



**CARINA ISABEL
MARTINS FIALHO**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS
GORDOS EM ALIMENTOS POR
CROMATOGRAFIA GASOSA**



**CARINA ISABEL
MARTINS FIALHO**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS
EM ALIMENTOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, do Doutor Bruno Manuel Galinho Henriques, Investigador Doutorado da Universidade de Aveiro e da Laura Cristina Oliveira Sousa, Coordenadora Técnica do Laboratório de MIA da empresa Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A.

o júri
presidente

Prof. Doutora Helena Isabel Seguro Nogueira
Professora assistente, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Teresa Lemos Pereira Saúde Reis
Investigadora Doutorada, Ispup- Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto

Prof. Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira
Professora Associada, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço em especial à Professora Eduarda Pereira por todo o apoio, orientação, ajuda e disponibilidade para que tudo corresse da melhor forma.

À Laura Sousa pela paciência e ensinamentos que me forneceu ao longo deste período de estágio.

A todos os colaboradores da Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A. por todo o apoio, atenção e amizade.

Aos meus colegas de Mestrado aos quais agradeço por todo o companheirismo e ajuda ao longo destes dois anos.

Um especial agradecimento aos meus pais, ao meu irmão e ao Paulo, sem eles isto nunca seria possível.

Por fim, um agradecimento à Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A. por esta oportunidade de estágio e pelas oportunidades que me tem oferecido.

palavras-chave

Ácidos gordos, GC-FID, Validação de métodos, matrizes alimentares

resumo

Ao longo dos anos, os consumidores tornaram-se mais exigentes relativamente aos produtos que consomem e a procura de qualidade nos alimentos consumidos tem crescido exponencialmente. Isto obriga a uma maior atenção dos produtores e a um aumento do controlo da segurança e qualidade alimentar. A Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A. é uma empresa dedicada à segurança alimentar e nutrição sendo uma das maiores multinacionais na área da qualidade e segurança alimentar. A empresa oferece diferentes serviços ao cliente, incluindo análises na área da físico-química, da microbiologia, do ambiente e sensorial, assim como de rotulagem, auditorias, consultoria e legislação.

A validação de métodos ocorre no âmbito de uma melhoria contínua do laboratório e é um objetivo dos laboratórios. Este trabalho teve por principal objetivo apoiar a validação de um método analítico para determinar o perfil de ácidos gordos em alimentos, utilizando cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama. A gordura é um lípido essencial na alimentação humana e apesar de se fazer a análise de todos os ácidos gordos, a atenção tem sido focada essencialmente nos ácidos gordos essenciais, nos isómeros do ácido linoléico conjugado e nos ácidos saturados.

A técnica utilizada foi a cromatografia gasosa com ionização de chama, GC-FID, e as amostras são tratadas consoante o tipo de matriz. Foi possível estudar o perfil dos ácidos gordos e a identificação destes está relacionada com o tempo de retenção de cada um. Para a validação foram utilizadas diversas matrizes: óleo vegetal, banha de porco, maionese, atum em conserva, salmão, panado misto e leite em pó. Para a realização do estudo da veracidade foram utilizados Materiais de Referência Certificados e foi possível observar que os valores de Z-Score obtidos estavam entre -2 e 2, sendo esses valores considerados aceitáveis. O estudo da repetibilidade foi realizado para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, tendo sido obtidos valores do limite de repetibilidade de 0,98 %, 0,31 % e 0,40 %, respetivamente. Também foi possível calcular a precisão intermédia das diferentes matrizes e foi observado que o maior valor de precisão intermédia foi de 3,1 % correspondente aos ácidos gordos polinsaturados da matriz maionese.

keywords

Fatty acids; GC-FID; Method validation; food matrices

abstract

Over the years, consumers have become more demanding regarding the products they consume and a demand for quality in the food consumed has grown exponentially. This requires greater attention from producers and increased control over food safety and quality.

Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A. is a company dedicated to food safety and nutrition, being one of the largest multinationals in the area of quality and food security. The company offers different services to the client, including analyzes in the area of physical chemistry, microbiology, environment and sensory, as well as labeling, audits, consultancy and legislation.

The validation of methods takes place in the context of continuous improvement of the laboratory and is an objective of the laboratories. This work had as main objective to support the validation of an analytical method to determine the profile of fatty acids in food, using gas chromatography coupled to a flame ionization detector. Fat is an essential lipid in human food and despite the analysis of all fatty acids, attention has been focused mainly on essential fatty acids, isomers of conjugated linoleic acid and saturated fatty acids.

The technique used was gas chromatography with flame ionization, GC-FID, and the samples are treated according to the type of matrix. It was possible to study the profile of fatty acids and their identification is related to the retention time of each one. Several matrices were used for validation: vegetable oil, lard, mayonnaise, canned tuna, salmon, mixed breaded and powdered milk. To carry out the veracity study, Certified Reference Materials were used and it was possible to observe that the Z-Score values obtained were between -2 and 2, these values being considered acceptable. The repeatability study was carried out for saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, with repeatability limit values of 0.98 %, 0.31 % and 0.40 %, respectively. It was also possible to calculate the intermediate precision of the different matrices and it was observed that the highest intermediate precision value was 3.1 % corresponding to the polyunsaturated fatty acids of the mayonnaise matrix.

Índice

I - Introdução.....	1
1. Enquadramento e objetivos do Estágio.....	3
2. A empresa Mérieux NutriSciences, Siliker Portugal S.A.	3
3. Gordura e o seu consumo em Portugal	5
4. Ácidos gordos	6
4.1. Biossíntese dos ácidos gordos	7
4.2. Ácidos gordos saturados	8
4.3. Ácidos gordos insaturados	9
4.4. Ácidos gordos trans.....	9
4.5. Ácido linoléico conjugado	10
4.6. Ácidos gordos essenciais.....	10
5. Ácidos gordos em diversos alimentos	11
5.1. Carnes.....	11
5.2. Peixes	12
5.3. Leite e derivados	12
5.4. Azeite e óleos vegetais	12
6. Cromatografia gasosa	13
7. Qualidade em laboratórios.....	15
7.1. A qualidade nos laboratórios de ensaios	15
7.2. Norma NP ISO/IEC 17025.....	16
7.3. Controlo de qualidade	19
II - Parte experimental	21
1. Validação de métodos de ensaio.....	23
Avaliação direta	24
Avaliação indireta	25
2. Extração da gordura dos alimentos.....	30
2.1. Amostras denominadas de gerais no laboratório.....	31
2.2. Produtos lácteos	31
2.3. Azeites e óleos	31
3. Metilação dos ácidos gordos para ésteres metílicos	32
3.1. Amostras denominadas de gerais	32
3.2. Produtos lácteos e derivados	32
3.3. Azeites, óleos e gorduras.....	32
4. Condições cromatográficas de análise dos compostos de interesse	33
4.1. Mistura de padrões C37	33
5. Análises realizadas para a validação de métodos.....	35
III - Resultados e discussão	37

1. Mistura de padrões C37	39
2. Matrizes analisadas.....	39
2.1. Veracidade	39
a. Óleo vegetal	40
b. Salmão.....	42
c. Maionese	45
2.2. Repetibilidade	48
a. Ácidos gordos saturados	48
b. Ácidos Gordos Monoinsaturados.....	50
c. Ácidos Gordos Polinsaturados	52
2.3. Precisão intermédia	53
IV – Conclusão	57

Índice de figuras

Figura 1: Fotografia das instalações da Mérieux NutriSciences em Canelas, Vila Nova de Gaia.....	4
Figura 2: Representação das diversas áreas de atuação da empresa Mérieux NutriSciences.....	5
Figura 3: Biossíntese dos ácidos gordos. O primeiro passo é a condensação, depois a redução, desidratação e redução.....	8
Figura 4: Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa onde se podem observar os componentes principais deste.....	14
Figura 5: Exemplo de um cromatograma do leite, onde é possível a identificação e quantificação dos diversos ácidos gordos pelos diferentes tempos de retenção.....	15
Figura 6: Composição da mistura de padrões C37.....	34
Figura 7: Cromatograma da mistura de padrões C37.....	39
Figura 8: Cromatograma obtido por GC-FID para o óleo vegetal.....	40
Figura 9: Cromatograma obtido por GC-FID de uma amostra de salmão.....	42
Figura 10: Cromatograma obtido por GC-FID de uma amostra de maionese.....	45
Figura 11: Cromatograma obtido por GC-FID da matriz banha de porco.....	65
Figura 12: Cromatograma obtido por GC-FID de um atum em conserva.....	67
Figura 13: Cromatograma obtido de uma amostra de panado misto.....	69
Figura 14: Cromatograma obtido de uma amostra de leite em pó.....	71
Figura 15: Certificado de análise do óleo vegetal.....	73
Figura 16: Certificado de análise da matriz maionese.....	74
Figura 17: Certificado de análise da matriz maionese (continuação).....	75
Figura 18: Certificado de análise da matriz salmão.....	76
Figura 19: Certificado de análise da matriz salmão (continuação).....	77

Índice de tabelas

Tabela 1: Resultados para os nove ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e valores do intervalo de aceitação dos resultados retirados do certificado do MRC para a matriz óleo vegetal.....	41
Tabela 2: Resultados para os nove ensaios realizados no mesmo dia para o ácido linoleico (C18:2n6c), o ácido linolénico (C18:3n3c), o ácido oleico (C18:1n9c), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0), para o óleo vegetal.....	41
Tabela 3: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz óleo vegetal, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experiencialmente com o valor referência.....	42
Tabela 4: Ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e intervalo definido no certificado do MRC da matriz salmão.....	43
Tabela 5: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas no mesmo dia e o intervalo definido no certificado do MRC da matriz salmão.....	43
Tabela 6: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz salmão, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experiencialmente com o valor referência.....	44
Tabela 7: Resultados para os dez ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e valores do intervalo de aceitação dos resultados retirados do certificado do MRC para a maionese.....	45
Tabela 8: Resultados obtidos para os ácidos gordos das dez réplicas realizadas e o intervalo definido no MRC da maionese.....	46
Tabela 9: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz maionese, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experiencialmente com o valor referência.....	47
Tabela 10: Resultados obtidos para os ácidos gordos saturados para o estudo da repetibilidade.....	48
Tabela 11: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos saturados.....	49
Tabela 12: Teste de Grubbs dos ácidos gordos saturados	49
Tabela 13: Teste C de Cochran dos ácidos gordos saturados	50
Tabela 14: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos saturados.....	50
Tabela 15: Resultados obtidos para os ácidos gordos monoinsaturados para o estudo da repetibilidade.....	50

Tabela 16: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos monoinsaturados.....	51
Tabela 17: Teste de Grubbs para os ácidos gordos monoinsaturados	51
Tabela 18: Teste C de Cochran dos ácidos gordos monoinsaturados	51
Tabela 19: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e o coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos monoinsaturados.....	52
Tabela 20: Resultados obtidos para os ácidos gordos polinsaturados para o estudo da repetibilidade.....	52
Tabela 21: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos polinsaturados.....	52
Tabela 22: Teste de Grubbs para os ácidos gordos polinsaturados	53
Tabela 23: Teste C de Cochran dos ácidos gordos polinsaturados	53
Tabela 24: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e o coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos polinsaturados	53
Tabela 25: Resultados obtidos dos ácidos gordos saturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédia, o desvio padrão da precisão intermédia (Si), o coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e o limite da precisão intermédia (L.P.I.) em percentagem, das matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.....	54
Tabela 26: Resultados obtidos dos ácidos gordos monoinsaturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédia, o desvio padrão da precisão intermédia (Si), o coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e o limite da precisão intermédia (L.P.I.) em percentagem, das matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.....	54
Tabela 27: Resultados obtidos dos ácidos gordos polinsaturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédia, o desvio padrão da precisão intermédia (Si), o coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e o limite da precisão intermédia (L.P.I.) em percentagem, das matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.....	55
Tabela 28: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as oito réplicas realizadas para a amostra banha de porco.....	65
Tabela 29: Resultados obtidos para os ácidos gordos das oito réplicas realizadas para a matriz atum em conserva.....	67
Tabela 30: Resultados obtidos para os ácidos gordos das dez réplicas realizadas para a matriz Panado misto.....	69
Tabela 31: Resultados obtidos para os ácidos gordos das dez réplicas realizadas para a matriz leite em pó.....	71

Tabela 32: Valores críticos do Teste de Grubbs.....	78
Tabela 33: Valores críticos do Teste C de Cochran.....	79
Tabela 34: Valores de fAGi.....	80

I - Introdução

1. Enquadramento e objetivos do Estágio

Atualmente, a preocupação com a qualidade alimentar é crescente devido à maior informação do consumidor e devido à enorme produção de alimentos, para atender à sua crescente procura. A fraude alimentar é cada vez mais frequente, isto é, os produtores ou os comerciantes adulteram diversas características dos alimentos como a espécie do animal, a origem geográfica, produtos rotulados como biológicos, etc.

Para atender às necessidades impostas pelos consumidores de terem conhecimento do que consomem, as empresas da área da qualidade alimentar têm de verificar a qualidade e garantir a segurança e para isso implementam métodos de análise para verificação dos objetivos impostos.

Para um laboratório ser acreditado, é necessário a implementação da norma NP ISO/IEC 17025, uma norma para laboratórios de ensaios e/ou calibração, que apresenta diversos requisitos para a implementação da qualidade num laboratório. Um dos requisitos menciona a validação de métodos. A validação de métodos permite evidenciar que o método é adequado para o seu propósito. O trabalho realizado neste estágio, na empresa Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A, foi a validação de um método de avaliação do perfil de ácidos gordos em diversos alimentos, nomeadamente: óleo vegetal, banha de porco, atum em conserva, salmão, maionese, panado misto e leite em pó. Com um estudo de diversos tipos de matrizes é possível alargar a área de aplicação do método.

2. A empresa Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A.

Em julho de 1992, surgiu a empresa EGI - Sociedade da Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., em Vila Nova de Gaia. Uma empresa que visava atender às necessidades daquela época, onde a segurança alimentar e a prevenção da qualidade começava a acentuar-se. A EGI rapidamente assumiu a liderança no setor de análises agroalimentares em Portugal.

Em 1993, após a implementação da política de qualidade, a EGI torna-se um laboratório acreditado, passando a integrar o Sistema Português da Qualidade. Até março de 2008, esta empresa foi denominada de EGI, mas nessa data, a multinacional norte-americana Silliker adquiriu a empresa, e assim surgiu a Silliker Portugal S.A. (figura 1). Esta empresa multinacional é um dos maiores grupos mundiais na área da qualidade e segurança alimentar.



Figura 1: Fotografia das instalações da Mériex NutriSciences em Canelas, Vila Nova de Gaia.

Em 1897, o Instituto Mériex foi fundado por Marcel Mériex e tornou-se líder mundial no campo das vacinas humanas e veterinárias. Em 1990, a empresa Norte Americana, Silliker foi adquirida. Esta empresa, criada em 1967, tinha como objetivos a segurança e a qualidade alimentar, sendo uma empresa pioneira nestas duas áreas, fornecendo serviços na área do controlo analítico de alimentos. Com esta aquisição, o Instituto Mériex passou a abordar a segurança alimentar e a nutrição.^[1]

Após a inserção da empresa EGI na multinacional Silliker, em 2014, esta passou a apresentar-se como Mériex NutriSciences e conta atualmente com mais de 7000 funcionários em mais de 100 laboratórios em 26 países, atuando em diversas áreas, como é possível observar na figura 2.^[1]

A Mériex NutriSciences, Silliker Portugal S.A., é uma empresa acreditada pela norma NP ISO/IEC 17025 como Laboratório de Ensaios, sendo reconhecida como tal pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), com o Certificado de Acreditação nº L0087. Esta norma estabelece os requisitos de gestão e técnicos para a implementação de um sistema de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração.

A Mériex NutriSciences, Silliker Portugal S.A. é uma empresa que oferece aos seus clientes diversos serviços como a análise microbiológica, química e sensorial. Além destes serviços apresenta outros tais como a rotulagem, consultoria, entre outros. As análises realizadas na empresa dividem-se em análises físico-químicas clássicas, métodos instrumentais

de análise, microbiologia e ambiente. Alguns exemplos de análises físico-químicas são a quantificação de proteínas, matéria gorda, humidade, entre outros. Nos métodos instrumentais de análise são realizadas quantificações de ácidos gordos, metais vestigiais, colesterol, toxinas, açúcares, entre outros, usando métodos espectroscópicos e cromatográficos. ^[1]

Os colaboradores da empresa realizam um esforço diário para manter a qualidade desejada, executando tarefas e conhecendo a sua importância, mantendo sempre o foco na melhoria contínua.

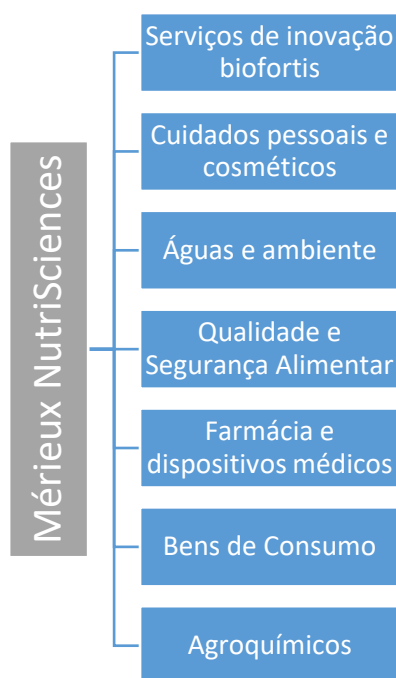


Figura 2: Representação das diversas áreas de atuação da empresa Mérieux NutriSciences.

3. Gordura e o seu consumo em Portugal

A gordura é um tipo de lípido essencial na alimentação de qualquer pessoa. Apesar de atualmente ser combatido o consumo excessivo de gordura, esta quando consumida em proporções adequadas fornece nutrientes necessários ao organismo como ácidos gordos essenciais para o transporte de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e mantém a temperatura corporal (Kadam & Prabhasankar, 2010). Aproximadamente 30 % é a quantidade de calorias diárias que devem ser consumidas de gordura. As gorduras podem ser consumidas a partir de diferentes alimentos, como por exemplo o ómega 3 que é consumido através do peixe.

As gorduras são essenciais, no entanto quando consumidas em excesso poderão ser prejudiciais ao organismo. Um exemplo é o colesterol. O colesterol está presente em diversos alimentos de origem animal e quando consumido em excesso pode ser muito prejudicial.

A Balança Alimentar Portuguesa (BAP) fornece informação sobre o consumo de diversos produtos do ponto de vista da disponibilidade destes. Em Portugal, segundo a BAP, registou-se um consumo por habitante de 3834 kcal diário, acima do valor recomendado 2000 kcal por dia. Este estudo data dos anos de 2012 a 2016, e mostra alguns desvios face à Roda dos Alimentos. As disponibilidades alimentares de alguns grupos de alimentos apresentam desvios maiores que o recomendado, como é o caso do grupo das carnes, pescado e ovos, o grupo dos cereais, raízes e tubérculos e o grupo dos óleos e gorduras. Por outro lado, a disponibilidade alimentar é deficitária em grupos como o leite e produtos lácteos, no grupo das leguminosas secas e no grupo dos frutos e hortícolas.^[2]

Para além do grupo dos óleos e gorduras ser o maior fornecedor de gorduras na alimentação diária dos portugueses, outros grupos também são responsáveis pela disponibilidade de gorduras nos produtos alimentares, como o grupo da carne, pescados e ovos, e o grupo do leite e produtos lácteos.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aconselha um consumo inferior a 10 % de calorias provenientes de gorduras saturadas, pois estas estão relacionadas com o aumento de doenças cardiovasculares.

O consumo de gorduras tem vindo a ser preocupante devido ao excesso de disponibilidade como realça a Balança Alimentar Portuguesa, e isto leva a uma necessidade de conhecimento dos alimentos, nomeadamente dos seus constituintes.^[2]

4. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são moléculas com um grupo carboxílico numa extremidade com uma longa cadeia carbonada, saturada ou insaturada, com 4 a 36 carbonos. Estes compostos são insolúveis em água, pois apesar do grupo carboxílico ser polar, a afinidade com a água diminui com o aumento da cadeia carbonada. Os ácidos gordos são importantes e necessários na síntese de membranas, sinalização e construção de elementos estruturais nas células e tecidos e solubilização de constituintes extracelulares (German & Dillard,2004; Fahy et al., 2011).

Os ácidos gordos podem ser classificados como saturados e insaturados. Ácidos gordos saturados são classificados pelo número de carbonos da cadeia carbonada, e os insaturados são classificados pelo número de ligações duplas, a sua configuração e posição. Um ácido gordo apenas com uma ligação dupla na sua cadeia carbonada é designado por monoinsaturado. Um ácido gordo com duas ou mais ligações duplas na sua cadeia carbonada é denominado de polinsaturado (Rustan & Drevon, 2001).

A nomenclatura de designação de ácidos gordos apresenta em primeiro o número de átomos de carbono, depois o número de ligações duplas e por fim o número do átomo de carbono entre a extremidade metilo e a primeira ligação dupla. Por exemplo, o ácido oleico com fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, a sua nomenclatura é 18:1n9, o 18 corresponde ao número de carbonos existentes no ácido gordo, o 1 corresponde ao número de ligações duplas existentes e o número nove corresponde ao carbono onde está presente a ligação dupla. No caso de um ácido gordo saturado, como é o caso do ácido eicosanóico, com fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$, a sua nomenclatura seria 20:0, pois não apresenta ligações duplas (Seppänen-Laakso et al., 2002). Os ácidos gordos ómeegas podem ter uma nomenclatura diferente, onde é utilizada a letra grega ómega (ω), onde este símbolo substitui o n.

Os ácidos gordos saturados e insaturados apresentam diferentes tipos de empacotamento. Os ácidos gordos saturados não apresentam diferentes conformação tendo uma maior interação de Van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas, o que permite um maior grau de compactação. Por sua vez, os ácidos gordos insaturados têm conformações cis e trans devido à presença das ligações duplas, o que permite que o seu empacotamento seja menos rígido, pois as suas ligações são mais fracas. Esta propriedade reflete-se nas suas propriedades físico-químicas, por exemplo, à temperatura ambiente, os ácidos gordos 12:0 a 24:0 são sólidos (Kaneko et al., 1998).

4.1. Biossíntese dos ácidos gordos

A biossíntese dos ácidos gordos ocorre no citoplasma enquanto que a acetilcoenzima A, também conhecida por acetil CoA, é formada na mitocôndria. O malonil CoA é um intermediário resultante da carboxilação do acetil CoA, com consumo de ATP. Após isto, é formado o acetil ACP e o malonil ACP que irão condensar, formando uma molécula de quatro carbonos que após uma cascata de três reações: redução, desidratação e redução, forma o butiril-ACP (figura 3). Para formação dos ácidos gordos, o butiril-ACP irá condensar com uma molécula de malonil ACP, e o ciclo repete, até à formação de um ácido gordo. A cada ciclo

destes são adicionados dois carbonos, por condensação da molécula já formada com o malonil ACP (Heil et al., 2019).

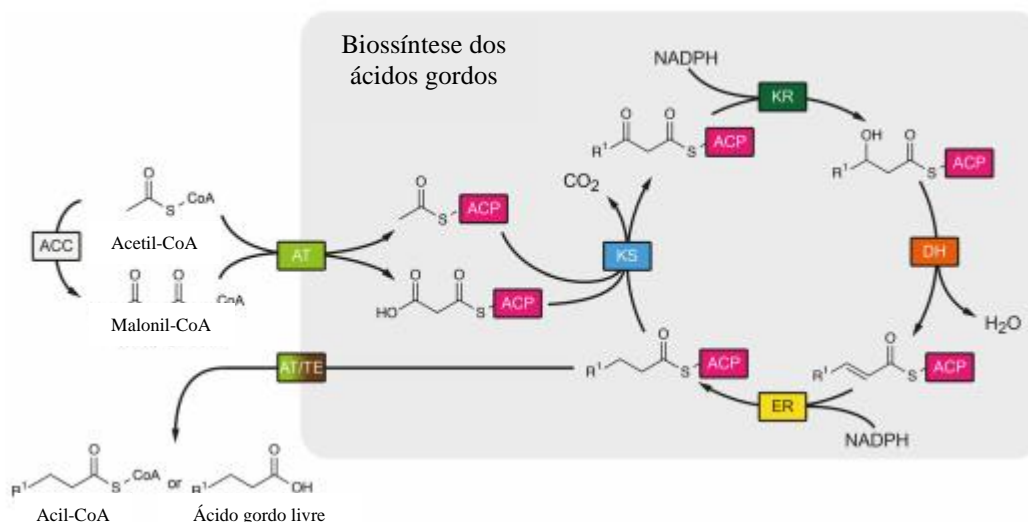


Figura 3: Biossíntese dos ácidos gordos. O primeiro passo é a condensação, depois a redução, desidratação e redução.

O palmitato, C₁₆H₃₂O₂, é um precursor de ácidos gordos de cadeia longa através de alongação e é também precursor de ácidos gordos insaturados por dessaturação (Moran, 2012).

4.2. Ácidos gordos saturados

Os ácidos gordos saturados apresentam apenas ligações simples. Os ácidos gordos saturados apresentam um empacotamento que permite a estabilização por interações hidrofóbicas permitindo um arranjo quase cristalino. Assim, à temperatura ambiente, os ácidos gordos saturados apresentam uma consistência semelhante à cera.

Os ácidos gordos saturados apresentam geralmente entre 2 e 22 carbonos, e número par de carbonos. Os ácidos gordos saturados são o ácido butírico (C₄:0), o ácido capríco (C₆:0), o ácido caprílico (C₈:0), o ácido cáprico (C₁₀:0), o ácido láurico (C₁₂:0), o ácido mirístico (C₁₄:0), o ácido palmítico (C₁₆:0), o ácido esteárico (C₁₈:0), o ácido araquidónico (C₂₀:0), o ácido beénico (C₂₂:0) e o ácido linhocérico (C₂₄:0).

O leite é uma matriz alimentar que apresenta uma grande quantidade de ácidos gordos saturados, principalmente o ácido palmítico (Teng et al., 2014). Os ácidos gordos saturados estão presentes noutras amostras como nas carnes, manteigas, queijos, natas, iogurtes, gelados de leite, mas também em óleo. As carnes além de apresentarem alta concentração de ácidos gordos saturados apresentam também alta concentração de ácidos gordos monoinsaturados

(Wood et al., 2008). O côco apresenta um elevado número de ácidos gordos saturados, tal como os seus derivados.

4.3. Ácidos gordos insaturados

Os ácidos gordos insaturados apresentam uma ou mais ligações duplas. Um ácido gordo com apenas uma ligação dupla é denominado de monoinsaturado, e na maioria deles, a ligação dupla está entre o C-9 e o C-10. Este tipo de ácidos gordos ocorre na natureza com maior frequência com 18 átomos de carbono, sendo a cadeia mais curta de 14 átomos de carbono e a mais comprida de 22 carbonos.

Os ácidos gordos insaturados podem ser monoinsaturados se apenas apresentarem uma ligação dupla ou polinsaturados se apresentarem mais que uma ligação dupla. O ácido oleico é o exemplo de um ácido gordo monoinsaturado e este é o ácido gordo monoinsaturado na dieta, a partir do consumo de azeite (Alonso et al., 2013). As nozes e alguns tipos de carnes também podem apresentar ácido oleico. Os ácidos gordos polinsaturados são, por exemplo, o ácido linoléico e o ácido linolénico. O ácido linoléico apresenta duas ligações duplas, enquanto que o ácido linolénico apresenta três ligações duplas. O ácido linoléico está presente em grande concentração em soja, milho, açafrão e óleo de girassol. O ácido linolénico apresenta grande abundância em amostras como vegetais de folhas verdes, em óleos de linhaça e canola. Estes dois ácidos gordos polinsaturados são importantes para o organismo humano apesar de não serem produzidos por este (Dipasquale et al., 2018). Os ácidos gordos insaturados podem ser divididos em ómega-3 (n3), ómega-6 (n6) e ómega-9 (n9).

Uma dieta rica em ácidos gordos insaturados está relacionada com doenças crónicas do sistema cardiovascular.

4.4. Ácidos gordos trans

Os ácidos gordos trans são isómeros dos ácidos gordos cis. Tal como os seus isómeros, nos ácidos gordos trans existe pelo menos uma ligação dupla e a diferença reside na posição dos hidrogénios. Se ambos os hidrogénios estiverem no mesmo plano, estamos perante um ácido gordo cis, se estiverem em planos opostos estamos perante um ácido gordo trans.

A forma trans dos ácidos gordos ocorre após a hidrogenação parcial das gorduras e óleos. A hidrogenação é um processo no qual são adicionados hidrogénios às ligações duplas, eliminando-as (Salimon et al., 2017). Esta hidrogenação é parcial, isto é, há uma redução do teor de insaturação, continuando a existir ligações duplas. Este processo é utilizado para

melhorar a textura e a estabilidade da comida durante um maior período, pois os ácidos gordos trans têm um ponto de ebulição mais elevado e maior estabilidade que os isómeros cis (Omar & Salimon, 2013). Os ácidos gordos trans estão presentes em diversos produtos de pastelaria como: bolachas, biscoitos, bolos, crackers e pão.

As gorduras trans também podem aparecer de forma natural em alimentos que provêm de animais ruminantes, sendo possível o consumo de gorduras trans a partir de carnes, leites e derivados. Em produtos lácteos e derivados, a percentagem de isómeros trans é significativa, sendo o isómero trans mais predominante o agrupado C18:1t, dos isómeros C18:1n9t e C18:1n11t (Lindmark et al., 2008).

Atualmente, diversos estudos têm mostrado que as duas variáveis, ácidos gordos trans e doenças cardiovasculares, podem estar relacionadas, quando ocorre uma ingestão destes ácidos gordos em quantidades mais elevadas do que as recomendadas. (Costa et al., 2016). Além das doenças cardiovasculares, aumenta também o risco de diabetes e cancro, segundo a Direção Geral de Saúde.

4.5. Ácido linoléico conjugado

O ácido linoléico conjugado é um ácido gordo que ocorre naturalmente em animais ruminantes, como a vaca e o cordeiro, e conseqüentemente no leite (Mulvihill, 2001). O ácido linoléico conjugado, ou CLA, designa uma família de isómeros que apresentam ligações duplas de carbono, separadas por um carbono. As ligações duplas do CLA podem ser trans ou cis, o que resulta num diverso número de isómeros com variações de posição (7,9; 8,10; 9,11; 10,12; ou 11,13) e de geometria (c/c; c/t; t/t ou t/c) (Schmid et al., 2006; Kumari et al., 2017). O CLA pode ser formado por dois processos diferentes: por biohidrogenação incompleta do ácido linoléico e linolénico ou por compostos intermediários formados durante a biohidrogenação de ácidos gordos polinsaturados. O primeiro processo ocorre no rúmen e o segundo processo ocorre nos tecidos (Bauman et al., 1999).

Segundo diversos estudos, o CLA tem aplicações na saúde sendo anticarcinogénico, antidiabético, entre outros. O CLA pode também diminuir a percentagem de gordura. Quanto ao efeito antidiabético, com o consumo de CLA, foi demonstrado que o nível de glucose no sangue diminui.

4.6. Ácidos gordos essenciais

Os ácidos gordos essenciais são constituintes membranares que fornecem à membrana fluidez e apesar de fundamental ao organismo humano, este não consegue sintetizá-lo. Para tal, é preciso introduzir alimentos que contenham ácidos gordos essenciais na dieta.

Os ácidos gordos essenciais são polinsaturados e ocorrem de duas formas no organismo: ω -3 e ω -6. ω -3 é derivado do ácido linolénico- α e o ω -6 é derivado do ácido linoléico-cis. O ácido gordo ómega-3 (ω -3) é caracterizado por ter uma ligação dupla no terceiro carbono a partir da extremidade metilo. E o ácido gordo ómega-6 (ω -6) é caracterizado pela presença de uma ligação dupla no sexto carbono a partir da extremidade metilo (Wall et al., 2010).

Por ação de dessaturases e alongação, o ácido gordo ómega-6 é sintetizado a araquidónico (AA) e este pode ser sintetizado a ácido eicosapentaenóico (EPA). Por sua vez, por ação de desaturases e alongação, o ácido gordo ómega-3 é sintetizado a ácido docosahexaenóico (DHA) e, de seguida, a ácido docosapentaenóico (DPA). Estes metabolismos são importantes pois estes são precursores de eicosanóides (Uauy et al., 2001; Granot & Deckelbaum, 2017). AA (ómega-6) e EPA (ómega-3) têm efeitos opostos, pois um tem ação pró-inflamatória e o outro anti-inflamatória, respetivamente. Uma ingestão de ómega-6, em quantidades superiores às recomendadas, pode provocar um estado pró-trombótico, pró-inflamatório e proconstritivo (Simopoulos et al., 2002; Das, 2006A).

Os ácidos gordos essenciais podem ser encontrados em diversos alimentos. Podemos encontrar ácido linolénico em cereais, ovos, óleos vegetais, margarina, açafrão, entre outros. O ácido α -linoléico pode encontrar-se no óleo de linhaça e de colza, nozes e vegetais de folhas verdes. O azeite é rico em ácido oleico que é considerado um ómega-9. A maior fonte de EPA e DHA são os peixes marinhos, mas quando o peixe é de água doce há pouca probabilidade da presença da presença destes ácidos gordos (Das, 2006B).

5. Ácidos gordos em diversos alimentos

5.1. Carnes

Nas carnes entre 15 e 30 % é gordura. Os ácidos gordos mais abundantes nas carnes são o C16:0, o C18:0 e o C18:1n9c, que correspondem ao ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, respetivamente. A quantidade destes ácidos gordos varia consoante a espécie em estudo, por exemplo, a carne de vaca apresenta uma maior quantidade de ácido palmítico (C16:0), enquanto que a carne de ovelha apresenta maior quantidade de ácido esteárico (C18:0). O CLA

também está presente neste tipo de amostras. A carne apresenta geralmente entre 30 e 40 % de ácidos gordos saturados (Wood et al., 2004; Wood et al. 2008).

5.2. Peixes

Os peixes apresentam no seu perfil de ácidos gordos, ácidos gordos ómega, que são característicos deste tipo de matriz. Os ácidos gordos saturados nos peixes variam entre 30 e 40 % e os ácidos gordos insaturados apresentam aproximadamente 60 % da totalidade de ácidos gordos. Os ácidos gordos monoinsaturados estão presentes em maior quantidade (aproximadamente 40 %) que os ácidos gordos polinsaturados (aproximadamente 20 %) (Das, 2006B; Zuraini et al., 2016). Esta matriz apresenta diversos tipos de ácidos gordos ómega, onde é possível verificar a sua proporção ω_6/ω_3 , que quando os valores são abaixo de 4 podem ser consumidos na dieta para prevenção de doenças cardiovasculares (Ramos Filho et al., 2008).

5.3. Leite e derivados

O leite e seus derivados apresentam um perfil lácteo, isto é, apresentam C4:0, C6:0, C8:0 e os restantes ácidos gordos. Só podemos considerar que uma amostra tem perfil lácteo se esta apresentar ácido butírico, seguido dos ácidos gordos saturados seguintes. Este tipo de matriz apresenta cerca de 70 % de ácidos gordos saturados, dos quais o ácido palmítico é o mais expressivo pois representa aproximadamente 30 % dos ácidos gordos saturados do leite (Teng et al., 2017). Aproximadamente 11 % dos AGS, nesta matriz, estão relacionados com os ácidos gordos do C4:0 até ao C10:0 (Lindmark et al., 2008).

Os ácidos gordos insaturados também estão presentes no leite, cerca de 25 % de monoinsaturados com maior expressão do ácido oleico (Teng et al., 2017). Os ácidos gordos polinsaturados correspondem a 5 % dos ácidos gordos totais do leite, dos quais faz parte o CLA, com isómeros diferentes, sendo o mais predominante o ácido ruménico (RA) (Lindmark et al., 2008).

5.4. Azeite e óleos vegetais

O azeite é caracterizado pela presença do ácido oleico (C18:1), um ómega-9. Um azeite apresenta ácidos gordos monoinsaturados entre 70 e 80 % da quantidade total de ácidos gordos e cerca de 6 a 10 % de ácidos gordos polinsaturados. O ácido oleico é o ácido gordo com maior expressão neste tipo de matriz (Orsavova et al., 2015; Yorulmaz et al., 2019). A partir do perfil de ácidos gordos obtido é possível identificar e distinguir um azeite virgem extra de um azeite

virgem, por exemplo. A partir do regulamento nº 796/2002 é possível verificar as diferenças no perfil de ácidos gordos entre os diferentes tipos de azeite.^[3]

Ao contrário do azeite, os óleos apresentam uma maior quantidade de ácido linoléico (C18:2) do que ácido oleico, e também maior quantidade de ácido linolénico. Os óleos vegetais são amostras que variam significativamente com a planta de origem. O óleo de côco apresenta na sua composição uma predominância do ácido Láurico (45-53 %) e do ácido Mirístico (16-28 %), e apresenta aproximadamente 90 % de ácidos gordos saturados. O óleo de palma é um óleo comumente utilizado na alimentação como em bolachas e batatas fritas. Este óleo apresenta uma grande percentagem de ácido palmítico. O óleo de girassol apresenta uma maior contribuição do ácido linoleico (48-74 %) e do ácido oleico (14-40 %), no entanto, o óleo de girassol pode ter alto teor oleico, apresentando uma percentagem mais elevada de ácido oleico (75-91 %) (Souza et al., 2019).

6. Cromatografia gasosa

A cromatografia é uma técnica analítica que tem como objetivo a separação e identificação dos componentes de uma mistura. Esta técnica baseia-se na migração dos componentes numa fase móvel e numa fase estacionária. A fase móvel, ou eluente, é a fase onde os componentes se movem, esta fase pode ser gasosa ou líquida. A fase estacionária é uma fase fixa, normalmente fixa nas paredes da coluna, que irá interagir com os componentes da mistura e esta pode ser líquida ou sólida (Skoog et al., 2017).

A cromatografia gasosa é uma cromatografia onde a fase móvel é um gás inerte, que pode ser hidrogénio, hélio, azoto ou árgon. Na cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e consoante a sua interação com a fase estacionária os constituintes da amostra são separados. Se os componentes apresentarem maior interação com a fase estacionária, estes são retidos mais tempo nesta fase. No caso particular da utilização da cromatografia gasosa para separar ácidos gordos de uma amostra, os ácidos gordos com uma cadeia carbonada menor eluem primeiro que os ácidos gordos com cadeias carbonadas maiores.

As vantagens da utilização da cromatografia gasosa são a rapidez, a alta sensibilidade, o poder de separação e resolução e, uma das mais importantes vantagens, a amostra é necessária em pequena quantidade (Skoog et al., 2017).

Um equipamento de cromatografia gasosa divide-se em diversas componentes: o gás de arraste, o injetor, a coluna e o detetor, como é possível observar na figura 4.

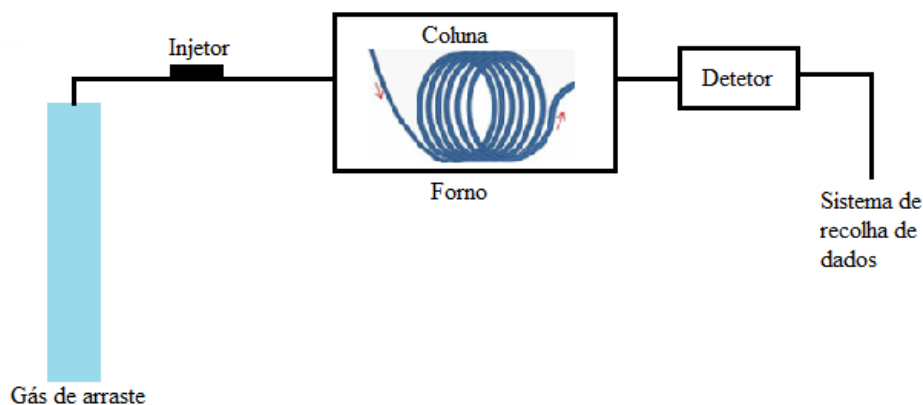


Figura 4: Esquema de um equipamento de cromatografia gasosa onde se podem observar os componentes principais.

O gás de arraste usualmente utilizado é o hidrogénio, o azoto ou o hélio, no entanto, por vezes é utilizada uma mistura entre estes. Estes gases apresentam boas características como o facto de serem inertes, interagindo o mínimo possível com a amostra. A seringa introduz a amostra no injetor, onde esta irá vaporizar imediatamente, e o gás de arraste irá arrastar a amostra pela coluna.

A coluna pode ser empacotada ou capilar. A coluna capilar tem maior comprimento e por isso maior eficiência para a separação de misturas complexas, como é o caso dos ácidos gordos, no entanto, a coluna empacotada é mais económica. A escolha da coluna recai sobre o tipo de análise, a quantidade de amostra disponível e a complexidade da amostra (Kaneko et al. 1998).

Para análises da composição de ácidos gordos numa amostra, o detetor usualmente utilizado é o Detetor de Ionização de Chama (FID). Este detetor utiliza, normalmente, uma chama ar/hidrogénio e com a passagem da amostra, esta chama irá formar iões, estes iões irão produzir um sinal elétrico e que sua vez será transformado num sinal cromatográfico. O detetor de ionização de chama apresenta algumas vantagens, como o baixo ruído e a alta sensibilidade. A desvantagem é que este detetor destrói a amostra aquando da combustão (Omar & Salimon, 2013). O detetor FID tem sido amplamente utilizado como detetor de ácidos gordos.

O GC-FID apresenta uma desvantagem que influencia a análise de ácidos gordos que é a análise de compostos voláteis unicamente. Para tal, os ácidos gordos são normalmente analisados como ésteres metílicos (FAME), e aquando da sua análise existe uma boa a

separação dos picos cromatográficos pois os compostos como ésteres metílicos são mais voláteis (Eder, 1995).

Após a análise pelo GC-FID, um cromatograma é obtido onde é apresentado o perfil de ácidos gordos presentes na amostra. O cromatograma relaciona o tempo de retenção com a resposta, sendo que os ácidos gordos com cadeias carbonadas menores têm tempos de retenção menores. A altura dos picos cromatográficos está relacionada com a abundância desse ácido gordo na amostra. Na figura 5 podemos observar um cromatograma retirado da literatura, onde é possível verificar o perfil de ácidos gordos de um leite, onde podemos ver uma abundância maior do C16:0, este corresponde ao ácido palmítico, um ácido gordo saturado, muito abundante nos leites e derivados (Teng et al., 2014).

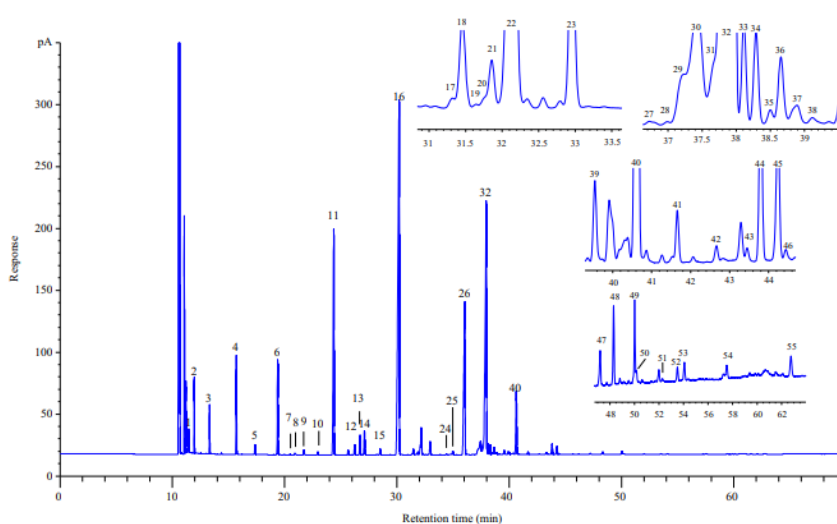


Figura 5: Exemplo de um cromatograma do leite, onde é possível a identificação e quantificação dos diversos ácidos gordos pelos diferentes tempos de retenção (Teng et al., 2014).

7. Qualidade em laboratórios

7.1. A qualidade nos laboratórios de ensaios

Atualmente, a qualidade é cada vez mais procurada e os laboratórios tentam garantir que os resultados obtidos são fidedignos e que o cliente pode ter total confiança nos resultados obtidos, e para tal, é necessário recorrer a métodos validados, obter acreditação segundo a norma NP ISO/IEC 17025, entre outros aspetos.

A qualidade pode ser definida pela capacidade de certas características de um produto ou serviços tenderem às necessidades explícitas ou implícitas de clientes ou outras partes

interessadas. Num laboratório de análises alimentares, os clientes procuram sempre a qualidade e a segurança dos alimentos que consomem. Para tal, é necessário recorrer a métodos validados, isto é, recorrer a um método onde foi demonstrado, através de evidências, de que o método é adequado para o que é pretendido. O controlo de qualidade permite proporcionar confiança da qualidade dos resultados pois define as técnicas e atividades para atender aos requisitos da qualidade. Num laboratório de análises, isto é realizado a partir de ensaios interlaboratoriais, por comparação de resultados da mesma amostra. Para garantir também o controlo e garantia de qualidade no laboratório são implementados alguns procedimentos como as curvas de calibração, padrões, repetições de amostras, a utilização de materiais de referência, entre outros.

7.2. Norma NP ISO/IEC 17025

Em 1978 surgiu uma norma que visava comprovar a competência de laboratórios de Calibração e Ensaio, a ISO Guia 25. Esta norma não foi aceite na Europa, e a norma que ficou em vigor foi a EN 45001. Ambas as normas apresentavam diversas deficiências relacionadas com a política da qualidade e a rastreabilidade de medições, e em 1995 foi iniciada a revisão destas normas (Rocha & Vieira, 2019). A norma ISO/IEC 17025 foi publicada pela primeira vez em 1999 e surgiu da revisão da ISO Guia 25, uma norma que definia requisitos necessários para uma padronização de atividades de laboratórios de ensaio; mais tarde a Organização Internacional de Normalização (ISO) estendeu esses requisitos também para laboratórios de calibração (Cortez, 1999).

Após a sua primeira aplicação, em 2005 esta norma sofreu algumas alterações para passar a integrar a ISO 9001. A ISO 9001 é uma norma que define os requisitos para a implementação de um sistema de gestão de qualidade. A norma ISO/IEC 17025:2005 dividia-se em requisitos de gestão e requisitos técnicos. Após traduzida para português pelo Instituto Português da Qualidade (IPQ), esta norma deu origem à NP ISO/IEC 17025:2005 (Rocha & Vieira, 2019).

Em 2017 foi publicada outra versão. Esta apresenta uma divisão dos requisitos diferente da versão anterior, sendo discriminados cinco grandes grupos de requisitos: requisitos gerais, requisitos de estrutura, requisitos de recursos, requisitos de processos e requisitos do sistema de gestão.

A norma NP ISO/IEC 17025:2018 é uma norma exclusiva para laboratórios de ensaios e calibração, define requisitos a que os laboratórios devem obedecer para obterem a acreditação. A implementação desta norma demonstra que o laboratório de ensaio e calibração apresenta um Sistema de Gestão de Qualidade, demonstrando ser um laboratório competente e credível. Para um laboratório ser acreditado em Portugal é necessário ser reconhecido como tal pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC). Esta norma estabelece os requisitos de gestão e técnicos para a implementação de um sistema de gestão da qualidade em laboratórios de ensaio e calibração. Esta norma é internacional, o que permite estabelecer um padrão internacional sendo possível a comparação e aceitação de resultados com laboratórios situados em diferentes países.

A acreditação é uma mais valia para o laboratório pois este irá ter a vantagem de ser uma empresa imparcial e com competência para a realização de diversos ensaios. A aplicação da norma NP EN ISO/IEC 17025:2017 incentiva uma cultura de exigência, é possível captar clientes exigentes que necessitam dos seus resultados prestados por protocolos acreditados e confiáveis (Cortez, 1999). Outra vantagem é que com o controlo necessário da calibração e verificação dos equipamentos, evitam-se falhas, o que fornece uma maior satisfação dos clientes. Além de uma mais valia para o laboratório, é uma mais valia para o cliente que assegura que os seus produtos são analisados por um laboratório competente, evidencia que os seus produtos cumprem os requisitos de qualidade e elimina a barreira da exportação dos seus produtos.

Os laboratórios deverão recorrer a uma auditoria interna de 1 em 1 ano para verificar o cumprimento dos requisitos definidos na norma NP EN ISO/IEC 17025. As não conformidades de uma auditoria têm de ser identificadas e analisadas, recorrendo a ações corretivas para evitar que se repitam as não conformidades (NP EN ISO/IEC 17025, 2018).

Então, para a implementação da norma NP EN ISO/IEC 17025 é necessário obedecer e cumprir com os requisitos por ela mencionados, esses requisitos irão garantir que o laboratório é um laboratório acreditado, fornecendo confiança e viabilidade dos seus resultados.

Os requisitos gerais abrangem a confidencialidade e a imparcialidade. O laboratório tem de garantir aos seus clientes que os seus serviços serão confidenciais e todos os colaboradores assinam um acordo de confidencialidade. O laboratório deve também ser capaz de responder às atividades propostas com imparcialidade, não cedendo a pressões que possam comprometer a veracidade dos seus resultados (NP EN ISO/IEC 17025, 2018). Para os

requisitos de estrutura é necessário a entidade comprovar a sua existência com auxílio de um documento legal. O laboratório tem de identificar a pessoa ou pessoas responsáveis pelo laboratório. Outro ponto inserido nos requisitos gerais é a definição do âmbito da acreditação do laboratório, isto é, o laboratório deve documentar todas as atividades por ele realizadas que obedecem à norma NP ISO/IEC 17025, e é necessário evidenciar que são cumpridos todos os requisitos presentes nesta norma. O laboratório deve criar um documento que evidencie a inserção do laboratório na estrutura de entidade, deve identificar a organização interna do laboratório, identificando, por exemplo, as funções de cada pessoa no laboratório e a sua hierarquia. O laboratório deve ter colaboradores que tenham a autoridade para realizar atividades como a implementação e manutenção do sistema de gestão e evidenciar a comunicação relacionada com a eficácia do sistema de gestão e de atender às necessidades dos clientes (NP EN ISO/IEC 17025, 2018). Os requisitos de recurso estão relacionados com o pessoal, as instalações e condições ambientais, os equipamentos, a rastreabilidade metrológica e os produtos e serviços de fornecedores externos. A demonstração de competência é importante para mostrar que o colaborador está apto para a realização dos ensaios laboratoriais, isto pode ser demonstrado pela participação em exercícios de comparação interlaboratoriais. O laboratório deve incluir pessoal que realize diversas atividades incluindo o desenvolvimento, modificação, verificação e validação de métodos e a análise crítica dos seus resultados e a sua devida autorização. As instalações e condições ambientais devem ser adequadas e asseguradas às atividades do laboratório, este deve monitorizar, controlar e registar as condições ambientais de acordo com os métodos ou procedimentos a realizar. Quanto ao equipamento é necessária uma verificação dos equipamentos em uso, deve haver um procedimento que contenha o seu manuseamento, uso e manutenção, para evitar uma má utilização dos equipamentos. Os equipamentos de calibração devem ser calibrados para atender à necessidade de alcançar a exatidão da medição e a incerteza da medição requeridas para fornecer um resultado válido. Todos os equipamentos que necessitam de calibração devem ser etiquetados e identificados para que os colaboradores possam identificar a necessidade de calibração ou o período de validade. São necessárias verificações intermédias para evitar avarias ou falhas de acordo com um procedimento, como é o caso da calibração diária das balanças ou o caso da verificação das micropipetas quando utilizadas (NP EN ISO/IEC 17025, 2018).

Nos requisitos de processos estão referidos diversos pontos como a análise de consultas, propostas e contratos; a seleção, verificação e validação de métodos; a amostragem; o manuseamento de itens de ensaio e calibração; os registos técnicos; a avaliação da incerteza da medição; o assegurar a validade dos resultados obtidos; reclamações; emendas de relatórios;

trabalho não conforme e controlo de dados e gestão da informação. A seleção e verificação de métodos diz-nos que o laboratório deve utilizar métodos e procedimentos adequados para a análise em estudo, e toda a documentação de apoio como normas, manuais, entre outros, devem estar disponíveis para consulta por qualquer colaborador. Os métodos utilizados nos laboratórios devem seguir normas internacionais, ou nacionais, ou organizações fidedignas, no entanto, também é possível a implementação de um método desenvolvido ou modificado pelo próprio laboratório. Todos os desvios ao método acreditado, devem ser considerados não acreditados.

Na validação de métodos são mencionados quatro pontos: métodos não normalizados, revalidação de métodos, validação relevante face às necessidades e registos de validação. Para assegurar a validade dos resultados o laboratório participa em exercícios de comparação interlaboratoriais, utiliza materiais de referência certificados, ensaios com amostras cegas, entre outros definidos na norma NP ISO/IEC 17025 (NP EN ISO/IEC 17025, 2018).

Por fim os requisitos do sistema de gestão. Neste ponto, é possível seguir a opção A ou B. A opção A corresponde à abordagem de pontos como a documentação do sistema de gestão, controlo de documentos do sistema de gestão, controlo de registos, ações para abordar riscos, melhoria, ações corretivas, auditorias internas e análises críticas pela gerência. A opção B corresponde a um laboratório que já teria implementado um sistema de gestão pela norma NP ISO/IEC 9001 e que atenda a todos os requisitos definidos na norma NP ISO/IEC 17025 e que cumpram com os pontos referentes à opção A.

A norma NP ISO/IEC 17025 é uma norma que permite a acreditação de um laboratório e como referido acima, a validação de métodos é um dos pontos dos requisitos de processos. Num laboratório acreditado, a validação dos métodos implementados na empresa é uma mais valia para garantir veracidade e confiabilidade nos seus resultados. A empresa de realização do Estágio, apesar de ter métodos já validados, pretende ampliar as suas validações de métodos e este trabalho veio de acordo com essa necessidade.

7.3. Controlo de qualidade

O controlo de qualidade pretende garantir que os resultados emitidos pelo laboratório são confiáveis, para tal são realizados controlos de qualidade internos e externos. O controlo de qualidade interno está relacionado com a realização de brancos, duplicados, amostras de controlo diário, cartas de controlo e amostras cegas. O controlo de qualidade externo está

relacionado com os materiais certificados de referência e participação em ensaios interlaboratoriais (Magnusson, 2014).

A realização de **brancos** é importante pois permite identificar interferências que possam existir e para eliminar também a contaminação das amostras após um elevado número de leituras. Deve ser realizada a leitura de um branco a cada dez amostras (Magnusson, 2014).

A realização de **duplicados** consiste na realização de dois ensaios da mesma amostra, este ponto fornece uma informação sobre a precisão do método analítico. A realização destes verificam a repetibilidade do método ao longo da sua realização.

A análise de **amostras cegas** fornece um meio de verificar o desempenho do método pois não é do conhecimento do analista que esta amostra é uma amostra cega, portanto é tratada como qualquer outra amostra. Este tipo de análise além de demonstrar o desempenho do método, demonstra também o desempenho do analista (Magnusson, 2014).

As amostras de **controle diário de processos** (DPCs) são amostras que são realizadas no início da realização de cada método, são amostras que são suficientemente estáveis e homogêneas para fornecerem um resultado sempre semelhante. Para controle dos DPCs são formadas cartas de controle que são criadas que contêm pelo menos 20 pontos e o resultado do DPC terá de estar compreendido no intervalo definido na carta de controle.

II - Parte experimental

1. Validação de métodos de ensaio

A validação de um método é descrita como o processo de definição de um requisito e de confirmação de que o método é adequado para a determinação em estudo (Magnusson, 2014). Aquando da validação de um método é necessário descrever e caracterizar o mesmo. A descrição do método interno deve ser realizada em documentos detalhados para fácil execução por qualquer pessoa.

Um documento de um método interno deve conter alguns elementos identificadores como: designação do ensaio, código identificador do ensaio, revisão/edição, data de entrada em vigor com menção dos responsáveis pela elaboração e aprovação e o número da página e total de páginas. O documento deve conter também elementos descritivos do método, nomeadamente resumo, campo de aplicação, equipamento, reagentes e material, processo de calibração e ensaio e o processo do cálculo dos resultados. Por fim, as referências bibliográficas e normativas.

Métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo laboratório e métodos normalizados modificados pelo laboratório devem ser validados (Magnusson, 2014). Sempre que forem realizadas alterações em métodos validados, é necessário observar se estes afetam a validação inicial, e se sim deve ser realizada uma nova validação do método. As características do desempenho dos métodos podem incluir limite de deteção, limite de quantificação, seletividade, linearidade, repetibilidade, entre outras mencionadas na NP ISO/IEC 17025 (NP EN ISO/IEC 17025, 2018).

De acordo com o motivo da alteração de um método ou a sua implementação, são necessários alguns estudos podendo ser feita avaliação direta ou indireta. Por avaliação indireta, o método evidencia as suas características como o estudo de que o método irá corresponder ao objetivo esperado, estudo dos princípios teóricos para evidenciar a base científica do método, estudo de erros e de fatores que possam interferir com o método, estudo das condições operatórias do método e estudo do desempenho do método para conhecer a qualidade dos resultados a partir de diversos parâmetros como: gama de trabalho/linearidade; limiares analíticos (deteção e quantificação); sensibilidade; precisão; exatidão.

A avaliação direta é definida pela comparação com o resultado de um método normalizado, materiais de referência certificados e ensaios interlaboratoriais. Este tipo de avaliação está relacionada com a exatidão dos métodos. Para a avaliação indireta estão

considerados diversos parâmetros: especificidade/seletividade, quantificação, precisão e exatidão (Relacre, 2000).

Avaliação direta

A veracidade é um modo de avaliação direta e é definida a proximidade da média dos resultados com valor de referência (Magnusson, B., 2014) e os métodos utilizados são: materiais de referência certificados; ensaios interlaboratoriais; testes comparativos. Os Materiais de Referência Certificados (MRC) são materiais com valores para as diferentes grandezas definidos com uma incerteza associada e além de serem utilizados para a validação de métodos, poderão também ser utilizados para controlo externo da qualidade.

O resultado obtido na análise de um MRC compara-se com o valor certificado, determinando-se o erro e exatidão da análise. Para avaliação dos resultados obtidos da análise de um MRC adotam-se alguns processos: erro relativo, teste de hipóteses, fator de desempenho Z e erro normalizado (Relacre, 2000). O Grupo da Mérieux NutriSciences utiliza Bipea e Fapas para ensaios de comparação interlaboratorial (ECIs), que são materiais certificados e para análise do desempenho dos métodos, é calculado o fator de desempenho Z, chamado de Z-score, é calculado pela equação 1:

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \quad \text{Equação 1}$$

Onde X_{lab} é o valor obtido no laboratório;

X_v representa o valor aceite como verdadeiro, quer seja o valor certificado do MRC, ou o estabelecido em ensaios laboratoriais;

s é a unidade de desvio, normalmente o desvio padrão do MRC, ou o desvio padrão estabelecido no ensaio laboratorial.

Um valor de Z-score entre -2 e 2 é considerado aceitável, os valores de Z-score entre 2 e 3 ou -2 e -3 são considerados questionáveis e um valor de Z-score maior que 3 ou que -3 é considerado incorreto. Idealmente, o valor obtido de Z-score deveria estar compreendido no intervalo de -2 a 2, quando isto não acontece, é necessário perceber o erro e elaborar um plano de ações corretivas.

Para verificar a veracidade de um método, pode-se calcular o erro de justeza. Este é calculado pela subtração do valor de referência à média dos valores obtidos (equação 2):

$$\text{Erro de justeza (\%)} = \frac{(\bar{x} - Xv)}{Xv} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde Xv é o valor aceite como verdadeiro/valor de referência;
 \bar{x} é a média dos valores obtidos em laboratório.

Avaliação indireta

A avaliação indireta está relacionada com a especificidade e seletividade, quantificação, precisão e exatidão. A seletividade é definida como a capacidade de um método discriminar um analito numa mistura sem interferências. Pode considerar-se um método analítico específico e seletivo quando, após os testes de recuperação, se verificam taxas de recuperação próximas de 100 %.

A quantificação engloba as curvas de calibração, limiares analíticos do método de ensaio e sensibilidade. A calibração pode ser definida como um conjunto de operações que relaciona a resposta obtida com o valor já conhecido de concentração de um conjunto de padrões (Relacre, 2000).

A curva de calibração é obtida através de uma série de soluções padrão com concentração conhecidas, que são medidas num equipamento analítico nas mesmas condições das amostras que se irão analisar posteriormente; após isto, estabelece-se uma curva de calibração e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras. Para aceitar uma curva de calibração é necessário definir o coeficiente de correlação, gama de trabalho, linearidade e declive.

Os limiares analíticos do método de ensaio incluem o limite de deteção e o limite de quantificação. O limite de deteção (LD) é definido como o teor mínimo a partir do qual é possível a deteção do analito, corresponde à menor quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra (equação 3). Por vezes, as leituras são inferiores ao limite de deteção, essa leitura não é significativa pois não se pode garantir a presença ou ausência do analito.

$$LD = X_0 + K * \sigma_0 \quad \text{Equação 3}$$

Onde X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio, lidos ao longo de vários dias de trabalho;
 σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 ;

K é uma constante, $K \simeq 3,3$ para um nível de confiança de cerca de 99,7 %.

O limite de quantificação (LQ) designa-se como a menor concentração a partir do qual podemos quantificar o analito (equação 4). Normalmente, corresponde ao valor mais baixo do padrão da curva de calibração (Relacre, 2000).

$$LQ = X_0 + 10 * \sigma_0 \quad \text{Equação 4}$$

Onde X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos lidos ao longo de vários dias de trabalho;

σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 .

A sensibilidade avalia a capacidade de um método para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito e é definida pelo quociente entre o valor lido (ΔL) e a variação da concentração (ΔC) (equação 5).

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \text{Equação 5}$$

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios repetidos de uma mesma amostra, entre ensaios independentes, amostras semelhantes, em condições definidas e constantes. São calculados três tipos de precisão: a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia.

A **repetibilidade** é conhecida como a precisão de um método sobre uma mesma amostra, em condições constantes, e é determinada a partir da repetição de sete vezes ou mais de uma amostra, em condições constantes, em ensaios realizados no próprio laboratório. No entanto, a repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial, o número de medições pode ser inferior a dez vezes, mas superior a duas vezes. O limite da repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença entre dois ensaios com as mesmas condições (Relacre, 2000).

Para o cálculo do limite da repetibilidade é necessário calcular diversos parâmetros, nomeadamente calcular a média (equação 6):

$$\text{Média} = \bar{x} = \frac{\sum x_{lab}}{n} \quad \text{Equação 6}$$

Onde \bar{x} é a média dos resultados;

$\sum x_{lab}$ é o somatório dos valores obtidos no laboratório;
 n é o número de ensaios realizados.

Após o cálculo da média, é necessário calcular a variância (equação 7):

$$\text{Variância} = S_{ri}^2 = \frac{\sum(x_{lab} - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \text{Equação 7}$$

Onde S_{ri}^2 é a variância;
 x_{lab} é o valor obtido em laboratório;
 \bar{x} é a média dos resultados;
 $n - 1$ são os graus de liberdade.

É ainda necessário calcular o desvio padrão, que é a raiz quadrada da variância (equação 8):

$$\text{Desvio padrão} = S_{ri} = \sqrt{S_{ri}^2} \quad \text{Equação 8}$$

Onde S_{ri} é o desvio padrão.
 S_{ri}^2 é a variância.

O limite da repetibilidade, para um nível de confiança de 95%, é calculado pela equação 9:

$$\text{Limite de repetibilidade} = r = 2,8 * S_{ri} \quad \text{Equação 9}$$

Onde r é o limite de repetibilidade;
 S_{ri} é o desvio padrão.

O limite de repetibilidade relativo é calculado pela equação 10:

$$\text{Limite da repetibilidade relativo} = \frac{r}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Equação 10}$$

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) é calculado com auxílio da equação 11 e é expresso em percentagens. Este corresponde ao desvio padrão de repetibilidade a dividir pela média dos valores considerados (\bar{x}).

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Equação 11}$$

O Teste de Grubbs permite-nos verificar a presença de valores extremos quando comparados com o conjunto de resultados obtidos. Para o teste de Grubbs o valor mínimo é o valor mais baixo dos ensaios realizados na mesma matriz e o valor máximo é o valor mais elevado dos ensaios realizados na mesma matriz.

Os valores de Gp mínimo e máximo, são definidos como os valores de Grubbs mínimos e máximos, são calculados com o auxílio da equação 12 e 13, respetivamente:

$$Gp \text{ mínimo} = \frac{\bar{x} - x_{\text{valor mínimo}}}{S_{ri}} \quad \text{Equação 12}$$

Onde \bar{x} é o valor médio;

$x_{\text{valor mínimo}}$ é o valor mínimo dos ensaios realizados;

S_{ri} é o desvio padrão.

$$Gp \text{ máximo} = \frac{\bar{x} - x_{\text{valor máximo}}}{S_{ri}} \quad \text{Equação 13}$$

Onde \bar{x} é o valor médio;

$x_{\text{valor máximo}}$ é o valor máximo dos ensaios realizados;

S_{ri} é o desvio padrão.

O teste C de Cochran (equação 14) avalia e compara as variâncias, comparando a maior variância obtida com a soma de todas as variâncias, tendo em consideração os valores críticos de Cochran, presentes no anexo H:

$$C = \frac{S_{ri(máx)}^2}{\Sigma S_{ri}^2} \quad \text{Equação 14}$$

Onde $S_{ri(máx)}^2$ é o quadrado da maior variância;

ΣS_{ri}^2 é o somatório de todas as variâncias.

O Teste C de Cochran compara o valor crítico tabelado para um grau de confiança de 95 % com a maior variância obtida nas réplicas das diferentes matrizes. Se o C de Cochran for menor que o C calculado (para o nível de significância de 5 %; equação 14), o valor é aceite.

Após o cálculo da repetibilidade, Teste de Grubbs e Teste C de Cochran, e após verificação da aceitação destes resultados, é possível relacionar as matrizes entre si calculando o valor do limite da repetibilidade, o valor do limite da repetibilidade relativo e o valor do

coeficiente de variação médio relativo. Estas variáveis têm em conta as médias dos limites de repetibilidade, dos limites de repetibilidade relativos e dos coeficientes de variação médios relativos.

O valor do limite da repetibilidade é calculado pela equação 15:

$$\text{Valor do limite da repetibilidade} = V.L.R. = \frac{\sum r}{N} \quad \text{Equação 15}$$

Onde r é o limite da repetibilidade;

N é o número de matrizes em estudo.

O valor do limite da repetibilidade relativo é calculado pela equação 16:

$$\begin{aligned} \text{Valor do limite da repetibilidade relativo} &= \\ &= \frac{\sum \text{Limite de repetibilidade relativo}}{N} \end{aligned} \quad \text{Equação 16}$$

O cálculo do coeficiente de variação médio relativo é calculado pela equação 17:

$$\text{Coeficiente de variação médio relativo} = \overline{CV_r} = \frac{\sum CV_r}{N} \quad \text{Equação 17}$$

Onde CV_r é o desvio padrão relativo.

A **reprodutibilidade** é definida como a precisão de um método em condições diferentes sobre a mesma amostra, e é determinada a partir de ensaios interlaboratoriais, onde se faz variar os laboratórios, operadores ou épocas. O limite da reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar com uma probabilidade de 95% a diferença entre dois resultados com condições referidas anteriormente (Relacre, 2000). O valor da variância associada a este estudo calcula-se pela equação 18:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad \text{Equação 18}$$

Onde S_{Li}^2 é a variância interlaboratorial e a outra variável é a variância da repetibilidade, já mencionada anteriormente.

A reprodutibilidade, para um nível de confiança de 95%, é calculada da mesma forma que a repetibilidade, utilizando a mesma equação, mas substituindo o desvio padrão, que nesta

variante, é o desvio padrão da reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório (S_{Ri}) (equação 19).

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} \quad \text{Equação 19}$$

O coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R) é calculado pela equação 20:

$$CV_r = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Equação 20}$$

A **precisão intermédia** é outra variante que se refere à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método no mesmo laboratório, mas com uma ou mais condições a variar, analistas, equipamentos, entre outros (Relacre, 2000). Este parâmetro pode ser avaliado com a realização de duplicados, em diferentes dias.

Para o cálculo do limite de precisão intermédia é necessário calcular o desvio padrão da precisão intermédia (S_i ; equação 21):

$$\text{Desvio padrão da precisão intermédia} = S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum (D1 - D2)^2} \quad \text{Equação 21}$$

Onde S_i é o desvio padrão da precisão intermédia;

t é o número de duplicados em análise;

$D1$ é o ensaio 1 dos duplicados realizados;

$D2$ é o ensaio 2 dos duplicados realizados.

Após o cálculo do desvio padrão da precisão intermédia, é necessário calcular o limite de precisão intermédio (equação 22):

$$\text{Limite de precisão intermédio} = \frac{S_i * 2,8}{\bar{x}_{duplicados}} \quad \text{Equação 22}$$

Onde $\bar{x}_{duplicados}$ corresponde à média dos duplicados realizados.

2. Extração da gordura dos alimentos

A metodologia utilizada para a extração da gordura difere consoante a amostra em estudo. Na empresa existe um método de extração para leites e iogurtes, outro método de extração para azeites, gorduras, banhas, margarinas e outro para as restantes amostras.

2.1. Amostras denominadas de gerais no laboratório

Como amostras gerais entendem-se bolachas, cereais, barras de cereais, farinhas, pastelarias, pescados, carnes, pratos cozinhados, entre outras.

Nestas amostras a extração de gorduras é realizada da seguinte forma: num gobelé de 400 mL, adicionar cerca de 100 g de amostra. Juntar 125 mL de uma solução de n-hexano:2-propanol (3:2). Agitar com o auxílio de uma vareta de vidro. Verter para um balão de fundo redondo com auxílio a um funil com filtro e sulfato de sódio anidro. Evaporar, num evaporador rotativo a 55 °C, até o solvente ser evaporado sendo assim obtida a gordura. Colocar o balão numa estufa a 80 °C para retirar qualquer solvente ainda presente na amostra.

Este procedimento é semelhante para os diferentes tipos de matrizes. Quando as amostras são bolachas, barras de cereais, cereais e farinhas, a solução fica turva sendo necessária a centrifugação.

2.2. Produtos lácteos

Para os produtos lácteos é utilizada a norma ISO 15885. Para extrair a gordura de produtos lácteos é necessário colocar 100 mL de amostra numa âmpola. No caso do leite em pó, pesar 10 g da amostra para um balão volumétrico de 100 mL e adiciona-se água desionizada até dissolver e aferir. Adicionar à amostra 20 mL de amónia, 80 mL de etanol absoluto e 100 mL de éter dietílico. Agitar para libertar o gás e agitar novamente durante um minuto. Após a separação de fases, adicionar 100 mL de n-hexano e agitar para libertar o ar. Quando as fases estiverem separadas, rejeitar a fase inferior. Adicionar 100 mL da solução de sulfato de sódio (100 g/L), agitar para libertar o gás e rejeitar a fase inferior. Adicionar 100 mL de sulfato de sódio (100 g/L), agitar para libertar o gás e agitar durante um minuto. Rejeitar a fase inferior e filtrar para um balão de fundo redondo com auxílio de um funil com filtro e sulfato de sódio. Evaporar a 60 °C num evaporador rotativo. Após a evaporação do solvente, levar à estufa, a 80 °C, para retirar qualquer resto de solvente.

2.3. Azeites e óleos

Para as amostras de azeites e óleos não é necessária extração da gordura. Para a metilação destas amostras é retirado diretamente o volume necessário da matriz azeite e óleo.

3. Metilação dos ácidos gordos para ésteres metílicos

Para a metilação da gordura é utilizada uma solução metanólica de hidróxido de potássio. Para a preparação desta solução pesar 11,2 g de hidróxido de potássio (KOH) em 100 mL de metanol, levar ao banho de ultra-sons. Após a total dissolução do KOH, deixar arrefecer e aferir. Esta solução tem validade de uma semana.

3.1. Amostras denominadas de gerais

Após a secagem na estufa, pipetar para um tubo de 10 mL, 0,1 mL da gordura da amostra, adicionar 5 mL de isoctano. Após agitação, adicionar 200 µL da solução de hidróxido de potássio e agitar os tubos durante 1 minuto, levando à formação de ésteres metílicos dos ácidos gordos que são compostos mais voláteis para análise no cromatógrafo gasoso. Após trinta minutos, é visível observar um precipitado no fundo do tubo, podendo transferir-se o sobrenadante para um vial de 2 mL e a análise é feita por GC-FID.

Consoante o tipo de amostras a quantidade de gordura é variável. Há amostras que apresentam pouca quantidade de gordura, não sendo possível obter os 100 µL necessários para a metilação. Neste tipo de amostras, o solvente é adicionado diretamente ao balão, em função da gordura no balão. No caso de a amostra apenas apresentar gordura nas paredes a quantidade de solvente utilizada é de 2 mL.

3.2. Produtos lácteos e derivados

Pipetar 100 µL da gordura da amostra e adicionar 5 mL de n-heptano. Após agitação, adicionar 200 µL da solução de hidróxido de potássio (2.2) e agitam-se os tubos durante 1 minuto. Deixar repousar até que a parte superior da solução fique límpida e decantar essa solução para um vial para injeção no cromatógrafo gasoso. A utilização de n-heptano como solvente para uma posterior metilação da gordura, não é apenas utilizada em produtos lácteos com este tipo de extração, mas em todos os derivados lácteos, nomeadamente queijos.

3.3. Azeites, óleos e gorduras

Os azeites são preparados de acordo com o regulamento nº 796/2002.^[3] Este regulamento indica-nos que para a preparação de ésteres metílicos do azeite é necessário pipetar 0,1 mL da amostra de azeite, adicionar 2 mL de n-heptano e agitar. Adicionar 0,2 mL da solução metanólica de hidróxido de potássio e agitar energicamente. Quando o sobrenadante ficar límpido pode passar-se este para um vial para ser injetado no cromatógrafo gasoso.

Para amostras como o óleo e gorduras utiliza-se o método adotado para os azeites, utilizando isoctano como solvente.

4. Condições cromatográficas de análise dos compostos de interesse

O método usado para este tipo de análise apresenta as seguintes condições:

Coluna: capilar, 60m x 250 μ m x 0,20 μ m; Detetor FID: 280 °C; Injetor: split 150:1, a 250 °C; Forno: 250 °C. Fluxo: contante a 1,105 [mL/min]; Gás de transporte: Ar comprimido e Hidrogénio (10:1); Detetor 280 °C. Volume de injeção: 0,60 μ L; Tempo de análise: 17 minutos.

Antes de cada injeção, a seringa é lavada três vezes com solvente; após a injeção, a seringa é lavada novamente três vezes com solvente. Para a realização de uma série de amostras é necessária recorrer a uma sequência de análise: Leitura de um branco, nomeadamente isoctano, para verificar que não existem interferências que possam levar à falsa identificação de um pico cromatográfico correspondente a um ácido gordo; leitura uma mistura de padrões C37. Esta mistura contém 37 ésteres metílicos de ácidos gordos; leitura de um material de referência, denominado de amostra de controlo de qualidade; leitura das amostras. A cada dez amostras, fazer a leitura de um branco para limpeza e confirmação de que não existem interferências.

4.1. Mistura de padrões C37

A mistura de padrões C37 contém 37 ésteres metílicos de ácidos gordos e esta pretende confirmar que os ácidos gordos estão a ser corretamente identificados, a partir do tempo de retenção, e o cálculo da percentagem da área de cada éster metílico, fornecendo os fatores de resposta. Na figura 6 é possível observar os ácidos gordos existentes na mistura de padrões.

Table 1. Composition of Supelco 37 Component FAME Mix

Peak ID [■]	Component (acid methyl esters)	Weight (%)
1	C4:0 (Butyric)	4
2	C6:0 (Caproic)	4
3	C8:0 (Caprylic)	4
4	C10:0 (Capric)	4
5	C11:0 (Undecanoic)	2
6	C12:0 (Lauric)	4
7	C13:0 (Tridecanoic)	2
8	C14:0 (Myristic)	4
9	C14:1 (Myristoleic)	2
10	C15:0 (Pentadecanoic)	2
11	C15:1 (<i>cis</i> -10-Pentadecenoic)	2
12	C16:0 (Palmitic)	6
13	C16:1 (Palmitoleic)	2
14	C17:0 (Heptadecanoic)	2
15	C17:1 (<i>cis</i> -10-Heptadecenoic)	2
16	C18:0 (Stearic)	4
17	C18:1n9c (Oleic)	4
18	C18:1n9t (Elaidic)	2
19	C18:2n6c (Linoleic)	2
20	C18:2n6t (Linolelaidic)	2
21	C18:3n6 (γ -Linolenic)	2
22	C18:3n3 (α -Linolenic)	2
23	C20:0 (Arachidic)	4
24	C20:1n9 (<i>cis</i> -11-Eicosenoic)	2
25	C20:2 (<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoic)	2
26	C20:3n6 (<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoic)	2
27	C20:3n3 (<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoic)	2
28	C20:4n6 (Arachidonic)	2
29	C20:5n3 (<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic)	2
30	C21:0 (Henicosenoic)	2
31	C22:0 (Behenic)	4
32	C22:1n9 (Erucic)	2
33	C22:2 (<i>cis</i> -13,16-Docosadienoic)	2
34	C22:6n3 (<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic)	2
35	C23:0 (Tricosanoic)	2
36	C24:0 (Lignoceric)	4
37	C24:1n9 (Nervonic)	2

■ Peak numbers in Figures A–D.

Figura 6: Composição da mistura de padrões C37.^[4]

Cada ácido gordo apresenta um tempo de retenção que é característico. Após a identificação na mistura de padrões, a percentagem de ácidos gordos na amostra pode ser calculada a partir da área correspondente a cada ácido gordo. Para os cálculos posteriores é necessário calcular o F (equação 23) que relaciona a quantidade do éster metílico de ácidos gordos (FAME) com a área do FAME no padrão.

$$F = \frac{\text{Quantidade do FAME}}{\text{Área do FAME do padrão}} \quad \text{Equação 23}$$

Após este cálculo, é necessário calcular a percentagem de cada FAME presente na amostra, equação (24).

$$\% (FAME \text{ na amostra}) = \frac{\text{Área (FAME)} \times F}{\sum \text{Áreas}} \quad \text{Equação 24}$$

Este valor é normalizado com auxílio à equação 25, onde é calculada a % do éster metílico de ácido gordo normalizado:

$$\% (FAME \text{ na amostra}) \text{ normalizado} = \frac{\% (FAME \text{ na amostra})}{\sum \% (FAMEs \text{ na amostra})} \quad \text{Equação 25}$$

A conversão de FAME para ácidos gordos tem em consideração o fator fAGi, anexo I. Este fator fAGi denomina-se como o fator de conversão individual de um FAME para o ácido

gordo correspondente. A percentagem de ácido gordo presente na amostra é o produto da área do FAME por fAGi, (equação 26).

$$\% (AG \text{ na amostra}) = \text{Área}_{FAME}(\%) \times fAGi \quad \text{Equação 26}$$

Para efetuar a normalização dos resultados, divide-se a % de AG na amostra pelo somatória das % dos ácidos gordos na amostra, (equação 27).

$$\% (AG \text{ na amostra}) \text{ normalizado} = \frac{\% (AG \text{ na amostra})}{\sum \% (AGs \text{ na amostra})} \quad \text{Equação 27}$$

5. Análises realizadas para a validação de métodos

Para a validação dos métodos realizada neste trabalho foram realizadas extrações de sete amostras: salmão, atum em conserva, panado misto e maionese que são amostras extraídas como amostras gerais. As amostras de banha de porco e óleo vegetal são extraídas como um azeite. O leite em pó é extraído como um produto lácteo.

Para o estudo de repetibilidade foram realizados dez ensaios no mesmo dia das sete amostras. Para o estudo da precisão intermédia foram realizados dois duplicados em cinco dias diferentes, para as amostras óleo vegetal, banha de porco, salmão, atum em conserva, panado misto e maionese.

III - Resultados e discussão

Este trabalho foi realizado na presença da analista principal para acompanhar o método e foram sempre utilizados *Daily Process Control* (DPC), ou seja, uma amostra de controlo diário, para verificar se os resultados obtidos estavam no intervalo definido pela empresa.

1. Mistura de padrões C37

A mistura de padrões C37 permite a identificação dos diferentes compostos e na figura 7 é possível verificar um cromatograma obtido para esta mistura de padrões. Esta mistura permite-nos identificar os picos dos diferentes ácidos gordos, tal como definir o seu fator de resposta. É necessária sempre a verificação desta mistura confirmando a integração correta dos picos, com auxílio do certificado de análise que nos fornece a informação dos picos existentes e a quais ácidos gordos estes correspondem.

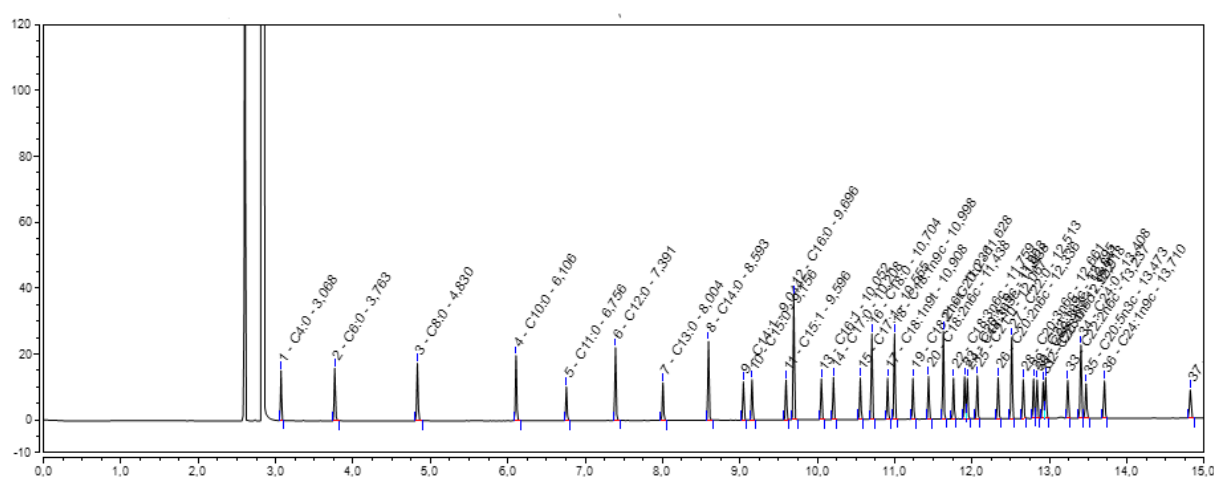


Figura 7: Cromatograma da mistura de padrões C37.

2. Matrizes analisadas

Para a validação do método, nomeadamente avaliação da veracidade, repetibilidade e precisão intermédia foram analisadas sete matrizes diferentes: óleo vegetal, banha de porco, atum em conserva, salmão, maionese, panado misto e leite em pó.

As matrizes óleo vegetal, salmão e maionese correspondem a materiais de referência certificados (MRC), o que nos permite avaliar o desempenho analítico do método pela comparação dos intervalos definidos do MRC com os diversos parâmetros em estudo, avaliando a sua veracidade.

2.1. Veracidade

A veracidade é definida como a justeza de medição e é a concordância entre a média dos ensaios realizados e o valor de referência. A veracidade deste método foi demonstrada pela comparação dos resultados obtidos no laboratório com os valores presentes nos certificados de análise dos materiais de referência em estudo. Além da comparação dos resultados com o intervalo definido pelos certificados de análise dos diferentes MRC, também foi calculado o Z-score e o erro de justeza para as matrizes salmão e maionese de modo a demonstrar o desempenho do método.

a. Óleo vegetal

Na figura 8 encontra-se um cromatograma referente à matriz óleo vegetal. Tratando-se de um óleo, as abundâncias dos ácidos gordos variam consoante a sua origem, e esta matriz apresenta uma elevada percentagem ácidos gordos polinsaturados: presença de C18:2n6c e C18:3n3c.

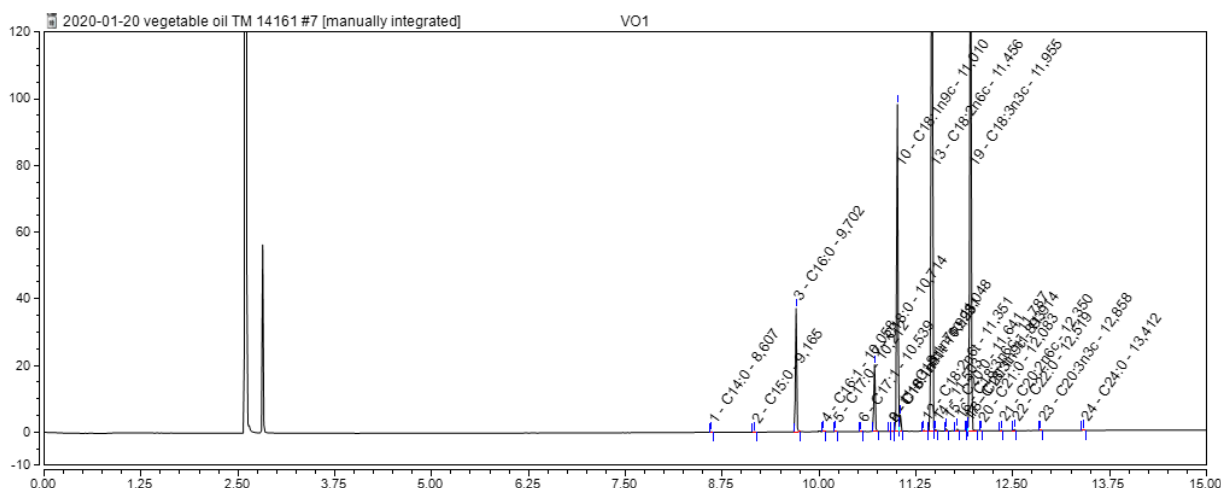


Figura 8: Cromatograma obtido por GC-FID para o óleo vegetal.

Na tabela 1 encontram-se discriminados os valores de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados em percentagem, assim como o intervalo definido pelo certificado do MRC, presente no anexo E, intervalo para o qual o valor obtido em laboratório deve estar compreendido para que o Z-score seja menor ou igual a 2. Através da comparação dos valores da tabela 1 com os valores de intervalo definidos pelo certificado, verifica-se que os valores obtidos em laboratório estão dentro do intervalo, assumindo-se assim que os valores são aceitáveis.

Tabela 1: Resultados para os nove ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e valores do intervalo de aceitação dos resultados retirados do certificado do MRC para a matriz óleo vegetal.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Intervalo
Sat.	9,620	9,690	9,610	9,680	9,660	9,690	9,720	9,650	9,670	8,500-10,39
Mon.	17,56	17,58	17,58	17,58	17,57	17,57	17,56	17,59	17,58	15,32-18,72
Pol.	72,77	72,67	72,76	72,69	72,72	72,69	72,66	72,72	72,70	66,87-75,41

Na tabela 2 estão discriminados os valores para o ácido linoléico (C18:2n6c), linolénico (C18:3n3c), oleico (C18:1n9c), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0).

Tabela 2: Resultados para os nove ensaios realizados no mesmo dia para o ácido linoleico (C18:2n6c), o ácido linolénico (C18:3n3c), o ácido oleico (C18:1n9c), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0), para o óleo vegetal.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	Intervalo
C18:2n6c	37,57	37,54	37,56	37,55	37,55	37,54	37,52	37,56	37,53	34,92-39,38
C18:3n3c	35,06	35,00	35,07	35,01	35,04	35,02	35,01	35,03	35,04	31,87-35,93
C18:1n9c	16,63	16,63	16,63	16,63	16,63	16,63	16,62	16,65	16,64	14,80-18,08
C16:0	5,920	5,940	5,920	5,930	5,900	5,930	5,960	5,940	5,910	5,200-6,360
C18:0	3,440	3,450	3,450	3,450	3,450	3,460	3,460	3,460	3,460	3,050-3,730

Para estes ácidos gordos foi possível verificar também que os valores estavam compreendidos no intervalo definido pelo certificado do MRC (anexo E), pois na tabela 2, podemos observar que os valores obtidos, para as diferentes réplicas realizadas no mesmo dia, estão compreendidos no intervalo esperado.

Na tabela 3, podemos observar o erro de justeza obtido para a matriz óleo vegetal, calculado com auxílio à equação 2. Os valores de referência estão no anexo E. Como é possível observar, os erros de justeza são positivos, o que nos indica que os valores obtidos laboratorialmente são superiores ao valor de referência presente no certificado, todos os erros de justeza são inferiores a 10%. Na tabela 3 estão sobre a veracidade/justeza do método. Ao dividir o valor médio obtido dos resultados experimentais pelo valor de referência presente no certificado do MRC, é possível observar que quanto mais próximo de 1, mais o valor obtido nos ensaios laboratoriais se aproxima do valor real, concluindo que maior será a veracidade/justeza.

Tabela 3: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz óleo vegetal, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experiencialmente com o valor referência.

	Média	Valor Referência	Erro de Justeza	Média Valor Ref.
Saturados	9,665	9,45	2,3 %	1,023
Monoinsaturados	17,57	17,02	3,3 %	1,033
Polinsaturados	72,71	71,14	2,2 %	1,022

b. Salmão

Na figura 9 podemos observar o cromatograma associado à matriz de salmão. Este cromatograma é característico de um pescado, pois podemos notar a presença dos ácidos gordos ómeegas. A presença do ácido gordo Eicosapentaenóico (C20:5n3c), também denominado por EPA e do ácido gordo Docosahexaenóico (C22:6n3c), conhecido por DHA, são características de matrizes de pescados. O salmão apresenta uma percentagem de ácidos gordos saturados entre os 15 a 16 %, uma percentagem de ácidos gordos monoinsaturados de 47 a 49 % e uma percentagem de ácidos gordos polinsaturados de 35 a 38 %. O salmão também apresenta ácido erúcido.

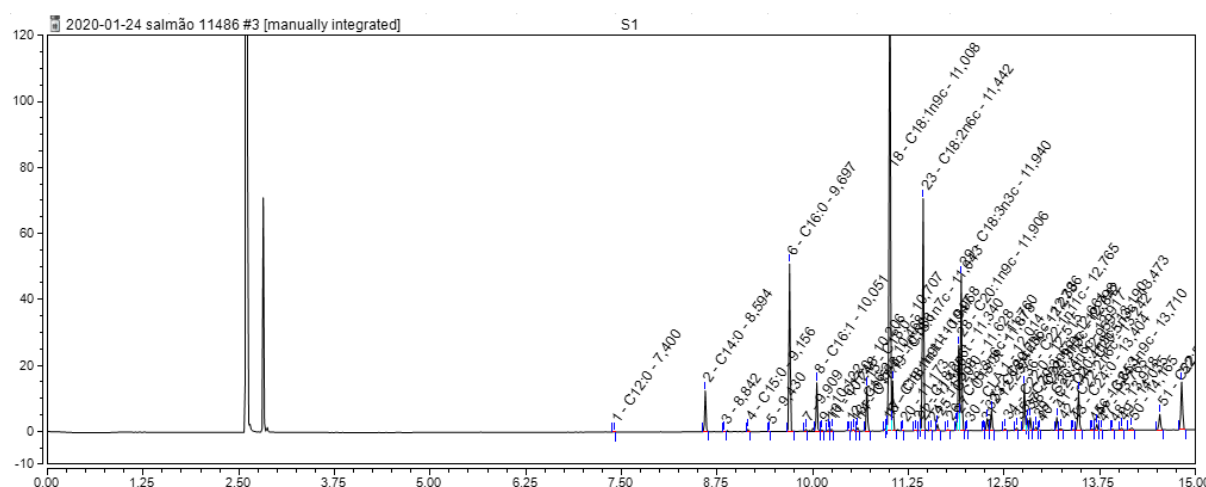


Tabela 4: Ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e intervalo definido no certificado do MRC da matriz salmão.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Intervalo	Média
Sat.	15,56	15,51	15,52	15,51	15,5	15,5	15,53	15,5	15,58	15,52	15,5-18,9	15,52
Mon.	48,87	48,86	48,83	48,89	48,81	48,91	48,91	48,87	48,76	48,79	44,7-51,7	48,85
Pol.	35,3	35,38	35,41	35,38	35,4	35,33	35,24	35,29	35,37	35,42	30,3-37,2	35,35

Na tabela 4 estão apresentados os valores de repetibilidade obtidos para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Os Z-score calculados para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, foram, respetivamente, 0,93, 0,31 e 0,62. Estes três valores de Z-score obtidos nesta matriz estão no intervalo admitido, considerando-se assim os valores aceitáveis.

Tabela 5: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas no mesmo dia e o intervalo definido no certificado do MRC da matriz salmão.

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Intervalo do MRC
C04:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C06:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C14:0	2,45	2,45	2,41	2,46	2,46	2,46	2,45	2,51	2,45	2,45	1,90-2,90
C14:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C15:0	0,19	0,17	0,16	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,17	0,19	0,00-0,70
C15:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,50
C15:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,50
C15:1n5c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C16:0	9,66	9,6	9,63	9,63	9,62	9,62	9,61	9,68	9,61	9,66	8,90-10,9
C16:1n7c	2,77	2,96	2,62	2,95	2,88	2,99	2,81	3,01	2,95	2,77	2,20-3,20
C16:2n4c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C16:3n4C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C17:0	0,15	0,19	0,15	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,00-0,70
C17:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,60
C17:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,50
C17:1n7c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,60
C18:0	2,51	2,47	2,55	2,49	2,51	2,49	2,52	2,48	2,5	2,51	2,3,0-3,30
C18:1	36,82	36,85	37,19	37	36,9	37,28	37,31	36,87	37,33	36,82	33,3-40,3
C18:2	13,42	13,49	13,52	13,51	13,47	13,5	13,65	13,47	13,63	13,42	12,2-14,9

Tabela 5: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas no mesmo dia e o intervalo definido no certificado do MRC da matriz salmão (continuação).

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Intervalo do MRC
C18:3	9,91	9,74	9,52	9,85	9,76	9,75	9,94	9,83	9,47	9,91	8,20-10,0
C18:4n3c	0,7	0,76	0,76	0,77	0,76	0,75	0,6	0,76	0,76	0,7	0,20-1,20
C20:0	0,36	0,38	0,39	0,38	0,38	0,38	0,39	0,38	0,39	0,36	0,00-0,90
C20:1n9c	5,48	5,34	5,34	5,17	5,39	5,24	5,05	5,24	4,75	5,48	4,50-5,50
C20:2n6c	1,25	1,26	1,29	1,27	1,28	1,26	1,1	1,26	1,29	1,25	0,70-1,70
C20:3n3c	0,86	0,85	0,86	0,86	0,86	0,85	0,87	0,84	0,88	0,86	0,40-1,40
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,2	0,19	0,2	0,00	0,00	0,00-0,50
C20:4n3c	0,94	0,91	0,91	0,92	0,92	0,91	0,93	0,91	0,93	0,94	0,40-1,40
C20:4n6c	0,1	0,28	0,23	0,28	0,28	0,28	0,29	0,28	0,29	0,1	0,00-0,80
C20:5n3c	2,88	2,85	2,89	2,86	2,86	2,83	2,9	2,83	2,93	2,88	2,20-3,20
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C22:0	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,00-0,70
C22:1n9c	0,73	0,75	0,76	0,74	0,75	0,75	0,76	0,73	0,76	0,73	0,20-1,20
C22:1n11c	3,07	2,93	2,98	2,95	2,99	2,93	3	2,91	3,04	3,07	2,40-3,40
C22:2n6c	0,00	0,13	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,60
C22:5n3c	1,33	1,29	1,32	1,29	1,3	1,27	1,31	1,27	1,32	1,33	0,80-1,80
C22:6n3c	4,23	4,1	4,18	4,08	4,1	4,05	4,14	4,02	4,15	4,23	3,70-4,70
C23:0	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00	
C24:0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,00-0,60
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,90

Na tabela 5 estão presentes os dez diferentes ensaios realizados para a matriz de salmão e na última coluna estão os intervalos definidos pelo certificado do MRC (anexo F). Pela análise da tabela 5 conclui-se que os ácidos gordos estão todos compreendidos dentro do intervalo definido no MRC.

O erro de justeza é calculado pela equação 2 e está na tabela 6.

Tabela 6: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz salmão, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experientialmente com o valor referência.

	Média	Valor Referência	Erro de Justeza	Média Valor Ref.
Saturados	15,52	17,20	-9,8 %	0,902
Monoinsaturados	48,85	48,20	1,3 %	1,01
Polinsaturados	35,35	33,80	4,6 %	1,05

Na tabela 6 podemos observar que o erro de justeza mais elevado é o correspondente aos ácidos gordos saturados, o que nos indica que a média dos resultados obtidos para os erros de justeza obtidos, é a que é mais diferenciada. Isto também pode ser observado pelo cálculo da proximidade da média ao valor de referência que para os ácidos gordos saturados é 0,9023, um valor afastado do valor ideal, 1.

c. Maionese

O cromatograma obtido para a matriz maionese encontra-se na figura 10. O teor de ácidos gordos monoinsaturados está relacionado com o C18:1n9c, sendo o ácido gordo com maior expressão na matriz de maionese. O teor de ácidos gordos polinsaturados está relacionado com o C18:2n6c e C18:3n3c.

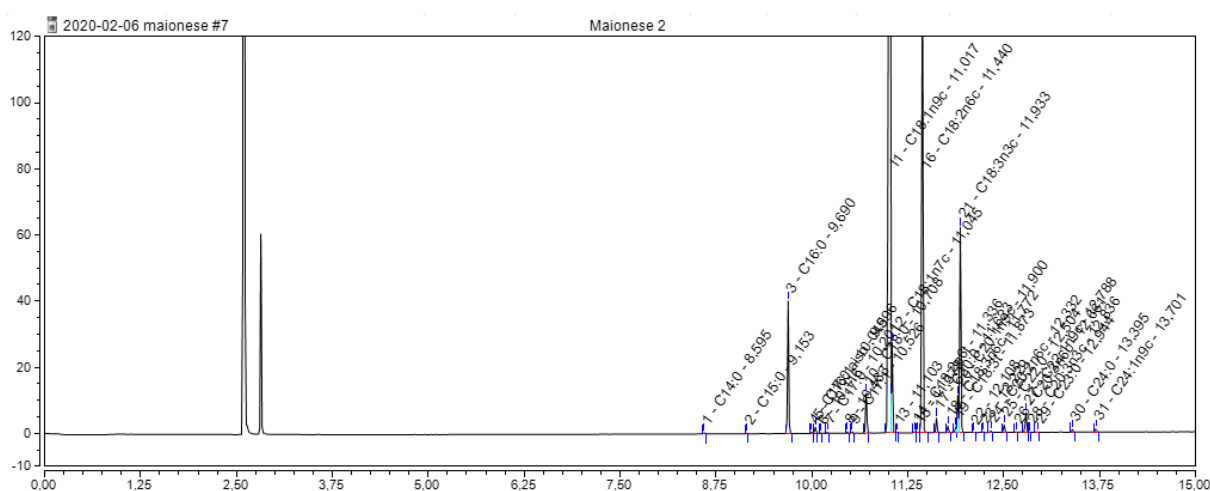


Figura 10: Cromatograma obtido por GC-FID de uma amostra de maionese.

A maionese é um material certificado de referência o que permitiu a comparação dos resultados obtidos com o intervalo definido no certificado do MRC (anexo H).

Tabela 7: Resultados para os dez ensaios realizados no mesmo dia para os ácidos gordos saturados (sat.), monoinsaturados (mon.) e polinsaturados (pol.) e valores do intervalo de aceitação dos resultados retirados do certificado do MRC para a maionese.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Int.	Média
Sat.	7,340	7,390	7,460	7,440	7,460	7,430	7,400	7,440	7,370	7,320	6,7-8,3	7,410
Mon.	65,00	64,90	64,89	64,91	64,86	64,92	64,90	64,92	64,98	64,98	60,9-67,9	64,93
Pol.	27,39	27,45	27,38	27,38	27,43	27,39	27,43	27,37	27,38	27,43	24,7-30,3	27,40

Na tabela 7 estão discriminadas as percentagens de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados obtidos para as 10 amostras para o cálculo da repetibilidade. Na tabela 6 estão discriminados os valores do perfil de ácidos gordos obtidos para as 10

amostras em condições de repetibilidade. É possível verificar que todos os valores se encontram dentro do intervalo definido pelo certificado do MRC.

Os Z-score calculados para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, foram, respetivamente, 0,30, 0,88 e 0,11 e como é possível verificar, os valores de Z-score obtidos para esta matriz estão inseridos no intervalo definido, o que nos indica que os valores são aceitáveis.

Na tabela 8 estão apresentados os resultados obtidos para as dez réplicas realizadas no mesmo dia da matriz maionese e o intervalo do MRC.

Tabela 8: Resultados obtidos para os ácidos gordos das dez réplicas realizadas e o intervalo definido no MRC da maionese.

Ácidos gordos											Intervalo do MRC
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	
C04:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C06:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C14:0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0-0,6
C14:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C15:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0-0,5
C15:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,50
C15:1n5c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C16:0	4,80	4,80	4,89	4,87	4,88	4,86	4,82	4,85	4,79	4,78	4,40-5,40
C16:1n7c	0,24	0,24	0,25	0,24	0,25	0,25	0,24	0,25	0,24	0,25	0,00-0,70
C16:2n4c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C16:3n4c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C17:0	0,00	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00	
C17:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C17:0 aiso	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,00-0,50
C17:1n7c	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	
C18:0	1,53	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52	1,53	1,53	1,53	1,10-2,10
C18:1	62,45	62,27	62,34	62,34	62,22	62,37	62,30	62,35	62,38	62,35	58,3-65,3
C18:2	19,00	19,08	18,98	18,99	19,06	18,95	19,06	18,97	18,98	19,07	17,4-21,2
C18:3	8,59	8,56	8,59	8,58	8,55	8,59	8,56	8,59	8,59	8,55	7,60-9,40
C18:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabela 8: Resultados obtidos para os ácidos gordos das dez réplicas realizadas e o intervalo definido no MRC da maionese (continuação).

Ácidos gordos											Intervalo do MRC
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	
C20:0	0,51	0,51	0,51	0,50	0,50	0,51	0,51	0,51	0,52	0,51	0,00-1,00
C20:1n9c	1,34	1,37	1,31	1,33	1,36	1,32	1,36	1,32	1,33	1,36	0,90-1,90
C20:2n6c	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,00-0,60
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C20:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C20:4n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C22:0	0,29	0,29	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,29	0,28	0,00-0,80
C22:1n9c	0,77	0,81	0,77	0,78	0,81	0,77	0,80	0,80	0,80	0,81	0,30-1,30
C22:1n11c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00-0,50
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C22:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
C24:0	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12	0,00-0,60
C24:1n9c	0,15	0,16	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,00-0,70

Como é possível observar, os valores obtidos em laboratório estão dentro dos limites definidos no certificado do MRC da matriz maionese (anexo F).

Na tabela 9 encontram-se discriminados os valores médios dos ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, os valores de referência correspondentes, os erros de justeza e a comparação do valor médio obtido em laboratório com o valor de referência presente no certificado do MRC.

Tabela 9: Média dos valores obtidos em laboratório para os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados da matriz maionese, o seu valor de referência, o respetivo erro de justeza e o cálculo da aproximação do valor obtido experiencialmente com o valor referência.

	Média	Valor Referência	Erro de Justeza	Média Valor Ref.
Saturados	7,410	7,500	-1,2 %	0,9880
Monoinsaturados	64,93	64,40	0,8 %	1,008
Polinsaturados	27,40	27,50	0,4 %	0,996

Na tabela 9 onde podemos encontrar os erros de justeza calculados (equação 2), verifica-se que os ácidos gordos polinsaturados apresentam um erro de justeza baixo, mostrando que o valor obtido laboratorialmente se encontra próximo do valor de referência, como também é possível observar pela comparação da média com o valor de referência, sendo esse valor muito próximo de 1.

2.2. Repetibilidade

Para o cálculo da repetibilidade foram utilizadas dez ensaios realizados em condições de repetibilidade, ou seja, realizados pelo mesmo analista, no mesmo dia. A repetibilidade pode ser estudada com 7 ou mais ensaios da mesma matriz, e nas amostras banha de porco e atum em conserva, foram consideradas 8 ensaios. Os valores utilizados para o cálculo da repetibilidade das matrizes banha de porco, atum em conserva e panado misto encontram-se nos anexos A, B e C, respetivamente.

a. Ácidos gordos saturados

Na tabela 10 estão discriminados os valores obtidos em laboratório para as diferentes matrizes em estudo em condições de repetibilidade.

Tabela 10: Resultados obtidos para os ácidos gordos saturados para o estudo da repetibilidade.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Óleo Vegetal	9,620	9,690	9,610	9,680	9,660	9,690	9,720	9,650	9,670	X
Banha de porco	39,39	39,25	39,29	39,12	39,15	39,11	39,14	39,21	X	X
Atum em Conserva	23,66	23,54	23,58	23,52	23,63	23,69	23,66	23,69	X	X
Salmão	15,56	15,51	15,52	15,50	15,50	15,53	15,50	15,58	15,52	15,52
Maionese	7,340	7,390	7,460	7,440	7,460	7,430	7,400	7,440	7,370	7,320
Panado misto	22,77	22,96	22,98	22,96	22,88	23,02	22,99	23,02	23,05	23,04

Com os resultados da tabela 10, foi possível calcular o limite da repetibilidade apresentado na tabela 11.

Pela análise da tabela 11, é possível observar que os valores obtidos para o limite de repetibilidade estão compreendidos entre 0,075 para a matriz de salmão e 0,274 para a matriz de banha de porco, calculados com auxílio à equação 9.

Tabela 11: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos saturados.

Matriz	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
Óleo Vegetal	9,666	0,0012	0,0350	0,3625	0,098	1,015
Banha de porco	39,21	0,0096	0,0978	0,2494	0,274	0,698
Atum em Conserva	23,62	0,0044	0,0666	0,2821	0,187	0,790
Salmão	15,52	0,0007	0,0267	0,1723	0,075	0,483
Maionese	7,405	0,0025	0,0495	0,6684	0,139	1,872
Panado misto	22,97	0,0072	0,0850	0,3701	0,238	1,036

O limite de repetibilidade relativo está compreendido entre 0,483 % correspondente à matriz de salmão e 1,872 % relativo à matriz de maionese (equação 10). Isto indica-nos que a matriz maionese aceita uma maior diferença entre dois resultados, devido ao desvio padrão relativo ser mais elevado. As diferenças entre dois resultados da mesma amostra são inferiores ao limite de repetibilidade, assim os resultados são concordantes entre medições consecutivas.

Para os valores de G_p mínimos e máximos serem aceitáveis, estes terão de ser inferiores aos valores críticos a 1 % (anexo H). Estes valores são calculados com auxílio às equações 12 e 13. Após a aplicação do teste de Grubbs, foi possível verificar que o teste ao valor máximo, da matriz de óleo vegetal, estava em estado de alerta, indicando que o valor de G_p máximo era superior ao valor crítico a 1 % e para que a matriz óleo vegetal fosse aceite, foi necessário eliminar um ensaio realizado para esta matriz. Após a eliminação desse ensaio, todos os valores de teste de Grubbs foram considerados aceitáveis (tabela 12).

Tabela 12: Teste de Grubbs para os ácidos gordos saturados.

Matriz	População	Valor crítico 1%	G_p Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	G_p Valor máximo	Teste ao valor máximo
Óleo Vegetal	9	2,387	1,586	Aceitável	1,554	Aceitável
Banha de Porco	8	2,274	0,997	Aceitável	1,866	Aceitável
Atum em Conserva	8	2,274	1,519	Aceitável	1,032	Aceitável
Salmão	10	2,482	0,897	Aceitável	2,093	Aceitável
Maionese	10	2,482	1,717	Aceitável	1,111	Aceitável
Panado misto	10	2,482	2,318	Aceitável	0,977	Aceitável

O teste C de Cochran (equação 14) está relacionado com a maior variância obtida no conjunto de amostras consideradas e ao ter o leite em pó no conjunto de matrizes em estudo, o teste de C de Cochran indicava que se devia eliminar esta matriz, de maior variância, pois esta apresentava um valor de C de Cochran superior ao valor crítico tabelado. A eliminação desta

matriz pode ser explicada devido à natureza muito variada das matrizes em estudo. Após eliminação desta matriz, pela análise da tabela 13, verifica-se que o valor crítico tabelado é superior ao C de Cochran calculado, e portanto os valores são considerados aceites

Tabela 13: Teste C de Cochran para os ácidos gordos saturados.

Teste C de Cochran	Número de matrizes: 6	Maior variância: 0,010	Valor crítico tabelado - Cc (5 %): 0,3817	Avaliação: $C_{Calc} < C_{tab5\%}$
	Número de ensaios: 9	C de Cochran (calculado): 0,373		

Na tabela 14 estão os valores obtidos para o limite de repetibilidade das diferentes matrizes, que é de 0,16%, e o seu valor relativo é 0,98%. O coeficiente de variação médio relativo calculado a partir do desvio padrão da repetibilidade é 0,35%. Estes valores relacionam o desvio padrão relativo de todas as amostras em estudo tal como o limite de repetibilidade relativo.

Tabela 14: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos saturados.

Valor do limite da repetibilidade	0,1683
Valor do limite da repetibilidade relativo	0,9823
Coeficiente de variação médio relativo	0,3508

b. Ácidos Gordos Monoinsaturados

A tabela 15 apresenta os parâmetros utilizados para o cálculo da repetibilidade dos ácidos gordos monoinsaturados, com auxílio das equações 6 a 17.

Tabela 15: Resultados obtidos para os ácidos gordos monoinsaturados para o estudo da repetibilidade.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Óleo Vegetal	17,56	17,58	17,58	17,58	17,57	17,57	17,56	17,59	17,58	X
Banha de porco	47,25	47,33	47,22	47,37	47,41	47,44	47,39	47,36	X	X
Atum em Conserva	48,48	48,58	48,47	48,42	48,50	48,45	48,42	48,46	X	X
Salmão	48,87	48,86	48,83	48,89	48,81	48,91	48,91	48,87	48,76	48,79
Maionese	65,00	64,90	64,89	64,91	64,86	64,92	64,90	64,92	64,98	64,98
Panado misto	50,89	50,76	50,75	50,77	50,83	50,70	50,66	50,67	50,61	50,71

O limite de repetibilidade relativo mais baixo é de 0,162 %, pertencente ao óleo vegetal e o mais elevado é de 0,460 % que pertence ao Panado misto, como é possível verificar na tabela 16. Estes valores indicam-nos que a matriz do panado misto aceita uma maior diferença entre dois resultados.

Tabela 16: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos monoinsaturados.

Matriz	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
Óleo Vegetal	17,5744	0,0001	0,0101	0,0577	0,028	0,162
Banha de porco	47,3463	0,0059	0,0765	0,1616	0,214	0,453
Atum em Conserva	48,4725	0,0027	0,0515	0,1062	0,144	0,297
Salmão	48,8500	0,0026	0,0510	0,1044	0,143	0,292
Maionese	64,9260	0,0021	0,0455	0,0701	0,127	0,196
Panado misto	50,7350	0,0069	0,0833	0,1642	0,233	0,460

Na tabela 17 estão representados os resultados obtidos para o teste de Grubbs. Como é possível observar que os valores de G_p mínimos (equação 12) e máximos (equação 13) das matrizes são inferiores ao valor crítico a 1 %, podem-se considerar os valores obtidos para as diferentes matrizes aceitáveis.

Tabela 17: Teste de Grubbs para os ácidos gordos monoinsaturados.

Matriz	População	Valor crítico 1%	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Óleo Vegetal	9	2,387	1,425	Aceitável	1,534	Aceitável
Banha de porco	8	2,274	1,650	Aceitável	1,225	Aceitável
Atum em Conserva	8	2,274	1,020	Aceitável	2,088	Aceitável
Salmão	10	2,482	1,765	Aceitável	1,177	Aceitável
Maionese	10	2,482	1,450	Aceitável	1,626	Aceitável
Panado misto	10	2,482	1,501	Aceitável	1,861	Aceitável

O Teste C de Cochran, como pode ser observado na tabela 18, foi considerado aceite, pois o valor crítico tabelado de C de Cochran é maior que o C de Cochran calculado, com auxílio à equação 14.

Tabela 18: Teste C de Cochran dos ácidos gordos monoinsaturados.

Teste C de Cochran	Número de matrizes: 6	Maior variância: 0,007	Valor crítico tabelado - C_c (5 %): 0,3817	Avaliação: $C_{Calc} < C_{tab5\%}$
	Número de ensaios: 9	C de Cochran (calculado): 0,343		

Verificados os resultados e obtendo resultados aceites tanto do Teste de Grubbs como do Teste de Cochran, determinou-se o valor do limite da repetibilidade (equação 15), que é de 0,15 % e o relativo (equação 16) de 0,31 %. O coeficiente de variação médio relativo (equação 17) foi igual a 0,11 %. Estes valores estão na tabela 19.

Tabela 19: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e o coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos monoinsaturados.

Valor do limite da repetibilidade	0,1484
Valor do limite da repetibilidade relativo	0,3099
Coeficiente de variação médio relativo	0,1107

c. Ácidos Gordos Polinsaturados

A tabela 20 apresenta os valores utilizados para o cálculo da repetibilidade do método em estudo.

Tabela 20: Resultados obtidos para os ácidos gordos polinsaturados para o estudo da repetibilidade.

Matriz	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Óleo Vegetal	72,77	72,67	72,76	72,69	72,72	72,69	72,66	72,72	72,70	X
Banha de porco	13,22	13,24	13,22	13,25	13,24	13,26	13,28	13,25	X	X
Atum em Conserva	27,50	27,53	27,58	27,67	27,50	27,49	27,52	27,48	X	X
Salmão	35,30	35,38	35,41	35,38	35,40	35,33	35,24	35,29	35,37	35,42
Maionese	27,39	27,45	27,38	27,38	27,43	27,39	27,43	27,37	27,38	27,43
Panado misto	25,50	25,43	25,41	25,41	25,43	25,42	25,49	25,45	25,47	25,38

Os limites de repetibilidade relativos variam entre 0,14 e 0,64 %, onde o atum em conserva aceita uma maior diferença entre dois resultados, apresentando um desvio padrão relativo mais elevado, enquanto que o óleo vegetal é a matriz com um limite da repetibilidade relativo mais baixo (tabela 21). É possível verificar também que a diferença entre dois ensaios, na mesma amostra, é inferior ao limite da repetibilidade, confirmando que as medições consecutivas são concordantes.

Tabela 21: Parâmetros utilizados para o cálculo de repetibilidade dos ácidos gordos polinsaturados.

Matriz	Média	Variância	Desvio padrão	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
Óleo Vegetal	72,71	0,0014	0,0376	0,0517	0,105	0,145
Banha de porco	13,24	0,0004	0,0200	0,1510	0,056	0,423
Atum em Conserva	27,53	0,0040	0,0632	0,2297	0,177	0,643
Salmão	35,35	0,0035	0,0594	0,1680	0,166	0,471
Maionese	27,40	0,0008	0,0287	0,1047	0,080	0,293
Panado misto	25,44	0,0015	0,0381	0,1499	0,107	0,420

Os resultados obtidos do Teste de Grubbs das diferentes matrizes foram considerados aceitáveis, o que significa que os valores de G calculados são menores que os valores críticos a 1 % (tabela 22).

Tabela 22: Teste de Grubbs para os ácidos gordos polinsaturados.

Matriz	População	Valor crítico 1%	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Óleo Vegetal	9	2,387	1,301	Aceitável	1,627	Aceitável
Banha de porco	8	2,274	1,250	Aceitável	1,750	Aceitável
Atum em Conserva	8	2,274	0,850	Aceitável	2,155	Aceitável
Salmão	10	2,482	1,885	Aceitável	1,145	Aceitável
Maionese	10	2,482	1,150	Aceitável	1,638	Aceitável
Panado misto	10	2,482	1,547	Aceitável	1,599	Aceitável

Após o cálculo de C de Cochran, o valor calculado é menor que o valor crítico tabelado a 5 % (tabela 23). O Teste de C de Cochran permite-nos decidir se existe uma variância significativamente maior que as outras variâncias em estudo e com as quais deve ser comparável. Ao obtermos o teste de C de Cochran como aceite podemos concluir que a maior variância neste conjunto de resultados é comparável com as outras variâncias em estudo.

Tabela 23: Teste C de Cochran dos ácidos gordos polinsaturados.

Teste C de Cochran	Número de matrizes: 6	Maior variância: 0,004	Valor crítico tabelado - C _c (5 %): 0,3817	Avaliação: C _{Calc} <C _{tab} 5%
	Número de ensaios: 9	C de Cochran (calculado): 0,344		

Após o Teste de Grubbs e C de Cochran serem aceites, foi possível o cálculo do valor do limite de repetibilidade (equação 15), apresentado na tabela 24, de 0,12 %, e o relativo de 0,40 %. O coeficiente de variação médio relativo (equação 29) foi igual a 0,14 %.

Tabela 24: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e o coeficiente de variação médio relativo para os ácidos gordos polinsaturados.

Valor do limite da repetibilidade	0,1153
Valor do limite da repetibilidade relativo	0,3990
Coeficiente de variação médio relativo	0,1425

2.3. Precisão intermédia

Para obter a precisão intermédia foram realizadas 6 amostras em duplicados em cinco dias diferentes, pela mesma analista. Nas tabelas 25, 26 e 27 estão os valores dos duplicados, o desvio padrão da precisão intermédia, o coeficiente de variação médio e o limite de precisão intermédio.

Tabela 25: Resultados obtidos dos ácidos gordos saturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédia, o desvio padrão da precisão intermédia (Si), o coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e o limite da precisão intermédio (L.P.I.) em percentagem, das matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Si	C.V.M.	L.P.I.
Óleo Veg.	9,66	9,70	9,69	9,71	9,85	9,76	9,63	9,60	9,68	9,66	0,03376	0,3483	0,9752
Banha	39,39	39,48	38,49	38,38	39,40	39,25	39,39	39,41	40,33	40,32	0,06572	0,1669	0,4673
Atum	23,34	23,08	23,14	23,38	23,33	22,87	21,53	21,52	23,02	22,75	0,2024	0,8880	2,4865
Salmão	15,27	15,27	15,26	15,42	15,51	15,69	14,37	14,56	15,04	15,12	0,1002	0,6617	1,8527
Maionese	7,46	7,37	7,46	7,48	7,25	7,31	7,27	7,19	7,30	7,34	0,04483	0,6106	1,7096
Panado	23,06	22,95	24,59	24,76	24,38	24,70	25,44	25,58	25,72	26,00	0,1554	0,6286	1,7600

Pela análise da tabela 25 verifica-se que o limite precisão intermédio mais elevado é de 2,48 %, correspondente ao atum em conserva e o menor limite de precisão intermédio corresponde à banha de porco, com 0,46 % (calculados a partir da equação 22).

Tabela 26: Resultados obtidos para os ácidos gordos monoinsaturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédio, do desvio padrão da precisão intermédia (Si), do coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e do limite da precisão intermédia (L.P.I.) em percentagem para as matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Si	C.V.M.	L.P.I.
Óleo Veg.	17,64	17,55	17,53	17,52	17,52	17,55	17,50	17,50	17,34	17,40	0,03563	0,2036	0,5700
Banha	47,22	47,16	47,02	47,64	46,74	46,93	47,93	47,87	46,44	46,54	0,2092	0,4437	1,242
Atum	48,32	48,25	47,86	47,71	47,85	48,17	48,76	48,72	49,76	50,25	0,1927	0,3969	1,111
Salmão	48,57	48,59	49,00	48,98	49,09	48,94	47,41	47,74	48,55	48,53	0,1152	0,2372	0,6642
Maionese	64,84	64,92	64,85	64,91	64,28	64,82	64,19	64,67	65,96	65,37	0,2967	0,4572	1,2803
Panado	50,75	50,58	54,54	54,27	54,35	54,28	55,12	54,98	55,90	55,64	0,1392	0,2577	0,7215

Pela análise da tabela 26 verifica-se que o maior valor do limite de precisão intermédio (L.P.I.%) é de 1,28 %, correspondente à maionese e o menor limite de precisão intermédio corresponde ao óleo vegetal.

Tabela 27: Resultados obtidos para os ácidos gordos polinsaturados dos cinco duplicados realizados em dias diferentes para cálculo da precisão intermédio, do desvio padrão da precisão intermédia (Si), do coeficiente de variação médio (C.V.M.) em percentagem e do limite da precisão intermédia (L.P.I.) em percentagem para as matrizes óleo vegetal, banha de porco, atum, salmão, maionese e panado misto.

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Si	C.V.M.	L.P.I.
Óleo Veg.	72,70	72,70	72,72	72,72	72,59	72,65	72,82	72,85	72,94	72,89	0,02648	0,0364	0,1018
Banha	13,20	13,17	14,26	13,80	13,55	13,57	12,43	12,44	12,97	12,92	0,1468	1,1095	3,1066
Atum	27,16	27,42	27,93	27,77	27,58	27,74	28,76	28,81	26,36	26,13	0,1320	0,4788	1,3406
Salmão	35,18	35,12	34,89	34,76	34,54	34,53	37,69	37,18	35,92	35,86	0,1686	0,4741	1,3274
Maionese	27,44	27,45	27,42	27,35	28,26	27,58	28,25	27,82	26,48	27,03	0,3089	1,1233	3,1453
Panado	25,31	25,59	20,14	20,27	20,57	20,25	18,79	18,82	17,78	17,65	0,1468	0,7155	2,0034

O limite de precisão intermédia dos ácidos gordos polinsaturados mais elevado é o da maionese, correspondente a 3,14 % e o menor valor pertence ao óleo vegetal, 0,10 % (tabela 27).

O facto de o estudo da precisão intermédia ser realizado em dias diferentes, pode levar a uma maior variabilidade dos resultados, sendo uma análise adequada para observar como variam os resultados, variando uma das variáveis, neste caso o tempo. Os limites de precisão calculados para os duplicados realizados em cinco dias diferentes para as seis diferentes matrizes em estudo são todos inferiores a 3,14 %, correspondendo este ao limite de precisão intermédio da matriz maionese no estudo dos ácidos gordos polinsaturados.

IV – Conclusão

Atualmente, a segurança alimentar é uma grande preocupação tanto para os consumidores como para os produtores. Empresas como a Mérieux NutriSciences, Silliker Portugal S.A. tentam fornecer aos seus clientes uma resposta quanto à segurança alimentar. O controlo de qualidade é algo que tem sido fundamental para fornecer resultados confiáveis e verdadeiros.

A qualidade é cada vez mais procurada pelos clientes e a validação de métodos é um dos aspetos necessários para fornecer evidências da credibilidade dos seus resultados. A validação de métodos faz parte do controlo de qualidade e para este trabalho foi proposta uma validação dos ácidos gordos de diversas matrizes, tendo-se procedido ao estudo da repetibilidade e da precisão intermédia.

Para a avaliação da veracidade foram utilizados materiais de referência certificados (MRC), nomeadamente de óleo vegetal, maionese e salmão, onde foi possível calcular o Z-score dos ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Os resultados de Z obtidos estavam compreendidos entre -2 e 2, sendo os resultados considerados aceitáveis. A partir da análise dos MRC também foi possível observar que todos os ácidos gordos componentes das matrizes tinham valores dentro dos intervalos impostos pelos certificados de análise.

Para o cálculo do limite de repetibilidade é necessária a realização de 7 ou mais réplicas de diferentes amostras, no mesmo dia. O limite de repetibilidade relativa dos ácidos gordos saturados foi de 0,98 %, o limite de repetibilidade dos ácidos gordos monoinsaturados foi de 0,31 % e o limite de repetibilidade dos ácidos gordos polinsaturados foi de 0,40 %.

A precisão intermédia é calculada pela realização de duplicados em cinco dias diferentes. Após o cálculo do limite de precisão intermédia dos duplicados de cada amostra para os três grupos de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados observou-se que o maior limite de precisão intermédia foi de 3,1 % correspondente aos ácidos gordos polinsaturados da maionese.

A matriz leite em pó foi extraída e foram realizados ensaios de repetibilidade para a mesma. Após a aplicação do teste C de Cochran esta matriz apresentava uma maior variância sendo que foi eliminada do conjunto em estudo. Isto acontece, pois, o número de matrizes em estudo é baixo e as variâncias são mais distintas, sendo que uma maior variância irá afetar o conjunto de resultados.

Para este trabalho procedeu-se à validação do método de análise das matrizes óleo vegetal, banha de porco, salmão, maionese, atum em conserva, panado misto e leite em pó. Este trabalho irá ser utilizado para a validação dos métodos que continuará a decorrer no laboratório.

V- Referências bibliográficas

- Alonso, A., Ruiz-Gutierrez, V., & Martínez-González, M. Á. (2006). Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public health nutrition*, 9(2), 251-257.
- Costa, N., Cruz, R., Graça, P., Breda, J., & Casal, S. (2016). Trans fatty acids in the Portuguese food market. *Food control*, 64, 128-134.
- Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., & Griinari, D. J. (1999, June). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. In *Proc. Am. Soc. Anim. Sci* (Vol. 77, pp. 1-14).
- Cortez, L. (1999). The implementation of accreditation in a chemical laboratory. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(9-10), 638-643.
- Das, U. N. (2006A). Essential fatty acids-a review. *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(6), 467-482.
- Das, U. N. (2006B). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(4), 420-439.
- Dipasquale, D., Basiricò, L., Morera, P., Primi, R., Tröscher, A., & Bernabucci, U. (2018). Anti-inflammatory effects of conjugated linoleic acid isomers and essential fatty acids in bovine mammary epithelial cells. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 12(10), 2108-2114.
- Eder, K. (1995). Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 671(1-2), 113-131.
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(11), 637-647.
- Flores, C., Dias, M. G., & Santos, M. (2015). A importância da avaliação do desempenho de uma metodologia analítica: a avaliação da exatidão na quantificação de niacina em alimentos. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, ptg 3.
- German, J. B., & Dillard, C. J. (2004). Saturated fats: what dietary intake?. *The American journal of clinical nutrition*, 80(3), 550-559.

Granot, E., & Deckelbaum, R. J. (2017). Essential Fatty Acids. In *Nutrition and Health in a Developing World* (pp. 321-335). Humana Press, Cham.

Guia do Relacre 13, Validação de Métodos Internos de ensaio em Análises químicas, 2000. Disponível em: <http://www.Relacre.pt/assets/Relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>. Acesso em janeiro de 2019.

Guia para aplicação da norma NP EN ISO/IEC 17025, 2018. Disponível em: http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001_GuiaAplicacao17025_v20181231.pdf. Acesso em janeiro de 2019.

Heil, C. S., Wehrheim, S. S., Paithankar, K. S., & Grininger, M. (2019). Fatty acid biosynthesis: Chain-length regulation and control. *ChemBioChem*, 20(18), 2298-2321.

Kadam, S. U., & Prabhasankar, P. (2010). Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43(8), 1975-1980.

Kaneko, F., Yano, J., & Sato, K. (1998). Diversity in the fatty-acid conformation and chain packing of cis-unsaturated lipids. *Current opinion in structural biology*, 8(4), 417-425.

Kumari, S., Yong Meng, G., & Ebrahimi, M. (2017). Conjugated linoleic acid as functional food in poultry products: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 491-506.

Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & nutrition research*, 52(1), 1821.

Magnusson, B. (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. *Eurachem Guide*, ptg: 57.

Moran, L. A. (2012). Principles of biochemistry. *Pearson*. Fifth Edition.

Mulvihill, B. (2001). Ruminant meat as a source of conjugated linoleic acid (CLA). *Nutrition Bulletin*, 26(4), 295-299.

NP EN ISO/IEC 17025. (2018). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

Omar, T. A., & Salimon, J. (2013). Validation and application of a gas chromatographic method for determining fatty acids and trans fats in some bakery products. *Journal of Taibah University for Science*, 7(2), 56-63.

- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Ramos Filho, M. M., Ramos, M. I. L., Hiane, P. A., & Souza, E. M. T. D. (2008). Perfil lipídico de quatro espécies de peixes da região pantaneira de Mato Grosso do Sul. *Food Science and Technology*, 28(2), 361-365.
- Rocha, L. A., & Vieira, C. A. (2019). 06) O Desenvolvimento da ABNT NBR ISO/IEC 17025 e como ela se Tornou Instrumento para o Gerenciamento de Laboratórios de Análises Ambientais. *Revista Brasileira de Gestão e Engenharia| RBGE| ISSN 2237-1664*, (19), 77-98.
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (2001). Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of Life Sciences*, ptg: 7.
- Salimon, J., Omar, T. A., & Salih, N. (2017). An accurate and reliable method for identification and quantification of fatty acids and trans fatty acids in food fats samples using gas chromatography. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1875-S1882.
- Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., & Bee, G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science*, 73(1), 29-41.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465(1-2), 39-62.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning.
- Souza, P. T., Ansolin, M., Batista, E. A., Meirelles, A. J., & Tubino, M. (2019). Identification of Extra Virgin Olive Oils Modified by the Addition of Soybean Oil, Using Ion Chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(5), 1055-1062.
- Teng, F., Wang, P., Yang, L., Ma, Y., & Day, L. (2017). Quantification of fatty acids in human, cow, buffalo, goat, yak, and camel milk using an improved one-step GC-FID method. *Food Analytical Methods*, 10(8), 2881-2891.

Uauy, R., Hoffman, D. R., Peirano, P., Birch, D. G., & Birch, E. E. (2001). Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*, 36(9), 885-895.

Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*, 68(5), 280-289.

Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., ... & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat science*, 66(1), 21-32.

Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., ... & Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat science*, 78(4), 343-358.

Yorulmaz, A., Erinc, H., & Tekin, A. (2013). Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(5), 647-658.

Zuraini, A., Somchit, M. N., Solihah, M. H., Goh, Y. M., Arifah, A. K., Zakaria, M. S., ... & Jais, A. M. (2006). Fatty acid and amino acid composition of three local Malaysian *Channa* spp. fish. *Food Chemistry*, 97(4), 674-678.

Referências online

[1] Mérieux NutriSciences. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal>. Acesso em dezembro de 2019.

[2] Balança Alimentar Portuguesa (2012). Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=289818234&PUBLICACOESmodo=2&xlang=pt. Acesso em dezembro de 2019.

[3] Regulamento (CE) n.º 796/2002 da Comissão, de 6 de Maio de 2002, que altera o Regulamento (CEE) n.º 2568/91 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados, e as notas complementares constantes do anexo do Regulamento (CEE) n.º 2658/87 do Conselho relativo à nomenclatura pautal e estatística e à pauta aduaneira comum. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32002R0796>. Acesso em Maio de 2020.

[4] Comparison of 37 Component FAME Standard on Four Capillary GC Columns. Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/8100/8046.pdf>. Acesso em maio de 2020.

ANEXOS

Anexo A - Banha de porco

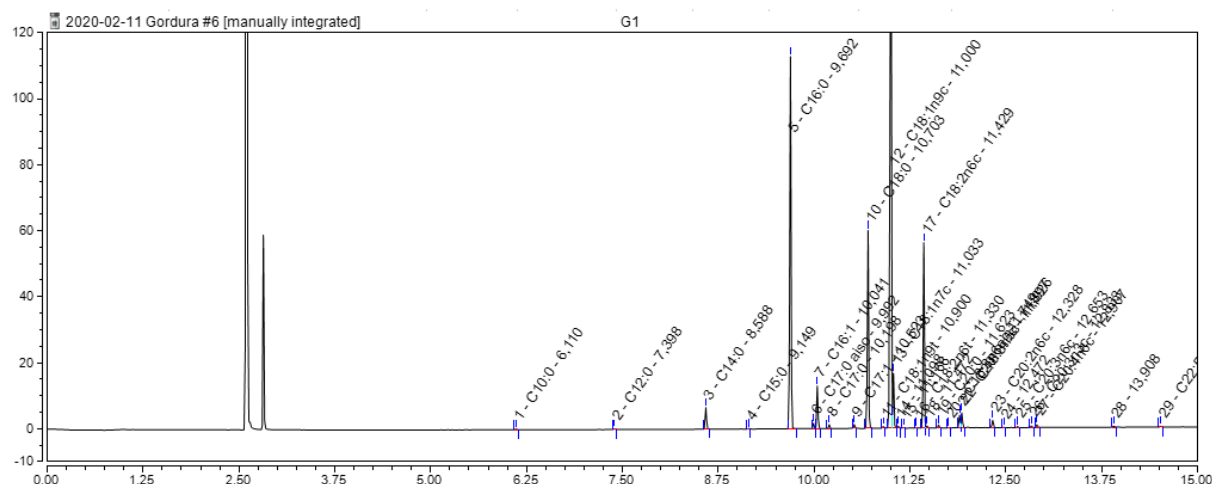


Figura 11: Cromatograma obtido por GC-FID da matriz banha de porco.

Tabela 28: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as oito réplicas realizadas para a amostra banha de porco.

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
C04:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C06:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C08:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,08	0,07	0,06	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,07	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06
C14:0	1,39	1,35	1,38	1,36	1,33	1,34	1,33	1,35
C14:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:1n5c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	24,50	24,32	24,41	24,28	24,24	24,23	24,29	24,30
C16:1n7c	2,78	2,76	2,79	2,76	2,75	2,77	2,75	2,77
C16:2n4c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:3n4C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
C17:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0 aiso	0,33	0,33	0,34	0,33	0,33	0,33	0,33	0,34
C17:1n7c	0,24	0,25	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24

Tabela 28: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as oito réplicas realizadas para a amostra banha de porco (continuação).

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
C18:0	12,58	12,66	12,58	12,56	12,65	12,61	12,61	12,64
C18:1t	0,13	0,18	0,18	0,17	0,20	0,19	0,19	0,18
C18:1n7c	3,10	3,11	3,09	3,08	3,09	3,11	3,08	3,08
C18:1n9c	40,37	40,45	40,34	40,48	40,56	40,55	40,55	40,50
C18:2t	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2n6c	11,26	11,28	11,25	11,27	11,27	11,29	11,30	11,28
C18:3t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3n3c	1,00	1,01	1,02	1,02	1,02	1,01	1,02	1,01
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,18	0,18	0,19	0,18	0,19	0,18	0,19	0,19
C20:1n9c	0,77	0,76	0,75	0,81	0,77	0,77	0,77	0,77
C20:2n6c	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
C20:3n3c	0,14	0,14	0,14	0,15	0,14	0,15	0,14	0,14
C20:3n6c	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
C20:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,23	0,22	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n11c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Anexo B - Atum em conserva

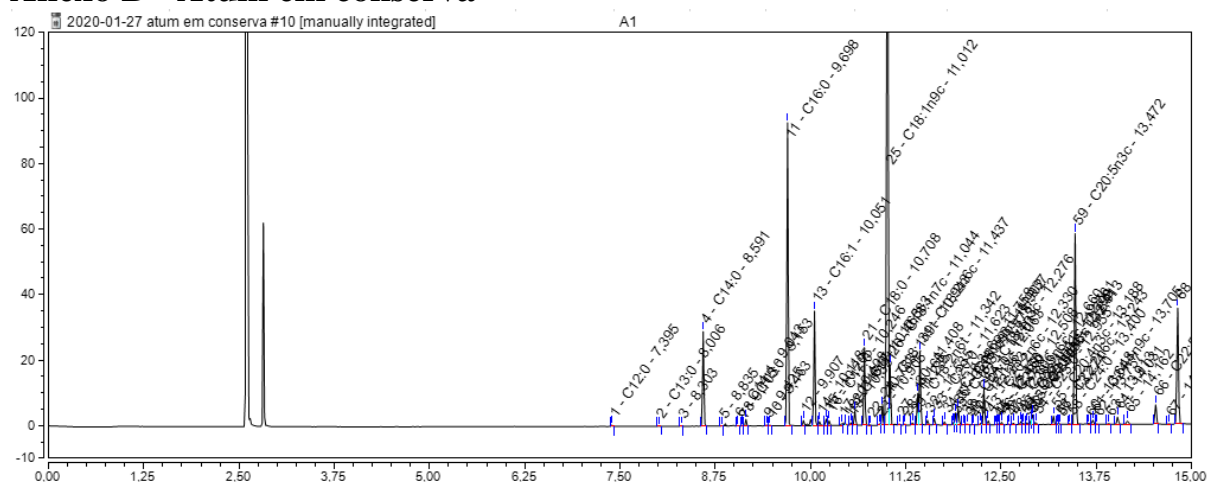


Figura 12: Cromatograma obtido de um atum em conserva.

Tabela 29: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as oito réplicas realizadas para a matriz atum em conserva.

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
C04:0	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C06:0	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C08:0	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C11:0	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,00	0,07	0,00	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
C14:0	4,52	4,39	4,48	4,39	4,35	4,35	4,34	4,33
C14:1n9c	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,31	0,3	0,32	0,31	0,31	0,3	0,31	0,3
C15:0 iso	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0 aiso	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:1n5c	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	14,5	14,45	14,46	14,35	14,52	14,47	14,47	14,5
C16:1n7c	5,65	5,59	5,61	5,55	5,58	5,57	5,57	5,57
C16:2n4c	0,05	0,19	0,19	0,19	0,00	0,19	0,19	0,00
C16:3n4C	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0	0,24	0,23	0,23	0,3	0,23	0,31	0,31	0,31
C17:0 iso	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0 aiso	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:1n7c	0,67	0,66	0,67	0,66	0,12	0,12	0,12	0,12
C18:0	3,43	3,45	3,43	3,45	3,52	3,5	3,49	3,51
C18:1t	0,1	0,09	0,09	0,09	0,1	0,09	0,09	0,1
C18:1n7c	2,52	2,53	2,52	2,55	2,57	2,56	2,58	2,61

Tabela 29: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as oito réplicas realizadas para a matriz atum em conserva (continuação).

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
C18:1n9c	38,69	38,85	38,7	38,69	39,46	39,23	39,19	39,4
C18:2t	0,17	0,15	0,17	0,16	0,17	0,17	0,2	0,15
C18:2n6c	3,3	3,33	3,28	3,27	3,34	3,3	3,31	3,3
C18:3t	0,19	0,10	0,11	0,10	0,10	0,19	0,10	0,11
C18:3n3c	0,91	0,97	0,9	0,9	0,91	0,9	0,91	0,91
C18:3n6c	0,15	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15	0,15
C18:4n3c	1,72	1,74	1,73	1,73	1,72	1,71	1,72	1,73
C20:0	0,32	0,32	0,32	0,32	0,33	0,33	0,33	0,33
C20:1n9c	0,55	0,55	0,55	0,55	0,56	0,56	0,56	0,57
C20:2n6c	0,23	0,24	0,23	0,23	0,25	0,24	0,24	0,24
C20:3n3c	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09
C20:3n6c	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
C20:4n3c	0,40	0,41	0,40	0,41	0,41	0,41	0,4	0,41
C20:4n6c	0,49	0,48	0,48	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
C20:5n3c	10,97	10,88	10,97	11,03	11,03	10,95	10,95	11,03
C21:0	0,07	0,07	0,07	0,07	0	0,07	0,07	0,07
C22:0	0,15	0,13	0,15	0,13	0,15	0,15	0,13	0,13
C22:1n9c	0,06	0,05	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05
C22:1n11c	0,14	0,14	0,16	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
C22:2n6c	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5n3c	1,24	1,23	1,24	1,26	1,26	1,25	1,25	1,25
C22:6n3c	7,82	7,72	7,79	7,85	7,75	7,71	7,71	7,77
C23:0	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09
C24:0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
C24:1n9c	0,21	0,2	0,21	0,21	0,00	0,21	0,21	0,00

Anexo C - Panado misto

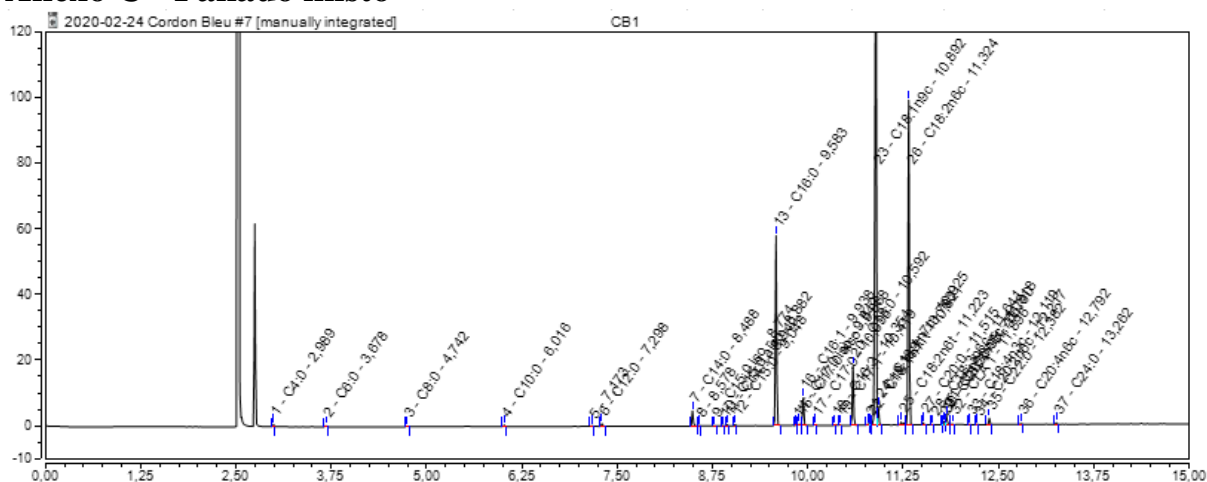


Tabela 30: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas para a matriz panado misto (continuação).

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
C18:2t	0,54	0,55	0,55	0,55	0,54	0,55	0,55	0,55	0,56	0,56
C18:2n6c	24,57	24,61	24,58	24,61	24,63	24,53	24,52	24,51	24,49	24,52
C18:3t	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3n3c	0,77	0,75	0,76	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74	0,73	0,74
C18:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4n3c	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,05	0,00
C20:0	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,20	0,19	0,19	0,20
C20:1n9c	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25	0,24	0,25	0,25	0,25	0,25
C20:2n6c	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,05	0,05
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,09	0,06	0,06	0,07	0,06
C20:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,50	0,47	0,55	0,55	0,47	0,56	0,56	0,55	0,58	0,56
C22:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n11c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,09	0,00
C22:6n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
C24:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Anexo D – Leite em pó

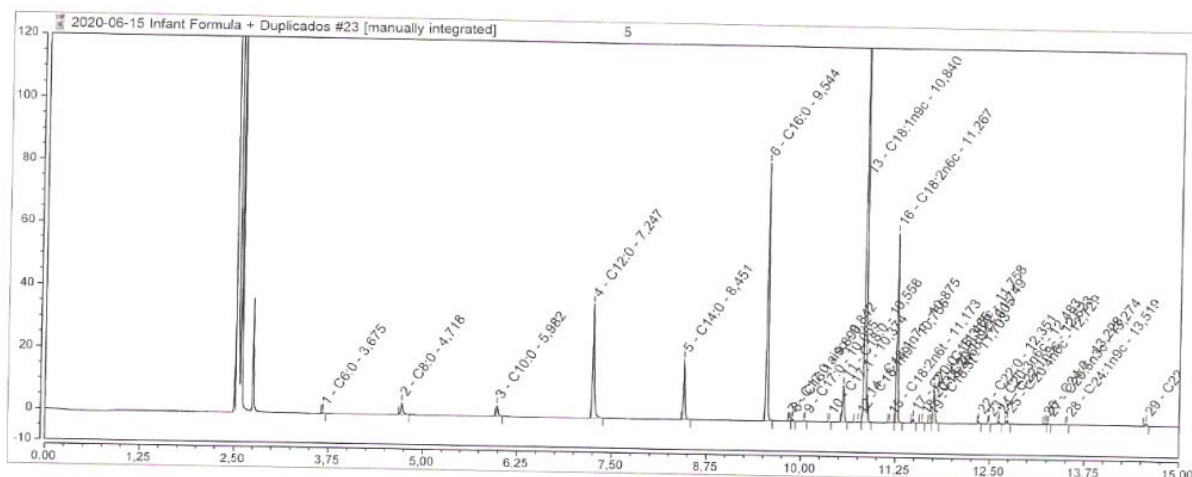


Figura 14: Cromatograma obtido de uma amostra de leite em pó.

Tabela 31: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas para a matriz leite em pó.

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
C04:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C06:0	0,05	0,08	0,09	0,10	0,12	0,09	0,08	0,09	0,07	0,08
C08:0	1,54	1,60	1,72	1,58	1,74	1,65	1,63	1,65	1,63	1,58
C10:0	1,2	1,25	1,33	1,35	1,33	1,23	1,26	1,28	1,34	1,28
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	11,80	11,74	11,81	11,89	11,72	11,56	11,54	11,51	11,58	11,46
C14:0	5,09	5,01	5,03	5,06	5,08	5,00	4,98	4,93	5,03	4,98
C14:1n9c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:1n5c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	18,70	18,54	18,62	18,58	18,51	18,57	18,47	18,41	18,43	18,50
C16:1n7c	0,19	0,19	0,21	0,20	0,20	0,18	0,19	0,20	0,17	0,19
C16:2n4c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:3n4C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
C17:0 iso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:0 aiso	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C17:1n7c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	3,37	3,32	3,34	3,33	3,33	3,34	3,37	3,38	3,36	3,38
C18:1t	0,06	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0,07	0,07
C18:1n7c	1,21	1,39	1,33	1,37	1,36	1,36	1,39	1,39	1,37	1,38

Tabela 31: Resultados obtidos para os ácidos gordos para as dez réplicas realizadas para a matriz leite em pó (continuação).

Ácidos gordos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
C18:1n9c	38,28	38,14	37,95	37,93	38,05	38,23	38,37	38,50	38,29	38,40
C18:2t	0,05	0,06	0,05	0,05	0,00	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
C18:2n6c	13,40	13,52	13,43	13,47	13,48	13,49	13,54	13,58	13,50	13,55
C18:3t	0,00	0,00	0,06	0,05	0,06	0,07	0,05	0,05	0,05	0,06
C18:3n3c	2,76	2,73	2,68	2,69	2,65	2,56	2,86	2,87	2,74	2,66
C18:3n6c	0,09	0,05	0,05	0,09	0,09	0,08	0,05	0,05	0,10	0,05
C18:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,33	0,32	0,31	0,32	0,32	0,33	0,33	0,32	0,32	0,33
C20:1n9c	0,35	0,36	0,41	0,38	0,43	0,55	0,24	0,24	0,35	0,45
C20:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4n6c	0,42	0,56	0,42	0,41	0,40	0,40	0,40	0,39	0,39	0,40
C20:5n3c	0,08	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09
C21:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22
C22:1n9c	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,22	0,22
C22:1n11c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2n6c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6n3c	0,38	0,36	0,36	0,37	0,36	0,37	0,36	0,37	0,36	0,37
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,13	0,14	0,12
C24:1n9c	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05

Anexo E- Certificado de análise do óleo vegetal

Figura 15: Certificado de análise do óleo vegetal



Fera Science Ltd (Fera)
Sand Hutton, York, YO41 1LZ
Tel: +44 (0)1904 462100 Fax: +44(0)1904 500440
info@fapas.com www.fapas.com

FAPAS QC MATERIAL DATA SHEET	T14161QC
Matrix	Vegetable Oil
Weight / Volume of Contents	30 ml

Analyte	Assigned Value, X_a	Range for $ z \leq 2$	Units	No. of data points producing X_a
Saturates	9.45	8.50 - 10.39	g/100g of sample	67
Mono-unsaturates	17.02	15.32 - 18.72	g/100g of sample	65
Poly-unsaturates	71.14	66.87 - 75.41	g/100g of sample	65
Linoleic Acid (C18:2 n-6)	37.15	34.92 - 39.38	g/100g of sample	64
alpha Linolenic Acid (ALA, C18:3 n-3)	33.90	31.87 - 35.93	g/100g of sample	63
Oleic Acid (C18:1(n9)cis)	16.44	14.80 - 18.08	g/100g of sample	63
Palmitic Acid (C16:0)	5.78	5.20 - 6.36	g/100g of sample	65
Stearic Acid (C18:0)	3.39	3.05 - 3.73	g/100g of sample	65

This data sheet is applicable until	14 Nov 2017
Recommended Storage on receipt	Ambient

Notes
<ul style="list-style-type: none"> • Mix the QC material thoroughly before taking a representative analytical sample • The assigned value has been derived from the consensus of laboratories taking part in this proficiency test, using a variety of methods. This is not a certified reference value. • The Range for $z \leq 2$ is the concentration range within the limits of ± 2 z-scores. The assigned value and its range have been established from the proficiency test data and are suitable for use by laboratories as a fit-for-purpose quality control measure. • Stability of the QC material has been established as sufficient for the scope of the proficiency test from previous experience, expert advice and published literature. FAPAS advises that the QC material is analysed within the recommended date. FAPAS QC materials are intended to be used as single-analysis samples. • Full details on the proficiency test procedure used to characterise this QC material are available in the Protocol, Part 1 - Common Principles, freely available to download from the FAPAS website. • You may use any method of analysis you wish.

Anexo F - Certificado de análise da maionese

Figura 16: Certificado de análise da matriz maionese.


		Mayonnaise / VCal - MIN - AG - Echantillon 02-7320 Mayonnaise / CV - MIN - FA - Sample 02-7320																	
		Valeur assignée / Assigned value					Aptitude / Proficiency					Population totale / Total population							
Critère / Criterion	Unité / Unit	x_p	$u(x_p)$	$s(x_p)$	$p(x_p)$	$CV(x_p)$ %	σ_p	VT	Max	Min	p_0	p_1	$x^*_{0.95}$	$s^*_{0.95}$	$p_{0.95}$	$CV_{0.95}$ %	$p_{0.95}$	$p_{0.95}$	
MS20	g / 100 g	77,1	0,1	0,4	31	1	0,5	1,0	78,1	76,1	1	3	31	77,1	0,4	31	1	0	0
MSA20	α / 100 α	77,1	0,1	0,4	31	1	0,5	1,0	78,1	76,1	1	4	25	77,1	0,4	25	1	0	0
CEND20	g / 100 g	1,34	0,01	0,05	54	4	0,20	0,40	1,74	0,94	0	0	54	1,34	0,05	54	4	0	0
pH20		3,64	0,03	0,16	32	4	0,16	0,32	3,96	3,32	3	9	32	3,64	0,16	32	4	0	0
PROT20	α / 100 α	1,1	0,0	0,1	36	9	0,2	0,4	1,5	0,7	4	11	36	1,1	0,1	36	9	0	0
PROA20	g / 100 g	1,1	0,0	0,1	36	9	0,2	0,4	1,5	0,7	1	13	8	1,2	0,2	8	17	0	0
PROD20	α / 100 α	1,4	0,1	0,4	11	29	0,2	0,4	1,8	1,0	3	27	11	1,4	0,4	11	29	0	0
PRODA20	g / 100 g	1,4	0,1	0,4	11	29	0,2	0,4	1,8	1,0	3	30	10	1,1	0,1	10	9	0	0
LIPD20	g / 100 g	70,5	0,5	2,2	31	3	1,4	2,7	73,2	67,8	6	19	31	70,5	2,2	31	3	0	0
LIPA20	α / 100 α	70,5	0,5	2,2	31	3	1,4	2,7	73,2	67,8	5	21	25	70,3	2,2	24	3	0	4
GLUC20	g / 100 g	3,6	0,3	1,6	34	44							34	3,6	1,6	34	44	0	0
GLUC20	g / 100 g	0,2	0,0	0,0	31	0	0,1	0,2	0,4	0,0	1	3	42	0,2	0,0	37	0	0	12
FRUC20	α / 100 α	0,2	0,0	0,0	28	0	0,1	0,2	0,4	0,0	0	0	41	0,2	0,0	32	0	0	22
SACC20	g / 100 g	1,5	0,0	0,1	36	7	0,2	0,4	1,9	1,1	0	0	41	1,5	0,1	41	7	0	0
LACT20	g / 100 g												40					0	88
MALT20	g / 100 g												40					3	85
SSAC20	g / 100 g	1,9	0,0	0,2	36	11	0,3	0,6	2,5	1,3	1	2	41	1,9	0,2	41	11	0	0
FTDT	g / 100 g												15					0	53
FTDTA	g / 100 g												9					0	56
FINS	g / 100 g												5					0	60
FNSA	g / 100 g												0					0	0
FSOL	g / 100 g												4					0	75
FSOLA	g / 100 g												0					0	0
PERD20	mg.kg ⁻¹	3,0	0,5	1,9	20	63	0,8	1,6	4,6	1,4	6	30	23	3,0	1,9	20	63	5	5
ADLE20	%												20					0	0
Ca20	mg / 100 g	13	0	2	35	15	3	6	19	7	2	6	38	13	2	35	15	5	3
Cu20	mg / 100 g												33					0	52
Fe20	mg / 100 α	0,35	0,01	0,06	29	17	0,12	0,23	0,58	0,12	1	3	36	0,35	0,06	29	17	8	11
Mn20	mg / 100 g												32					0	44
Mn20	mg / 100 α	5	0	0	33	0	1	2	7	3	0	0	35	5	0	33	0	0	6
P20	mg / 100 g	35	1	4	33	11	2	4	39	31	6	18	34	35	4	33	11	0	3
K20	mg / 100 g	23	1	6	33	26	4	8	31	15	7	21	36	23	6	33	26	0	8
Se20	µg / 100 g												18					0	28
Na20	mg / 100 g	494	6	34	43	7	25	49	543	445	4	9	44	494	34	43	7	2	0
Zn20	mg / 100 g	0,22	0,01	0,04	30	18	0,10	0,20	0,42	0,02	3	10	35	0,22	0,04	30	18	3	11
C20	mg / 100 α	1252	20	39	6	3	107	213	1465	1039	0	0	6	1252	39	6	3	0	0
CA20	mg / 100 g	1252	20	39	6	3	107	213	1465	1039	1	5	23	1310	57	22	4	4	0
I20	µg / 100 g												9					0	44
BUTY 20	%												27					0	41
CAPO 20	%												30					0	37
CAPV 20	%												31					0	39
CAPJ 20	%												31					0	39
CAPL 20	%												11					0	27
LAUR 20	%												31					0	39
IMYR 20	%	0,0	0,0	0,0	5	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	12	0,0	0,0	10	0	0	17
MYRI 20	%	0,1	0,0	0,0	16	0	0,3	0,5	0,6	0,0	0	0	33	0,1	0,0	24	0	3	24
MYRT 20	%												30					0	40
MEDE 20	%	0,0	0,0	0,0	5	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	12	0,0	0,0	9	0	0	25
AMT 20	%	0,0	0,0	0,0	7	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	14	0,0	0,0	11	0	0	21
PENT 20	%												29					0	48
SPAL 20	%	0,0	0,0	0,0	6	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	12	0,0	0,0	10	0	0	17
PALM 20	%	4,9	0,1	0,2	21	4	0,3	0,5	5,4	4,4	3	8	37	4,9	0,2	37	4	0	0
PALT 20	%	0,2	0,0	0,0	20	0	0,3	0,5	0,7	0,0	0	0	37	0,2	0,0	36	0	0	3

Figura 17: Certificado de análise da matriz maionese (continuação).

Critère / Criterion		Valeur assignée / Assigned value					Aptitude / Proficiency					Population totale / Total population							
		Unité / Unit	x_{ij}	$u(x_{ij})$	$s(x_{ij})$	$p(x_{ij})$	CV(x _{ij}) %	σ_{ij}	VT	Max	Min	ρ_{ij}	σ_{ij}	x^*_{tot}	s^*_{tot}	p_{tot}	CV _{tot} %	σ_{tot}	ρ_{tot}
IMAR 20	%												13					0	31
ADPH 20	%	0,0	0,0	0,0	7	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	13	0,0	0,0	11	0	0	15
MARG 20	%												32					0	34
HDEC 20	%												30					0	27
ISTE 20	%	0,0	0,0	0,0	6	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	11	0,0	0,0	10	0	0	9
STEA 20	%	1,6	0,0	0,0	22	0	0,3	0,5	2,1	1,1	2	5	37	1,6	0,1	37	6	0	0
OLEI 20	%	61,8	0,1	0,4	21	1	1,8	3,5	65,3	58,3	2	5	37	61,8	0,6	37	1	0	0
LINO 20	%	19,3	0,1	0,3	21	2	1,0	1,9	21,2	17,4	1	3	37	19,3	0,3	37	2	0	0
RUME 20	%												13					0	31
LINE 20	%	8,5	0,1	0,4	20	5	0,5	0,9	9,4	7,6	3	8	36	8,4	0,3	36	4	0	0
STER 20	%												20					0	35
ARAI 20	%	0,5	0,0	0,0	21	0	0,3	0,5	1,0	0,0	0	0	37	0,5	0,0	37	0	0	0
GADO 20	%	1,4	0,0	0,1	20	7	0,3	0,5	1,9	0,9	2	6	36	1,4	0,1	36	7	0	0
EIDI 20	%	0,1	0,0	0,0	15	0	0,3	0,5	0,6	0,0	0	0	30	0,1	0,0	24	0	0	20
EICO 20	%												30					0	33
EICOT9 20	%	0,0	0,0	0,0	5	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	8	0,0	0,0	8	0	0	0
EICOT5 20	%												30					0	37
EICOT3 20	%												18					0	28
EIPE 20	%												29					0	34
BEHE 20	%	0,3	0,0	0,0	21	0	0,3	0,5	0,8	0,0	0	0	35	0,3	0,0	35	0	0	0
CETO11 20	%	0,0	0,0	0,0	8	0	0,3	0,5	0,5	0,0	2	15	17	0,0	0,0	13	0	0	24
ERUC 20	%	0,8	0,0	0,0	19	0	0,3	0,5	1,3	0,3	3	10	31	0,8	0,0	31	0	0	0
DODE 20	%												27					0	33
DOPE 20	%												17					0	35
CLUP 20	%												24					0	38
DOHE 20	%												29					0	38
LIGN 20	%	0,1	0,0	0,0	18	0	0,3	0,5	0,6	0,0	0	0	32	0,1	0,0	29	0	0	9
NERV 20	%	0,2	0,0	0,0	19	0	0,3	0,5	0,7	0,0	0	0	33	0,2	0,0	31	0	0	6
AUTRE 20	%												25					0	8
TOTAL 20	%												31					0	0
AGS20	%	7,5	0,1	0,3	38	4	0,4	0,8	8,3	6,7	5	13	38	7,5	0,3	38	4	0	0
AGM20	%	64,4	0,2	0,9	37	1	1,8	3,5	67,9	60,9	4	11	37	64,4	0,9	37	1	0	0
AGP20	%	27,5	0,2	0,9	37	3	1,4	2,8	30,3	24,7	5	14	37	27,5	0,9	37	3	0	0
AGTS20	%	0,4	0,1	0,2	21	50	0,3	0,5	0,9	0,0	0	0	28	0,4	0,2	21	50	0	25
AGAU20	%												19					0	11
AGTOTAL20	%	100,0	0,0	0,0	32	0							32	100,0	0,0	32	0	0	0
BUTYA 20	α / 100 α	0,00	0,00	0,00	10	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	13	0,00	0,00	10	0	0	23
CAPDA 20	g / 100 g												15					0	27
CAPYA 20	g / 100 g												15					0	27
CARIA 20	g / 100 g												15					0	27
CARLA 20	g / 100 g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
LAURA 20	g / 100 g												15					0	27
IHYRA 20	α / 100 α	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
MYRIA 20	g / 100 g	0,04	0,00	0,00	15	0	0,10	0,20	0,24	0,00	0	0	17	0,04	0,00	15	0	0	12
MYRTA 20	g / 100 g												15					0	27
MEDEA 20	α / 100 α	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
ASMTA 20	g / 100 g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
PENTA 20	g / 100 g												15					0	27
IPALA 20	g / 100 g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
PALMA 20	g / 100 g	3,40	0,08	0,27	19	8	0,17	0,34	3,74	3,06	3	16	19	3,40	0,27	19	8	0	0
PALTA 20	α / 100 α	0,18	0,01	0,03	19	17	0,10	0,20	0,38	0,00	0	0	19	0,18	0,03	19	17	0	0
IMARA 20	g / 100 g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14
ADMHA 20	α / 100 α	0,00	0,00	0,00	7	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	7	0	0	0
MARGA 20	α / 100 α	0,02	0,01	0,03	12	150	0,10	0,20	0,22	0,00	0	0	14	0,02	0,03	12	150	0	14

Anexo G - Certificado de análise do salmão

Figura 18: Certificado de análise da matriz salmão.



Saumon Vitamines Acides gras - Echantillon 06-4520
Salmon Vitamins Fatty acids - Sample 06-4520

Résumé statistique des résultats
Statistical summary of the results

Critère / Criterion	Unité / Unit	Valeur assignée / Assigned value					Aptitude / Proficiency					Population totale / Total population							
		x _{ref}	s(x _{ref})	s(x _{ref})	p(x _{ref})	CV(x _{ref}) %	σ _{ref}	VT	Max	Min	p _{ref}	p _{ref}	p _{ref}	x ^{ref}	s ^{ref}	p _{ref}	CV _{ref} %	p _{ref} %	p _{ref} %
TCCo20	mg	3.58	0.26	0.77	14	22	0.77	1.54	5.12	2.04	0	0	15	3.63	0.77	15	21	0	0
TCCo20	mg	1.63	0.15	0.36	9	22	0.36	0.72	2.35	0.91	0	0	9	1.63	0.36	9	22	0	0
VB1 20	mg	0.20	0.02	0.07	16	35	0.03	0.06	0.26	0.14	8	47	17	0.19	0.07	17	37	0	0
VB2 20	mg	0.07	0.01	0.04	13	57	0.03	0.05	0.12	0.02	2	14	17	0.07	0.04	14	57	0	18
VPP 20	mg	6.47	0.36	1.09	14	17	1.09	2.18	8.65	4.29	1	7	16	6.47	1.09	14	17	13	0
VBS 20	mg	1.08	0.15	0.35	8	32	0.35	0.70	1.78	0.38	0	0	9	1.08	0.35	8	32	0	11
VB6 20	mg	0.47	0.04	0.12	11	26	0.08	0.16	0.63	0.31	1	8	13	0.46	0.13	12	28	0	8
VB9 20	µg												8						50
VB9L 20	µg												3						67
VB12 20	µg	4.0	0.3	0.7	11	18	0.7	1.4	5.4	2.6	1	8	12	3.9	0.8	12	21	0	0
BUTY 20	%												29						34
CARD 20	%												32						38
CAPY 20	%												32						34
CARI 20	%												32						34
CARL 20	%	0,0	0,0	0,0	9	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	12	0,0	0,0	10	0	0	17
LAUR 20	%												36						28
DMYR 20	%	0,0	0,0	0,0	9	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	13	0,0	0,0	11	0	0	15
MYRI 20	%	2.4	0.0	0.2	27	8	0.3	0.5	2.9	1.9	4	10	41	2.4	0.2	41	8	0	0
MYRT 20	%												34						38
MEDE 20	%	0,0	0,0	0,0	11	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	14	0,0	0,0	13	0	0	7
AIMT 20	%	0,0	0,0	0,0	9	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	14	0,0	0,0	11	0	0	21
RENT 20	%	0,2	0,0	0,0	27	0	0,3	0,5	0,7	0,0	0	0	41	0,2	0,0	40	0	0	2
IPAL 20	%	0,0	0,0	0,0	11	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	14	0,0	0,0	13	0	0	7
PALM 20	%	9.9	0.1	0.4	28	4	0.5	1.0	10.9	8.9	8	20	41	10.2	0.7	41	7	0	0
PALT 20	%	2.7	0.1	0.2	28	7	0.3	0.5	3.2	2.2	4	10	41	2.8	0.2	41	7	0	0
IMAR 20	%	0,1	0,0	0,1	10	100	0,3	0,5	0,6	0,0	0	0	15	0,1	0,1	14	100	0	7
ADMI 20	%	0,0	0,0	0,0	11	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	15	0,0	0,0	14	0	0	7
MARG 20	%	0,2	0,0	0,0	26	0	0,3	0,5	0,7	0,0	0	0	40	0,2	0,0	39	0	0	3
HDEC 20	%	0,1	0,0	0,0	22	0	0,3	0,5	0,6	0,0	0	0	36	0,1	0,0	30	0	0	17
ISTE 20	%	0,0	0,0	0,0	9	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	13	0,0	0,0	11	0	0	15
STEA 20	%	2,8	0,0	0,1	28	4	0,3	0,5	3,3	2,3	6	15	41	2,8	0,2	41	7	0	0
OLEI 20	%	36,8	0,2	1,0	27	3	1,8	3,5	40,3	33,3	7	17	41	36,9	1,7	41	5	0	0
LIND 20	%	13,5	0,1	0,4	28	3	0,7	1,4	14,9	12,1	3	7	41	13,5	0,5	41	4	0	0
RUHE 20	%	0,0	0,0	0,0	10	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	16	0,0	0,0	12	0	0	25
LINE 20	%	9,1	0,1	0,4	27	4	0,5	0,9	10,0	8,2	6	15	41	9,1	0,5	41	5	0	0
STER 20	%	0,7	0,0	0,1	19	14	0,3	0,5	1,2	0,2	2	8	28	0,7	0,2	26	29	0	7
ARAI 20	%	0,4	0,0	0,0	28	0	0,3	0,5	0,9	0,0	1	3	40	0,4	0,0	39	0	0	3
GADO 20	%	5,0	0,1	0,5	27	10	0,3	0,5	5,5	4,5	14	35	40	5,0	0,5	40	10	0	0
ESCO 20	%	1,2	0,0	0,1	25	8	0,3	0,5	1,7	0,7	4	10	40	1,1	0,1	40	9	0	0
ESCO 20	%	0,9	0,1	0,2	27	22	0,3	0,5	1,4	0,4	5	13	39	0,8	0,3	38	38	0	3
ESCOT9 20	%	0,0	0,0	0,0	9	0	0,3	0,5	0,5	0,0	0	0	9	0,0	0,0	9	0	0	0
ESCOT6 20	%	0,3	0,0	0,0	26	0	0,3	0,5	0,8	0,0	1	3	40	0,3	0,1	38	33	0	5
ESCOT3 20	%	0,9	0,0	0,1	15	11	0,3	0,5	1,4	0,4	2	11	19	0,9	0,1	19	11	0	0
EIPE 20	%	2,7	0,0	0,1	26	4	0,3	0,5	3,2	2,2	5	13	40	2,7	0,2	39	7	0	3
BEHE 20	%	0,2	0,0	0,0	26	0	0,3	0,5	0,7	0,0	3	8	37	0,2	0,0	36	0	0	3
CETOL1 20	%	2,9	0,1	0,3	19	10	0,3	0,5	3,4	2,4	7	27	27	2,8	0,4	26	14	0	4
ERUC 20	%	0,7	0,0	0,1	24	14	0,3	0,5	1,2	0,2	6	16	38	0,8	0,1	37	13	0	3
DOZI 20	%	0,1	0,0	0,0	20	0	0,3	0,5	0,6	0,0	2	7	35	0,1	0,0	28	0	0	20
DOTI 20	%												22						27
CLUP 20	%	1,3	0,0	0,2	24	15	0,3	0,5	1,8	0,8	2	6	32	1,3	0,2	31	15	0	3
DOHE 20	%	4,2	0,1	0,5	27	12	0,3	0,5	4,7	3,7	13	33	40	4,3	0,6	40	14	0	0

RCIL n° 2018-2019 - 0465 ~ Février 2019 / February 2019 ~ Page 41/99
 Reproduction interdite sans autorisation du Bpea / No reproduction without Bpea authorization

Figura 19: Certificado de análise da matriz salmão (continuação)

Critères / Criterion		Unités / Unit	Valeur assignée / Assigned value					Aptitude / Proficiency					Population totale / Total population							
			x _{ref}	u(x _{ref})	s(x _{ref})	p(x _{ref})	CV(x _{ref}) %	σ _{ref}	VT	Max	Min	ps	ps ₁	ps ₂	x ¹ _{ref}	s ¹ _{ref}	ps ₁	CV _{ref} %	ps ₁ %	ps ₂ %
LIGN 20	%	0.1	0.0	0.0	19	0	0.3	0.5	0.6	0.0	2	7	36	0.1	0.0	30	0	0	17	
NERV 20	%	0.4	0.0	0.1	26	25	0.3	0.5	0.9	0.0	1	3	39	0.4	0.1	38	25	0	3	
AUTRE 20	%												29						0	0
TOTAL 20	%												37						0	0
AGS20	%	17.2	0.4	1.8	41	10	0.9	1.7	18.9	15.5	12	29	41	17.2	1.8	41	10	0	0	0
AGM20	%	48.2	0.4	2.1	40	4	1.8	3.5	51.7	44.7	6	15	40	48.2	2.1	40	4	0	0	0
AGP20	%	33.8	0.5	2.5	40	7	1.7	3.4	37.2	30.4	5	13	40	33.8	2.5	40	7	0	0	0
AGTS20	%	0.4	0.1	0.4	24	100	0.3	0.5	0.9	0.0	2	8	30	0.4	0.4	24	100	0	20	
AGAL20	%												21						5	
AGTOTAL20	%	100,0	0,0	0,0	33	0					0		33	100,0	0,0	33	0	0	0	
BUTYA 20	g												19						26	
CAPOA 20	g												21						29	
CAPYA 20	g	0,00	0,00	0,00	15	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	21	0,00	0,00	16	0	0	24	
CARIA 20	g												21						33	
CARLA 20	g	0,00	0,00	0,00	7	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	8	0,00	0,00	7	0	0	13	
LAURA 20	g												21						38	
IMYRA 20	g	0,00	0,00	0,00	7	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	9	0,00	0,00	8	0	0	11	
MYRIA 20	g	0,29	0,02	0,09	21	31	0,10	0,20	0,49	0,09	1	5	21	0,29	0,09	21	31	0	0	
MYSTA 20	g												20						35	
MEDIA 20	g	0,00	0,00	0,00	8	0	0,10	0,20	0,20	0,00	1	11	9	0,00	0,00	9	0	0	0	
AIMTA 20	g	0,00	0,00	0,00	5	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	6	0,00	0,00	5	0	0	17	
RENTA 20	g	0,02	0,00	0,00	19	0	0,10	0,20	0,22	0,00	0	0	21	0,02	0,00	19	0	0	10	
SPALA 20	g	0,00	0,00	0,00	5	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	6	0	0	14	
PALMA 20	g	1,18	0,07	0,27	21	23	0,12	0,24	1,42	0,94	7	33	21	1,18	0,27	21	23	0	0	
PALTA 20	g	0,34	0,03	0,09	20	26	0,10	0,20	0,54	0,14	1	5	21	0,33	0,10	21	30	0	0	
DMARA 20	g	0,00	0,00	0,00	7	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	7	0	0	0	
AIMHA 20	g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	6	0,00	0,00	6	0	0	0	
MARGA 20	g	0,02	0,00	0,01	18	50	0,10	0,20	0,22	0,00	1	5	21	0,02	0,01	19	50	0	10	
HDECA 20	g	0,01	0,01	0,02	14	200	0,10	0,20	0,21	0,00	0	0	20	0,01	0,02	15	200	0	25	
ISTEA 20	g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	6	0,00	0,00	6	0	0	0	
STEA 20	g	0,33	0,02	0,08	21	24	0,10	0,20	0,53	0,13	2	9	22	0,32	0,09	22	28	0	0	
OLEIA 20	g	4,13	0,26	0,89	19	22	0,33	0,66	4,79	3,47	10	45	22	4,17	1,02	22	24	0	0	
LINDA 20	g	1,53	0,09	0,30	18	20	0,14	0,27	1,80	1,26	8	38	21	1,49	0,39	21	26	0	0	
BLINEA 20	g	0,00	0,00	0,00	6	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	7	0,00	0,00	7	0	0	0	
LINIA 20	g	1,02	0,06	0,22	21	22	0,12	0,23	1,25	0,79	5	23	22	1,01	0,22	22	22	0	0	
STERA 20	g	0,07	0,01	0,03	12	43	0,10	0,20	0,27	0,00	0	0	14	0,07	0,04	13	57	0	7	
ARAIA 20	g	0,04	0,00	0,01	19	25	0,10	0,20	0,24	0,00	1	5	21	0,05	0,01	20	20	0	5	
GADDA 20	g	0,54	0,04	0,14	21	26	0,10	0,20	0,74	0,34	4	18	22	0,53	0,16	22	30	0	0	
ESDA 20	g	0,12	0,01	0,03	19	25	0,10	0,20	0,32	0,00	0	0	21	0,12	0,04	20	33	0	5	
ESDA 20	g	0,09	0,01	0,03	17	33	0,10	0,20	0,29	0,00	0	0	20	0,10	0,03	18	30	0	10	
EICOTA9 20	g	0,00	0,00	0,00	4	0	0,10	0,20	0,20	0,00	0	0	4	0,00	0,00	4	0	0	0	
EICOTA6 20	g	0,03	0,00	0,01	20	33	0,10	0,20	0,23	0,00	0	0	22	0,03	0,01	21	33	0	5	
EICOTA3 20	g	0,09	0,01	0,03	8	33	0,10	0,20	0,29	0,00	0	0	8	0,09	0,03	8	33	0	0	
ESPA 20	g	0,32	0,02	0,08	20	25	0,10	0,20	0,52	0,12	2	10	22	0,31	0,10	21	32	0	5	
BEHA 20	g	0,02	0,00	0,00	18	0	0,10	0,20	0,22	0,00	1	5	21	0,02	0,00	19	0	0	10	
CETOA11 20	g	0,31	0,04	0,11	12	35	0,10	0,20	0,51	0,11	1	8	12	0,31	0,11	12	35	0	13	
ERUCA 20	g	0,08	0,01	0,02	16	25	0,10	0,20	0,28	0,00	1	6	19	0,08	0,02	17	25	0	11	
DODIA 20	g	0,01	0,00	0,01	12	100	0,10	0,20	0,21	0,00	0	0	15	0,01	0,01	13	100	0	13	
DOTEA 20	g												12						42	
CLIPA 20	g	0,14	0,01	0,03	17	21	0,10	0,20	0,34	0,00	0	0	17	0,14	0,03	17	21	0	0	
DOHEA 20	g	0,55	0,04	0,13	21	24	0,10	0,20	0,75	0,35	3	14	21	0,55	0,13	21	24	0	0	
LIGNA 20	g	0,01	0,00	0,01	16	100	0,10	0,20	0,21	0,00	1	6	21	0,01	0,01	17	100	0	19	
NERVA 20	g	0,05	0,01	0,02	13	40	0,10	0,20	0,25	0,00	1	7	16	0,06	0,02	14	33	0	13	
AUTRA 20	g												15						0	0
TOTAA 20	g												22						0	0
AGRS20	g / 100 g												22						0	0

RCIL n° 2018-2019 - 0465 ~ Février 2019 / February 2019 ~ Page 42/99
 Reproduction interdite sans autorisation du Bipea / No reproduction without Bipea authorisation

Anexo H - Valores críticos para o teste de Grubbs e teste C de Cochran

Tabela 32: Valores críticos do Teste de Grubbs.

p	um maior ou um menor
	valor critico 1%
3	1,155
4	1,496
5	1,764
6	1,973
7	2,139
8	2,274
9	2,387
10	2,482
11	2,564
12	2,636
13	2,699
14	2,755
15	2,806
16	2,852
17	2,894
18	2,932
19	2,968
20	3,001
21	3,031
22	3,060
23	3,087
24	3,112
25	3,135
26	3,157
27	3,178
28	3,199
29	3,218
30	3,236
31	3,253
32	3,270
33	3,286
34	3,301
35	3,316
36	3,330
37	3,343
38	3,356
39	3,369
40	3,381
p= número de laboratórios num dado nível	

Tabela 33: Valores críticos do Teste C de Cochran.

valores criticos para teste C de Cochran									
n° matrizes	n° ensaios								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0,9985	0,975	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,801
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,653	0,6333	0,6167
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,398	0,3817	0,3682
7	0,7271	0,5612	0,48	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,391	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659
10	0,602	0,445	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439
12	0,541	0,3924	0,3264	0,288	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,116
30	0,2929	0,198	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958
40	0,237	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,078	0,0745

Anexo I - Fator de conversão de FAME para o ácido gordo correspondente (fAGi)

Tabela 34: Valores de fAGi.

Ácido Gordo	fAGi
C4:0	0,863
C6:0	0,892
C8:0	0,903
C10:0	0,911
C11:0	0,925
C12:0	0,930
C13:0	
C14:0	0,942
C14:1	0,942
C15:0	0,945
C15:1	0,945
C16:0	0,948
C16:1	0,948
C17:0	0,951
C17:1	0,950
C18:0	0,953
C18:1n9t	0,953
C18:1n9c	0,953
C18:2n6t	0,952
C18:2n6c	0,952
C20:0	0,957
C18:3n6c	0,952
C20:1n9c	0,957
C18:3n3c	0,952
C21:0	0,959
C20:2n6c	0,957
C22:0	0,957
C20:3n6c	0,956
C22:1n9c	0,960
C20:3n3c	0,956
C23:0	0,962
C20:4n6c	0,956
C22:2n6c	0,960
C20:5n6c	0,957
C24:0	0,966

Tabela 34: Valores de fAGi (continuação).

Ácido Gordo	fAGi
24:1n9c	0,963
C22:6n3c	0,958