Método proposto vs método utilizado**

A exatidão também pode ser determinada analisando as mesmas amostras, de preferência espalhadas de igual modo, pela gama de trabalho, em métodos diferentes<sup>26,114</sup>. Um método é o que está a ser validado e outro método é um método já validado, com concentração conhecida<sup>26,28,114,117</sup>. O cálculo da diferença entre cada resultado obtido por cada método e a aplicação de um teste estatístico dirá quão exato é o método<sup>26,28,114</sup>. A maior dificuldade é encontrar um método já validado para o estudo em questão, mas, caso se encontre, pode-se alterar mais facilmente o método<sup>26,114</sup>.

### **2.2.8.3. Ensaios colaborativos**

Os estudos colaborativos são feitos com pelo menos oito laboratórios, mas em casos extremos pode-se fazer com mais de cinco laboratórios<sup>26</sup>. Para além de reunir um número significativo de laboratórios a validar o mesmo método, a estabilidade da amostra é muitas vezes comprometida<sup>26</sup>. O estudo da validação dos dados envolve a aplicação do teste de análise de variâncias, ANOVA, onde se determina se as diferenças entre os resultados obtidos em cada laboratório são significativas<sup>26</sup>.

### **2.2.8.4. Ensaio de recuperação**

O ensaio de recuperação é o método mais utilizado na validação exatidão, mais precisamente a justeza, pois mostra a quantidade de analito recuperado numa amostra fortificada em relação à concentração existente numa amostra real<sup>26,28,29,116,117</sup>. A recuperação corrige o resultado

obtido dos erros sistemáticos provenientes do pré-tratamento de amostra, preparação da fortificação, interferentes da matriz ou da leitura do instrumento<sup>26,29,122</sup>. Como estratégias de fortificação há a adição de um isótopo do analito e a adição de um padrão com analito<sup>116</sup>.

O procedimento consiste em analisar uma amostra em que se sabe a concentração do analito, esta amostra é denominada de branco de amostra. Em seguida, fortifica-se o branco de amostra com três concentrações diferentes. É preciso ter em conta que as concentrações tem de estar perto do LDQ, a meio da gama de concentrações e outra perto da maior concentração da curva de calibração<sup>28,113,116,117</sup>. As três concentrações para a recuperação também podem ser o valor do LDQ, o dobro do LDQ e o décuplo do LDQ<sup>116</sup>. Se a gama de trabalho não estiver ajustada, então trabalha-se num intervalo de concentração, maior que o LDQ, compreendido na gama de trabalho e preferencialmente onde podem haver várias amostras<sup>28,116</sup>. O número de réplicas para cada concentração é de pelo menos três, sendo o mais indicado seis<sup>117,28,29</sup>. Para cada fortificação deve-se calcular o CV e a recuperação<sup>29,113</sup>. Para uma recuperação com MRC faz-se uso da equação 37, em que  $C_{med}$  é a concentração do MRC obtida e  $C_{MRC}$  é a concentração declarada<sup>28,29</sup>. A recuperação através da fortificação no produto de 100 pelo quociente da diferença entre a concentração da amostra fortificada,  $C_1$ , e a concentração da amostra em branco,  $C_2$ , pela concentração da fortificação,  $C_3$ , obtendo assim o valor de recuperação percentual,  $R(\%)$ , (equação 39)<sup>26</sup>.

$$R(\%) = 100 \times \frac{C_{med}}{C_{MRC}} \quad \text{(equação 37)}$$

$$R(\%) = 100 \times \frac{C_1 - C_2}{C_3} \quad \text{(equação 39)}$$

O valor ideal de recuperação é de 100%, os resultados tem de ser consistentes, precisos e reprodutíveis<sup>118,28,116</sup>. Mediante a concentração e a complexidade da amostra ou da matriz a percentagem é alterada<sup>28,117</sup>.

A tabela 5 mostra as taxas de recuperação aceitáveis para cada unidade de concentração<sup>26,117</sup>.

Tabela 5. Taxa de analito e a respetiva percentagem de recuperação.

Taxa de analito (%)	R (%) <sup>117</sup>	R (%) <sup>26</sup>
100%	98-102	
10%	98-102	98-102

1%	97-103	97-102
0,1%	95-105	95-105
100 ppm	90-107	90-107
10 ppm	80-110	80-110
1 ppm	80-110	80-110
100 ppb	80-110	80-110
10 ppb	60-115	60-115
1 ppb	40-120	40-120

### 2.3. Materiais e reagentes

Todos os reagentes tem um grau de pureza superior a 95 %, à exceção do ácido abiético que é 75 % puro.

- Ácido palmítico, 99%, Sigma
- Ácido linoleico, *analytical standard*, Sigma-Aldrich
- Ácido oleico, *analytical standard*, Sigma-Aldrich
- Ácido esteárico, GC capilar, Sigma
- Ácido abiético, GC, Sigma-Aldrich
- Ácido heptadecanoico,  $\geq 98\%$ , Sigma
- Piridina, GC, *Sigma-Aldrich*
- BSTFA + TMCS, (99:1), Supelco
- $\alpha$  – pineno, *analytical standard*, Sigma-Aldrich
- Canfeno, *analytical standard*, Supelco
- $\beta$  – pineno, *analytical standard*, Sigma - Aldrich
- Limoneno, *analytical standard*, Sigma - Aldrich
- Nonano, *ReagentPlus*, Sigma - Aldrich
- Hexano, *ReagentePlus*, Sigma - Aldrich

Os solutos foram pesados numa balança analítica METTLER TOLEDO AB204-S com erro, repetibilidade e resolução digital de  $\pm 0,0001$  g. As soluções mãe foram feitas em balões

volumétricos de 5 ou 25 mL de classe A, da marca GLASSCO e da marca Normax, respectivamente, ambos com uma incerteza de  $\pm 0,04$  mL. As restantes soluções e a preparação de amostras foram feitas *via/s* de âmbar, com tampa de rosca e septo de silicone com Politetrafluoretileno e com micropepetas EASY 40+ de 20 a 200  $\mu\text{L}$  e de 100 a 1000  $\mu\text{L}$ .

A preparação das soluções e das amostras para validação do método para de gordos e resínicos foi realizada na *hotte* e com luvas devido aos perigos associados à piridina e ao reagente derivatizante. Para ocorrer a reação colocou-se numa estufa da marca wtb binder.

A microseringa tem capacidade de 1  $\mu\text{L}$  modelo 1BR-7 e a coluna capilar é SGE FORTE BP5 30m x 0,25mm, 0,25  $\mu\text{m}$  e o linner é de 4mm quartzo split/splilkess da Perkin Elmer.

# **Capítulo 3. Tratamento de resultados e discussão**



### 3.1. Análise das soluções e misturas padrão de ácidos gordos e resínicos em resinas e *tall oil*

Em cromatografia otimizou-se a resolução e o tempo de análise em função de  $k$ , obtendo o método da tabela 6. Injetou-se cada solução com um padrão, em seguida injetou-se a mistura de padrões e verificou-se que não havia sobreposição de picos. Os picos dos ácidos estão apresentados no cromatograma da figura 12 e o respetivo tempo de retenção sob as condições do método está na tabela 7. A análise quantitativa de amostras foi realizada pelo método do padrão interno. Neste caso escolheu-se o ácido heptadecanóico, como padrão interno, pois não se sobrepunha com outros picos, quer de amostras, quer de soluções padrão e também é um ácido gordo. Em todas as análises de amostras pesou-se cerca de 8 a 10 mg de amostra, pipetou-se 100  $\mu$ L de solução, 100  $\mu$ L de padrão interno e 100  $\mu$ L de reagente derivatizante para um *vial*, totalizando um volume de 300  $\mu$ L. Tanto as amostras como as soluções padrão estiveram na estufa entre 60 a 70 °C por um minuto para que a reação ocorresse.

Tabela 6. Condições de operação, de GC-FID Clarus 580 e especificações da coluna capilar BP-5, utilizadas para as análises das soluções padrão, mistura de soluções padrão de ácidos gordos e resínicos, resinas, colofónia, *tall oil*.

Coluna	Comprimento da coluna (m)	30
	Diâmetro interno (mm)	0,25
	Espessura do filme ( $\mu$ m)	0,25
	Limite de temperaturas da coluna	-60 a 320/340
Temperatura do injetor (°C)		250
Temperatura do forno (°C)	Rampa 1	110-220 (10°C/min) 220 (4 min)
	Rampa 2	220-235 (2°C/min)
	Rampa 3	235-290 (10°C/min) 290 (1 min)
Temperatura do detetor (°C)		300
<i>Split</i> (mL/min)		20
Fluxo da chama (mL/min)		Ar: Hidrogénio 450:45
Fluxo do gás de arraste (mL/min)		1

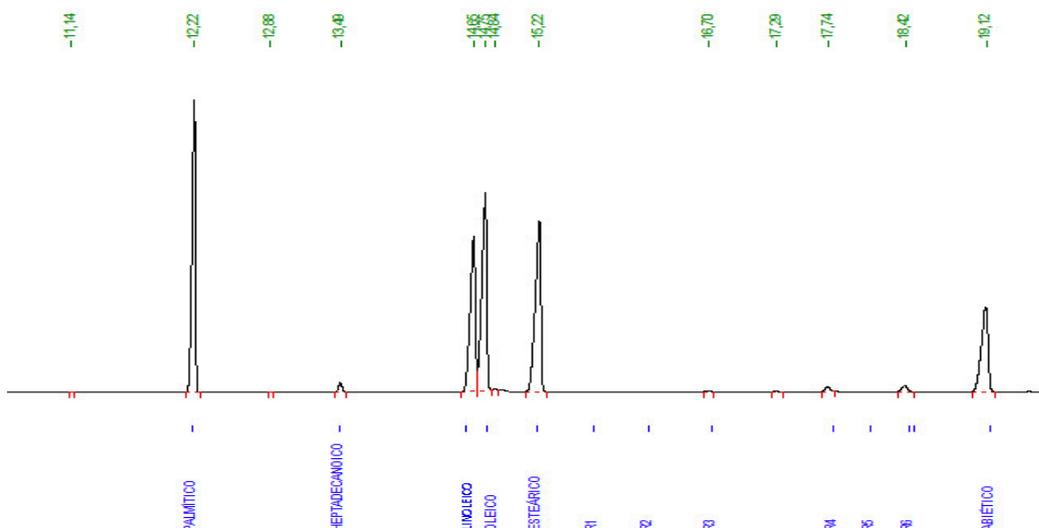


Figura 12. Cromatograma de uma solução de 10 ppm de ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico e ácido abiético obtido num GC-FID sob o método especificado nas condições da tabela 6.

Tabela 7. Tabela do tempo de retenção dos ácidos em estudo, quando analisados nas condições cromatográficas mencionadas na tabela 6.

Ácido	Tempo de retenção (min)
Palmitico	12,2
Heptadecanóico	13,5
Linoleico	14,7
Oleico	14,8
Esteárico	15,3
Abiético	19,1

Antes de realizar as análises a coluna foi condicionada e foram feitos vários ciclos até se obter uma linha de base aceitável. O método foi obtido com uma resolução aceitável para todos os conjuntos de ácidos que foram objetos de estudo. Portanto pode-se dizer que o método permite separar os ácidos gordos e fornecer resolução suficientes. As condições de temperatura do forno foram otimizadas para alcançar estes dados.

### 3.1.1. Curvas de calibração

A tabela 8 mostra os vários parâmetros obtidos a partir da construção da curva de calibração, considerando que em  $x$  estão os valores de concentração em ppm e no eixo  $y$  os valores da razão entre área de cada ácido com a área do padrão interno. Nas curvas de calibração com concentrações maiores o intervalo de concentração teórica é de 0,02 a 10,02ppm. O valor 0,02ppm fez-se a partir de uma solução de 0,30ppm. Os restantes valores de concentração, desta

curva de calibração fizeram-se pela diluição da solução mãe de 25 ppm. O volume de injeção para 0,02ppm foi de 1 $\mu$ L, para 1,27ppm foi de 0,9 $\mu$ L e diminuiu-se o volume de injeção sucessivamente até à solução de 5,02ppm, em que se injetou 0,5  $\mu$ L. Para as restantes soluções injetou-se sempre 0,2 $\mu$ L devido à grandeza das concentrações evitando assim, a saturação do detetor e possíveis contaminações na coluna. Em todas as retas fez-se o teste dos valores suspeitos, tal como explicado na equação do capítulo e confirma-se a inexistência de valores suspeitos (tabela 8).

### 3.1.1.1. Ácido palmítico

Analisaram-se várias amostras e calculou-se a concentração de ácido palmítico em cada uma delas utilizando a curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $10,00 \pm 0,012$  ppm. O maior valor de concentração encontrado de ácido palmítico nas amostras foi de  $1,76 \pm 0,0031$  ppm. Dado que é uma concentração muito baixa, em relação a esta curva, optou-se por determinar a concentração do ácido palmítico nas amostras na curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  ppm a  $1,28 \pm 0,0017$  ppm e obteve-se concentrações que ficaram fora da curva de calibração Utilizado esta curva obteve-se valores máximos de concentração de aproximadamente de 1,3 ppm. De modo a empregar a curva de calibração tendo em conta estes dados foi utilizado uma curva de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,93 \pm 0,0049$  ppm nas análises das amostras.

O número de pontos para cada curva de calibração é diferente, por sua vez o valor da constante da distribuição de *t-student* aumenta para curvas com menores pontos. O coeficiente de correlação varia de 0,9990 a 0,9997, logo há linearidade porque todos os valores correspondem a uma correlação fortíssima por serem maiores que 0,995. A sensibilidade e o erro associado ao declive são maiores para a curva  $0,020 \pm 0,0027$  a  $10,00 \pm 0,012$  ppm, comparando com as outras curvas. Na curva utilizada para a validação o declive é intermédio e o erro associado à ordenada na origem é o menor. As variações observadas no valor de ordenada na origem e no respetivo erro não dependem da curva de calibração mais usadas. A ordenada na origem para a curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $10,00 \pm 0,012$  ppm tem um valor negativo, contrariamente as restantes curvas tem um valor positivo. A curva utilizada para a validação tem a maior ordenada na origem e o respetivo erro é o menor. O desvio padrão residual da curva de calibração é calculado pelas diferenças entre os valores separados e os valores experimentais.

Quanto mais desviados os pontos estiverem maior  $S_{\frac{y}{x}}$ , por isso é que a curva de  $0,0196 \pm 0,0027$  a  $1,934 \pm 0,0049$  ppm tem o menor desvio. Pois apesar de somente metade dos pontos coincidirem na linha de tendência os restantes pontos estão muito próximos da mesma linha. Os valores dos limiares analíticos que têm a mesma ordem de grandeza são maiores para a maior gama de concentração e menores para a curva de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,93 \pm 0,0049$  ppm porque o declive é o maior e o  $S_{\frac{y}{x}}$  é o menor. O desvio padrão do método e o erro associado à concentração são menores para  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,93 \pm 0,0049$  ppm. O coeficiente de variação do método está relacionado com  $S_{\frac{y}{x}}$  e a média dos valores de  $x$ . Como a média dos valores de concentração da curva com menor concentração de limite superior é menor o coeficiente de variação do método é o maior. Pode-se verificar o oposto para a curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $10,00 \pm 0,012$  ppm. A incerteza associada a uma concentração aumenta com o aumento da gama de concentrações porque os valores das concentrações estão muito afastados do centroíde.

### 3.1.1.2. Ácido linoleico

Para o ácido linoleico soube-se logo que a curva de calibração em estudo seria a partir da curva com maiores concentrações, pois os picos cromatográficos obtidos pelas análises das amostras as razões das áreas eram bastante intensos. No entanto, como se fez a curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,25 \pm 0,17$  ppm a partir da mistura de padrões que incluem este composto, os resultados também estão apresentados na tabela.

A curva de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $9,856 \pm 0,012$  ppm indicou através do produto da maior concentração de composto encontrado nas amostras por 1,5 que a gama de concentrações mais indicada seria de  $0,020 \pm 0,24$  a  $8,26 \pm 0,24$  ppm. Então retirou-se o último ponto da curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $9,856 \pm 0,012$  ppm, assim a gama de concentrações é de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $8,62 \pm 0,023$  ppm. Mas, aplicando o teste de Mandel conclui-se que a reta validada a utilizar é de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $7,40 \pm 0,020$  ppm.

O declive é semelhante para as retas com gamas de concentrações maiores e diminui para um pouco mais de metade para a curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,25 \pm 0,17$  ppm. O erro associado ao declive é menor para esta curva e maior para a curva de  $0,020 \pm 0,0027$

a  $8,62 \pm 0,023$  ppm. A ordenada na origem é de  $-0,707$  ppm<sup>-1</sup> para a gama de concentrações maior, ao retirar um ponto dessa curva o valor da ordenada na origem continua negativo, mas mais próximo de zero, sendo  $-0,0392$  ppm<sup>-1</sup> e a curva com a maior concentração de  $7,40 \pm 0,020$  ppm já tem um valor positivo de  $0,0252$  ppm<sup>-1</sup>, que é o maior para as quatro curvas. Apesar o valor da ordenada na origem ser o maior para essa curva, o erro associado é dos menores encontrados, sendo que o menor corresponde ao da curva de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,25 \pm 0,17$  ppm. Esta mesma curva tem dos menores desvios padrões residuais, conseqüentemente tem menores limiares analíticos e maior coeficiente de correlação. O valor de r encontra-se no intervalo de uma correlação fortíssima. O pior r determinado corresponde ao da curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $8,62 \pm 0,023$  ppm, mas mesmo assim o seu valor está compreendido entre 0,995 e 1. Esta curva como a que tem menor gama de concentrações têm piores coeficientes de *Pearson*, resultando em coeficientes de variação maiores, que são os maiores obtidos para todos os ácidos. Mas, o maior valor de  $S_m$  pertence à curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $8,62 \pm 0,023$  ppm e o menor pertence à curva de calibração com a menor amplitude de concentrações. Os dois resultados deste parâmetro dependem mais de  $S_{\bar{y}_x}$ , dado que tem o valor de  $0,1516$  e de  $0,0161$  para a curva até  $1,25 \pm 0,17$  ppm e  $8,62 \pm 0,023$  ppm, respetivamente. O mesmo se pode verificar para o erro  $S_x$  porque depende diretamente de  $S_m$ . A curva de calibração utilizada para calcular as amostras tem desvio padrão da concentração é de  $0,17$  ppm e este valor é segundo desvio mais pequeno quando comparado com as outras retas.

### 3.1.1.3. Ácido oleico

À semelhança do ácido linoleico percebeu-se que existiam grandes quantidades de ácido linoleico em amostras através da visualização de cromatogramas e dos cálculos da concentração pela curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $9,87 \pm 0,012$  ppm. E, pelo mesmo método calculado para os ácidos gordos anteriores, fazendo o produto da maior concentração obtida em amostras por 1,5, soube-se que a gama de concentrações ideal era de  $0,020 \pm 0,15$  a  $10,01 \pm 0,15$  ppm. Este valor encaixa perfeitamente na curva de concentração elaborada e por isso não é necessário fazer qualquer ajuste ou fazer outra curva de raiz. A sensibilidade deste ácido é maior que a dos ácidos anteriores e o erro associado ao declive é cerca do triplo de  $S_{\alpha}$  da curva de calibração de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,25 \pm 0,17$  ppm. Nessa mesma curva a ordenada na origem é positiva e tal como para os

restantes ácidos, a ordenada na origem na curva de calibração com a gama de concentrações superior tem um valor negativo. O erro associado à ordenada na origem tem uma diferença de 40% entre as duas curvas. O desvio padrão residual das curvas de calibração é de 0,1139 para um coeficiente de correlação fortíssima de 0,9993, o que resulta em  $I_{dd}$  e  $I_{dq}$  de 0,4274 e 1,4247 ppm, respetivamente. O coeficiente de variação do método para a curva de calibração com maiores concentrações é cerca de 1,5 vezes menor que o coeficiente da outra curva de calibração. Os parâmetros  $S_x$  e  $S_m$  da curva de calibração de  $0,020 \pm 0,15$  a  $10,01 \pm 0,15$  ppm são aproximadamente 4,3 vezes maiores que os valores destes mesmo parâmetros da curva de calibração.

#### 3.1.1.4. Ácido esteárico

Contrariamente ao ácido oleico o ácido esteárico tinha concentrações muito baixas nas amostras. Começou-se por calcular a concentração nas amostras recorrendo à curva de calibração de  $0,020 \pm 0,15$  a  $9,84 \pm 0,024$  ppm e pelo produto da maior concentração calculada nas amostras por 1,5 obteve-se uma gama de concentrações de  $0,020 \pm 0,11$  a  $1,29 \pm 0,11$  ppm. Decidiu-se calcular a concentração deste produto nas amostras recorrendo à curva de calibração com a gama de concentrações menores, a partir do produto da maior concentração determinada por 1,5 verificou-se que a gama de concentrações deveria ser de  $0,020 \pm 0,031$  a  $1,70 \pm 0,031$  ppm. A construção da curva de calibração relativa ao processo de validação é constituída por 8 pontos e uma gama de  $0,0196 \pm 0,0027$  a  $1,74 \pm 0,0062$  ppm.

A curva de calibração utilizada na validação tem um coeficiente de correlação de 0,9993. Já a curva com maior amplitude de concentrações tem um coeficiente de *Pearson* intermédio, considerando todas as curvas estudadas para este ácido A sensibilidade é quase 1 para a curva de concentração final de 1,792745 ppm, diminui cerca de 20 % para a curva com a maior gama de concentrações e decai quase 40 % para a curva de  $0,020 \pm 0,0027$  a  $1,25 \pm 0,17$  ppm. A ordenada na origem é a maior para a curva da validação e o erro associado tem um valor intermédio. Os limiares analíticos,  $S_a$ ,  $S_y$ ,  $S_m$  e  $S_x$  maiores correspondem à curva de calibração de  $0,020 \pm 0,15$  a  $9,84 \pm 0,024$  ppm e os menores pertencem à curva que será utilizada nas restantes etapas de validação. Os sobrantes parâmetros são os menores, à exceção do coeficiente de variação do método que tem um valor intermédio de 2,10 %, para a curva de  $0,020 \pm 0,15$  a  $9,84 \pm 0,024$  ppm e

a curva  $0,020 \pm 0,15$  a  $1,74 \pm 0,0062$  ppm tem na mesma um coeficiente de variação do método maior. A curva de calibração utilizada na validação tem menor erro associado à curva de calibração, menores desvios padrão do método e menor erro associado à concentração. O desvio padrão residual da curva de calibração não é o menor, mas como o declive é o maior, então os limiares analíticos serão os menores calculados.

### 3.1.1.5. Ácido abiético

Há amostras que têm elevadas quantidades de ácido abiético, por isso a curva a usar é a curva de  $0,015 \pm 0,0027$  a  $7,50 \pm 0,023$  ppm. Como não foi possível realizar mais análises, idealmente para o ácido abiético tinha de ter uma gama de concentrações de  $0,015 \text{ ppm} \pm 0,090$  a  $11,34 \pm 0,090$  ppm. O maior valor de concentração é de  $7,50 \pm 0,023$  ppm porque a pureza do reagente é de 75 %. A sensibilidade do abiético é mais baixa porque oxida em contacto com o ar, transformando-se em ácido dehidroabiético. Apesar do *via*/ estar fechado e ter BSTFA+TMCS, a solução mãe não tem reagente derivatizante estando mais sujeita à oxidação da espécie isso poderá ser uma possível justificação para qualquer diferença na validação do método. De fato, o declive é mais baixo comprando com outros ácidos, mas o erro do declive é satisfatório. O coeficiente de correlação é maior para a curva de calibração de  $0,015 \pm 0,0027$  a  $7,50 \pm 0,023$  ppm. A ordenada na origem é positiva para a primeira curva e para a curva de menor gama de concentração é negativa, muito próxima de zero, mas os erros associados à ordenada na origem são os dois muito baixos e  $S_b$  da primeira curva de calibração é 1,43 vezes maior que a incerteza determinada na curva de  $0,015 \pm 0,0027$  a  $0,95 \pm 0,023$  ppm.

O valor de  $S_{\frac{y}{x}}$  é maior para a curva de calibração de  $0,015 \pm 0,0027$  a  $7,50 \pm 0,023$  ppm e é 6,5 vezes maior que o  $S_{\frac{y}{x}}$  da curva com uma gama de concentrações inferior. Por sua vez, os limiares analíticos,  $S_m$  e  $S_x$  têm os valores mais altos, comparando com a reta de  $0,015 \pm 0,0027$  a  $0,95 \pm 0,023$  ppm e as diferenças são significativas. O coeficiente de variação do método é menor para a curva de calibração com as concentrações maiores porque o número de pontos é maior, assim como as suas concentrações, resultando em uma média de concentrações maiores. Como são indiretamente proporcionais, o coeficiente de variação do método é menor.

Tabela 8. Valores dos parâmetros calculados e tabelados a partir da construção da curva de calibração para cada ácido em estudo pelo método cromatográfico apresentado na tabela 6.

ácido	C (ppm)	GC (ppm)	R	t (95 %)	a	Sa	b (ppm <sup>-1</sup> )	Sb (ppm <sup>-1</sup> )	$\frac{S_y}{x}$	LDD (ppm)	LDQ (ppm)	CV <sub>m</sub> (%)	S <sub>m</sub> (ppm)	S <sub>x0</sub> (ppm)
Palmitico	0,020 ± 0,0027 10,00 ± 0,012	0,020 -1,76	0,9994	t <sub>6</sub> = 2,365	0,7763	0,0600	-0,0358	0,0101	0,0975	0,38	1,26	2,51	0,13	0,13
	0,020 ± 0,0027 1,27 ± 0,17	0,020 - 1,30	0,9990	t <sub>6</sub> = 2,776	0,5782	0,0119	0,0158	0,0153	0,0160	0,083	0,28	4,30	0,028	0,030
	0,020 ± 0,0027 1,93 ± 0,0049		0,9997	t <sub>6</sub> = 2,447	0,6983	0,0084	0,0311	0,0073	0,0129	0,056	0,18	1,90	0,019	0,020
Linoleico	0,020 ± 0,0027 9,86 ± 0,012	0,020 - 8,26	0,998	t <sub>6</sub> = 2,365	0,6824	0,0940	-0,0707	0,0160	0,1528	0,68	2,26	4,54	0,22	0,24
	0,020 ± 0,0027 1,25 ± 0,17	0,020 - 11,56	0,999	t <sub>6</sub> = 2,776	0,4757	0,0111	0,0031	0,0146	0,0150	0,095	0,32	4,92	0,032	0,095
	0,020 ± 0,24 8,62 ± 0,24	0,020 - 8,33	0,998	t <sub>6</sub> = 2,365	0,6678	0,0890	-0,0305	0,0172	0,1377	0,62	2,06	4,77	0,21	0,22
	0,020 ± 0,0027 7,39 ± 0,0097		0,999	t <sub>6</sub> = 2,571	0,6454	0,0694	0,0252	0,0156	0,1017	0,47	1,41	4,26	0,14	0,17
Oleico	0,020 ± 0,0027 9,86 ± 0,012	0,020 - 10,01	0,9993	t <sub>6</sub> = 2,365	0,8077	0,0380	-0,1121	0,0063	0,1139	0,43	1,42	2,78	0,14	0,15
	0,020 ± 0,0027 1,25 ± 0,17		0,998	t <sub>6</sub> = 2,776	0,5441	0,0121	0,0055	0,0145	0,0164	0,090	0,30	4,34	0,030	0,032
Estearico	0,020 ± 0,15 9,84 ± 0,024	0,020 - 1,29	0,9995	t <sub>6</sub> = 2,365	0,8042	0,0279	-0,0096	0,0047	0,0837	0,31	1,04	2,10	0,11	0,11
	0,02 ± 0,0027 1,25 ± 0,17	0,020 - 1,70	0,998	t <sub>6</sub> = 2,776	0,5836	0,0124	0,0188	0,0162	0,0167	0,086	0,29	4,50	0,029	0,031
	0,020 ± 0,0027 1,74 ± 0,0062		0,9993	t <sub>6</sub> = 2,365	0,9684	0,0087	0,0301	0,0082	0,0247	0,077	0,26	2,85	0,026	0,027
Abietico	0,015 ± 0,0027 7,50 ± 0,023	0,020 - 11,34	0,9995	t <sub>6</sub> = 2,365	0,6498	0,0341	0,0171	0,0076	0,0555	0,26	0,85	2,27	0,085	0,090
	0,015 ± 0,0027 0,95 ± 0,023		0,9991	t <sub>6</sub> = 2,776	0,4508	0,0057	-0,0005	0,0098	0,0077	0,051	0,17	3,52	0,017	0,013

### 3.1.2. Teste de Mandel

Os valores de concentração e da razão da área do ácido com a área do padrão interno foram utilizados para construir um gráfico e assumiu-se que a linha de tendência é polinomial de segundo grau em vez de uma reta do primeiro. Depois calculou-se os valores do desvio padrão residual da curva e a diferença das variâncias como se fossem de segundo grau. A razão entre  $S_{y2}^2$  e  $DS^2$  é o valor de  $PG$  que depois é comparado com  $F$ . Para este estudo apenas se utilizaram as curvas de calibração ajustada para a concentração de ácido (tabela 9).

Tabela 9. Gamas de trabalho utilizadas para os restantes processos de validação de cada ácido.

Ácido	Gama de concentração (ppm)
Palmitico	0,020 ± 0,0027 a 1,93 ± 0,0049
Linoleico	0,020 ± 0,0027 a 7,39 ± 0,0097
Oleico	0,020 ± 0,0027 a 9,86 ± 0,012
Esteárico	0,020 ± 0,0015 a 1,74 ± 0,0062
Abiético	0,020 ± 0,0027 a 7,50 ± 0,023

Ao observar os dados obtidos na tabela 10 o valor de  $PG$  do ácido linoleico sobressai logo porque é maior do que o valor de  $F$  tabelado para 7 graus de liberdade. Para contrariar esta equação teve-se de retirar o ultimo valor da curva de calibração. Assim, teve-se uma curva de calibração do ponto 0,002 ± 0,0027 ppm a 7,39 ± 0,0097 ppm e voltou-se a calcular a equação da curva de calibração do primeiro grau e polinomial segundo grau. Em seguida determinou-se o valor do desvio padrão residual de cada curva e a diferença das variâncias para calcular o novo valor de  $PG$ . Esta curva de calibração é constituída por 7 pontos, por isso o número de  $F$  tabelado para 6 graus de liberdade no numerador e no denominador é 5,820 e este valor é maior que o resultado de 0,54 para o valor de  $PG$ . Por fim, pode-se afirmar que existe uma calibração linear para cada ácido

Tabela 10. Valores de desvio padrão residual e diferença das variâncias para uma curva de calibração de segundo grau, mais valores calculados de  $PG$  e valores tabelados de  $F$  para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em  $F_{n_1, n_2, \alpha}$ ,  $n_1 - 1$  é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e  $n_2 - 1$  é o número de graus de liberdade da variância do denominador.

Ácido	Palmitico	Linoleico	Oleico	Esteárico	Abiético
$S_{y2}$	0,014	0,12	0,10	0,020	0,060
$DS^2$	1,50E-08	6,94E-02	3,01E-02	1,30E-03	7,2E-04
$PG$	7,51E-08	5,060	2,980	2,736	0,207
$F$	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{8,8} = 4,433$	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{8,8} = 4,433$

### 3.1.3. Gama de trabalho

Na análise da gama de trabalho foram feitas 10 análises da concentração mais baixa e 10 análises da concentração mais alta, para as cinco retas, como se todas tivessem uma curva de calibração de concentração de 0,02 ppm a 10,02 ppm. Ao calcular o valor de *PG* para as concentrações 0,02 e 10,02 ppm verificou-se que este era muito maior que o valor de *F* correspondente. Então decidiu-se dividir a gama de concentrações em mais duas gamas de concentrações ficando 10 análises para 0,02 ppm, 0,2 ppm, e uma segunda gama de 2 ppm e 10,02 ppm. De 0,02 ppm a 0,2 ppm e de 2 ppm a 10,02 ppm o valor de *PG* era menor que o valor de *F* tabelado existindo ajuste para estas faixas de concentração. Para solucionar a falta de ajuste de 0,2 ppm a 2 ppm adotou-se a mesma estratégia e voltou-se a dividir em mais duas concentrações 0,8 ppm e 1,4 ppm. Deste modo já foi possível obter o ajuste da gama de trabalho. Para todos os valores de todos os ácidos fez-se o teste de *Grubbs* e de *Dean e Dixon*, e alguns valores tiveram de ser excluído por serem valores suspeitos. Em alguns ajustes teve-se de se retirar até dois valores, ficando o valor de *n* igual a 8, o que ainda é aceitável para calcular *PG*. Apesar da utilização de teste de *Grubbs* e de *Dean e Dixon* em alguns casos o valor de *PG* continua a sobrepor-se ao valor de *F*. De modo a conseguir o ajuste pretendido foram retirados alguns valores. Por exemplo, para o ajuste da gama de trabalho do ácido oleico usaram-se os 10 resultados das soluções independentes de  $0,20 \pm 0,0015$  ppm e os resultados de 9 soluções independentes de  $0,81 \pm 0,0026$  ppm. Para ajustar nas concentrações de  $0,81 \pm 0,0026$  ppm a  $1,42 \pm 0,015$  ppm usaram-se as 10 soluções independentes para  $0,81 \pm 0,0026$  ppm, em vez dos valores obtidos de 9 soluções independentes.

A tabela 11 mostra os vários valores de *PG* e o respetivo valor de *F* para um teste bicaudal com uma probabilidade de 95%, para *n*-1 soluções independentes. O ácido palmítico tem todas as gamas de trabalho ajustadas e não foi necessário retirar qualquer valor, nem havia existência de valores suspeitos. Nas primeiras gamas de concentração acontece o mesmo ao ácido linoleico, mas na concentração  $1,38 \pm 0,015$  ppm o teste de *Grubbs* e o teste de *Dean e Dixon* encontram um valor suspeito e teve-se de retirar, diminuindo um valor nos graus de liberdade. Para fazer com que o valor de *PG* das concentrações  $1,38 \pm 0,015$  ppm e  $1,97 \pm 0,015$  ppm fosse menor que o valor de *F* tabelado foi necessário retirar um valor a  $1,97 \pm 0,015$  ppm, que não foi possível eliminar com os testes de rejeição. Para o cálculo do último *PG* do ácido linoleico já se utilizou o valor retirado, mas foi preciso retirar um valor a  $9,856 \pm 0,012$  ppm e mesmo retirando o valor em

1,97 ± 0,015 ppm, *PG* continuaria a ser maior que *F*. O valor de resposta retirado a 9,86 ± 0,012 ppm não foi confirmado como valor a rejeitar. No ácido oleico pode-se ver que foi onde se teve de retirar mais valores. Em 0,020 ± 0,0027 ppm tem um valor suspeito, e ao longo das concentrações não existiam valores suspeitos mas foi necessário retirar valores para obedecer à equação do ajuste da gama de trabalho por vezes para o seguinte *PG* teve-se de considerar os valores retirados. A única gama de concentrações em que se aceitaram todos os valores foi na de 0,81 ± 0,0027 a 1,42 ± 0,015 ppm. Apesar do ácido esteárico ter o mesmo número de gamas este não se estende até à gama de 2,03 ± 0,015 a 9,84 ± 0,024 ppm. Tanto para o ácido esteárico como para o ácido abiético, ambos têm apenas uma gama que não está ajustada com as 10 soluções independentes. A gama do ácido esteárico em que se teve de tirar valores é a de 0,80 ± 0,0025 ppm de concentração e foi necessário retirar dois valores com a finalidade de obter o valor de *PG* menor que o valor de *F* tabelado. No caso do ácido abiético todos os valores foram úteis para os cálculos menos na última gama de concentrações e esse valor teve de ser excluído porque senão a gama não ficava ajustada.

Ao comparar com os valores da curva de calibração há algo assimétrico no ácido oleico e linoleico. O ácido linoleico tem os maiores erros associados ao declive, ordenada na origem e desvio padrão residual da curva de calibração, mas no ajuste das gamas de trabalho não se teve de retirar muitos valores. No entanto, o ácido oleico tem erros menores mas foi muito mais difícil ajustar as gamas de trabalho.

**Tabela 11. Valores calculados de *PG* e valores tabelados de *F* para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em  $F_{n-1, n-1}^*$ ,  $n-1$  é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e  $n-1$  é o número de graus de liberdade da variância do denominador.**

Ácido	Palmítico	Linoleico	Oleico	Esteárico	Abiético
<i>PG</i> <sub>0,02-0,2ppm</sub>	1,640 $F_{9,9} = 4,026$	1,682 $F_{9,9} = 4,026$	1,766 $F_{9,8} = 4,357$	2,970 $F_{9,9} = 4,026$	3,837 $F_{9,9} = 4,026$
<i>PG</i> <sub>0,2-0,8ppm</sub>	3,844 $F_{9,9} = 4,026$	3,530 $F_{9,9} = 4,026$	3,925 $F_{8,9} = 4,102$	3,514 $F_{7,9} = 4,197$	1,965 $F_{9,9} = 4,026$
<i>PG</i> <sub>0,8-1,4ppm</sub>	3,873 $F_{9,9} = 4,026$	3,012 $F_{8,9} = 4,102$	2,634 $F_{9,9} = 4,026$	3,601 $F_{9,9} = 4,026$	2,975 $F_{9,9} = 4,026$
<i>PG</i> <sub>1,4-2ppm</sub>	3,564 $F_{9,9} = 4,026$	3,442 $F_{8,8} = 4,433$	3,655 $F_{7,9} = 4,197$	2,617 $F_{9,9} = 4,026$	3,535 $F_{9,9} = 4,026$
<i>PG</i> <sub>2-10,02ppm</sub>		3,121 $F_{8,9} = 4,102$	4,084 $F_{7,9} = 4,197$		3,450 $F_{8,9} = 4,102$

### 3.1.4. Amostras

Cerca de 50 amostras de diferentes origens e de vários tipos, tais como ácidos gordos, resínicos, colofónias, *tall oil* foram analisadas. Após saber quais as curvas de calibração adequadas voltou-se a calcular a concentração nas amostras e obteve-se as concentrações. (VER ANEXO I). Em todos os ácidos, à exceção do ácido abiético, a percentagem dos valores abaixo dos Ldd é de 32 a 61 %, isto deve-se ao facto de vários compostos serem colofónia ou derivados e por isso, a sua constituição é pouco rica em ácidos gordos. Como os valores são tão baixos, é normal que mais de metade esteja abaixo ou entre o limite de quantificação e de deteção quando também foram analisados compostos com elevadas quantidades de ácidos gordos. No ácido palmítico e oleico 41 % dos resultados de concentração obtidos estão acima do Ldq, já para o linoleico tem 30 % e a menor percentagem pertence ao ácido esteárico com 11 % das amostras com concentração maior que o Ldq. Dado que o ácido abiético não tem a gama de concentrações ajustada e grande parte dos compostos contém elevadas quantidades de ácidos resínicos, este ácido tem 80 % dos resultados acima do Ldq. Dos 20 % de amostras que restam, do ácido abiético, apenas 11 % dos resultados são analisados com uma incerteza maior que a do valor calculado e 9 % dos resultados são detetados com uma incerteza menor mas a incerteza da quantificação é maior e por isso estão entre o Ldd e o Ldq. Com estas percentagens vê-se que há uma dificuldade em obter só uma curva de calibração que se ajuste a amostras com tanta variedade de concentrações.

### 3.1.5. Precisão

Ao longo deste capítulo apresentaram-se várias curvas e todas tinham o parâmetro  $CV_m$ . Para todas as curvas de calibração conclui-se que todas as curvas eram precisas. O maior valor calculado pertence à reta do ácido linoleico, em que o coeficiente de variação é de 5,30 %. Este valor, assim como todos os outros, encontra-se abaixo do coeficiente de variação do método que pode ser 7,30 %<sup>26</sup> ou 11%<sup>117</sup>.

Como não existiram ensaios interlaboratoriais ou realizaram ensaios nas condições de reprodutibilidade calculou-se a repetibilidade, que para estas situações é igual à reprodutibilidade. As amostras foram analisadas em duplicado e como só se realizaram as análises num laboratório não existe precisão intermédia, a reprodutibilidade depende apenas da variância de cada

concentração obtida em duplicado, pois tem somente um grau de liberdade. Em algumas amostras não se calculou a variância porque a concentração era de zero, mas nas restantes calculou-se o valor máximo e valor menor das variâncias para cada ácido (tabela 12). O ácido abiético é o composto em que há menor variância dos resultados e o valor maior da repetibilidade é muito maior. Esta variância elevada acontece porque em uma amostra fez-se uma análise passado algum tempo e verificou-se o decaimento da resposta do ácido abiético, contudo ao não contabilizar esse valor a variância diminui logo, mas ao retirar esse valor verifica-se que  $3,8854E-02$  ppm<sup>2</sup> continua a ser maior das maiores variâncias calculadas. O ácido linoleico e oleico tem a repetibilidade da mesma ordem porque há sobreposição dos picos, mas mesmo com a sobreposição dos picos é possível obter repetibilidade muito satisfatória. No entanto é de salientar que a amplitude entre a repetibilidade do ácido linoleico é maior e o valor da maior repetibilidade para o ácido linoleico é perto do triplo do valor do ácido oleico, mas a repetibilidade menor do ácido linoleico é quase 10 vezes menor à repetibilidade do ácido oleico. O ácido palmítico tem valores de repetibilidade baixos, mas o ácido esteárico tem valores de  $r$  muito pequenos e as concentrações obtidas são as menores de todos os padrões em estudo. Deste modo podemos confirmar que o método é preciso pois é possível haver repetibilidade em vários níveis de concentração para ácidos diferentes. As análises das gamas de trabalho também foram analisadas. Aos valores de resposta das soluções independentes determinou-se o valor de concentração, em seguida fez-se o produto da concentração de cada ácido por 2,8, obtendo assim o valor de repetibilidade. Nestes casos o número de graus de liberdade é maior e por isso os menores valores de reprodutibilidade são afetados, não sendo tão menores como nas análises em duplicado das amostras. Verificou-se que a menor repetibilidade das gamas de trabalho corresponde ao menor valor de concentração teórica 0,02. O maior valor de repetibilidade corresponde à maior de concentração teórica, à exceção do ácido esteárico em que a repetibilidade é maior para a concentração teórica de  $1,38 \pm 0,011$  ppm.

**Tabela 12. Maiores, M, e menores, m, valores de repetibilidade, r, calculados para cada ácido na análise de amostras e na análise de soluções elaboradas para a gama de trabalho.**

Ácido	$r_{M amostras}$ (ppm)	$r_{m amostras}$ (ppm)	$r_{M gama de trabalho}$ (ppm)	$r_{m gama de trabalho}$ (ppm)
Palmítico	5,40E-01	1,90E-05	1,87E-01	1,47E-02
Linoleico	2,31E+00	5,33E-04	2,40E-01	9,16E-03
Oleico	1,37E+00	1,65E-03	3,44E-01	7,41E-03
Esteárico	7,02E-02	7,53E-06	4,41E-02	1,24E-02
Abiético	5,36E+00	1,03E-04	1,17E-01	7,10E-03

### 3.1.6. Ensaio de recuperação

Não foi possível realizar os ensaios de recuperação porque o tempo foi insuficiente dado que primeiramente se fizeram ensaios abaixo do ldd e ldq por isso é que os resultados não são satisfatórios. As amostras A9, A29, A18, A42 e A45 mostraram tem valores de concentrações adequadas para o estudo.

Para o ácido palmítico a amostra indicada seria a A9 pois tem valor acima dos limiares analíticos e as fortificações seriam entre a gama de trabalho de  $0,80 \pm 0,0025$  a  $1,38 \pm 0,0015$  ppm. Para as amostras de ácido linoleico e ácido oleico pode-se utilizar como branco de amostra a amostra A29 e A18. Ambas as concentrações calculadas de espécie estão compreendidas na gama de trabalho de 2 a 10 ppm. Os ensaios de recuperação do ácido esteárico podem ser feitos com a amostra A42 e as fortificações estarem entre  $0,80 \pm 0,0025$  ppm e  $1,38 \pm 0,011$  ppm. Como ultima sugestão têm-se a amostra A45 e as fortificações podem ser entre o valor da sua concentração e  $1,5 \pm 0,011$  ppm.

### 3.2. Análise das soluções e misturas padrão de terpenos em aguarrás

A validação do método da aguarrás foi baseada na norma ASTM D6387<sup>125</sup>. Apesar da fase estacionária não ser a mais apropriada, escolheu-se fazer as análises nesta coluna, pois não havia qualquer alteração significativa para não fazer as análises. Portanto, é escusado mudar de coluna para cada análise e poupa-se em material para a manutenção do equipamento cromatográfico. O facto de a coluna não ser a mais indicada faz com que os compostos não tenham tempo de retenção correspondente à temperatura de ebulição dos mesmos. O tempo de retenção é de acordo com a afinidade de cada composto à coluna. A tabela 13 mostra o método utilizado inspirado na norma para analisar esta classe de compostos de modo a que o tempo de análise e a resolução entre compostos fosse otimizada.

O solvente utilizado é o hexano e os compostos padrão são o  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno e limoneno. Os tempos de retenção destes terpenos aparecem entre os 4 e os 8 minutos. O  $\alpha$ -pineno tem um tempo de retenção de 5,2 minutos, o canfeno aparece aos 5,5 minutos, após 1,1 minutos visualiza-se o pico do  $\beta$ -pineno e aos 7,9 minutos aparece o pico do limoneno. O padrão interno utilizado foi o que era mencionado nos cromatogramas da norma, o nonano, e não ao

longo do texto, o decano pois neste programa aparecia aos 6,3 minutos. Logo se verificou que este composto não era o mais indicado pois aparecia a um tempo de retenção entre o canfeno e o  $\beta$  – pineno. Portanto, decidiu-se trocar pelo nonano e este composto tem um tempo de retenção de 4,41 minutos. Fez-se uma curva de calibração de 0,2 a 25 ppm de terpenos, com 40  $\mu$ L de nonano. Verificou-se que as razões das amostras eram muito baixas, pois para a maior concentração os valores da razão da área de cada terpeno com a área do padrão interno os 0,051 para  $\alpha$ -pineno e 0,038 ppm para o canfeno. Por isso, decidiu-se fazer uma solução de 10 ppm de padrão interno. Para cada análise injetou-se 60  $\mu$ L desta solução e uma toma de 185 $\mu$ L proveniente de 55 $\mu$ L de amostra dissolvido em 1 mL de solvente. Para este método não foi necessário qualquer processo de derivatização.

**Tabela 13.** Condições de operação, de GC-FID Clarus 580, com uma coluna capilar DB-5, utilizadas para as análises das soluções padrão, mistura de soluções padrão de terpenos e aguarrás.

Coluna	Comprimento da coluna (m)	30
	Diâmetro interno (mm)	0,25
	Espessura do filme ( $\mu$ m)	0,25
	Temperatura da coluna	-60 a 320/340
	Temperatura do injetor ( $^{\circ}$ C)	250
	Temperatura do forno ( $^{\circ}$ C)	Rampa 1 77-82 (5 $^{\circ}$ C/min)
		Rampa 2 82 (5min)
		Rampa 3 88 (1 $^{\circ}$ C/min)
		200 (12 $^{\circ}$ C/min)
		290 (1 min)
	Temperatura do detetor ( $^{\circ}$ C)	300
	<i>Split</i> (mL/min)	90
	Fluxo da chama (mL/min)	Ar: Hidrogénio 450:45
	Fluxo do gás de arraste (mL/min)	1

Apesar de se saber que a aguarrás tem sempre uma percentagem elevada de  $\alpha$ -pineno e uma percentagem intermédia de  $\beta$  – pineno decidiu-se efetuar curvas de calibração com quantidades de concentração equivalentes, para todos os compostos. O valor mais baixo das curvas de calibração é 0,2 ppm. Comparando com o método anterior este valor é 10 vezes maior, no entanto o *split* deste método é muito superior. Tentou-se diminuir o valor mais baixo para 0,04 ppm mas em diversas análises o equipamento não conseguia detetar automaticamente e com uma linha de base correta. O mesmo ocorreu para concentrações de 0,06, 0,08, 0,10, 0,13, 0,15 e 0,18 ppm. Somente o valor 0,2 ppm é que cumpriu os requisitos pretendidos.

Como visualmente, o pico cromatográfico de  $\alpha$  - pineno era maior que os picos dos ácidos gordos, mesmo tendo em conta o *split* aumentou-se a concentração das curvas de calibração. A primeira curva tinha uma gama de concentrações de 0,2 a 5,16 ppm e aplicando como nos ácidos gordos a segunda curva tinha como segundo ponto de concentração 5,16ppm, fazendo uma curva

de 0,2 a 35 ppm. Para GC-FID 35 ppm é uma concentração elevada. Por isso, decidiu-se injetar um valor intermédio da curva de calibração, o ponto selecionado foi 15,8 ppm. Comparando com os resultados obtidos para os ácidos gordos verificou-se que os picos eram menos intensos. Então tentou-se injetar uma solução de 35 ppm e depois fazer uma análise de um branco, de modo a saber se ficava alguma coisa retida na coluna cromatográfica. Após a análise do branco concluiu-se que não ficava nada retido na coluna e que o branco aparece sempre só com os picos do solvente, logo podia-se avançar com a construção desta curva. Todas as análises de 0,2 ppm foram elaboradas. Em todas as curvas de calibração verificou-se que não existiam valores suspeitos (tabela 14).

### 3.2.1. Curva de calibração

#### 3.2.1.1. $\alpha$ – pineno

Por observação dos cromatogramas viu-se que as áreas eram bastante maiores, em comparação com os ácidos gordos e resínicos, portanto construiu-se uma curva de calibração de  $0,2 \pm 0,0014$  a  $34,80 \pm 0,14$  ppm, recorrendo a uma solução de  $54,67 \pm 0,024$  ppm, realizada a partir de uma solução mãe de  $323,10 \pm 4,17$  ppm. Injetaram-se algumas soluções e depois de analisar o ponto de  $14,95 \pm 0,086$  ppm fez-se um branco para saber se algum composto ficava retido na coluna. A análise do branco mostrou que nenhum terpeno ficou retido. Aos  $34,80 \pm 0,14$  ppm voltou-se a injetar um branco e mais uma vez não existia qualquer pico para além do pico do solvente. Analisaram-se algumas amostras e a diferença entre o valor da maior concentração e o valor de menor concentração calculado multiplicada por 1,5 deu uma gama de concentrações de  $245 \pm 0,41$  ppm. Fez-se uma solução de 0,2 a 245 ppm, a partir de uma solução mãe de  $323,10 \pm 4,17$  ppm. O segundo ponto desta nova curva de calibração corresponde a  $34,80 \pm 0,14$  ppm. Durante a construção desta curva de calibração realizaram-se alguns brancos entre análises de padrões e concluiu-se que não havia qualquer retenção, por parte dos terpenos, na coluna cromatográfica. Entretanto analisaram-se amostras recentes e verificou-se que a curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $243,97 \pm 0,89$  ppm estava desajustada. O produto da diferença entre a maior e a menor concentração determinada por 1,5 indicava que a concentração maior deveria ser  $326 \pm 4,26$  ppm, mas como as amostras eram poucas e a concentração deste terpeno varia muito de amostra

para amostra decidiu-se fazer uma gama de concentrações de  $0,2 \pm 0,0014$  a  $346,36 \pm 0,71$  ppm. Esta nova gama calculada corresponde à gama de concentrações utilizada para a validação dos métodos e foi construída a partir de uma nova solução mãe de  $624,00 \pm 8,04$  ppm.

Todas as curvas apresentam o mesmo número de pontos, à exceção da reta de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $346,36 \pm 0,71$  ppm porque pelo teste de Mandel foi necessário retirar o último ponto de concentração ficando uma curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $297,15 \pm 0,71$  ppm, com  $n$  igual 7. A curva que tem todos os parâmetros menores é a curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,80 \pm 0,14$  ppm, mas tem a maior sensibilidade e o maior coeficiente de *Pearson*, 0,9996. A sensibilidade varia de 0,3497 a 0,3971, para a curva de calibração em estudo é de 0,3892 e é o maior das quatro curvas. A ordenada na origem é negativa para a curva de calibração com menor amplitude de concentrações e para a curva de  $0,1990$  a  $346,6417$  ppm e positiva para as restantes curvas. Ao retirar o último ponto da curva  $0,20 \pm 0,0014$  a  $346,36 \pm 0,71$  ppm fez com que o valor da ordenada na origem se aproxima-se de zero, não se verificando qualquer alteração significativa no erro associado à ordenada na origem. O desvio padrão residual diminui e os limiares analíticos têm valores intermédios porque o declive é dos menores calculados. Comparando  $S_m$  e  $S_x$  da curva  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,80 \pm 0,14$  ppm com os da  $0,20 \pm 0,0014$  a  $297,15 \pm 0,71$  ppm nota-se que diferem um do outro 10 unidades. O coeficiente de variação do método varia entre 2,19 e 3,30 %. Na curva em calibração, utilizada para o método da validação, o valor deste parâmetro é 3,30 %.

### 3.2.1.2. Canfeno

O canfeno é um terpeno que existe em poucas quantidades na aguarrás, por isso utilizou-se a curva de calibração de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $33,69 \pm 0,13$  ppm. As amostras analisadas da primeira vez mostraram que o produto da diferença entre a concentração maior e a menor por 1,5 foi de  $3,30 \pm 0,38$  ppm. Fez-se uma curva de calibração de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $3,56 \pm 0,0071$  ppm. Cada ponto de concentração foi feito por diluição de uma solução de  $5,53 \pm 0,0088$  ppm, proveniente da solução mãe de  $11,56 \pm 0,21$  ppm. A segunda remeça de amostras tinha concentrações de canfeno intermédias e por isso não afetou o produto da diferença entre a concentração maior e menor. Nas duas curvas de calibração o valor de  $n$  é 8 e o coeficiente de correlação é de 0,9996 e de 0,999 para a curva de calibração com concentração maior de 33,69

$\pm 0,13$  e  $3,56 \pm 0,0071$  ppm, respetivamente. O declive da curva selecionada para o processo de validação é de  $0,5217$  e o erro associado ao declive é  $4,17$  vezes menor que o erro associado à outra curva. A ordenada na origem não difere muito nas duas curvas, mas o erro associado à ordenada na origem da curva  $0,20 \pm 0,0014$  a  $33,69 \pm 0,13$  ppm é metade do erro da curva com menor gama de trabalho. Contrariamente, o desvio padrão residual é quase 4 vezes maior para a curva de calibração com gama de concentrações maior, logo os limiares analíticos,  $S_m$  e  $S_x$  são menores. O coeficiente de variação do método é maior para a curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $3,56 \pm 0,0071$  ppm devido ao facto de a média das concentrações ser maior na curva com maior amplitude do que na curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $3,56 \pm 0,0071$  ppm.

### 3.2.1.3. $\beta$ -pineno

Pela curva de calibração de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,75 \pm 0,14$  ppm calculou-se a concentração para as amostras que existiam inicialmente. Ao valor maior de concentração subtraiu-se o menor valor e fez-se o produto dessa diferença por  $1,5$ . O resultado obtido foi de  $70 \pm 0,37$  ppm. Entretanto analisaram-se as amostras mais recentes e verificou-se que para este composto terpénico a gama de concentrações aumentou de  $70 \pm 0,37$  para  $105 \pm 0,37$  ppm. Elaborou-se um conjunto de soluções de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $103,87 \pm 0,21$  ppm por diluição de uma solução mãe de  $187,12 \pm 2,42$  ppm. A correlação para esta curva é de  $0,999$  enquanto que a primeira curva tem um  $r$  de  $0,9996$ . O declive é praticamente o mesmo, mas o erro associado é muito maior para a curva com maior gama de concentrações porque o penúltimo ponto da curva de calibração está fora da linha de tendência, aumentando o valor deste erro. As ordenadas na origem são as duas negativas e relativamente próximas de zero e  $b$  da curva de calibração de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $103,87 \pm 0,21$  ppm é cerca de  $1,25$  vezes maior que o erro associado à primeira curva de calibração.  $S_b$  das duas curvas não é muito diferente. A curva com maior amplitude de concentrações tem um desvio padrão residual maior, cerca de  $5,25$  vezes maior em comparação com a outra curva. Os parâmetros de validação  $l_{dd}$ ,  $l_{dq}$ ,  $S_m$  e  $S_x$  também diferem na mesma proporção. O coeficiente de variação do método é maior para a curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $103,87 \pm 0,21$  ppm.

### 3.2.1.4. Limoneno

Para o limoneno também se utilizou a curva de calibração de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,61 \pm 0,14$  ppm. As razões das respostas de área de limoneno pela área do nonano foram substituídas na equação da curva de calibração e obtiveram-se as concentrações. Calculou-se o produto da diferença entre a maior e a menor concentração de limoneno por 1,5. Assim, descobriu-se que a gama de concentrações mais ajustada às amostras era de  $0,20 \pm 1,94$  a  $14,81 \pm 1,94$  ppm. Depois de se analisarem todas as amostras mostraram que a maior gama era de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,61 \pm 0,14$  ppm. Por isso a curva inicial para calcular a gama de concentrações foi a curva de concentração inicial. As duas curvas tem 8 pontos e um coeficiente de correlação de 0,9997 e 0,9993 para a curva de maior e menor gama de concentrações, respetivamente. O declive na curva  $0,20 \pm 0,0014$  a  $13,21 \pm 0,026$  ppm é 1,5 vezes maior que o declive da curva  $0,20 \pm 0,0014$  a  $34,61 \pm 0,14$  ppm e  $S_a$  só se modifica na casa das milésimas. Para a cura de menor gama de concentrações a ordenada na origem é o dobro de  $b$  da outra curva e o erro que pertence à ordenada na origem é quase o triplo do valor da curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $13,21 \pm 0,026$  ppm. O desvio padrão residual é muito parecido, mas os limiares analíticos tem valores desiguais porque são influenciados pelo declive que se encontra no denominador da fórmula deste parâmetro, assim como o desvio padrão do método e o desvio associado à concentração. O coeficiente de variação do método da curva com maior gama de concentrações é 1,6 vezes maior que o coeficiente de variação da curva de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $13,21 \pm 0,026$  ppm.

Tabela 14. Valores dos parâmetros calculados e tabelados a partir da construção da curva de calibração para cada terpeno em estudo pelo método cromatográfico apresentado na tabela 13.

Terpeno	C (ppm)	GC (ppm)	R	t (95 %)	a	Sa	b (ppm <sup>-1</sup> )	Sb (ppm <sup>-1</sup> )	$S_{\frac{y}{x}}$	LDD (ppm)	LDQ (ppm)	CV <sub>m</sub> (%)	S <sub>m</sub> (ppm)	S <sub>x0</sub> (ppm)
α - pineno	0,2 ± 0,0014 34,80 ± 0,14	0,2-245	0,9996	t <sub>e</sub> = 2,365	0,3971	0,0988	-0,0802	0,0047	0,1518	1,15	3,82	2,19	0,38	0,41
	0,20 ± 0,0014 243,97 ± 0,89	0,2-320	0,9990	t <sub>e</sub> = 2,365	0,3497	0,9074	1,4402	0,0062	1,4060	12,06	40,21	3,30	4,02	4,26
	0,2 ± 0,0014 346,36 ± 0,71		0,9995	t <sub>e</sub> = 2,365	0,3943	1,0707	-0,3441	0,0052	1,6575	12,61	42,04	2,42	4,20	4,46
	0,20 ± 0,0014 297,15 ± 0,71		0,9995	t <sub>e</sub> = 2,571	0,3892	1,0180	0,1614	0,0057	1,4926	11,51	38,35	2,58	3,84	4,10
Canfeno	0,20 ± 0,0014 33,69 ± 0,13		0,9996	t <sub>e</sub> = 2,365	0,4173	0,0958	-0,0945	0,0047	0,1472	1,06	3,53	2,08	0,35	0,38
	0,20 ± 0,0014 3,56 ± 0,0071	0,02 - 8,26	0,999	t <sub>e</sub> = 2,365	0,5217	0,0230	-0,0793	0,0106	0,0330	0,19	0,63	3,39	0,063	0,067
β - pineno	0,20 ± 0,0014 34,75 ± 0,14	0,2 -100	0,9996	t <sub>e</sub> = 2,365	0,4008	0,0834	-0,0896	0,0040	0,1399	1,05	3,49	2,81	0,34	0,37
	0,20 ± 0,0014 103,87 ± 0,21		0,9989	t <sub>e</sub> = 2,365	0,4055	0,4811	-0,1100	0,0078	0,7425	5,49	18,31	3,52	1,83	1,94
Limoneno	0,20 ± 0,0014 34,61 ± 0,14	0,2-14	0,9997	t <sub>e</sub> = 2,365	0,3982	0,0784	-0,0821	0,0038	0,1204	0,91	3,02	1,74	0,30	0,32
	0,20 ± 0,0014 13,21 ± 0,026	0,2-35	0,9993	t <sub>e</sub> = 2,365	0,5999	0,0769	0,1622	0,0093	0,1170	0,59	1,95	2,79	0,20	0,12

### 3.2.2. Teste De Mandel

Para o teste de Mandel analisaram-se apenas os valores de concentração e das respostas obtidas em cada cromatograma e aplicou-se uma linha de tendência polinomial de segundo grau. A partir da linha de tendência de polinomial de segundo grau obteve-se uma curva também do mesmo tipo. Determinou-se o desvio padrão residual relativo à curva do 2º grau. Com este valor mais o valor do desvio padrão residual obtido anteriormente pelos mesmos dados para uma curva do 1º grau calculou-se a diferença das variâncias. A razão entre a diferença das variâncias e o desvio padrão residual relativo à curva do 2º grau dão o valor de  $PG$ . As curvas utilizadas para este teste estão mencionadas na tabela 15.

Tabela 15. Gamas de concentração teóricas utilizadas para os restantes processos de validação de cada terpeno.

Terpeno	Gama de concentrações (ppm)
$\alpha$ – pineno	0,02 ± 0,0014 a 297,97 ± 0,64
Canfeno	0,02 ± 0,0014 a 3,56 ± 0,0071
$\beta$ – pineno	0,02 ± 0,0014 a 103,87 ± 0,23
Limoneno	0,02 ± 0,0014 a 34,6 ± 0,14

Todos os valores de  $PG$  são aplicados para a mesma constante de F com 7 graus de liberdade para o denominador e para o numerador,  $F_{7,7}$  é de 4,995. Na tabela 16 verifica-se que o  $\alpha$  – terpeno tem o valor de  $PG$  relativamente maior que o valor de F tabelado. De modo a conseguir cumprir os critérios deste teste, ou seja, o valor de F tabelado ser maior que o valor de  $PG$  teve-se de retirar o último valor da curva de calibração. Calculou-se a nova curva de calibração e  $S_{y_2}^2$ ,  $S_{\bar{y}_x}$  e  $DS^2$ . Para  $S_{\bar{y}_x}$  obteve-se o valor de 1,492617 que está relacionado com  $DS^2$  de 3,25 e  $S_{y_2}$  de 1,4043, obtendo assim um  $PG$  1,65. Uma vez que se retirou um ponto da curva de calibração, o valor de F tabelado passa a ser para 6 graus de liberdade no denominador e no numerador e tem o valor de 5,820. Dado que F é maior que  $PG$ , então todos os compostos estão aprovados no teste de Mandel.

Tabela 16. Valores de desvio padrão residual e diferença das variâncias para uma curva de calibração de segundo grau, mais valores calculados de  $PG$  e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada ácido. Em  $F_{n_1, n_2}$ ,  $n_1$  é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e  $n_2$  é o número de graus de liberdade da variância do denominador.

Terpeno	$\alpha$ - pineno	Canfeno	$\beta$ - pineno	Limoneno
$S_{y_2}$	1,271	0,040	0,810	0,120
$DS^2$	8,40E+00	2,67E-02	6,12E-03	1,49E-02
$PG$	5,19E+00	0,207	9,27E-3	1,020
F	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{7,7} = 4,995$	$F_{7,7} = 4,995$

### 3.2.3. Gama de trabalho

A gama de trabalho foi elaborada para todos os terpenos da concentração de 0,2 a 245 ppm, de modo a tornar mais rápida esta etapa, pois as gamas de trabalho são mais. Começou-se por dividir as gamas a partir do menor valor de concentração e foi-se aumentando de 10 em 10 unidades. As gamas de trabalho utilizadas inicialmente foram: 0,2 a 2, 2 a 20, 20 a 200, 200 a 245 e 245 a 350 ppm. As últimas gamas de trabalho são menores porque a curva de calibração do  $\alpha$  – pineno tinha uma gama de concentrações de  $0,2 \pm 0,0014$  a  $243,97 \pm 0,89$  ppm e com as análises de novas amostras a curva de calibração aumentou para  $346,36 \pm 0,71$  ppm. À semelhança dos ácidos gordos a análise das gamas de trabalho não correu como em teoria. A gama de trabalho de 2 a 20 ppm foi dividida em três gamas menores, de 2 a 8 ppm, de 8 a 14 ppm e de 14 a 20 ppm. As restantes gamas de trabalho apresentaram bons resultados e não foram divididas em outras gamas menores. O  $\alpha$  – pineno tem mais gamas de trabalho e apenas três gamas de trabalho tem menores graus de liberdade. Para avaliar a gama de  $13,89 \pm 0,0022$  a  $19,88 \pm 0,070$  ppm retirou-se uma resposta em  $19,88 \pm 0,070$  ppm que não era valor suspeito pelos testes de *Grubbs* e pelo teste de *Dean e Dixon*. Ao avaliar a gama de trabalho seguinte, de  $19,88 \pm 0,070$  ppm a  $199,13 \pm 0,40$  ppm já se inclui esse valor de resposta e na gama de trabalho seguinte retiraram-se duas respostas para conseguir obter o valor de *PG* menor que o valor de *F* tabelado, mas, posteriormente foram incluídas para a gama de trabalho final. Nesta última gama apenas se retirou um valor de resposta de  $346,36 \pm 0,71$  ppm, mas não era valores suspeitos, pelos dois testes estatísticos O canfeno apenas tem duas gamas de trabalho pois a gama de concentrações é muito baixa. Na última gama de trabalho foi preciso retirar um ponto de concentração para obter o ajuste da gama de trabalho. O composto  $\beta$  – pineno tem todas as gamas ajustadas, com 10 respostas para cada extremo de concentração, de gama cada gama de trabalho, à exceção da última gama. Nesta última gama foi necessário retirar grande parte dos pontos, o que indicava que a gama não está ajustada. Na curva de calibração deste terpeno, a gama de concentrações atinge os  $103,87 \pm 0,21$  ppm, por isso encurtou-se a gama de  $19,88 \pm 0,070$  a  $199,13 \pm 0,40$  ppm para uma gama de  $19,88 \pm 0,070$  a  $103,87 \pm 0,21$  ppm. Porém, foi necessário dividir esta gama em várias gamas:  $19,88 \pm 0,070$  a  $50,03 \pm 0,31$  ppm,  $50,03 \pm 0,31$  a  $79,63 \pm 0,33$  ppm e de  $79,63 \pm 0,33$  a  $110 \pm 0,22$  ppm. Deste modo foi possível obter as gamas ajustadas de acordo com o teste de *F*, com 10 ou 9 valores de resposta. O limoneno tem a gama ajustada até  $199,13 \pm 0,40$  ppm porque a curva de calibração tem a concentração máxima

de  $34,61 \pm 0,33$  ppm e este valor está incluído na gama de  $19,76 \pm 0,070$  a  $199,13 \pm 0,40$  ppm. As gamas de trabalho das extremidades tem 10 respostas para cada concentração e nas restantes foi necessário retirar uma ou duas respostas para cada concentração. Em nenhum dos casos apresentava valores suspeitos pelo teste de *Grubbs* ou pelo teste de *Dean e Dixon* Para ajustar a gama de trabalho de  $13,81 \pm 0,030$  a  $19,76 \pm 0,070$  ppm retiraram-se os dois valores mas seguidamente foram colocados para verificar se a gama de trabalho estava ajustada de  $19,76 \pm 0,070$  a  $199,13 \pm 0,40$  ppm. Todas as gamas para todos os compostos estavam ajustadas, aumentando as certezas de que a validação do método foi bem elaborada e realizada (tabela 17).

Tabela 17. Valores calculados de PG e valores tabelados de F para uma probabilidade de 95% para as curvas de calibração realizadas para cada terpeno. Em  $F_{n-1, n-1}^{\alpha, \beta}$ ,  $n-1$  é o valor do número de graus de liberdade da variância do numerador e  $n-1$  é o número de graus de liberdade da variância do denominador.

Terpeno	$\alpha$ - pineno	Canfeno	$\beta$ - pineno	Limoneno		$\beta$ - pineno
$PG_{0,2-2ppm}$	3,144	3,880	3,157	2,575	$PG_{0,2-2ppm}$	3,157
	$F_{9,9} = 4,026$	$F_{9,9} = 4,026$	$F_{9,9} = 4,026$	$F_{9,9} = 4,026$		$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{2-8ppm}$	3,781	3,730	2,779	3,650	$PG_{2-8ppm}$	2,779
	$F_{9,9} = 4,026$	$F_{8,9} = 4,102$	$F_{9,9} = 4,026$	$F_{8,9} = 4,026$		$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{8-14ppm}$	2,400		2,655	3,457	$PG_{8-14ppm}$	2,655
	$F_{9,9} = 4,026$		$F_{9,9} = 4,026$	$F_{9,8} = 4,357$		$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{14-20ppm}$	3,611		2,630	2,886	$PG_{14-20ppm}$	2,630
	$F_{8,9} = 4,102$		$F_{9,9} = 4,026$	$F_{7,9} = 4,197$		$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{20-200ppm}$	2,945		4,521	3,538	$PG_{20-50ppm}$	3,785
	$F_{9,9} = 4,026$		$F_{4,9} = 4,026$	$F_{9,9} = 4,026$		$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{200-245ppm}$	3,822				$PG_{50-80ppm}$	4,021
	$F_{7,9} = 4,197$					$F_{9,9} = 4,026$
$PG_{245-350ppm}$	4,048				$PG_{80-110ppm}$	4,115
	$F_{8,9} = 4,102$					$F_{8,8} = 4,433$

### 3.2.4. Amostras

O número de amostras para este estudo foi muito menor. Analisaram-se catorze amostras e calcularam-se as concentrações nas respetivas retas (figura 13, anexo II). A partir dos valores de concentração dos limiares analíticos determinou-se a resposta recorrendo à reta de cada terpeno e interpolou-se na mesma reta. Os valores dos ldd e ldq foram analisados com conjunto com as amostras. O  $\alpha$  - pineno e o canfeno tem todas as concentrações acima do ldq, ou seja, os resultados tem um erro de deteção e de quantificação menor que o valor de concentração na amostra. O limoneno tem apenas uma amostra considerada abaixo do ldd porque não foi identificado pelo equipamento. O  $\beta$  - pineno tem quatro amostras que estão abaixo do ldd. Como

estão abaixo deste limiar analítico têm um erro muito maior que a própria concentração. As restantes amostras estão todas acima do Idq. Dado que a porção de amostras era menor foi mais fácil criar curvas de calibração adequadas. Pode-se confirmar porque mais de metade dos pontos tem as concentrações de cada composto acima do Idq.

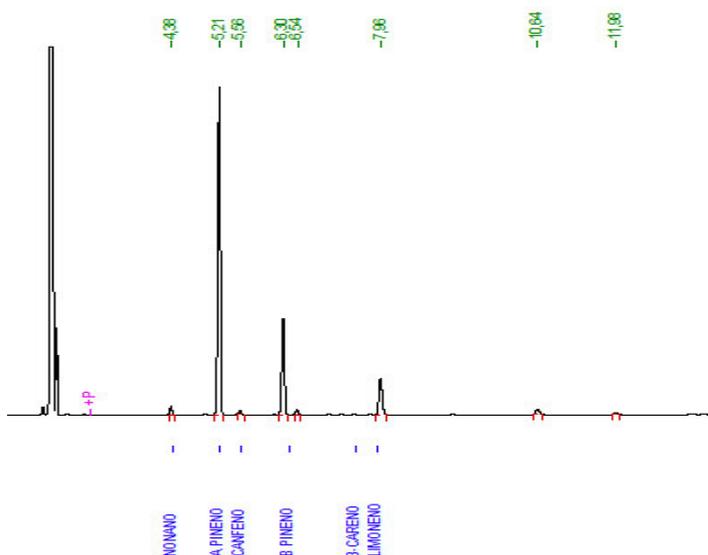


Figura 13. Fragmento de um cromatograma de uma amostra de aguarrás.

### 3.2.5. Precisão

A precisão do método foi analisada na construção das curvas de calibração. Também se analisaram os valores das gamas de trabalho e as amostras. Para as curvas de calibração as análises incluíam os 7 ou 8 pontos e avaliou-se a precisão pelo coeficiente de variação do método. Em todas as curvas estudadas os coeficientes de variação do método são menores que os valores estipulados pelas fontes bibliográficas mencionadas no capítulo anterior. O menor valor obtido foi de 1,74 % para a curva de calibração do limoneno, com concentrações teóricas de  $0,20 \pm 0,0014$  a  $35 \pm 0,14$  ppm. O maior  $CV_m$  corresponde à reta do  $\beta$  – pineno de  $0,02 \pm 0,0014$  a  $103,87 \pm 0,21$  ppm, e tem o valor de 3,52 %, pois corresponde à reta com maior desvio padrão residual e pior coeficiente de correlação. Os resultados mostram que o método é preciso para todos os ácidos.

Relativamente às amostras efetuaram-se análises em duplicados e pelo produto do desvio padrão das concentrações determinadas por 2,98 calculou-se a repetibilidade, para cada amostra. A maior e menor repetibilidade calculada corresponde ao  $\alpha$  – pineno, sendo da ordem das

unidades. Como as concentrações são da ordem das dezenas e das centenas de ppm justifica-se que a repetibilidade seja maior, quando comparada com os outros terpenos e até mesmo com os ácidos gordos. A repetibilidade do  $\beta$  – pineno e do limoneno é da ordem das unidades, sendo a repetibilidade deste pineno maior, isto deve-se ao fato das concentrações teóricas terem uma gama de  $103,87 \pm 0,21$  ppm. O canfeno tem menor gama de concentrações. A maior repetibilidade do canfeno é menor que 1 ppm e a menor repetibilidade é de  $6,82E-03$  ppm. Para os outros terpenos a repetibilidade aumenta com o aumento da concentração e é maior para o  $\alpha$  – pineno. Os dados utilizados para a gama de trabalho também foram aproveitados para o estudo da repetibilidade. Nestas análises o número de graus de liberdade é maior. A partir da resposta obtida das soluções independentes fez-se o produto do desvio padrão de cada concentração calculada pela reta de cada terpeno por 2,98. E, em todos os compostos terpénicos verificou-se que a repetibilidade é menor para o valor de concentração teórica 0,2 ppm e maior para a concentração da última gama de trabalho (tabela 18).

**Tabela 18. Maiores, M, e menores, m, valores de repetibilidade, r, calculados para cada terpeno na análise de amostras e na análise de soluções elaboradas para a gama de trabalho.**

Terpeno	$r_M$ amostras (ppm)	$r_m$ amostras (ppm)	$r_M$ gama de trabalho (ppm)	$r_m$ gama de trabalho (ppm)
$\alpha$ – pineno	16,18	1,69E-01	5,56	3,26E-02
Canfeno	0,83	6,82E-03	0,10	2,29E-02
$\beta$ – pineno	5,71	1,85E-02	3,71	4,42E-02
Limoneno	2,62	7,11E-03	1,31	4,08E-02

### 3.2.6. Ensaio de recuperação

No processo de validação do método da aguarrás foi possível efetuar ensaios de recuperação. Realizaram-se seis análises do branco de amostra em que se adicionou em 60  $\mu$ L de hexano, perfazendo um volume total de 305  $\mu$ L. Para além das análises do branco realizaram-se seis análises em mais 3 gamas de concentrações, igualmente desfasadas e distribuídas ao longo da gama de trabalho. Selecionaram-se diferentes gamas de trabalho tendo em conta os limiares analíticos, pois as soluções tem de estar todas acima dos limiares para garantir a excelência dos resultados. A amostra utilizada para o  $\alpha$  – pineno tinha concentração média de  $101,27 \pm 4,10$  ppm. Como a maior concentração da gama de trabalho era de  $199,13 \pm 0,40$  ppm, dividiu-se entre  $134,98 \pm 0,77$ ,  $165,54 \pm 0,77$  e  $198,65 \pm 0,77$  ppm. Estas concentrações são as concentrações de fortificação adicionadas em diferentes *via*s. O volume

adicionado era de 60  $\mu$ L, tal como se fez no branco de amostra. Os valores de fortificação foram de 101% para  $134,98 \pm 0,77$  e  $198,65 \pm 0,77$  ppm, para a fortificação de  $165,54 \pm 0,77$  ppm obteve-se uma percentagem de 92 %. Este terpeno tem concentrações da ordem das centenas de ppm e para esta parte estar validada é preciso ter valores percentuais de recuperação de 90 a 107 %. Todos os valores estão dentro do intervalo mencionado, portanto, foi possível obter resultados de validação com sucesso. A gama de trabalho escolhida para o canfeno foi de  $1,92 \pm 0,0033$  a  $19,25 \pm 0,068$  ppm. A amostra escolhida para os ensaios de recuperação de canfeno tinha concentração média de  $1,12 \pm 0,0067$  ppm. As três concentrações obtidas foram de:  $1,39 \pm 0,0073$  ,  $1,59 \pm 0,0074$  e  $1,83 \pm 0,0075$  ppm. O valor médio a primeira fortificação foi  $1,56 \pm 0,0067$  ppm, da segunda fortificação a concentração média determinada foi  $1,69 \pm 0,0067$  ppm, por fim, a terceira fortificação teve um valor médio de  $1,84 \pm 0,0067$  ppm. Todas as fortificações têm valores menores que o valor teórico, mas mesmo assim, as percentagens de fortificação são de 109 %, 101 % e 97 % Para esta gama de concentrações, da ordem de uma parte por milhão, a recuperação varia de 97 a 109 %. No estudo do composto  $\beta$  – pineno a gama de trabalho escolhida foi de  $19,88 \pm 0,070$  a  $50,03 \pm 0,31$  ppm. A amostra de aguarrás selecionada tem uma concentração média de  $22,35 \pm 1,94$  ppm. As fortificações são de  $30,67 \pm 0,31$  ppm a recuperação foi de 102 %, a fortificação seguinte de  $40,88 \pm 0,31$  ppm teve um valor de 91 % de recuperação e para  $50,03 \pm 0,31$  ppm de solução adicionada a percentagem de recuperação foi de 81 %. Para o limoneno selecionou-se a gama de  $13,81 \pm 0,31$  ppm a  $19,76 \pm 0,070$  ppm. A concentração no branco de amostra é de  $15,47 \pm 0,32$  ppm. As concentrações adicionadas à amostra foram  $16,43 \pm 0,060$ ,  $17,82 \pm 0,061$  e de  $19,21 \pm 0,061$  ppm. Este foi o composto com melhores percentagens de recuperação, 103, 99 e de 101 % para a primeira, segunda e terceira fortificação. As percentagens dos três últimos terpenos encontram-se inseridas nas concentrações da ordem das dezenas de partes por milhão e a amplitude de recuperação corresponde a 80 a 110%. Como as percentagens estão contidas neste intervalo, a recuperação foi bem-sucedida para validar os métodos criados (tabela 19).

**Tabela 19. Valores de fortificação dos terpenos em estudo, F, e respetiva recuperação percentual, R (%), inseridos em uma gama de trabalho.**

Terpeno	Gama de trabalho	F <sub>1</sub> (ppm)	R <sub>1</sub> (%)	F <sub>2</sub> (ppm)	R <sub>2</sub> (%)	F <sub>3</sub> (ppm)	R <sub>3</sub> (%)
α – pineno	19,88 ± 0,070 199,13 ± 0,40	134,98 ± 0,77	101	167 ± 0,77	92	200 ± 0,77	101
Canfeno	1,92 ± 0,0024 19,25 ± 0,068	1,43 ± 0,0073	109	1,67 ± 0,0074	101	1,97 ± 0,0075	97
β – pineno	19,88 ± 0,070 50,03 ± 0,31	30,67 ± 0,31	102	40,33 ± 0,31	99	50 ± 0,31	81
Limoneno	13,81 ± 0,031 19,76 ± 0,070	16,43 ± 0,060	103	17,82 ± 0,061	99	19,21 ± 0,061	101



## Capítulo 4. Conclusão



## 4. Conclusão

A coluna cromatográfica, assim como o programa de temperaturas e o fluxo do gás de arraste foram otimizados e essenciais para conseguir validar com sucesso estes dois métodos.

Os compostos de colofónia, CTO, DTO e TOFA são analisados por cromatografia. As amostras são estáveis para realizar análises. Verificou-se que apesar de não se realizarem ensaios de recuperação o método descreve a composição de ácidos gordos e resinicos descritos como na literatura para diferentes amostras. Os testes de Mandel e a gama de trabalho, assim como análise de muitas amostras foram essenciais para validar este método.

A aguarrás teve menor volume de amostras, no entanto complementou-se a validação do método pela realização de ensaios de recuperação garantiram a exatidão do método estabelecido.

Para os dois métodos verificou-se que a linearidade, exatidão, precisão e repetibilidade encontram-se de acordo com os guias estabelecidos, garantindo que o método foi validado com sucesso.

Poder-se-ia fazer uma curva de calibração ajustada para o ácido abiético e ensaios de recuperação para todos os ácidos de modo a saber com maior certeza a exatidão dos métodos validados.

Futuramente, será necessário, pelos menos, elaborar novas curvas de calibração como uma medida de revalidação do método.



## **Capítulo 5. Bibliografía**



## 5. Bibliografia

1. Ciesla W. *Non-Wood Forest Products from Conifers*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1998.
2. Phillips M a, Croteau RB. Resin-based defenses in conifers. *Trends Plant Sci.* 1999;4(5):184-190. doi:10.1016/S1360-1385(99)01401-6.
3. Rodrigues-Corrêa KCDS, de Lima JC, Fett-Neto AG. Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. *Food Energy Secur.* 2012;1(2):81-93. doi:10.1002/fes3.13.
4. Franceschi VR, Krokene P, Christiansen E, Krekling T. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytol.* 2005;167(2):353-75. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01436.x.
5. Ciesla W. Products of resin processing. In: *Encyclopedia of Life Support Systems*. Vol II.; 2005.
6. Abril N, Gion J-M, Kerner R, et al. Proteomics research on forest trees, the most recalcitrant and orphan plant species. *Phytochemistry* 2011;72(10):1219-42. doi:10.1016/j.phytochem.2011.01.005.
7. Pinus Pinaster Aiton. Available at: [http://www.floramuseum.com/imagenes/Pinus\\_pinaster002.jpg](http://www.floramuseum.com/imagenes/Pinus_pinaster002.jpg).
8. Rodrigues-Corrêa K, Lima J, Fett-neto A. *Oleoresins from Pine: Production and Industrial Uses*. (Ramawat KG, Mérillon J-M, eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-22144-6.
9. Limbu LP. A Feasibility Study on Oleo-resin Based Turpentine Oil Industry in Bhimeshwor Municipality of Dolakha District. 2014;3(June):244-252.
10. Nerg a., Kainulainen P, Vuorinen M, Hanso M, Holopainen JK, Kurkela T. Seasonal and geographical variation of terpenes, resin acids and total phenolics in nursery grown seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *New Phytol.* 1994;128(4):703-713. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb04034.x.
11. Wiyono B, Tachibana S, Tinambunan D. Chemical Composition of Indonesian Pinus

- merkusii Turpentine Oils, Gum Oleoresins and Rosins from Sumatra and Java. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2006;9(1):7-14.
12. Adams RP. Comparison of the volatile leaf and wood oils of the subspecies of *Pinus torreyana*: two isolated, narrow endemics in California. 2013;95 (2)(May):188-191.
  13. Lopes C. Caracterização de resinas naturais e seus derivados por análise multivariada. *A confiança nas relações interorganizacionais. O&S- ...* 2008. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:OLIVEIRA+LOPES#8>. Accessed September 18, 2014.
  14. Rosin collection work: A over view. 2007. Available at: [http://www.forestrynepal.org/images/resin work in nepal.pdf](http://www.forestrynepal.org/images/resin%20work%20in%20nepal.pdf).
  15. Teshome T. Analysis of resin and turpentine oil constituents of *Pinus patula* grown in Ethiopia. *Ethiop. e-Journal Res. Innov. foresight* 2011;3(Agriculture and Forestry issue):38-48.
  16. Mateus E. Characterization of *Pinus* spp. needles by gas chromatography and mass spectrometry: Application to plant-insect interactions. 2009. Available at: <http://run.unl.pt/handle/10362/1979>. Accessed November 5, 2014.
  17. Instituto I, Recursos N De, Inia BL, Oeiras M. PINE RESIN SECTOR IN PORTUGAL – WEAKNESSES AND CHALLENGES Characterization of Portuguese. *For. IDEAS* 2012;18(1):10-18.
  18. Arshadi M, Backlund I, Geladi P, Bergsten U. Comparison of fatty and resin acid composition in boreal lodgepole pine and Scots pine for biorefinery applications. *Ind. Crops Prod.* 2013;49:535-541. doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.038.
  19. Paudyal D. Sustainable Resin Tapping in Nepal : Challenges and Opportunities. 2008:172-179.
  20. Axelsson S. Resin acids in commercial products and the work environment of swedish wood pellets production. 2012.
  21. Silvestre AJD. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier; 2008. doi:10.1016/B978-0-08-045316-3.00004-1.
  22. Anna K. Applicability of crude tall oil for wood protection. 2008.

23. Nogueira JMF. Crude Tall-Oil : Uma Significativa Fonte em Acidos Gordos e Resínicos. *Soc. Port. Química* 1995;57(Abril):13-21.
24. Propst J, Marshall D. *Tall Oil*. (Society PC, ed.). New York: Pulp Chemicals Association; 1981.
25. Norlin L-H. Tall Oil. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000. doi:10.1002/14356007.a26\_057.
26. Polese L, Ribeiro ML. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS : ESTRATÉGIA E DISCUSÃO. *Pestic. R. Ecotoxicol. e Meio Ambient.* 2003;13(Jan./dez.):129-146.
27. Ant R, Fax T. *VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia*. 1ª Edição . Caparica, Portugal; 2012.
28. Huber L. *Validation of Analytical Methods*. Interpharm. New York, USA: Informa Healthcare; 2007.
29. Maurício A de Q, Pereira MC, Magalhães WF de, Cazarim LCA. *Guia de Validação E Controle de Qualidade Analítica Fármacos Em Produtos Para Alimentação Animal E Medicamentos Veterinários*. 1ª edição. Brasília: Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento.; 2011.
30. Westbrook JW, Walker AR, Neves LG, et al. Discovering candidate genes that regulate resin canal number in *Pinus taeda* stems by integrating genetic analysis across environments , ages , and populations. *New Phytol.* 2015;205:627-641.
31. Cristine K, Fett-neto AG. Seasonality and chemical elicitation of defense oleoresin production in field-grown slash pine under subtropical climate. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2013;25(1):56-61.
32. Coppen JJW. Gums , resins and latexes of plant origin and latexes. *Food Agric. Organ. United Nation.* 1995:152. Available at: <http://www.fao.org/docrep/018/v9236e/v9236e.pdf>. Accessed September 20, 2015.
33. Wiedenhoeft AC. Chapter 3 - Structure and Function of Wood Contents. In: *Wood Handbook - Wood as an Engineering Material*.; 2010:1-18.
34. Eller ASD, Harley P, Monson RK. Potential contribution of exposed resin to ecosystem emissions of monoterpenes. *Atmos. Environ.* 2013;77:440-444.

doi:10.1016/j.atmosenv.2013.05.028.

35. Papadopoulos AM. Resin Tapping History of an Aleppo Pine Forest in Central Greece. *Open Forest Sci. J.* 2013;6(Suppl 1 : M5):50-53.
36. Tadesse W, Nanos N, Aufion FJ, Alia R, Gil L. Evaluation of high resin yielders of pinus pinaster ait. *For. Genet.* 2001;8(4):271-278.
37. Rocchini LA, Lindgren BS, Bennett RG. of resin flow and monoterpene composition on susceptibility of lodgepole pine to attack by the Douglas-fir pitch moth, *Synanthedon novaroensis* (Lep., Sesiidae). *J. Appl. ...* 2000;124:87-92. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0418.2000.00449.x/full>. Accessed October 31, 2014.
38. Spanos K, Gaitanis D, Spanos I. Resin production in natural Aleppo pine stands in northern Evia, Greece. *Web Ecol.* 2010;10(1):38-43. doi:10.5194/we-10-38-2010.
39. Valto P, Knuutinen J, Alén R. Overview of analytical procedures for fatty and resin acids in the papermaking process. *BioResources* 2012;7(4):6041-6076.
40. Pio C a., Valente A a. Atmospheric fluxes and concentrations of monoterpenes in resin-tapped pine forests. *Atmos. Environ.* 1998;32(4):683-691. doi:10.1016/S1352-2310(97)00327-0.
41. Wilbon P a., Chu F, Tang C. Progress in renewable polymers from natural terpenes, terpenoids, and rosin. *Macromol. Rapid Commun.* 2013;34(1):8-37. doi:10.1002/marc.201200513.
42. Forest PP, Davis TS, Hofstetter RW. Allometry of Phloem Thickness and Resin Flow and. *For. Sci.* 2014;60(x):1-5.
43. Fiebach K, Grimm D. Resins, Natural. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000:477-494. doi:10.1002/14356007.a23\_073.
44. Keeling CI, Bohlmann J. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry* 2006;67(22):2415-2423. doi:10.1016/j.phytochem.2006.08.019.
45. Rigol a. Sample handling and analytical protocols for analysis of resin acids in process waters and effluents from pulp and paper mills. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2003;22(10):738-749. doi:10.1016/S0165-9936(03)01011-2.

46. Omrani A, Rostami AA, Yazdizadeh N, Khoshroo M. Experimental and theoretical studies on carbon surface modification by reduction of in situ generated diazonium salt. *Chem. Phys. Lett.* 2012;539–540(0):107-111. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2012.05.008>.
47. Çitoğlu G, Acikara Ö. *Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids*. (Dhanarasu DS, ed.). turkey; 2012. Available at: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/32738/InTech-Column\\_chromatography\\_for\\_terpenoids\\_and\\_flavonoids.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/32738/InTech-Column_chromatography_for_terpenoids_and_flavonoids.pdf).
48. Hall DE, Zerbe P, Jancsik S, et al. Evolution of Conifer Diterpene Synthases: Diterpene Resin Acid Biosynthesis in Lodgepole Pine and Jack Pine Involves Monofunctional and Bifunctional Diterpene Synthases. *Plant Physiol.* 2013;161(2):600-616. doi:10.1104/pp.112.208546.
49. Zeiss HH. The Chemistry of the Resin Acids. *Chem. Rev.* 1948;42(1):163-187. doi:10.1021/cr60131a004.
50. Rogachev AD, Salakhutdinov NF. Chemical Composition of Pinus sibirica ( Pinaceae ). *Chem. Biodivers.* 2015;12:1-53.
51. ASTM E 28 - 67, Standard Test Method for Softening Point By Ring And Ball Apparatus. 1967. Available at: [www.astm.org](http://www.astm.org).
52. ASTM D1544-04 (98), Standard Test Method for Color of Transparent Liquids (Gardner Color Scale). 1998. Available at: [www.astm.org](http://www.astm.org).
53. ASTM D 465 - 82, Standard Test Method for Acid Number Of Rosin. 1982. Available at: [www.astm.org](http://www.astm.org).
54. Zinkel DF, Russell J. *Naval Stores Production, Chemistry, Utilization*. New York, USA: Pulp Chemicals Association, INC; 1989.
55. ASTM D 464 - 59, Standard Test Methods for Saponification Number Of Rosin. 1975. Available at: [www.astm.org](http://www.astm.org).
56. The Brookfield Thermosel System, Operating Instructions, Manual No. M/89-200-B.
57. Liang T, Zhang Y, Li S, Nguyen TTH. Synthesis, characterization, and bioactivity of rosin quaternary ammonium salt derivatives. *BioResources* 2013;8(1):735-742.

58. Singh T, Singh AP. A review on natural products as wood protectant. *Wood Sci. Technol.* 2012;46(5):851-870. doi:10.1007/s00226-011-0448-5.
59. Dimethylacetal N, Mcguire JM, Powis PJ. Gas Chromatographic Analysis of Tall Oil Fractionation Products After Methylation with. *J. Chromatogr. Sci.* 1998;36(February):104-108.
60. Tall Oil. In: *Van Nostrand's Scientific Encyclopedia*. John Wiley & Sons, Inc.; 2005. doi:10.1002/0471743984.vse8427.
61. Huibers DTA. Tall Oil. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2000. doi:10.1002/0471238961.2001121208210902.a01.
62. Johnsson S, Wansbrough H, Lindstrom M. The pulp and paper industry. *Chem. Process. New Zeal.* 1998;18:1-15. Available at: <http://nzic.org.nz/ChemProcesses/forestry/4C.pdf>.
63. Chapter 2. The pulp and paper making processes. Available at: <https://www.princeton.edu/~ota/disk1/1989/8931/893104.PDF>.
64. Chapter 10. Wood Products Industry. *Emiss. Factors AP 42, Compil. Air Pollut. Emiss. Factors* 1990;1. Available at: <http://www3.epa.gov/ttnchie1/ap42/ch10/>.
65. Mcginnis TP. Quantitative determination of fatty and resin acids in Kraft black liquors as their trimethylsilyl derivatives by gas chromatography. 1998;829:235-249.
66. Tran H, Vakkilainen EK. The Kraft Chemical Recovery Process. *TAPPI Kraft Recover. Course* 2012:1-8. Available at: <http://www.tappi.org/content/events/08kros/manuscripts/1-1.pdf>.
67. Anna K. *Applicability of Crude Tall Oil for Wood Protection*; 2008.
68. Magee T V, Zinkel DF, Service UF, Gifford O, Drive P. Composition of American Distilled Tall Oils. *JAOC* 1992;69(4):321-324.
69. Ball GFA, Herrington PA, Patrick JE. Tall oil pitch as bitumen extender. *New Zeal. J. For. Sci.* 1993;23(2):236-242.

70. Lee SY, Hubbe MA, Saka S. Prospects for biodiesel as a byproduct of wood pulping – a review. *Energy* 2006;1(1):150-171. Available at: [http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/viewFile/BioRes\\_01\\_1\\_150\\_171\\_Lee\\_HS\\_Biodiesel\\_Wood\\_Pulping\\_Review/15](http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/viewFile/BioRes_01_1_150_171_Lee_HS_Biodiesel_Wood_Pulping_Review/15).
71. Thomas A. Fats and Fatty Oils. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000. doi:10.1002/14356007.a10\_173.
72. Product Datasheet FOR2. Available at: [http://www.forchem.com/files/637/forchem\\_datasheet\\_FOR2\\_003.pdf](http://www.forchem.com/files/637/forchem_datasheet_FOR2_003.pdf). Accessed October 30, 2015.
73. ASTM D6166 - 12 Standard Test Method for Color of Pine Chemicals and Related Products (Instrumental Determination of Gardner Color). Available at: <http://www.astm.org/Standards/D6166.htm>.
74. Unsaponifiable Matter In Tall Oil. Available at: [http://www.pfi.no/Documents/Scan\\_test\\_methods/T/T\\_13\\_74.pdf](http://www.pfi.no/Documents/Scan_test_methods/T/T_13_74.pdf). Accessed October 31, 2015.
75. SCAN - T 11:72 Acid Number of Tall Oil. Available at: [http://www.pfi.no/Documents/Scan\\_test\\_methods/T/T\\_11\\_72.pdf](http://www.pfi.no/Documents/Scan_test_methods/T/T_11_72.pdf). Accessed October 31, 2015.
76. Gscheidmeier M, Fleig H. Turpentine. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000. doi:10.1002/14356007.a27\_267.
77. Department F. Chapter 8 turpentine. Available at: <http://www.fao.org/docrep/v5350e/V5350e10.htm>. Accessed May 4, 2015.
78. Belgacem MN, Gandini A. Terpenes: Major Sources, Properties and Applications. In: *Monomers, Polymers and Composites*. Elsevier; 2008:17-38. Available at: 2015-09-22.
79. Sell CS. Terpenoids. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2000. doi:10.1002/0471238961.2005181602120504.a01.pub2.
80. Barceloux DG. TURPENTINE and PINE OIL ( Pinus Species ). In: *Medical Toxicology of Natural Substances*. John Wiley & Sons Inc.; 2008:666-672.
81. Seed T, Group W, Tests Q. Cone and Seed Improvement Program BCMoF Tree Seed Centre. *Tree Improv. Branch* 2009:1-4. Available at:

82. Chomel M, Fernandez C, Bousquet-Mélou A, et al. Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *J. Ecol.* 2014;102:411-424. doi:10.1111/1365-2745.12205.
83. Civit L, Nassef HM, Fragoso A, O'Sullivan CK. Amperometric determination of ascorbic acid in real samples using a disposable screen-printed electrode modified with electrografted o-aminophenol film. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56(22):10452-5. doi:10.1021/jf802536k.
84. IGPAI. NP-73 Essência de Terbentina (Aguarrás)C0. 1964:1-2.
85. IGPAI. NP-74 Essência de Terbentina (Aguarrás) Densidade relativa. 1964:1-2.
86. IGPAI. NP-66 Essência de Terbentina (Aguarrás) índice de refração. 1961:1-2.
87. IGPAI. NP-78 Essência de Terbentina (Aguarrás) Ensaio de destilação. 1964:1-3.
88. IGPAI. NP-65 Essência de Terbentina (Aguarrás) Determinação do índice de acidez. 1961:1961.
89. IGPAI. NP-76 Essência de terbentia Ponto de inflamação. 1964:1-2.
90. IGPAI. NP-75 Essência de Terbentina (Aguarrás) Teor em resíduo de evaporação. 1964:1.
91. Moore BD, Andrew RL, Külheim C, Foley WJ. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol.* 2013;201:733-750. doi:10.1111/nph.12526.
92. Silva MR, Andrade FN, Fumes BH, Lanças FM. Unified chromatography: Fundamentals, instrumentation and applications†. *J. Sep. Sci.* 2015;38(17):3071-3083. doi:10.1002/jssc.201500130.
93. Barry EF, Grob RL. Capillary Column Gas Chromatography. In: *Columns for Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.; 2006:94-209. doi:10.1002/9780470114186.ch3.

94. Miller JM. Gas Chromatography. In: *Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.; 2009:141-182. doi:10.1002/9780471980582.ch7.
95. Seppänen-Laakso T, Laakso I, Hiltunen R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Anal. Chim. Acta* 2002;465(1-2):39-62. doi:10.1016/S0003-2670(02)00397-5.
96. Harris D c. *Quantitative Chemical Analysis*. Seventh ed. USA: W. H. Freeman and Company; 2007. doi:10.1016/j.micron.2011.01.004.
97. Seidel-Morgenstern A, Schulte M, Epping A. Fundamentals and General Terminology. In: *Preparative Chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012:7-46. doi:10.1002/9783527649280.ch2.
98. Grob RL. Introduction. In: *Modern Practice of Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.; 2004:1-21. doi:10.1002/0471651141.ch1.
99. Barry EF. *Columns: Packed and Capillary; Column Selection in Gas Chromatography*; 2004. doi:10.1002/0471651141.ch3.
100. Hinshaw J V. *Practical Gas Chromatography*; 2013. doi:10.1007/978-3-642-54640-2.
101. Restek. Guide to GC Column Selection and Optimizing Separations. 2013:1-16. Available at: <http://www.restek.com/pdfs/GNBR1724-UNV.pdf>.
102. Miller JM. Introduction to Chromatography. In: *Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc.; 2009:35-66. doi:10.1002/9780471980582.ch2.
103. Stashenko E, Martínez JR. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: Guo DX, ed. *Advances in Gas Chromatography*; 2014:1-38. doi:10.5772/57492.
104. Visentainer JV, Claus T, Ulisses L, Chiavelli R. Analytical Aspects of the Flame Ionization Detection in Comparison with Mass Spectrometry with Emphasis on Fatty Acids and Their Esters. In: Guo DX, ed. *Advances in Gas Chromatography*; 2014:39-56. doi:10.5772/57333.
105. Colón LA, Baird LJ. *Detectors in Modern Gas Chromatography*; 2004. doi:10.1002/0471651141.ch6.
106. Little JL. Artifacts in Trimethylsilyl Derivatization Reactions and Ways to Avoid Them. *J*

*Chromatogr. A* 1994;844(22):1-34.

107. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. *Adv. Gas Chromatogr. – Prog. Agric. Biomed. Ind. Appl.* 2012;83-156. doi:10.5772/33098.
108. Supelco. Bstfa + tmcs. 1997. Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product\\_Information\\_Sheet/4747.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/4747.pdf). Accessed October 30, 2015.
109. Ekeberg D, Flaete P-O, Eikenes M, Fongen M, Naess-Andresen CF. Qualitative and quantitative determination of extractives in heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2006;1109(2):267-72. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.027.
110. Rossé AD, Harynuk JJ. Methodology for the derivatization and quantification of dialkyl phosphate esters in petroleum samples. *Anal. Methods* 2010;2:1176. doi:10.1039/c0ay00235f.
111. Lappi HE, Alén RJ. Pyrolysis of crude tall oil-derived products. *BioResources* 2011;6(4):5121-5138.
112. Andrieux CP, Gonzalez F, Savent JM. Derivatization of Carbon Surfaces by Anodic Oxidation Arylacetates. Electrochemical Manipulation of Grafted Films. *J. Am. Chem. Soc.* 1997;119:4292.
113. Group E working. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. first inte. LGC, Queens Rd, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, United Kingdom; 1998.
114. Union I, Pure OF, Chemistry A, et al. QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES \* HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS ( IUPAC Technical Report ) Harmonized guidelines for single-laboratory ( IUPAC Technical Report ). 2002;74(5):835-855.
115. Castro A, Cabrita L. *Guia RELACRE 13- Validação de Métodos Internos de Ensaio Em ANÁLISE QUÍMICA*. 1ª edição. (RELACRE, ed.). Lisboa; 2000. Available at: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>. Accessed June 16, 2014.
116. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em Métodos

Cromatográficos e Electroforéticos. *Quim. Nova*, 2004;27(5):771-780.

117. Huber L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. second. New York: Informa Healthcare USA, Inc; 2007.
118. W. F, V. D, G. D. Quality Assurance in Analytical Chemistry: Applications in Environmental, Food and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering. In: Second Edi. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2007:9-55.
119. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth edit. Harlow: Pearson Education Limited; 2010. doi:10.1198/tech.2004.s248.
120. Group E working. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. first. Middlesex, United Kingdom: LGC (Teddington) Ltd; 1998.
121. Quapp W, Bruggemann L, Wennrich R. Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical. *Accred Qual Assur* 2006;11:625-631. doi:10.1007/s00769-006-0205-x.
122. EURACHEM/CITAC working group. *EURACHEM/CITAC GUIDE Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Third edit. (Ellison SLR, Williams A, eds.); 2012.
123. Magnusson B, Örnemark U, eds. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2ª edição.; 2014. doi:978-91-87461-59-0.
124. Barreira MJMM. OCORRÊNCIA DA PATULINA EM ALIMENTOS DESTINADOS A LACTENTES E CRIANÇAS: OPTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR SPE-HPLC-UV. *Biologia (Bratisl)*. 2009. Available at: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-88682-2\\_51](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-88682-2_51).
125. ASTM D6387: Standard Test Methods for Composition of Turpentine and Related Terpene Products. 2005;99:2-6.

## Anexos

### Anexo I

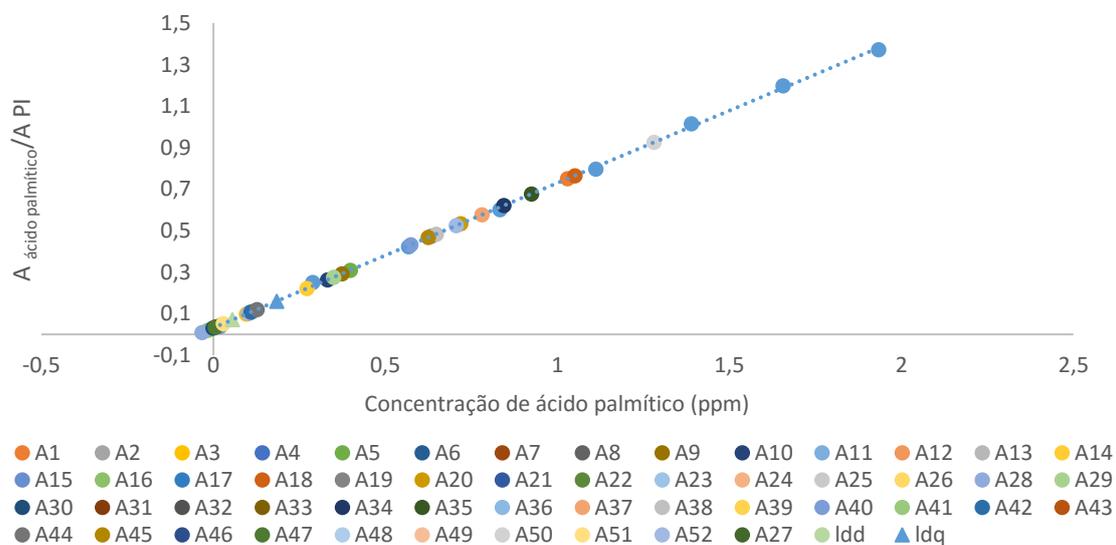


Gráfico 1. Curva de calibração de razão da área do ácido palmítico com a área do padrão interno vs concentração ácido palmítico e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 20. Concentração de ácido palmítico,  $C_{\text{palmítico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, A, e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\text{palmítico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{palmítico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{palmítico}} \pm s_{x0}$ (ppm)
A1	$1,030 \pm 0,020$	A19	$0,63 \pm 0,020$	A37	$0,78 \pm 0,020$
A2	$0,022 \pm 0,020$	A20	$0,72 \pm 0,020$	A38	$0,65 \pm 0,020$
A3	$0,097 \pm 0,020$	A21	$-0,0072 \pm 0,020$	A39	$0,82 \pm 0,020$
A4	$0,096 \pm 0,020$	A22	$-0,018 \pm 0,020$	A40	$0,57 \pm 0,020$
A5	$0,39 \pm 0,020$	A23	$-0,019 \pm 0,020$	A41	$0,12 \pm 0,020$
A6	$0,10 \pm 0,020$	A24	$-0,032 \pm 0,020$	A42	$0,11 \pm 0,020$
A7	$0,12 \pm 0,020$	A25	$-0,036 \pm 0,020$	A43	$0,11 \pm 0,020$
A8	$0,13 \pm 0,020$	A26	$-0,036 \pm 0,020$	A44	$0,13 \pm 0,020$
A9	$0,37 \pm 0,020$	A27	$-0,0069 \pm 0,020$	A45	$0,62 \pm 0,020$
A10	$0,33 \pm 0,020$	A28	$-0,032 \pm 0,020$	A46	$0,90 \pm 0,020$
A11	$0,12 \pm 0,020$	A29	$0,35 \pm 0,020$	A47	$0,0056 \pm 0,020$
A12	$0,11 \pm 0,020$	A30	$-0,00094 \pm 0,020$	A48	$-0,028 \pm 0,020$
A13	$0,10 \pm 0,020$	A31	$0,0077 \pm 0,020$	A49	$-0,020 \pm 0,020$
A14	$0,27 \pm 0,020$	A32	$-0,011 \pm 0,020$	A50	$1,28 \pm 0,020$
A15	$-0,030 \pm 0,020$	A33	$-0,020 \pm 0,020$	A51	$0,030 \pm 0,020$
A16	$-0,015 \pm 0,020$	A34	$0,85 \pm 0,020$	A52	$0,71 \pm 0,020$
A17	$0,12 \pm 0,020$	A35	$0,92 \pm 0,020$	ldd	$0,055 \pm 0,020$
A18	$1,05 \pm 0,020$	A36	$0,70 \pm 0,020$	ldq	$0,18 \pm 0,020$

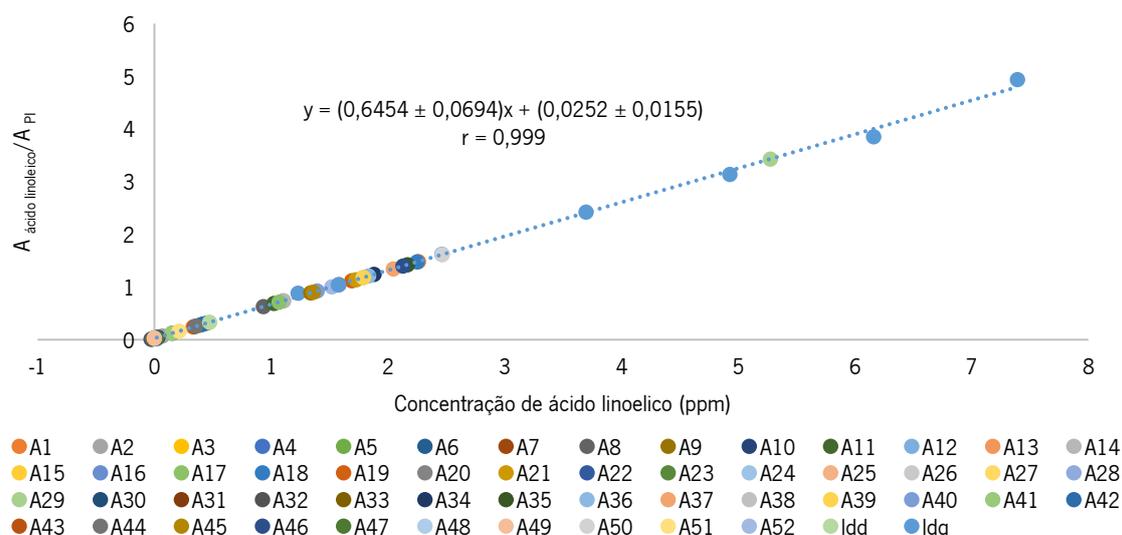


Gráfico 2. Curva de calibração de razão da área do ácido linoleico com a área do padrão interno vs concentração ácido linoleico e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 21. Concentração de ácido linoleico,  $C_{\text{linoleico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, A e limiares analíticos

Amostra	$C_{\text{linoleico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{linoleico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{linoleico}} \pm s_{x0}$ (ppm)
A1	2,26 ± 0,17	A19	1,69 ± 0,17	A37	2,046 ± 0,17
A2	0,069 ± 0,17	A20	1,58 ± 0,17	A38	1,79 ± 0,17
A3	0,46 ± 0,17	A21	1,73 ± 0,17	A39	1,79 ± 0,17
A4	0,44 ± 0,17	A22	-0,027 ± 0,17	A40	1,39 ± 0,17
A5	1,10 ± 0,17	A23	0,00 ± 0,17	A41	0,15 ± 0,17
A6	0,15 ± 0,17	A24	0,00 ± 0,17	A42	0,41 ± 0,17
A7	0,39 ± 0,17	A25	0,00 ± 0,17	A43	0,34 ± 0,17
A8	0,93 ± 0,17	A26	0,00 ± 0,17	A44	0,36 ± 0,17
A9	1,34 ± 0,17	A27	0,00 ± 0,17	A45	1,36 ± 0,17
A10	0,030 ± 0,17	A28	0,00 ± 0,17	A46	2,13 ± 0,17
A11	1,026 ± 0,17	A29	5,28 ± 0,17	A47	0,015 ± 0,17
A12	0,41 ± 0,17	A30	0,00 ± 0,17	A48	0,00 ± 0,17
A13	0,33 ± 0,17	A31	0,00 ± 0,17	A49	0,00 ± 0,17
A14	1,11 ± 0,17	A32	0,025 ± 0,17	A50	2,46 ± 0,17
A15	-0,024 ± 0,17	A33	-0,014 ± 0,17	A51	0,21 ± 0,17
A16	-0,027 ± 0,17	A34	1,88 ± 0,17	A52	1,52 ± 0,17
A17	1,070 ± 0,17	A35	2,17 ± 0,17	LDD	0,47 ± 0,17
A18	2,25 ± 0,17	A36	1,83 ± 0,17	LDQ	1,58 ± 0,17

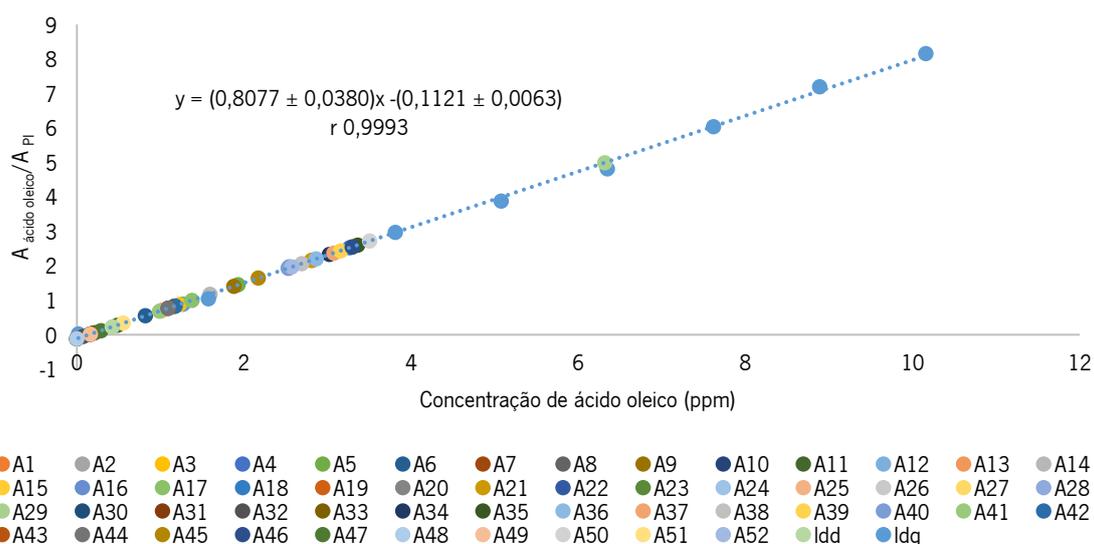


Gráfico 3. Curva de calibração de razão da área do ácido oleico com a área do padrão interno vs concentração ácido oleico e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 22. Concentração de ácido oleico,  $C_{oleico}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, A e limiares analíticos

Amostra	$C_{oleico} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{oleico} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{oleico} \pm s_{x0}$ (ppm)
A1	3,30 ± 0,15	A19	2,53 ± 0,15	A37	3,08 ± 0,15
A2	0,23 ± 0,15	A20	2,82 ± 0,15	A38	2,69 ± 0,15
A3	1,23 ± 0,15	A21	2,81 ± 0,15	A39	3,16 ± 0,15
A4	1,17 ± 0,15	A22	0,16 ± 0,15	A40	2,53 ± 0,15
A5	1,93 ± 0,15	A23	0,16 ± 0,15	A41	0,99 ± 0,15
A6	0,82 ± 0,15	A24	0,00 ± 0,15	A42	1,17 ± 0,15
A7	1,17 ± 0,15	A25	0,00 ± 0,15	A43	1,10 ± 0,15
A8	1,09 ± 0,15	A26	0,00 ± 0,15	A44	1,09 ± 0,15
A9	1,88 ± 0,15	A27	0,00 ± 0,15	A45	2,17 ± 0,15
A10	0,20 ± 0,15	A28	0,00 ± 0,15	A46	3,30 ± 0,15
A11	0,48 ± 0,15	A29	6,32 ± 0,15	A47	0,29 ± 0,15
A12	1,17 ± 0,15	A30	0,00 ± 0,15	A48	0,00 ± 0,15
A13	1,02 ± 0,15	A31	0,00 ± 0,15	A49	0,16 ± 0,15
A14	1,60 ± 0,15	A32	0,075 ± 0,15	A50	3,50 ± 0,15
A15	0,16 ± 0,15	A33	0,19 ± 0,15	A51	0,56 ± 0,15
A16	0,15 ± 0,15	A34	3,02 ± 0,15	A52	2,57 ± 0,15
A17	1,38 ± 0,15	A35	3,36 ± 0,15	LDD	0,42 ± 0,15
A18	3,27 ± 0,15	A36	2,87 ± 0,15	LDQ	1,41 ± 0,15

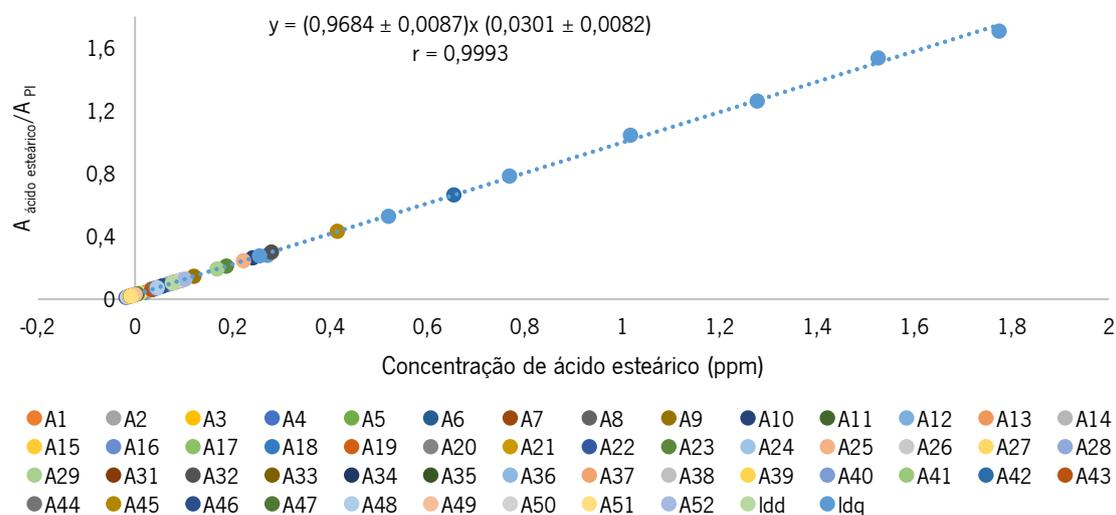


Gráfico 4. Curva de calibração de razão da área do ácido esteárico com a área do padrão interno vs concentração ácido esteárico e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 23. Concentração de ácido oleico,  $C_{\text{esteárico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, A e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\text{esteárico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{esteárico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{esteárico}} \pm s_{x0}$ (ppm)
A1	0,095 ± 0,027	A19	0,088 ± 0,027	A37	0,082 ± 0,027
A2	-0,0033 ± 0,027	A20	0,075 ± 0,027	A38	0,079 ± 0,027
A3	0,045 ± 0,027	A21	-0,0099 ± 0,027	A39	0,10 ± 0,027
A4	0,055 ± 0,027	A22	-0,018 ± 0,027	A40	0,066 ± 0,027
A5	0,065 ± 0,027	A23	0,19 ± 0,027	A41	0,036 ± 0,027
A6	0,033 ± 0,027	A24	0,00 ± 0,027	A42	0,65 ± 0,027
A7	0,045 ± 0,027	A25	0,22 ± 0,027	A43	0,034 ± 0,027
A8	0,042 ± 0,027	A26	-0,016 ± 0,027	A44	0,042 ± 0,027
A9	0,12 ± 0,027	A27	0,0093 ± 0,027	A45	0,42 ± 0,027
A10	0,24 ± 0,027	A28	0,00 ± 0,027	A46	0,057 ± 0,027
A11	0,037 ± 0,027	A29	0,17 ± 0,027	A47	0,0044 ± 0,027
A12	0,037 ± 0,027	A30	0,029 ± 0,027	A48	0,045 ± 0,027
A13	0,031 ± 0,027	A31	0,035 ± 0,027	A49	0,00 ± 0,027
A14	0,044 ± 0,027	A32	0,28 ± 0,027	A50	0,093 ± 0,027
A15	-0,014 ± 0,027	A33	-0,0097 ± 0,027	A51	-0,0090 ± 0,027
A16	-0,0057 ± 0,027	A34	0,077 ± 0,027	A52	0,10 ± 0,027
A17	0,036 ± 0,027	A35	0,080 ± 0,027	LDD	0,077 ± 0,027
A18	0,095 ± 0,027	A36	0,075 ± 0,027	LDQ	0,26 ± 0,027

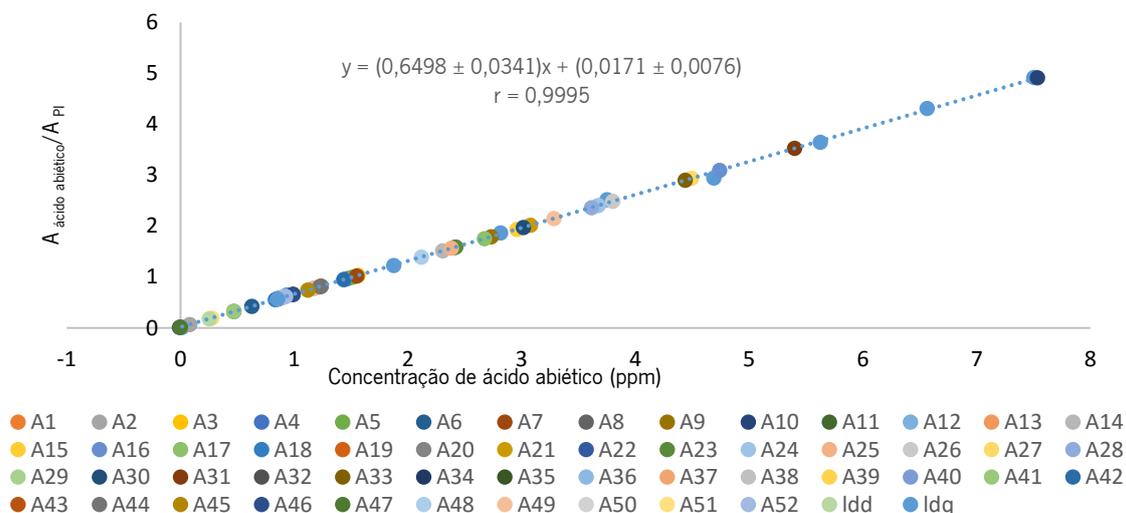


Gráfico 5. Curva de calibração de razão da área do ácido abiótico com a área do padrão interno vs concentração ácido abiótico e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 24. Concentração de ácido oleico,  $C_{\text{abóico}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, A e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\text{abóico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{abóico}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{abóico}} \pm s_{x0}$ (ppm)
A1	0,86 ± 0,090	A19	0,87 ± 0,090	A37	1,21 ± 0,090
A2	0,083 ± 0,090	A20	0,00 ± 0,090	A38	1,18 ± 0,090
A3	1,56 ± 0,090	A21	3,08 ± 0,090	A39	0,90 ± 0,090
A4	1,47 ± 0,090	A22	2,42 ± 0,090	A40	0,89 ± 0,090
A5	1,51 ± 0,090	A23	2,42 ± 0,090	A41	0,47 ± 0,090
A6	0,63 ± 0,090	A24	3,67 ± 0,090	A42	1,44 ± 0,090
A7	1,55 ± 0,090	A25	2,38 ± 0,090	A43	1,23 ± 0,090
A8	1,24 ± 0,090	A26	3,80 ± 0,090	A44	1,24 ± 0,090
A9	2,73 ± 0,090	A27	4,50 ± 0,090	A45	1,12 ± 0,090
A10	7,54 ± 0,090	A28	3,61 ± 0,090	A46	0,99 ± 0,090
A11	0,47 ± 0,090	A29	0,00 ± 0,090	A47	0,00 ± 0,090
A12	1,44 ± 0,090	A30	3,016 ± 0,090	A48	2,12 ± 0,090
A13	1,18 ± 0,090	A31	5,40 ± 0,090	A49	3,28 ± 0,090
A14	2,31 ± 0,090	A32	-0,0069 ± 0,090	A50	0,91 ± 0,090
A15	2,96 ± 0,090	A33	4,44 ± 0,090	A51	0,28 ± 0,090
A16	4,74 ± 0,090	A34	0,86 ± 0,090	A52	0,93 ± 0,090
A17	2,67 ± 0,090	A35	0,99 ± 0,090	LDD	0,26 ± 0,090
A18	0,83 ± 0,090	A36	0,87 ± 0,090	LDQ	0,85 ± 0,090

## Anexo II

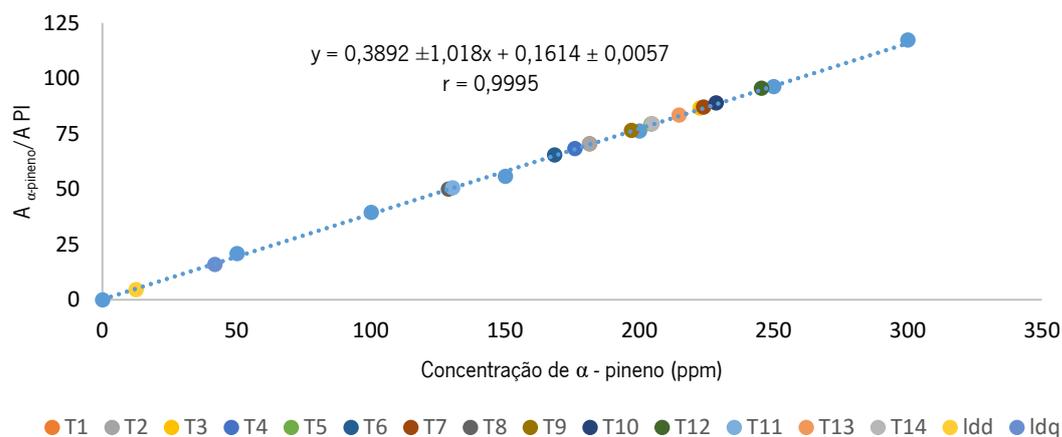


Gráfico 1. Curva de calibração de razão da área de  $\alpha$ -pineno com a área do padrão interno vs concentração de  $\alpha$ -pineno e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 25. Concentração de  $\alpha$ -pineno,  $C_{\alpha\text{-pineno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, T e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\alpha\text{-pineno}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\alpha\text{-pineno}} \pm s_{x0}$ (ppm)
T1	$181,61 \pm 4,10$	T9	$197,12 \pm 4,10$
T2	$181,53 \pm 4,10$	T10	$228,72 \pm 4,10$
T3	$222,73 \pm 4,10$	T11	$130,48 \pm 4,10$
T4	$176,090 \pm 4,10$	T12	$245,62 \pm 4,10$
T5	$204,51 \pm 4,10$	T13	$214,92 \pm 4,10$
T6	$168,56 \pm 4,10$	T14	$204,79 \pm 4,10$
T7	$223,98 \pm 4,10$	LDD	$12,61 \pm 4,10$
T8	$128,99 \pm 4,10$	LDQ	$42,039 \pm 4,10$

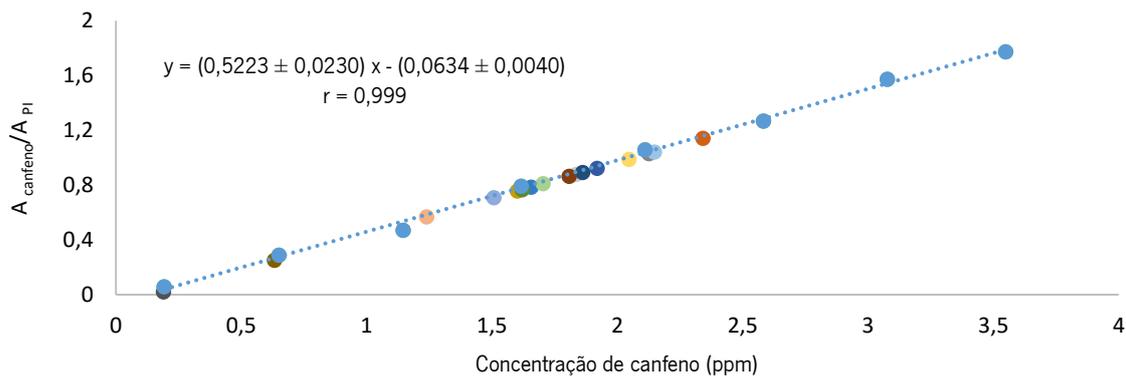


Gráfico 2. Curva de calibração de razão da área de canfeno com a área do padrão interno vs concentração canfeno e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 26. Concentração de canfeno,  $C_{\text{canfeno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, T e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\text{canfeno}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{canfeno}} \pm s_{x0}$ (ppm)
T1	$1,72 \pm 0,067$	T9	$1,90 \pm 0,067$
T2	$2,43 \pm 0,067$	T10	$2,12 \pm 0,067$
T3	$2,21 \pm 0,067$	T11	$1,77 \pm 0,067$
T4	$1,66 \pm 0,067$	T12	$1,56 \pm 0,067$
T5	$1,99 \pm 0,067$	T13	$1,93 \pm 0,067$
T6	$1,68 \pm 0,067$	T14	$1,87 \pm 0,067$
T7	$2,23 \pm 0,067$	LDD	$0,19 \pm 0,067$
T8	$1,28 \pm 0,067$	LDQ	$0,63 \pm 0,067$

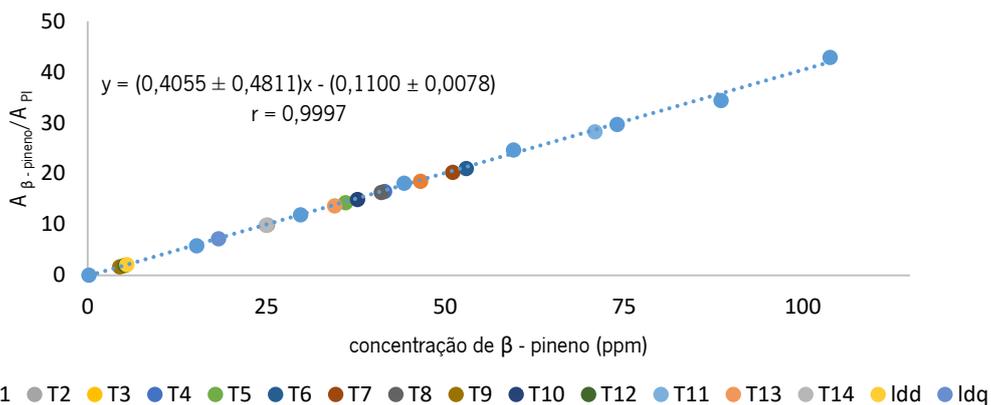


Gráfico 3.. Curva de calibração de razão da área de  $\beta$  - pineno com a área do padrão interno vs concentração de canfeno e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 27. Concentração de  $\beta$  - pineno,  $C_{\beta\text{-pineno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, T e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\beta\text{-pineno}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\beta\text{-pineno}} \pm s_{x0}$ (ppm)
T1	46,56 $\pm$ 1,94	T9	4,48 $\pm$ 1,94
T2	25,15 $\pm$ 1,94	T10	37,73 $\pm$ 1,94
T3	4,97 $\pm$ 1,94	T11	70,97 $\pm$ 1,94
T4	41,54 $\pm$ 1,94	T12	5,28 $\pm$ 1,94
T5	36,074 $\pm$ 1,94	T13	34,55 $\pm$ 1,94
T6	52,98 $\pm$ 1,94	T14	24,99 $\pm$ 1,94
T7	51,091 $\pm$ 1,94	ldd	5,49 $\pm$ 1,94
T8	41,061 $\pm$ 1,94	ldq	18,31 $\pm$ 1,94

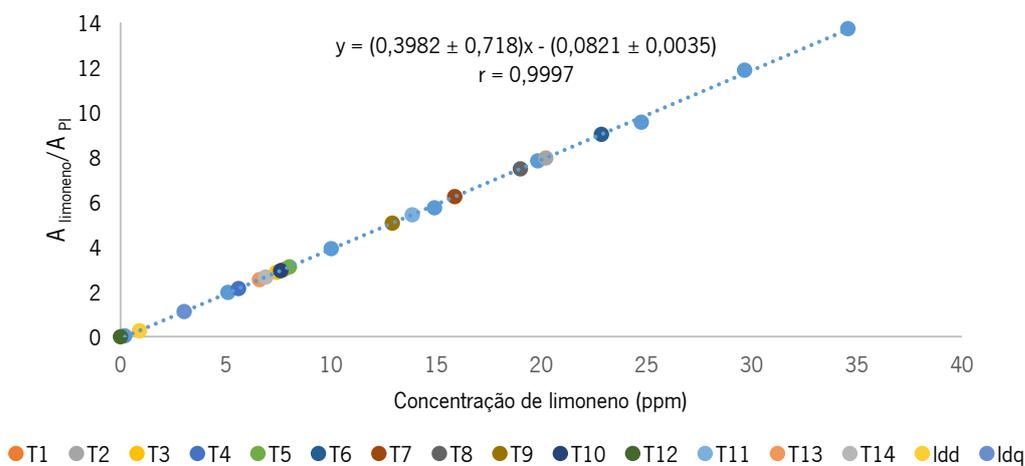


Gráfico 4. Curva de calibração de razão da área de limoneno com a área do padrão interno vs concentração de limoneno e amostras interpoladas na mesma curva de calibração realizada por cromatografia.

Tabela 28. Concentração de limoneno,  $C_{\text{limoneno}}$ , associada ao respetivo desvio padrão,  $s_{x0}$ , para amostras, T e limiares analíticos.

Amostra	$C_{\text{limoneno}} \pm s_{x0}$ (ppm)	Amostra	$C_{\text{limoneno}} \pm s_{x0}$ (ppm)
T1	$7,84 \pm 0,32$	T9	$13,058 \pm 0,32$
T2	$20,43 \pm 0,32$	T10	$7,70 \pm 0,32$
T3	$7,50 \pm 0,32$	T11	$14,02 \pm 0,32$
T4	$5,67 \pm 0,32$	T12	$0,00 \pm 0,32$
T5	$8,11 \pm 0,32$	T13	$6,68 \pm 0,32$
T6	$23,10 \pm 0,32$	T14	$6,96 \pm 0,32$
T7	$16,047 \pm 0,32$	ldd	$0,91 \pm 0,32$
T8	$19,21 \pm 0,32$	ldq	$3,024 \pm 0,32$

### Anexo III

A propagação das incertezas calculada para a concentração de uma solução mãe,  $\sigma(C)$ , relaciona a pureza,  $p$ , a massa,  $m$ , o volume do balão volumétrico,  $V$  e a massa molar,  $M$  com as respectivas incertezas,  $\sigma$ .

$$\frac{\sigma(C)}{C} = \sqrt{\left(\frac{\sigma(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(M)}{M}\right)^2}$$

A propagação das incertezas calculada para a concentração de uma solução,  $\sigma(C_f)$ , relaciona a concentração da solução mãe,  $C$ , o volume da solução mãe,  $V$ , e o volume final da solução,  $V_f$ , com as respectivas incertezas,  $\sigma$ .

$$\frac{\sigma(C)}{C} = \sqrt{\left(\frac{\sigma(C_f)}{C_f}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(V)}{V}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(V_f)}{V_f}\right)^2}$$