



Ana Filipa Neves Validação de métodos analíticos em matrizes  
Borges alimentares: Análise de açúcares por HPLC com  
detetor de índice de refração



Universidade de  
Aveiro  
Ano 2022

**Ana Filipa Neves** **Validação de métodos analíticos em matrizes alimentares: Análise de açúcares por HPLC com detetor de índice de refração**  
**Borges**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica do Professor João António Baptista Pereira de Oliveira, professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Engenheira Laura Cristina de Oliveira Sousa, coordenadora de métodos instrumentais de análise da Mérieux NutriSciences.

## **o júri**

Presidente

**Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier**  
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Vogais

**Professora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro**  
professora auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

**Professor João António Baptista Pereira de Oliveira**  
professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe pelo apoio incondicional que sempre me proporcionou e por ter sempre acreditado em mim.

Um agradecimento especial à empresa Mérieux NutriSciences, da qual atualmente faço parte, por me ter recebido durante estes meses de estágio, à minha orientadora, a Engenheira Laura Sousa e a todo o departamento de MIA pelos ensinamentos, disponibilidade e boa disposição diária.

Agradeço também ao meu orientador, o Professor João Oliveira, por toda a disponibilidade, orientação científica e acompanhamento ao longo da realização desta dissertação.

Ao João, por toda a paciência e por ter sempre estado a meu lado ao longo de todo o percurso.

À minha família que esteve sempre presente, um obrigado pelo vosso apoio e incentivo para nunca desistir dos meus objetivos.

À minha grande amiga Paula e a todos os que fizeram parte do meu percurso académico e de alguma forma me apoiaram e ajudaram a que fosse possível chegar a este momento.

Muito obrigado!

**palavras-chave**

Açúcares, Galactose, Glucose, Lactose, HPLC, Validação de métodos, Produtos sem lactose

**Resumo**

De forma a acompanhar as exigências dos consumidores têm surgido no mercado uma diversidade cada vez maior de produtos sem lactose, um dissacarídeo constituído por uma unidade de glucose e uma unidade de galactose. O método atualmente utilizado na Mérieux NutriSciences para análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) não apresenta resolução suficiente para separar as bandas da glucose e da galactose. Devido à constante inovação do mercado, surgiu recentemente uma nova coluna, a LUNA Omega 3  $\mu\text{m}$  Sugar 100 Å, com resolução suficiente para separar as bandas destes dois açúcares. Antes da sua aplicação na análise de produtos alimentares é necessário proceder à sua validação. A validação de métodos analíticos tem de ser comprovada nas diversas matrizes alimentares, de modo a serem garantidas a fiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.

Para a validação deste método analítico, que será aplicado principalmente a produtos sem lactose, foram analisados quatro grupos alimentares: açúcares, cereais, produtos lácteos e produtos confeccionados (como por exemplo o molho béchamel). Os parâmetros avaliados para a validação do método foram a linearidade, a incerteza, a precisão, a seletividade, a justeza, os limiares analíticos e a gama de trabalho, recorrendo a métodos estatísticos.

**Keywords**

Sugars, Galactose, Glucose, Lactose, HPLC, Method Validation, Lactose-Free Products

**Abstract**

To go along with consumer demands, an increasing diversity of products without lactose, a disaccharide composed of a glucose and a galactose units, has arrived on the market. The analytical method currently used at Mérieux NutriSciences for sugar analysis, performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), does not have enough resolution to separate the band of glucose and galactose. As a result of constant market innovation, a new column, LUNA Omega 3  $\mu\text{m}$  Sugar 100 Å, has recently emerged with enough resolution to separate the bands of these two sugars. Before its application in food analysis, it is necessary to proceed with the validation. The validation of analytical methods must be verified in multiple food matrices, in order to guarantee the reliability and reproducibility of the results. For the validation of this analytical method, which were applied mainly to lactose-free products, four food groups were analyzed: sugars, cereals, dairy products and cooked products (such as béchamel sauce). The parameters to be evaluated for the validation of the method were linearity, uncertainty, precision, selectivity, veracity, analytical limits and work range, using statistical methods.

## Índice

Capítulo 1- Introdução .....	13
1.1. Enquadramento do tema.....	13
1.2. Objetivos .....	14
1.3. Mérieux NutriSciences.....	15
Capítulo 2- Carboidratos .....	16
▪ 2.1. Métodos de análise .....	17
2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC).....	18
Capítulo 3-Parâmetros validados .....	21
▪ 3.1. Precisão .....	21
3.1.1. Repetibilidade .....	22
3.1.2. Reprodutibilidade.....	23
3.1.3. Precisão intermédia.....	23
▪ 3.2. Incerteza .....	24
▪ 3.3. Seletividade e especificidade.....	29
▪ 3.4. Justeza .....	29
▪ 3.5. Limiares analíticos .....	32
3.5.1. Limite de quantificação.....	32
3.5.2 Limite de deteção .....	33
▪ 3.6. Gama de trabalho.....	34
▪ 3.7. Adequabilidade do sistema.....	35
▪ 3.8. Validação segundo o AS-SOP.025.....	35
3.8.1. Horwitz Ratio (HorRat) .....	35
Capítulo 4- Métodos estatísticos .....	36
▪ 4.1. Curva de calibração e linearidade.....	36
▪ 4.2. Teste <i>t</i> .....	39
5. Materiais e métodos .....	42

▪ 5.1. Reagentes .....	42
▪ 5.2. Equipamentos .....	42
▪ 5.3. Material .....	43
▪ 5.4. Soluções .....	43
5.4.1. Solução mãe de calibração, com concentração aproximada de 18 g/L .....	43
5.4.2. Solução de fortificação .....	44
5.4.3. Soluções de Carrez I e Carrez II .....	44
5.4.4. Fase móvel .....	45
▪ 5.5. Protocolo para determinação de açúcares em matrizes alimentares .....	45
5.5.1. Preparação das amostras .....	45
5.5.2. Procedimento para amostra chocolate.....	46
5.5.3. Procedimento para as restantes amostras .....	47
▪ 5.6. Sistema de HPLC .....	47
6. Apresentação e discussão dos resultados .....	48
▪ 6.1. Análise qualitativa.....	48
▪ 6.2. Curva de calibração .....	49
• 6.3. Linearidade.....	51
▪ 6.4. Análise quantitativa.....	54
6.4.1. Concentração da frutose, glucose, galactose e sacarose expressa em g/100 g de amostra .....	54
6.4.2. Concentração da lactose e maltose expressa em g/100 g de amostra.....	54
▪ 6.5. Precisão .....	54
6.5.1. Repetibilidade .....	55
6.5.2. Precisão intermédia.....	59
▪ 6.6. Incerteza .....	61
▪ 6.7. Ensaios de recuperação .....	64
▪ 6.8. Seletividade e especificidade.....	65
▪ 6.9. Justeza .....	70

▪ 6.10. Limiães analíticos .....	72
6.10.1. Limite de quantificação.....	72
6.10.2. Limite de detecção .....	73
▪ 6.11. Gama de trabalho.....	75
▪ 6.12. Adequabilidade do sistema.....	75
▪ 6.13. Validação segundo o AS-SOP.025 .....	76
7. Conclusão.....	77
8. Bibliografia .....	78
Anexos.....	82
A. Curva de calibração .....	82
B. Linearidade.....	85
C. Precisão .....	97
D. Valores de testes estatísticos .....	106
E. Material de Referência certificado FAPAS T25200 Mikshake powder.....	107
F. Cálculos auxiliares .....	107

## Lista de figuras

Figura 1: Instalações da Mérieux NutriSciences em Vila Nova de Gaia .....	15
Figura 2: Estrutura dos monossacarídeos $\alpha$ -D-Glucose, $\alpha$ -D-Frutose e $\alpha$ -D-Galactose .....	16
Figura 3: Estrutura dos dissacarídeos sacarose, lactose e maltose .....	17
Figura 4: Representação esquemática da HPLC.....	<b>Erro! Marcador não definido.</b>
Figura 5: Diagrama de causa/efeito para visualização das grandezas que contribuem para o cálculo da incerteza, para o exemplo em que o reagente inicial se encontra no estado sólido .....	27
Figura 6: Exemplo de um cromatograma obtido por HPLC de um padrão de concentração 18,00 g/L, com identificação dos picos de cada açúcar respetivos tempos de retenção (em minutos). .....	49
Figura 7: Representação gráfica da reta de calibração da galactose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022 .....	50
Figura 8: Cromatograma do branco do processo.....	65
Figura 9: Cromatograma do padrão de 18,00 g/L.....	66
Figura 10: Cromatograma de uma amostra de iogurte sem fortificação.....	66
Figura 11: Cromatograma de uma amostra de iogurte fortificada com 10 mL da solução de fortificação de 50,00 g/L .....	66
Figura 12: Sobreposição dos quatro cromatogramas .....	67
Figura 13: Cromatograma de uma amostra de gelatina sem fortificação .....	68
Figura 14: Cromatograma de uma amostra de gelatina fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L .....	69
Figura 15: Cromatograma de uma amostra de chocolate sem fortificação .....	69
Figura 16: Cromatograma de uma amostra de chocolate fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L .....	69
Figura 17: Cromatograma de uma amostra de molho béchamel sem fortificação .....	70
Figura 18: Cromatograma de uma amostra de chocolate fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L .....	70
Figura 19: Cromatograma da gelatina fortificada com 0,40 mL da solução de fortificação de 50,00 g/L .....	74
Figura 20: Cromatograma da gelatina com seleção de janelas de ruído .....	74

## Lista de tabelas

Tabela 1: Preparação das soluções de calibração dos açúcares .....	44
Tabela 2: Valores obtidos da altura dos picos obtidos no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da galactose para construção da sua reta de calibração. ....	49
Tabela 3: Dados necessários para aplicação do teste t para o r à reta da galactose da figura 11, como o número de padrões utilizados para traçar a curva de calibração (n), o coeficiente de correlação do modelo linear (r), o valor de t calculado e o valor de t-student tabelado para n-2 graus de liberdade e 95 % de confiança .....	50
Tabela 4: Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade, para o açúcar galactose. ....	51
Tabela 5: Resultados obtidos nos 7 ensaios realizados para o estudo da precisão da galactose em condições de repetibilidade das 7 matrizes alimentares estudadas. ....	55
Tabela 6: : Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão da galactose em condições de repetibilidade para cada matriz analisada.....	55
Tabela 7: Valores para aplicação do teste de Grubbs às matrizes alimentares analisadas para o estudo da galactose .....	56
Tabela 8: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama baixa da galactose .....	57
Tabela 9: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da galactose.....	57
Tabela 10: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama intermédia da galactose ...	57
Tabela 11: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e coeficiente de variação obtidos para todas as gamas dos açúcares analisados.....	58
Tabela 12: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama baixa da galactose, para a matriz leite UHT .....	59
Tabela 13: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama intermédia da galactose para a matriz iogurte .....	60
Tabela 14: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama alta da galactose para a matriz bolacha maria .....	60
Tabela 15: Valores do coeficiente de variação médio e do limite de precisão intermédia para os açúcares analisados .....	61
Tabela 16: Incerteza relativa associada à concentração de cada açúcar analisado, expressa em g/100 g de amostra.....	64
Tabela 17: Resultados obtidos nos ensaios de recuperação em condições de repetibilidade.....	65
Tabela 18: Resumo dos tempos de retenção, assimetria, resolução e da percentagem de recuperação da amostra fortificada .....	67

Tabela 19: Resultados obtidos para as amostras analisadas para determinação da justeza da frutose, glucose, galactose, sacarose, maltose e lactose .....	71
Tabela 20: Resultados obtidos para o viés médio para os açúcares analisados .....	71
Tabela 21: Concentração obtida e esperada de frutose na gelatina .....	72
Tabela 22: Resultados obtidos para a recuperação média dos açúcares analisados .....	73
Tabela 23: Dados relativos ao cromatograma das figuras 23 e 24 .....	74
Tabela 24: Gama de trabalho dos açúcares analisados .....	75
Tabela 25: Tempo de retenção (expresso em minutos), assimetria e precisão (expressa em percentagem) obtidos de cinco injeções do padrão de 18,00 g/L.....	75
Tabela 26: Número de pratos teóricos e fator de capacidade ( $k'$ ) obtidos em cinco injeções do padrão de 18,00 g/L.....	75
Tabela 27: Resultados obtidos dos triplicados obtidos em dois dias distintos e determinação dos parâmetros necessários para validação dos critérios definidos no AS-SOP.25 .....	76

## Capítulo 1- Introdução

### 1.1. Enquadramento do tema

A indústria alimentar é uma das áreas que mais tem evoluído ao longo dos anos e na qual tem aumentado o interesse e exigência dos consumidores, não apenas com a segurança dos produtos alimentares consumidos, mas também com a sua qualidade e conteúdo nutricional. Assim, de forma a acompanhar a evolução do mercado e conseqüentemente dos seus novos desafios, a procura pela inovação, a redução de custos e um maior controlo na qualidade e segurança dos produtos, é implementado um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) de forma a promover a melhoria interna das organizações e/ou o seu reconhecimento externo (certificação). É de extrema importância evitar erros nos resultados apresentados, uma vez que estes irão retirar a credibilidade ao produto e/ou empresa e diminuir a confiança e a satisfação dos clientes, o que certamente iria resultar em graves conseqüências negativas para a empresa.

A existência de legislação e de normas para a indústria alimentar são importantes para a proteção dos consumidores. Para auxiliar neste processo, foram criadas diversas normas, nomeadamente a NP EN ISO/IEC 17025:2018 (Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaios e Calibração) que apresenta os princípios técnicos e de gestão a serem seguidos para garantir a qualidade dos serviços prestados e demonstrar a sua competência técnica [1]. É essencial que um laboratório de análises químicas e microbiológicas cumpra com os requisitos legais, exigências do mercado, expectativas e requisitos dos clientes e garanta a ausência de contaminações nos produtos que irão chegar ao consumidor. A ISO (Organização Internacional de Normalização), para além de estabelecer o sistema de qualidade, estabelece também que tenham de ser conseguidas a manutenção da integridade do produto e a satisfação do cliente [2].

A acreditação corresponde ao conjunto de regras e de procedimentos usados para o reconhecimento da competência técnica de entidades para a realização de atividades de avaliação da conformidade, sendo regida por normas internacionais. Um laboratório acreditado tem de possuir recursos humanos, instalações, equipamentos, métodos e procedimentos adequados, sendo o serviço de acreditação em Portugal prestado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC). Os laboratórios com certificado de acreditação são obrigados a cumprir os princípios estabelecidos e são sujeitos a auditorias periódicas para avaliar o cumprimento dos critérios de acreditação, sendo geralmente realizadas de forma anual. A acreditação distingue-se da certificação nos critérios e metodologias usadas, além de que apenas existe uma entidade acreditadora que efetua a regulação dos organismos de certificação. Em comum apresentam a

implementação de requisitos e procedimentos de gestão, sendo que a acreditação inclui a avaliação dos requisitos de competência [3], [4].

O sistema de controlo de qualidade dos resultados obtidos tem como finalidade identificar as causas dos erros e tentar eliminá-las. O objetivo de um laboratório químico é obter resultados de análises químicas, tendo estes resultados de ser controlados para conseguir a qualidade exigida pelo cliente e monitorizar a validade dos ensaios e das calibrações realizadas. Isto é conseguido de diversas formas, nomeadamente através do uso de materiais de referência certificados, da participação em ensaios interlaboratoriais e da realização de ensaios em duplicado [5].

## **1.2. Objetivos**

Os produtos lácteos possuem um elevado valor nutricional e fazem parte da alimentação diária da maioria da população mundial. A lactase, uma  $\beta$ -D-galactosidase encontrada no intestino humano para digestão da lactose, diminui ao longo da vida das pessoas adultas, levando a que cerca de 70 % destas desenvolvam intolerância à lactose ao longo da sua vida. A intolerância à lactose manifesta-se através de sintomas como, por exemplo, diarreia, flatulência, náuseas e vômitos [6], [7]. De forma a responder à necessidade destes consumidores, a indústria alimentar tem desenvolvido vários produtos sem lactose, sendo estes não apenas produtos lácteos mas também chocolates, bolachas e molhos.

A lactose é um dissacarídeo constituído por uma unidade de glucose unida por uma ligação glicosídica  $\beta$ -1,4 a uma unidade de galactose. Para produzir produtos sem lactose, esta molécula é hidrolisada dando origem aos seus monossacarídeos constituintes.

O método de análise de açúcares utilizado atualmente na Mérieux NutriSciences não possui resolução suficiente para conseguir separar as bandas da galactose e da glucose, surgindo no cromatograma em duas bandas parcialmente sobrepostas. Recentemente surgiu no mercado uma nova coluna, a Luna Omega 3  $\mu$ m Sugar 100 Å com resolução suficiente para separar as bandas da galactose e da glucose.

Assim, validou-se um método analítico com resolução suficiente para a separação das bandas de todos os açúcares analisados, sendo a sua aplicação principal na análise de produtos sem lactose. Foram analisados quatro grupos alimentares e estudadas sete matrizes: açúcares, produtos açucarados e derivados (chocolate preto e gelatina); alimentos confeccionados e pré-confeccionados (molho béchamel); cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados (bolacha maria) e leite, produtos lácteos e derivados (leite UHT, iogurte e batido de leite). Os açúcares analisados foram a glucose, a frutose, a galactose, a maltose, a sacarose e a lactose.

### 1.3. Mérieux NutriSciences

Em 1992 foi fundada a EGI- Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., de forma a responder às necessidades de serviços de análise e assessoria de segurança e qualidade alimentar apresentadas pelo mercado daquela época, assumindo-se como líder nacional nas análises para o setor agroalimentar. Em março de 2008 a multinacional norte-americana Silliker, um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços de qualidade e segurança alimentar, adquiriu a EGI que se tornou a Silliker Portugal, S.A. A partir de 2014 a Silliker Portugal, S.A., apresenta-se como Mérieux NutriSciences, empresa que assume um compromisso com a saúde pública e em proteger e melhorar a saúde dos consumidores. A Mérieux NutriSciences, atualmente sediada em Canelas, é um laboratório de terceira parte, ou seja, não possui interesses nas entidades que requisitam as análises, isto é, os clientes são empresas que não pertencem ao mesmo grupo.

A Mérieux NutriSciences (**Figura 1**) é líder no fornecimento de análises alimentares, estando presente em 26 países com mais de 100 laboratórios acreditados por todo o mundo. O grupo Mérieux NutriSciences é uma referência na prestação de serviços de excelência estando associado a valores como integridade, excelência, responsabilidade e iniciativa, para os quais contribuem o elevado conhecimento científico, os valores éticos e um sólido sistema de qualidade. Oferece vários serviços analíticos e de consultoria nas áreas de segurança e qualidade alimentar, água e ambiente, agroquímicos, cosméticos e higiene pessoal, bens de consumo, farmacêutica e dispositivos médicos.



*Figura 1: Instalações da Mérieux NutriSciences em Vila Nova de Gaia*

A Mérieux NutriSciences faz a recepção e preparação das amostras, análises químicas e microbiológicas de diversas matrizes alimentares, como carne e seus derivados, pescado e seus derivados, laticínios, água, bebidas, frutas e vegetais, cereais e grãos, alimentação animal e produtos acabados. Possui ainda os departamentos de rotulagem e mercadologia.

## Capítulo 2- Carboidratos

Os carboidratos constituem uma das classes mais abundantes e diversas de compostos orgânicos naturais. A exigência dos consumidores relativamente à qualidade dos produtos tem aumentado a análise analítica para rotulagem nutricional destes compostos. Além disso, os consumidores também estão cada vez mais conscientes da importância da rotulagem alimentar, das suas necessidades alimentares individuais e dos efeitos para a saúde do consumo excessivo de alimentos com elevado teor de açúcares, sódio e gordura saturada [8].

Do ponto de vista estrutural, os carboidratos são moléculas constituídas por átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio. Os carboidratos podem ser classificados com base no seu tamanho molecular, sendo monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos as três classificações principais. Os monossacarídeos, como a glucose, a frutose e a galactose (representados na **figura 2**) são os carboidratos mais simples, consistindo em cadeias de carbono com um grupo funcional carbonilo. O grupo funcional pode ser um aldeído ou uma cetona, sendo o monossacarídeo uma aldose ou uma cetose, respetivamente. O grupo hemiacetal de um monossacarídeo pode reagir com o grupo álcool de outro monossacarídeo e formar uma ligação glicosídica, originando um dissacarídeo, como a sacarose, a lactose e a maltose, representados na **figura 3**. Os oligossacarídeos são formados pela união de dois a dez monossacarídeos por ligações glicosídicas e os polissacarídeos podem conter centenas ou milhares de monossacarídeos [9]–[11].

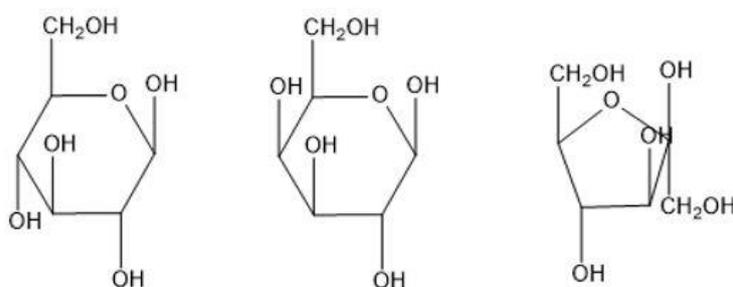


Figura 2: Estrutura dos monossacarídeos  $\alpha$ -D-Glucose,  $\alpha$ -D-Galactose e  $\alpha$ -D-Frutose

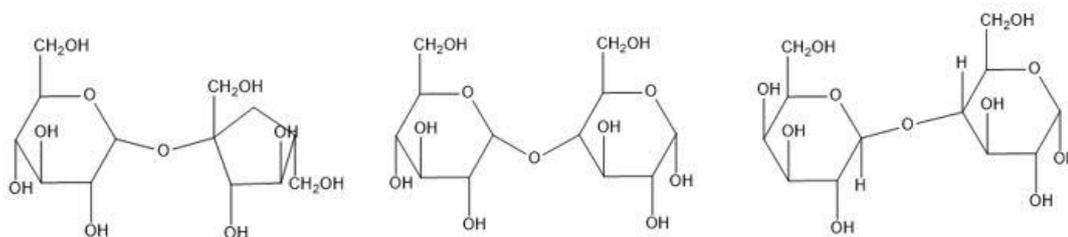


Figura 3: Estrutura dos dissacarídeos sacarose, maltose e lactose

O açúcar, para além de constituir a principal fonte de energia para o corpo humano, é um ingrediente atrativo para a indústria alimentar devido às diversas propriedades que possui. Ao ser adicionado aos produtos alimentares consegue aumentar a sua doçura, realçar as cores e sabores através da sua interação com outros constituintes dos alimentos, tornando-os mais apelativos para o consumidor. Além do ponto de vista sensorial, este ingrediente é muitas vezes adicionado pelas suas propriedades de preservação alimentar pela sua natureza higroscópica, que reduz a atividade da água nos alimentos e inibe o crescimento microbiano [8], [11]–[13].

#### ▪ 2.1. Métodos de análise

A escolha do método analítico mais adequado para cada análise depende da natureza da matriz, do objetivo, do custo e do tempo de cada análise. É necessário que o método seja validado para cada matriz, demonstrando que o método, utilizando aquelas condições específicas, é válido para o seu objetivo [2].

Devido à grande diversidade de matrizes a serem utilizadas, à sua rapidez e deteção simultânea de vários compostos com sensibilidade elevada, rapidamente os métodos instrumentais, como a cromatografia líquida de alta eficiência, substituíram muitas das análises anteriormente realizadas por química clássica (métodos não instrumentais).

Inicialmente, a análise de carboidratos era efetuada com testes de cor qualitativos que foram depois adaptados para quantificação dos açúcares redutores através da redução do Cu (II) a Cu (I) (teste de Fehling). Posteriormente foram utilizados métodos enzimáticos e atualmente a técnica mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência.

### 2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography- HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), desenvolvida durante os anos de 1960, é uma das técnicas de separação mais usada devido à sua sensibilidade, precisão e aplicabilidade a diversas substâncias de grande interesse para a indústria. Ao contrário de técnicas como a cromatografia gasosa, a HPLC não é limitada pela volatilidade da amostra ou pela sua estabilidade térmica. A separação cromatográfica resulta da interação seletiva entre as moléculas da amostra com a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (coluna cromatográfica).

O equipamento de HPLC, representado esquematicamente na **figura 4**, é constituído por um injetor, uma bomba de alta pressão, uma coluna cromatográfica, um detetor e um computador para processamento dos dados.

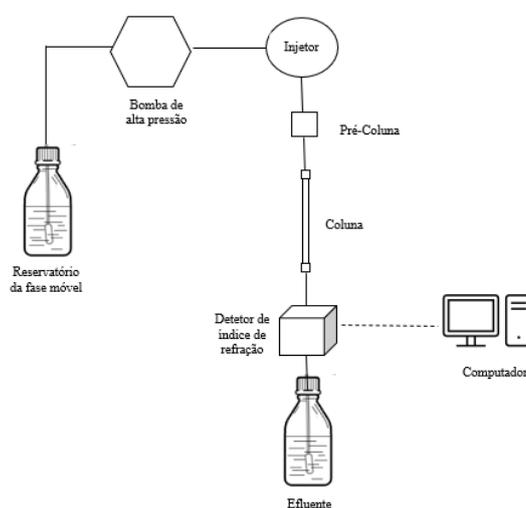


Figura 4: Representação esquemática da HPLC

O injetor é responsável por colocar a amostra no fluxo da fase móvel para que seja introduzida na coluna. A amostra encontra-se num frasco (vial) que está posicionado por baixo do conjunto da agulha e êmbolo. A válvula de injeção típica possui seis portas e duas posições: a posição de carga e a posição de injeção. Quando a válvula de injeção se encontra na posição de carga, a agulha de amostragem perfura a membrana de polietileno da tampa do frasco (vial) para introdução da amostra na serpentina (loop) fixa externa, ao mesmo tempo que a fase móvel flui diretamente da bomba para a coluna a alta pressão. Quando a válvula é rodada para a posição de injeção vai haver conexão entre a bomba e a fase móvel com a coluna, sendo a amostra impulsionada para a coluna. Após as injeções estarem completas, o conjunto da agulha é retirada

do frasco em análise e o frasco com amostra seguinte é injetado da mesma maneira. Os injetores automáticos permitem a análise de um grande número de amostras sem intervenção do operador e com elevada reprodutibilidade [2].

Os componentes da amostra são arrastados pela fase móvel ao longo da coluna através de uma bomba de alta pressão. Esta bomba é necessária uma vez que a fase móvel é um líquido com alguma viscosidade, sendo necessário a aplicação de pressão para ultrapassar a resistência exercida pelas pequenas partículas da coluna cromatográfica. A sua utilização tem a vantagem de se conseguir um fluxo de solvente rápido e controlado ao longo da coluna, resultando em condições reproduzíveis e maior precisão das análises efetuadas.

O processo de separação ocorre na coluna cromatográfica, que serve de suporte e contém a fase estacionária, conectando o injetor e o detetor. Os componentes da amostra vão migrar com velocidade diferente ao longo da coluna, sendo que o último componente a eluir é o que apresenta maior afinidade para a fase estacionária. A migração diferencial resulta do equilíbrio de distribuição dos diferentes componentes da amostra entre as partículas da fase estacionária e o fluxo da fase móvel. O requisito para utilização da HPLC é que a amostra seja solúvel na fase móvel. Se a fase estacionária for mais polar do que a fase móvel então a fase móvel é denominada de fase normal, sendo utilizado como material de suporte sílica e alumina. Se a fase estacionária for mais apolar então terá o nome de fase reversa, sendo esta a mais utilizada em HPLC devido à maioria dos compostos analisados serem polares. Os eluentes mais usados são a água, o metanol e o acetonitrilo. A fase móvel em HPLC deve ter elevado grau de pureza para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, uma vez que as impurezas podem interferir na deteção do analito. Uma forma de evitar a contaminação do equipamento por gases dissolvidos é a degaseificação da fase móvel, pois ao retirar os gases dissolvidos na fase móvel evitam-se bolhas na bomba, mantendo a linha de base estável. Para a degaseificação pode ser utilizado o aparelho de ultrassom. Outra maneira de impedir a contaminação da coluna é a utilização de uma pré-coluna, que contém o mesmo enchimento da fase estacionária mas tamanho menor, evitando alterações do desempenho da coluna e aumento do seu tempo de vida.

A eficiência da coluna pode ser medida pelo número de pratos teóricos (N) ou pela altura equivalente a um prato teórico (HETP). Define-se HETP como a espessura de uma camada de coluna em que existe equilíbrio das moléculas do analito entre as duas fases (móvel e estacionária). O número de pratos teóricos refere-se à capacidade relativa de uma coluna fornecer bandas estreitas e melhores separações.

O detetor tem como função identificar a presença do analito de interesse que está a ser eluído da coluna cromatográfica, gerando um sinal eletrónico na forma de banda cromatográfica (curva gaussiana). É desejável que o detetor da HPLC possua alta sensibilidade, baixo limite de deteção, ampla faixa de linearidade, seja confiável e reproduzível, de fácil operação, insensível a mudanças na fase móvel e à temperatura e apresente baixo nível de ruído. No entanto, não existe nenhum detetor que exiba todas as características mencionadas. Os detetores usados em HPLC podem ser do tipo ultravioleta-visível (UV-Vis), eletroquímicos, fluorescência, espectrometria de massa, de díodos e de índice de refração [2]. O tempo de retenção de cada banda, ou seja, o tempo que decorre entre a injeção da amostra e o máximo da banda, é utilizado para identificação dos compostos. A gama do fluxo pode variar entre 0,10 mL/min e 10,00 mL/min, sendo que a variação do fluxo resulta na alteração dos tempos de retenção e nas áreas dos picos, pelo que o fluxo tem de ser constante e isento de pulsações. Uma forma de reduzir os tempos de retenção sem diminuir o volume de retenção é aumentar a taxa de fluxo, sendo produzido uma cromatograma semelhante, mas com fatores de separação reduzidos [15].

Uma vez que os açúcares não possuem cromóforos ou fluoróforos, não podem ser detetados por detetores de fluorescência ou UV-Vis, sendo o detetor de índice de refração o mais utilizado para estes compostos, apresentando como vantagens a sua simplicidade e baixo custo. Como desvantagem encontra-se o facto de não poder ser utilizada eluição por gradiente, uma vez que qualquer alteração na composição da fase móvel vai alterar o seu índice de refração e, conseqüentemente, irá alterar o sinal da linha de base. Quanto maior for a diferença entre o índice de refração da fase móvel e da alteração do índice de refração provocada pela presença da amostra maior será o sinal obtido. O índice de refração depende da natureza do composto, da temperatura, do comprimento de onda da radiação e da concentração do composto. É através da manutenção constante das três primeiras variáveis referidas que se pode utilizar o índice de refração para determinar a concentração do composto [2], [14].

Ao efetuar uma separação cromatográfica iremos obter um cromatograma, ou seja, uma representação gráfica da separação, em que cada banda corresponde a um componente da amostra em estudo. Para avaliar a separação é necessário considerar a resolução, a capacidade de retenção e a seletividade do sistema cromatográfico. Bandas mais estreitas e com menores valor de  $t_w$  (largura da banda, expressa em termos de pratos teóricos) apresentam melhor separação.

A resolução corresponde à magnitude da separação, ou seja, à capacidade da coluna em separar as bandas do cromatograma, sendo que as bandas com baixa resolução irão apresentar má separação no cromatograma. A resolução pode ser determinada pela seguinte equação:

$$R_S = \frac{2\Delta t}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

Sendo  $R_S$  a resolução,  $\Delta t$  a diferença entre o tempo de retenção dos picos 1 e 2,  $w_1$  e  $w_2$  a largura das bandas 1 e 2 na linha de base, respetivamente [2].

### **Capítulo 3-Parâmetros validados**

A validação de métodos analíticos surgiu da necessidade de comprovar a qualidade dos métodos de ensaio, fornecendo conhecimento sólido e experiência prática do desempenho do método, incluindo a percepção de quais os passos críticos do processo e confiança de que os resultados analíticos apresentam a qualidade adequada ao objetivo. A NP ISO/IEC 17025:2018 [16] define a validação de um método analítico como a “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido” [17].

Para validar um método é necessário seguir vários passos, como especificar os requisitos do método e estabelecer os seus parâmetros de desempenho; identificar as grandezas que podem alterar estes parâmetros e a sua extensão; determinar as características do método e estabelecer as suas limitações; verificar se o uso do método cumpre com os requisitos; declarar se o método é válido ou não. Assim, torna-se necessário avaliar os parâmetros de validação como a exatidão, a incerteza, a precisão, a seletividade e especificidade, a veracidade, os limiares analíticos, a linearidade e a gama de trabalho e tratar os dados estatisticamente, útil para sumarizar os dados e fazer julgamentos objetivos sobre o conjunto dos dados obtidos [11], [18], [19].

#### **▪ 3.1. Precisão**

A precisão está relacionada com o grau de concordância entre os valores obtidos em medições repetidas na mesma amostra, ou em amostras semelhantes, em condições definidas de repetibilidade, reprodutibilidade ou de precisão intermédia, avaliando a dispersão de resultados entre ensaios independentes. Esta dispersão pode ser avaliada em três níveis distintos através da repetibilidade, reprodutibilidade ou da precisão intermédia [19], [20].

A precisão, parâmetro que depende da concentração do analito, descreve qualitativamente os erros aleatórios, sendo expressa quantitativamente por parâmetros como o desvio padrão (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

ou o coeficiente de variação (CV)

$$\% CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

onde s corresponde ao desvio-padrão e  $\bar{x}$  à média dos resultados obtidos. É considerado satisfatório um coeficiente de variação inferior a 10 %. No entanto, este valor pode diferir de acordo com o grau de exigência da precisão do método definido por cada laboratório. Quanto mais preciso for o resultado melhor será a sua qualidade [9], [11], [12].

### 3.1.1. Repetibilidade

A repetibilidade corresponde à precisão de um método de ensaio que é obtida em condições de repetibilidade, ou seja, as medições são realizadas sobre a mesma amostra durante um curto intervalo de tempo, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento e procedimento [9], [11], [12].

Para determinação da precisão em condições de repetibilidade, seguindo as orientações do ICH, devem ser efetuadas pelo menos 6 medições da mesma amostra [21], [22]. O resultado é aceite se as determinações forem realizadas em condições de repetibilidade e  $|X_i - X_{i-1}| \leq r_r$ , sendo  $r_r$  o limite de repetibilidade e  $X_i, X_{i-1}$  os resultados do ensaio obtidos em condições de repetibilidade. O limite de repetibilidade corresponde ao valor máximo da diferença absoluta entre dois resultados dos ensaios obtidos em condições de repetibilidade, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %). Para um nível de confiança de 95 %, o limite de repetibilidade,  $r_r$ , é avaliado de acordo com a expressão 4 e é expresso nas mesmas unidades que os resultados.

$$r_r = t_{crit} \cdot \sqrt{2} \cdot s_{ri} \quad (4)$$

sendo  $s_{ri}$  o desvio-padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados e  $t_{crit}$  o valor t-student bicaudal [20].

O fator  $\sqrt{2}$  reflete a diferença entre duas medições e  $t_{crit}$  é o valor t-student bicaudal para um número específico de graus de liberdade e com o nível de confiança necessário. Para um

número elevado de graus de liberdade, considera-se que  $t_{crit} \approx 2$ , a um nível de confiança de 95 %, pelo que o limite de repetibilidade é frequentemente aproximado a [9], [12], [20]:

$$r_r = 2,8 \cdot s_{ri} \quad (5)$$

O limite de repetibilidade relativo ( $CVr_r$ ) é obtido pela expressão 6:

$$CVr_r(\%) = 2,8 \times \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

O desvio padrão da repetibilidade ( $s_r$ ) é calculado pela expressão 7:

$$s_r = \sqrt{\sum_{k=1}^n \frac{(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (7)$$

sendo  $x$  o resultado individual obtido na amostra,  $\bar{x}$  a média aritmética dos resultados obtidos na amostra e  $n$  o número de ensaios efetuados na amostra.

A variância da repetibilidade ( $s_r^2$ ) é calculada pela expressão 8:

$$s_r^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(x-\bar{x})^2}{n-1} \quad (8)$$

### 3.1.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é definida como a precisão de um método de ensaio seguindo o mesmo procedimento de medição e utilizando sempre a mesma amostra, mas variando as condições de medição como o laboratório, o analista, o equipamento ou o intervalo temporal. Este parâmetro só pode ser estimado através de ensaios interlaboratoriais e define a amplitude dos erros aleatórios de quantificação, sendo esperado maior variação nos resultados do que em condições de repetibilidade. Não é um parâmetro importante na validação de um método em laboratórios de análises uma vez que as condições experimentais variam pouco ao longo do tempo. Para determinar a reprodutibilidade é calculada a variância associada através da expressão 9:

$$s_{Ri}^2 = s_{Li}^2 + s_{ri}^2 \quad (9)$$

em que  $s_{Ri}^2$  corresponde à variância da reprodutibilidade,  $s_{Li}^2$  à variância interlaboratorial e  $s_{ri}^2$  à variância da repetibilidade [9], [12].

### 3.1.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia, também designada por variabilidade intralaboratorial, é definida como a precisão de um método de ensaio avaliada por aplicação do mesmo procedimento na mesma amostra, durante um extenso período de tempo, sendo definidas quais as condições a

variar, como o uso de diferentes analistas ou equipamentos. É o parâmetro de qualidade mais representativo da variação dos resultados no laboratório, sendo as condições mais variáveis do que as condições de repetibilidade, e pode ser determinado e controlado de diversas formas consoante o ensaio e o tipo de aplicação do estudo, sendo umas delas as cartas de controlo de amplitudes. O objetivo ao estudar a precisão intermédia é obter uma estimativa da precisão que reflita todas as fontes de variação que irão ocorrer num único laboratório sobre condições de rotina [9], [12].

O desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) é determinado pela expressão 10:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (10)$$

sendo  $t$  o número de amostras analisadas,  $n$  o número de ensaios efetuados por amostra,  $j$  o número da amostra,  $k$  o número do resultado obtido para a amostra  $j$ ,  $y_{jk}$  o resultado individual ( $k$ ) para a amostra  $j$  de 1 a  $t$  e  $\bar{y}_j$  a média aritmética dos resultados da amostra  $j$  de 1 a  $t$ .

Quando  $n=2$  a equação é expressa na forma:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (11)$$

sendo  $y_{j1}$  o primeiro resultado da amostra  $j$  e  $y_{j2}$  o segundo resultado da amostra [20].

Para determinar o limite de precisão de intermédia, expresso em percentagem, é usada a expressão:

$$\text{Limite da precisão intermédia (\%)} = \frac{S_i \times 2,8}{\bar{x}} \times 100 \quad (12)$$

sendo  $S_i$  o desvio padrão da precisão intermédia e  $\bar{x}$  a média dos resultados obtidos.

### ▪ 3.2. Incerteza

A incerteza é o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos à grandeza que se pretende medir, sendo caracterizada por um intervalo. É a medida quantitativa da exatidão, parâmetro que está dependente dos erros sistemáticos mas que também combina a componente dos erros aleatórios. A determinação da incerteza é importante para avaliar a confiança no resultado obtido e para comparar os resultados entre medições e com os valores de referência. A avaliação da incerteza utiliza materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais ou ensaios de recuperação [5], [20].

É importante realçar que a incerteza de medição não é o mesmo que o erro de medição. Enquanto o erro é um valor único, o qual pode ser aplicado como correção do resultado obtido, a incerteza é um intervalo de confiança dos resultados, não podendo ser usada para a sua correção e por isso não deve ser interpretada como representante do erro. Podem ser desprezadas para o cálculo todas as componentes de incerteza cuja combinação seja inferior a 1/5 do valor da contribuição mais elevada para a incerteza [1], [23]–[25].

Existem dois tipos de incerteza, a incerteza combinada e a incerteza expandida, que podem ser determinadas com base na metodologia passo-a-passo ou na abordagem baseada nos dados de validação. A incerteza combinada ( $u_c(y)$ ) é a incerteza associada ao resultado quando são consideradas todas as fontes de incerteza que contribuem para o resultado final. Aplicando a lei da propagação das incertezas é possível combinar as contribuições das diversas componentes individuais de incerteza para obter um valor único. Antes da combinação, todas as contribuições para a incerteza têm de ser expressas na forma de incertezas padrão, ou seja, os componente da incerteza devem ser expressos como desvio padrão. Frequentemente as incertezas padrão apresentam uma distribuição retangular ou triangular. A distribuição retangular é utilizada quando não há informação que indique ausência de uma distribuição uniforme dos valores dentro do intervalo definido. Neste caso a função densidade probabilidade apresenta uma forma retangular (uma vez que todos os valores da grandeza apresentam igual probabilidade) e como neste caso a incerteza é apresentada na forma de intervalo de confiança,  $y \pm I$ , sem indicação do nível de confiança, a incerteza será  $u(y) = \frac{I}{\sqrt{3}}$ . No caso da distribuição triangular existe uma tendência central na distribuição dos valores e um valor mínimo e máximo, não existindo razão para esperar que os valores se encontrem nos extremos da grandeza. A função densidade probabilidade apresenta uma forma triangular e a incerteza será  $u(y) = \frac{I}{\sqrt{6}}$  [26].

No caso da realização de ensaios de recuperação para obtenção do valor da incerteza, a incerteza padrão combinada ( $u_c$ ) pode ser determinada através da expressão 13:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{fortificação relativo}}^2 + u_{\text{recuperação relativo}}^2} \quad (13)$$

sendo  $u_{\text{fortificação relativo}}$  a componente da incerteza relativa à preparação da solução de fortificação e  $u_{\text{recuperação relativo}}$  a componente da incerteza associada ao ensaio de recuperação.

A incerteza expandida (U) corresponde à incerteza global e define o resultado da medição sob a forma de intervalo  $[y-U; y+U]$  que inclui os valores que poderiam ser atribuídos à grandeza, com níveis de confiança elevados (superiores a 95 %). Para calcular a incerteza expandida o valor

da incerteza-padrão ( $u(y)$ ) deve ser multiplicado por um fator de expansão,  $k$ . Pela análise da curva gaussiana verifica-se que aproximadamente 68 % dos resultados estarão num intervalo de um desvio-padrão da média. Aplicando um fator de expansão igual a 2, obtemos que aproximadamente 95 % dos resultados estão dentro do intervalo de dois desvios-padrão da média de. Se  $k=3$  então o nível de confiança da incerteza aumenta para 99,7 %. Por esta razão, para o cálculo da incerteza expandida utiliza-se a expressão 14:

$$U = k \times u_c(y) \quad (14)$$

e considera-se que  $2 \leq k \leq 3$ , assumindo que a grandeza medida segue uma distribuição normal e que as contribuições das incertezas combinadas são da mesma ordem de grandeza [24], [27].

A incerteza expandida deve ser apresentada com dois algarismos significativos e o resultado deve ser arredondado ao último algarismo significativo da incerteza expandida associada [1].

Um dos métodos utilizados para calcular a incerteza combinada é o método por combinação de incertezas absolutas e relativas. Se a combinação envolver a soma e/ou diferença de grandezas, por exemplo  $y = p + q$ , a incerteza padrão combinada é dada pela expressão 15:

$$u_c(y(p, q)) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2} \quad (15)$$

Se o modelo envolver produtos e/ou quocientes (por exemplo  $y = p \times q \times r$  ou  $y = \frac{p}{q \times r}$ ), a incerteza padrão combinada é dada pela expressão 16:

$$\frac{u_c}{c}(y) = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2} \quad (16)$$

### 3.2.1. Abordagem “passo-a-passo”

O primeiro passo nesta abordagem é especificar a mensuranda, ou seja, a grandeza que se pretende medir, que é expressa através de uma equação matemática. Como exemplo iremos considerar a preparação de uma solução de fortificação (SF), sendo a mensuranda a concentração de analito (A) presente nessa solução. Se o reagente inicial se encontrar no estado líquido, a mensuranda pode ser expressa como:

$$[A]_{SF} = \frac{C_i \times V_i}{V_{SF}} \quad (17)$$

sendo  $C_i$  a concentração de analito no reagente inicial,  $V_i$  o volume retirado desse reagente e  $V_{SF}$  o volume final da solução de fortificação preparada.

Se o reagente inicial se encontrar no estado sólido:

$$[A]_{SF} = \frac{m \times P}{V_{SF}} \quad (18)$$

onde  $m$  é a massa da toma do reagente e  $P$  a sua pureza.

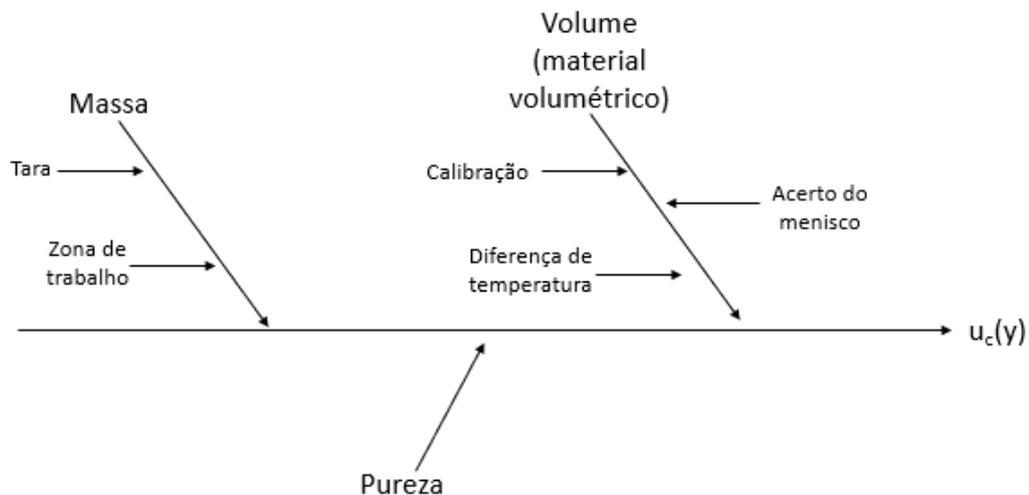


Figura 5: Diagrama de causa/efeito para visualização das grandezas que contribuem para o cálculo da incerteza, para o exemplo em que o reagente inicial se encontra no estado sólido

O segundo passo é identificar as fontes de incerteza, considerando que cada variável da expressão matemática contribui para a incerteza do resultado final. Podemos recorrer a diagramas de causa/efeito (também conhecidos por espinha de peixe) (como apresentado na **figura 5**) para facilitar a identificação e agrupar as fontes de incerteza a considerar [26].

O terceiro passo é agrupar as componentes de incerteza, quantificá-las e proceder à sua conversão em desvios padrão. No exemplo em que o reagente inicial se encontra no estado sólido, as fontes de incerteza a considerar são a massa  $m$ , a pureza  $P$  e o volume final da solução de fortificação. A incerteza associada à massa considera a incerteza padrão do certificado de calibração da balança na zona da tara ( $u_{\text{tara}}$ ) e na zona de trabalho ( $u_{\text{zt}}$ ), estando ambas dependentes do erro máximo admissível da balança (e.m.a.).

A incerteza padrão associada ao volume depende da micropipeta ou do material volumétrico utilizado para transferir o volume do reagente, sendo que a incerteza padrão da micropipeta vem indicada pelo fabricante no certificado. No caso dos materiais volumétricos devem considerar-se três variáveis de incerteza secundárias:

- a. a incerteza associada à calibração do material volumétrico ( $u_{\text{MV}}$ ),
- b. incerteza associada ao acerto do menisco do material volumétrico em condições de repetibilidade ( $u_{\text{me}}$ );
- c. a incerteza associada à diferença de temperatura do material volumétrico relativamente à temperatura de calibração ( $u_{\text{T}}$ ).

A incerteza associada à pureza é indicada no certificado do reagente na forma de incerteza expandida. Para transforma numa incerteza padrão deve dividir-se o valor indicado no certificado (I) por  $\sqrt{3}$ , assumindo que segue uma distribuição retangular:

$$u_p = \left(\frac{I}{\sqrt{3}}\right) \quad (19)$$

Para calcular a incerteza padrão da massa é necessário combinar a incerteza padrão na zona da tara e na zona de trabalho, usando a lei da propagação das incertezas:

$$u_m = \sqrt{(u_{tara})^2 + (u_{zt})^2} \quad (20)$$

sendo

$$u_{tara} = \left(\frac{e.m.a.}{\sqrt{3}}\right)_{tara} \quad (21)$$

$$u_{zt} = \left(\frac{e.m.a.}{\sqrt{3}}\right)_{zt} \quad (22)$$

admitindo uma distribuição retangular.

Para calcular a incerteza associada ao volume é preciso combinar a  $u_{Mv}$ , a  $u_T$  e  $u_{me}$ , usando a lei da propagação das incertezas. A  $u_{Mv}$  na forma de incerteza padrão é:

$$u_{Mv} = \frac{C_{MV}}{\sqrt{6}} \quad (23)$$

sendo  $C_{MV}$  a incerteza associada à calibração do volume do material volumétrico.

A  $u_{me}$  é determinada na forma de incerteza padrão pela determinação do desvio-padrão em condições de repetibilidade. A  $u_T$  é calculada na forma de incerteza padrão como:

$$u_T = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} \quad (24)$$

sendo  $\Delta V$  a variação do volume do material volumétrico, considerando que a temperatura do laboratório oscila aproximadamente 4°C:  $\Delta V = \pm (4 \times 2,1 \times 10^{-4})$ , sendo  $10^{-4}$  o coeficiente de expansão da água.

Combinando as fontes de incerteza padrão anteriores, a  $u_v$  é obtida por:

$$u_v = \sqrt{(u_{Mv})^2 + (u_{me})^2 + (u_T)^2} \quad (25)$$

O quarto passo é determinar a incerteza padrão combinada e calcular a incerteza expandida.

Assim, a incerteza combinada para o exemplo, recorrendo à metodologia passo a passo, é obtida pela equação 26:

$$u_c(y) = [A]_{SF} \times \sqrt{\left(\frac{u_p}{P}\right)^2 + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_v}{V}\right)^2} \quad (26)$$

Para calcular a incerteza expandida deve multiplicar-se a incerteza combinada pelo fator de expansão (k):

$$U(y) = u_c(y) \times k \quad (27)$$

A apresentação do resultado deve ser feito na forma de  $Y = y \pm U(y)$ .

### 3.2.2. Abordagem baseada em dados de validação

A abordagem baseada em dados de validação é adotada quando o método possui muitas etapas experimentais, tornando inviável a aplicação da abordagem passo-a-passo.

Na abordagem baseada em dados de validação, todos os resultados possuem uma incerteza associada. Para a quantificação da incerteza são utilizados os parâmetros globais de desempenho do método, independentemente da matriz analisada. Para o seu cálculo combinam-se as incertezas associadas à precisão (obtida em condições de precisão intermédia) e à justeza (quantificada pelo viés) relativas, de forma a serem combinadas.

$$u_c(y) = \sqrt{(u_{\text{precisão relativa}})^2 + (u_{\text{justeza relativa}})^2} \quad (28)$$

### ▪ 3.3. Seletividade e especificidade

A seletividade corresponde à capacidade de um método identificar e quantificar com exatidão apenas o analito na presença de interferentes, uma vez que estes podem influenciar o sinal obtido. A especificidade corresponde à capacidade do método responder apenas ao analito de interesse, não existindo interferentes no método. Para avaliar a presença de interferências pode recorrer-se a testes de recuperação, utilizando a mesma amostra com variações definidas da concentração do analito, em duplicado e em condições de repetibilidade. Se os valores das percentagens de recuperação estiverem dentro dos critérios de aceitação pré-definidos considera-se que o método é específico e seletivo [20], [24].

### ▪ 3.4. Justeza

Os erros sistemáticos são avaliados qualitativamente pela justeza, também denominada por veracidade, que corresponde ao grau de concordância entre a média de um número infinito de medições repetidas e o valor de referência aceite para o analito a ser determinado. Devido à impossibilidade de efetuar um número infinito de medições, quantitativamente a justeza é expressa na forma de viés.

O viés pode ser avaliado preferencialmente através da análise de materiais de referência certificados (MRC), no entanto na impossibilidade da sua utilização podem ser realizados testes comparativos e ensaios interlaboratoriais.

Ao utilizar um MRC devem ser efetuadas 7 réplicas e determinar o viés absoluto,  $v$ , expresso como:

$$v = \bar{x} - x_{ref} \quad (29)$$

sendo  $\bar{x}$  a média dos valores obtidos experimentalmente e  $x_{ref}$  o valor aceite como verdadeiro.

Pode também ser determinado o viés relativo,  $v$  (%) expresso como:

$$v(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (30)$$

Cada laboratório define o desvio permitido consoante o objetivo da análise, no entanto, geralmente um desvio viés inferior a 5 % é considerado satisfatório [20].

Ao analisar um MRC pode ainda ser calculado o valor-de-z (“z-score”) utilizando a equação 31 [20]:

$$valor - de - z = \frac{valor\ médio\ da\ repetibilidade\ (\bar{x}) - valor\ de\ referência\ (x_{ref})}{desvio\ padrão\ (s)} \quad (31)$$

De acordo com as indicações do Guia ISO/CEI 43 mencionadas no Guia Relacre 13 [20], um valor de  $|z| \leq 2$  é considerado satisfatório, se  $2 < |z| \leq 3$  o seu valor é questionável e se  $|z| > 3$  o valor considera-se incorreto, devendo o ensaio ser repetido.

Outra forma de avaliar a justeza é através da realização de ensaios de recuperação, devendo para isso a percentagem de recuperação obtida dentro do intervalo de recuperação dentro do intervalo definido.

#### **3.4.1. Materiais de referência certificados**

Um material de referência (MR) é um material suficientemente homogêneo e estável, cuja propriedades estão suficientemente especificadas para a sua utilização na aferição de equipamentos e avaliação de métodos de medição ou para atribuir valores a materiais em estudo. Um material de referência certificado (MRC) é um material de referência acompanhado de documentação emitida por uma entidade qualificada, cujos valores de concentração e incerteza

associada são conhecidos e rastreáveis. Os MRC devem ser utilizados para controlo das análises químicas e para a validação de métodos, sendo caracterizados pela sua representatividade, homogeneidade e estabilidade [5], [20], [28].

Uma das funções dos MRC é estabelecer a rastreabilidade das medições químicas e controlar a exatidão do método utilizado, assim como permitir a verificação do desempenho de um equipamento, procedimento e/ou dos analistas. Se existir concordância entre os valores dos resultados e o valor de referência desse material isso comprova a adequabilidade do método selecionado, a adequabilidade das condições de preparação das amostras, dos equipamentos e do operador, sendo os dados obtidos por esse método considerados corretos.

### 3.4.2. Rastreabilidade

O VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) define rastreabilidade como “propriedade do resultado de uma medição em que o resultado pode estar relacionado com uma referência através de documentos de calibrações, sendo que cada um contribui para a medição da incerteza” [28].

A rastreabilidade, que pode referir-se a documentação, é importante para bons resultados analíticos e confiança nesses resultados. Para além de essencial para a comparação de resultados, é também um requisito da ISO/IEC 17025 [24], [29].

### 3.4.3. Ensaio de Recuperação

Os ensaios de recuperação são essenciais para a validação de métodos analíticos, sendo utilizadas amostras, com a mesma matriz, que são fortificadas, ou seja, em que é adicionada uma quantidade conhecida de uma solução padrão de forma a verificar a quantidade de analito presente, devendo as amostras ser analisadas em replicado e em condições de repetibilidade. Com estes ensaios pretende-se verificar a existência de efeitos da matriz pela presença de interferentes que podem causar aumento ou diminuição da resposta analítica, sendo um ensaio importante para avaliar parâmetros como a seletividade do método [20].

O primeiro passo é determinar a concentração adicionada e o resultado teórico:

$$C_{adição} (g/L) = \frac{C_{solução\ mãe} (g/L) \times V_{inicial} (L)}{V_{final} (L)} \quad (32)$$

$$Resultado\ teórico (g/kg) = \frac{C_{adição} (g/L) \times volume (L)}{massa\ amostra (kg)} \quad (33)$$

O resultado teórico tem de ser convertido em g/100 g antes da sua utilização, sendo utilizada a equação 64 ou 65.

A percentagem de recuperação indica a quantidade de analito recuperada através da expressão 34:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Resultado obtido-branco}}{\text{Resultado teórico}} \times 100 \quad (34)$$

A recuperação média,  $\bar{R}$ , de analito de um material de referência é definida pela equação 35, sendo definida como a razão entre o valor médio estimado experimentalmente e o valor de referência:

$$\bar{R} = \frac{\overline{c_{obs}}}{c_{MRC}} \quad (35)$$

onde  $\overline{c_{obs}}$  é a concentração média estimada de  $n$  análises do MRC e  $c_{MRC}$  é o valor de referência do MRC [23].

### ▪ 3.5. Limiares analíticos

Os limiares analíticos, que incluem o limite de deteção e de quantificação, são estimados a partir da incerteza da quantificação do analito, incerteza de parâmetros da reta de calibração e dispersão dos valores em relação à reta de calibração. Esta determinação é importante para estabelecer qual é o menor nível aceitável de desempenho para uma aplicação.

#### 3.5.1. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor concentração de analito que pode ser quantificada pelo método com determinada exatidão e precisão de modo que o desempenho do método seja aceitável para uma dada aplicação. Em termos práticos, se o coeficiente de variação e o erro relativo forem inferiores a 10 % então a concentração do padrão de calibração menor, excluindo o branco, corresponde ao limite de quantificação. Apenas valores de concentração superiores ao limite de quantificação podem ser reportados e este pode ser determinado quantitativamente através da expressão genérica:

$$LOQ = x_0 + 10\sigma_0 \quad (36)$$

em que  $x_0$  corresponde à média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e reproduzindo o mais possível a situação de rotina e  $\sigma_0$  representa o desvio-padrão associado a  $x_0$ .

A quantificação é geralmente expressa em termos do sinal ou valor do analito que irá produzir estimativas com um desvio padrão relativo de 10 %, sendo por isso determinado pelo IUPAC que o valor de  $k$  por defeito é 10 [30].

Se o método envolver a utilização de calibração linear, então o limite de quantificação é dado pela expressão 37:

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (37)$$

na qual  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  o declive da curva de calibração [20].

Em métodos cromatográficos, o limite de quantificação pode também ser determinado pelo método da relação sinal-ruído, sendo este o método mais adequado quando os procedimentos analíticos apresentam ruído da linha de base. Para estimar o LOQ é comparado o sinal analítico obtido para uma amostra com baixa concentração da espécie de interesse com o sinal da amostra do branco. Assim, é estabelecida a concentração mínima que a espécie de interesse pode ser quantificada com confiança. É considerado aceitável uma relação sinal-ruído de 10:1, ou seja,  $\frac{S}{N} \geq 10$ , em que  $S$  é o sinal medido pelo equipamento e  $N$  o sinal do ruído da linha de base.

Outra forma de determinar o limite de quantificação é através de ensaios de recuperação, em que se fortifica a amostra com quantidades de analito que conduzem a que a concentração de analito obtida após a fortificação seja igual ao valor do limite de quantificação que se pretende definir. Deve ser calculada a recuperação de cada réplica efetuada e determinada a média das recuperações obtidas, que deve estar dentro do intervalo de recuperações definido pelo laboratório.

### 3.5.2 Limite de deteção

O limite de deteção (LOD) corresponde à concentração mínima de analito que pode ser detetada pelo método com determinado nível de confiança (normalmente 95 %). Na prática, corresponde à menor concentração de analito que pode ser distinguida do branco. Se for obtida uma leitura inferior ao limite de deteção não pode ser concluído que o analito está ausente na amostra, apenas podemos afirmar que, com o nível de confiança definido, a concentração do analito é inferior a determinado valor. O LOD não deve ser confundido com sensibilidade, uma vez que esta está associada à capacidade do método distinguir pequenas concentrações do analito [18].

Para determinar o limite de detecção são analisadas réplicas do branco e é utilizada a expressão 38:

$$LOD = x_0 + ks_0 \quad (38)$$

onde  $x_0$  representa a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e reproduzindo o mais possível a situação de rotina,  $s_0$  corresponde ao desvio-padrão associado a  $x_0$  e  $k$  à constante da distribuição normal.

Assumindo que a distribuição é gaussiana, então o valor de  $k$  (constante da distribuição normal) é 3,3 para um nível de confiança de 99,7 %. Se o método envolver a utilização de calibração linear, então o limite de detecção pode ser calculado pela expressão 39:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (39)$$

sendo  $S_{y/x}$  o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  o declive da curva de calibração.

No caso de método cromatográficos, em que existe ruído da linha de base, pode ser aplicado o método da relação sinal-ruído, sendo aceitável uma relação sinal-ruído de 3:1, ou seja  $\frac{S}{N} \geq 3$ , sendo  $S$  o sinal medido pelo equipamento e  $N$  o sinal do ruído da linha de base.

Para a correta definição do limite de detecção é preciso considerar a existência de dois tipos de erros possíveis em análises laboratoriais: o erro do tipo I (risco  $\alpha$ ) corresponde à probabilidade de confirmar a presença do analito em estudo numa amostra, quando, na verdade, está ausente. Já o erro do tipo II (risco  $\beta$ ) corresponde à probabilidade de confirmar a ausência do analito em estudo numa amostra, quando, na verdade, este está presente. Estes erros devem ser minimizados, pelo que para uma correta análise dos limiares analíticos  $\alpha=\beta=5\%$  (valores por defeito recomendados pelo IUPAC). Utilizando  $\alpha=\beta=5\%$  o LOD tem de ser 1,65s acima do valor especificado para o valor crítico, sendo  $1,65+1,65=3,30$ , que é frequentemente arredondado para 3s [18], [20].

### ▪ 3.6. Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações em que o método fornece resultados do analito de interesse com boa precisão, exatidão e com incerteza considerada aceitável. O limite de quantificação é o limite inferior da gama de trabalho e após o seu limite superior são observadas anomalias significativas na sensibilidade do método, pelo que este não

deve ser aplicado para concentrações fora da gama de trabalho definida. Para avaliação deste parâmetro deve ser representada graficamente a concentração do analito, com utilização de pelo menos cinco pontos de calibração com distribuição equitativa pela gama de concentrações [20].

### ▪ **3.7. Adequabilidade do sistema**

A adequabilidade do sistema consiste na capacidade do sistema analítico reportar um pico cromatográfico adequado no que respeita aos parâmetros de avaliação da qualidade cromatográfica, tais como tempo de retenção, resolução, assimetria, precisão dos resultados, número de pratos teóricos e fator de capacidade. Esta análise deve ser efetuada em cinco injeções do último padrão da curva de calibração. De acordo com o procedimento interno PCQ.34 [31], os critérios de aceitação são os seguintes:

- Tempo de retenção  $\pm 0,30$  min;
- Assimetria  $\leq 2,0$
- Pratos teóricos  $> 2000$
- Fator de capacidade  $> 2$
- Precisão: CV  $< 2,0$  %

### ▪ **3.8. Validação segundo o AS-SOP.025**

O procedimento global AS-SOP.025 “Development and industrialization of food chemistry methods” [32] é um procedimento interno definido pela Mérieux NutriSciences de modo a que o processo de validação seja consistente ao longo da rede global de laboratórios deste grupo. No AS-SOP.25 é recomendado efetuar ensaios de recuperação numa amostra por matriz e/ou a análise de um material de referência por família, sendo esses ensaios em triplicado, com 2 níveis diferentes (por exemplo LOQ e  $10 \times$  LOQ) e realizados em 2 dias diferentes. Para a avaliação da dispersão dos triplicados, foi adotado internamente a utilização do HorRat, apesar deste não ser um teste específico para a rejeição de replicados.

#### **3.8.1. Horwitz Ratio (HorRat)**

O Horwitz Ratio (HorRat) é um dos critérios adotados por organizações como a União Europeia e a AOAC INTERNATIONAL para aceitação de diversos métodos químicos de análises, sendo um parâmetro de desempenho normalizado relacionado com a precisão do método. Este parâmetro de desempenho foi desenvolvido a partir do desvio-padrão interlaboratorial, que possui uma variância elevada pela utilização de condições de reprodutibilidade. Pode também ser

aplicado ao desvio-padrão intralaboratorial, no entanto deve ser considerado metade a dois terços do valor obtido na equação devido à menor variância existente pela utilização de condições de repetibilidade.

O desvio-padrão relativo previsto (PRSD) pode ser representado empiricamente através da equação de Horwitz:

$$PRSD(\%) = 2C^{-0,15} \quad (40)$$

sendo C a concentração expressa fração mássica.

A concentração deve ser expressa de forma adimensional, através da fração mássica, de forma a simplificar a expressão e para ser independente do analito

O HorRat é calculado pela equação:

$$HorRat = \frac{CV(\%)}{PRSD} \quad (41)$$

Sendo o CV calculado a partir dos dados e PRSD o desvio-padrão relativo previsto pela equação de Horwitz. [33]

Empiricamente, a gama aceitável para o HorRat em condições de reprodutibilidade é entre 0,5 e 2,0. Se o resultado obtido for superior a 2,0 pode indicar a existência de amostras não homogêneas ou necessidade de otimizar o método. [34]

#### Capítulo 4- Métodos estatísticos

Os métodos estatísticos são importantes para o tratamento dos dados obtidos e para retirar conclusões objetivas sobre as diferenças entre conjuntos de dados (testes de significância).

##### ▪ 4.1. Curva de calibração e linearidade

Uma curva de calibração fornece informação sobre a existência de dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração da amostra. A linearidade corresponde à capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito, dentro de uma gama de trabalho definida, e pode ser avaliada visualmente, através do coeficiente de correlação (r), testes estatísticos ou pela análise de resíduos [20].

O coeficiente de correlação é um valor adimensional que estabelece a interdependência entre o sinal obtido e a concentração do padrão correspondente e pode tomar valores de  $-1 \leq r \leq +1$ , sendo que o seu valor deve ser superior a 0,995 para um bom ajuste do modelo linear. Para o modelo de regressão linear o coeficiente de correlação linear é calculado pela equação 42:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum((x_i - \bar{x})^2)][\sum((y_i - \bar{y})^2)]}} \quad (42)$$

Para avaliar se a correlação é significativa pode recorrer-se ao teste t para o r. A hipótese nula ( $H_0$ ) é definida como não existindo correlação linear entre x e y, ou seja,  $H_0: r=0$ . O primeiro passo é determinar o valor de t através da expressão 43:

$$t = \frac{|r| \times \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (43)$$

sendo n o número de padrões utilizados na construção da curva de calibração

Após o cálculo do valor t, este é comparado com o valor t tabelado para 95 % de confiança e n-2 graus de liberdade. Se  $|t_{cal}| < t_{tab}$  a hipótese nula é aceite, pelo que não existe correlação linear entre x e y. Se  $|t_{cal}| > t_{tab}$  a hipótese nula é rejeitada, havendo uma correlação linear entre x e y, sendo neste caso o modelo selecionado o que melhor se ajusta aos resultados. Outra forma de avaliar o ajuste é através de métodos estatísticos, como o teste de Mandel. O teste de Mandel avalia se a função mais adequada para representar a calibração é a função linear,  $y=a+bx$  ou uma função polinomial. Partindo do conjunto de pares ordenados deve ser calculada a função linear e outra função (por exemplo, a função quadrática,  $y=a+bx+cx^2$ ), os desvios-padrão para cada função ( $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ ), a diferença das variâncias ( $DS^2$ ) e o valor teste PG (teste F). O desvio padrão residual da reta de calibração exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}, \hat{y} = a + bx \quad (44)$$

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}}, \hat{y} = a + bx + cx^2 \quad (45)$$

De seguida é calculada a diferença das variâncias ( $DS^2$ ) é obtida pela expressão

$$DS^2 = (n-2) \cdot S_{y/x}^2 - (n-3) \cdot S_{y^2}^2 \quad (46)$$

onde  $S_{y/x}^2$  e  $S_{y^2}^2$  correspondem aos desvios-padrão residuais da calibração linear e não linear, respetivamente e n ao número de padrões de calibração.

De seguida é realizado um teste F, determinando o valor de PG pela equação 47:

$$PG = \frac{DS^2}{(S_{y^2})^2} \quad (47)$$

O passo seguinte é comparar o valor de PG obtido e o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para 1 grau de liberdade do numerador e n-3 graus de liberdade do denominador e 95 % de confiança. Se  $PG \leq F_{tab}$  a função de calibração é linear pois é a que produz

um melhor ajuste dos pontos. Se  $PG > F_{\text{tab}}$  a função que melhor se ajusta aos resultados obtidos é a função quadrática. Neste caso deve ser avaliada a possibilidade de reduzir a gama de trabalho ou de usar outra função com melhor ajuste [20].

Para traçar a curva de calibração a resposta obtida pelo instrumento de análise é relacionada, graficamente, com a variável em estudo (como a concentração), devendo ser escolhido o modelo que ajuste dos resultados obtidos (linear, quadrático...). O modelo escolhido deve apresentar o menor desvio dos resultados obtidos experimentalmente, de modo a que os valores de x desconhecidos previstos usando esse modelo providenciem confiança nos resultados obtidos. Os critérios de aceitação da reta de calibração, de acordo com o PCQ.34: Validação de métodos em análise química [31], são o coeficiente de correlação ser superior ou igual a 0,995, avaliação da linearidade e validação da gama de trabalho pelo teste de homogeneidade de variâncias.

Um dos métodos mais utilizados para a escolha do modelo de regressão é baseado no método dos mínimos quadrados, que assume que a soma dos quadrados das diferenças entre os valores previsto pelo modelo ( $\hat{y}_i$ ) e os valores de y é a menor possível, ou seja:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \text{minimo} \quad (48)$$

No modelo de regressão linear verifica-se a existência de uma relação linear entre os valores das ordenadas e das abcissas, sendo graficamente traduzido por uma reta cuja equação da reta de calibração é mostrada na equação 49:

$$y = a + bx \quad (49)$$

sendo a e b a ordenada na origem e o declive, respetivamente.

Os valores de a e b podem ser obtidos através de ferramentas informáticas, como o Excel, ou obtidos matematicamente pelas expressões 50 e 51. O valor t corresponde ao valor t-student tabelado para n-2 graus de liberdade e 95 % de confiança.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (50)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (51)$$

É necessário determinar a incerteza associada aos valores de a e b,  $s_{a,t}$  e  $s_{b,t}$ , respetivamente, sendo  $s_a$  e  $s_b$  calculados pelas equações 52 e 53.

$$s_a = s_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (52)$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (53)$$

sendo n o número de padrões utilizados para construir a curva de calibração e  $s_{y/x}$  o desvio padrão residual da curva de calibração (obtido pela equação 42) [20].

Assim, a forma correta de apresentar a reta de calibração do modelo de regressão linear é:

$$y = (a \pm s_a t) + (b \pm s_b t)x$$

#### ▪ 4.2. Teste *t*

O teste *t* avalia se as diferenças entre resultados são significativas, com um determinado grau de confiança, de forma a verificar se as diferenças observadas se devem apenas a erros aleatórios (e não a erros sistemáticos). Como hipótese nula ( $H_0$ ) considera-se que as médias não são significativamente diferentes e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) é que as médias são significativamente diferentes do  $x_{ref}$ , ou seja,  $H_0: \bar{x} = x_{ref}$ .

O valor *t* é determinado pela expressão 58:

$$t_{calculado} = |\bar{x} - x_{ref}| \times \frac{\sqrt{n}}{s} \quad (54)$$

sendo  $\bar{x}$  a média dos resultados obtidos experimentalmente, *s* o desvio padrão associado à média dos valores experimentais e *n* o número de resultados

De seguido o valor de  $|t|$  calculado é comparado com o valor *t-student* tabelado para *n*-1 graus de liberdade e 95 % de confiança. Se  $|t_{calculado}| < t_{tabelado}$ ,  $H_0$  não é rejeitada e podemos concluir que os resultados não diferem significativamente. Se  $|t_{calculado}| > t_{tabelado}$  os valores de  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  apresentam diferenças significativas, sendo evidenciada estatisticamente a existência de desvios [18], [20].

Uma das aplicações deste teste é na determinação da justeza durante a validação de um método, uma vez que se não forem verificadas diferenças significativas entre  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  para *n*-1 graus de liberdade e 95 % de confiança considera-se que o método é justo e que não há evidências da existência de erros sistemáticos a afetarem os resultados [35].

#### 4.3. Teste de Grubbs

A detecção estatística de valores atípicos (outliers) no conjunto de resultados obtido é de extrema importância. O teste de Grubbs é um teste estatístico, introduzido em 1950, que deteta valores atípicos, assumindo que a os resultados obtidos seguem uma distribuição normal. Para aplicar este teste é necessário previamente calcular a média e o desvio-padrão, de forma a verificar quão desviado se encontra o valor suspeito, sendo considerados como suspeitos os valores extremos do conjunto de resultados obtidos. Para isso é necessário organizar os valores por ordem crescente para posteriormente aplicar o teste ao mínimo e/ou máximo de forma a testar se esses extremos são valores atípicos. A presença de resultados atípicos é verificada num valor de cada vez, sendo eliminado caso seja um valor atípico e repetido o processo até não ser

detetado nenhum valor atípico. É recomendado utilizar níveis de confiança elevadas, como 99 %, não devendo ser utilizados níveis inferiores a 95 % [36].

A hipótese nula,  $H_0$ , é definida como não existindo valores atípicos no conjunto de dados,  $H_0: x_s=x_i$ , e a hipótese alternativa,  $H_1$ , como existindo exatamente um valor atípico no conjunto de dados.

Este teste é aplicado tanto ao valor mínimo como ao valor máximo dos resultados, sendo realizado para cada matriz de forma a avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor.

O primeiro passo é determinar a população e o valor crítico com 99 % de confiança. O passo seguinte é verificar qual o menor resultado obtido e utilizar expressão 59:

$$G_p \text{ Valor mínimo} = \frac{\text{média-valor mínimo}}{\text{desvio padrão}} \quad (55)$$

Se o  $G_p$  Valor mínimo for inferior ao valor crítico então  $H_0$  é aceite, não sendo o valor mínimo um valor atípico.

Para testar se o valor máximo é um valor atípico utilizar a expressão 60:

$$G_p \text{ Valor máximo} = \frac{|\text{média-valor máximo}|}{\text{desvio padrão}} \quad (56)$$

Se o  $G_p$  Valor máximo for inferior ao valor crítico então  $H_0$  é aceite, não sendo o valor máximo um valor atípico [37].

#### 4.4. Teste C de Cochran

O teste C de Cochran avalia a homogeneidade de variâncias entre ensaios através da comparação da maior variância com as outras variâncias, podendo ser utilizado para avaliar se é necessário eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método. Algumas das vantagens da utilização deste teste estatístico são a sua fácil aplicação e o uso de dados concisos como as variâncias. É relevante referir que só pode ser aplicado se o conjunto de dados seguir uma distribuição normal. A hipótese nula,  $H_0$  é que não existem diferenças significativas entre as variâncias ( $s_i^2$ ) e a hipótese alternativa,  $H_1$ , é que existe pelo menos uma variância significativamente superior às restantes [38], [39].

O primeiro passo é calcular o C de Cochran através da expressão 61:

$$C_{\text{calculado}} = \frac{\text{maior variância}}{\text{soma de todas as variâncias}} = \frac{s_{\text{max}}^2}{\sum s_i^2} \quad (57)$$

O valor C calculado é comparado com o valor C de Cochran crítico tabelado para 5 % de significância, com n graus de liberdade no numerador e h graus de liberdade no denominador (ver **anexo D2**), correspondendo n ao número de replicados e h ao número de ensaios realizados. Se o valor de C calculado for inferior ao valor de C tabelado, a hipótese  $H_0$  não é rejeitada, ou seja, o

ensaio com maior variância não deve ser rejeitado uma vez que não há evidências de existirem diferenças significativas entre as variâncias de todos os ensaios realizados. Se o valor de  $C$  calculado for superior ao valor de  $C$  tabelado, a hipótese  $H_0$  é rejeitada, ou seja, a maior variância é significativamente diferente das restantes variantes, devendo ser eliminada e repetir o teste para a maior variância seguinte [40].

## 5. Materiais e métodos

### 5.1. Reagentes

- Água desionizada
- Acetonitrilo para HPLC ( $C_2H_3N$ ),  $\geq 99,0\%$  - Honeywell| Riedel-de Haën 34851
- D-(-)-Frutose ( $C_6H_{12}O_6$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich F0127
- D-(+)-Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich G5767
- D-(+)-Galactose ( $C_6H_{12}O_6$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich 48260
- Sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich 84100
- D-(+)- Maltose monoidratada ( $C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich M5885
- $\alpha$ -Lactose monoidratada ( $C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$ ),  $\geq 99,0\%$  - Sigma-Aldrich L3625
- Sulfato de zinco hepta-hidratado,  $[ZnSO_4\cdot 7H_2O]$ - VWR Chemicals 29253.293
- Hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado,  $[K_4Fe(CN)_6\cdot 3H_2O]$ - VWR Chemicals 26812.295
- Éter de petróleo, com ponto de ebulição entre 40 °C e 60 °C- VWR Chemicals 23826.360

### 5.2. Equipamentos

- Balança analítica, capaz de pesar com aproximação de 0,1 mg- Sartorius BP221S
- Balança eletrônica de precisão, capaz de pesar com a aproximação de 0,1 mg – Mettler Toledo, XS603S
- Banho de ultrassons- VWR Chemicals
- Banho termostaticado sem agitação, regulável a uma temperatura de  $(90 \pm 5)$  °C, Julabo SW22
- Estufa de secagem, regulável a aproximadamente 60 °C- MMM Group
- Agitador magnético sem aquecimento, regulado a aproximadamente 400 rpm- Thermo Scientific
- Centrífuga, regulável a uma velocidade de 3000 rpm- Zentrifugen Rotina 380
- Sistema de filtração adequado para filtros de membrana de polipropileno de 47 mm e tamanho de poro de 0,45  $\mu m$
- Sistema HPLC - Agilent Technologies
- Granulador RETSCH GRINDOMIX GM200
- Bimby

### ▪ 5.3. Material

- Exsicador
- Barras magnéticas
- Balões volumétricos de (10,000 ± 0,025) mL, (25,00 ± 0,04) mL, (50,00 ± 0,06) mL e (100,0 ± 0,1) mL- Normax
- Balões de fundo plano de 250,0 mL – Schott Duran
- Cafeteira elétrica- Philips
- Copos de plástico assépticos com tampa rosca, com capacidade de 50 mL
- Filtros de papel pregueados- VWR 0,45 µm
- Gobelés de plástico, com capacidade de 100 mL
- Micropipetas de (1,0000±0,0006) mL, (5,0000 ± 0,0041) mL e (10,0000±0,0064 mL)- Eppendorf
- Tubos de centrifuga com tampa e capacidade de 50,0 mL- VWR
- Dispensadores de volume variável
- Pipetas de Pasteur
- Vareta de vidro
- Pérolas de vidro
- Frasco *schott*
- Cronómetro
- Proveta de vidro de 500 mL
- Seringa de 0,5 mL
- Filtros de seringa de PVDF de 25 mm, com 0,45 µm de porosidade
- Frascos para amostrador automático, com tampa e septo, de capacidade aproximada de 2 mL (vial)- VWR
- Coluna cromatográfica para determinação de hidratos de carbono, LUNA Omega 3 Sugars 100 Å 250 x 4,6 mm - Phenomenex

### ▪ 5.4. Soluções

#### 5.4.1. Solução mãe de calibração, com concentração aproximada de 18 g/L

Para preparar a solução padrão, considerando a pureza de cada açúcar, foi pesado com rigor (0,0001 g) aproximadamente 1,8000 g de cada açúcar analisado (frutose, glucose, galactose, sacarose, maltose e lactose) para um balão volumétrico de 100,0 mL, obtendo-se uma concentração final aproximada de cada açúcar de 18,00 g/L. De seguida foi adicionada água e

utilizado o banho de ultrassons até dissolução total, perfazendo depois o volume com água desionizada.

#### 5.4.1.2. Soluções de calibração dos açúcares

As soluções de calibração foram preparadas por diluição da solução mãe de calibração, em água, conforme indicado na **Tabela 1**.

*Tabela 1: Preparação das soluções de calibração dos açúcares*

<b>Padrão</b>	<b>Solução inicial (g/L)</b>	<b>Volume inicial (mL)</b>	<b>Volume final (mL)</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
<b>1</b>	18,00	0,5000	100,0	0,090
<b>2</b>	18,00	1,3000	100,0	0,23
<b>3</b>	18,00	2,5000	50,00	0,90
<b>4</b>	18,00	6,5000	50,00	2,34
<b>5</b>	18,00	9,5000	25,00	6,84
<b>6</b>	18,00	6,3000	10,00	11,34
<b>7</b>	18,00	-	-	18,00

#### 5.4.2. Solução de fortificação

Para preparar a solução de fortificação, considerando a pureza de cada açúcar, foi pesado aproximadamente 5,0000 g de cada açúcar analisado (frutose, glucose, maltose, galactose, sacarose, lactose) para um balão volumétrico de 100,0 mL, obtendo-se uma concentração final de cada açúcar de 50,00 g/L. De seguida foi adicionada água e utilizado o banho de ultrassons até dissolução total, perfazendo depois o volume com água desionizada.

#### 5.4.3. Soluções de Carrez I e Carrez II

A solução de Carrez I foi preparada pela dissolução de, aproximadamente, 15,0000 g de hexacianoferrato (II) de potássio tri-hidratado em água desionizada num balão volumétrico de 100,0 mL, com auxílio do banho de ultrassons. De seguida o volume do balão volumétrico foi ajustado com água desionizada e homogeneizado.

Para a solução de Carrez II foram dissolvidos 30,0000 g de sulfato de zinco hepta-hidratado em água desionizada num balão volumétrico de 100,0 mL com auxílio do banho de

ultrassons. De seguida o volume do balão volumétrico foi ajustado com água desionizada e homogeneizado.

As soluções de Carrez foram utilizadas para precipitar as proteínas que pudessem estar presentes na amostra e clarificaram a solução de modo a não existirem interferências na análise.

#### **5.4.4. Fase móvel**

Para preparar a fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrilo e água desionizada na proporção 75/25 (v/v) . A solução foi degaseificada no sistema de filtração e deve ser preparada e utilizada no dia da realização do ensaio.

### **▪ 5.5. Protocolo para determinação de açúcares em matrizes alimentares**

Foi seguido o procedimento interno relativo às análises físico-químicas PAFQ.235 [41], denominado “Determinação dos açúcares componentes e totais (frutose, glucose, galactose, sacarose, maltose e lactose)” para a determinação dos açúcares componentes e totais, sendo a determinação realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de índice de refração.

#### **5.5.1. Preparação das amostras**

As amostras para análise foram preparadas de acordo com o PAFQ.044: Métodos de preparação das amostras para análise [42].

Os leites homogeneizados industrialmente foram ser aquecidos na própria embalagem a uma temperatura de  $(40 \pm 2)$  °C durante 45 minutos devido à possibilidade da matéria gorda estar aderente às paredes do frasco. Após esse tempo a amostra foi homogeneizada com movimentos invertidos e suaves, de forma a não incorporar ar e evitar a formação de espuma. A seguir foicortada a embalagem e todo o conteúdo transferido para um copo de plástico, verificando que não restavam quaisquer resíduos (ex. matéria gorda) no pacote. A amostra foi armazenada refrigerada durante o período máximo de 1 semana.

O iogurte e o molho béchamel foram homogeneizados na própria embalagem com auxílio de uma vareta de vidro até obter uma mistura homogénea, tendo o cuidado de raspar bem todo o conteúdo do pacote ao transferir para um copo de plástico estéril. A amostra foi armazenada refrigerada durante o período máximo de 1 semana.

O chocolate foi homogeneizado no moinho granulador, sendo depois transferido para um copo de plástico e conservado à temperatura ambiente.

A bolacha maria foi homogeneizada na Bimby, sendo depois transferida para um copo de plástico e conservada à temperatura ambiente.

A preparação da gelatina (em pó) foi realizada de acordo com as instruções da embalagem. A amostra foi depois transferida para um copo de plástico assético e armazenada refrigerada.

Todos os copos foram identificados com o número da amostra e data da preparação, sem qualquer referência ao cliente fornecedor da amostra, de forma a que todas as análises fossem realizadas imparcialmente, como exigido pela NP EN ISO 17025:2018 [16] .

### 5.5.2. Procedimento para amostra chocolate

1. Pesar um tubo de centrifuga e registar a massa ( $T_{a_{tubo}}$ ).
2. Pesar a amostra homogeneizada para o tubo da centrifuga e registar a massa (T).
3. Adicionar éter de petróleo e centrifugar a solução, de modo a extrair a matéria gorda. Rejeitar o sobrenadante.
4. Repetir o passo anterior até o solvente não apresentar cor amarelada.
5. Colocar o tubo de centrífuga na estufa durante a noite para evaporação do solvente.
6. Retirar o tubo da estufa e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
7. Pesar e registar a massa do tubo seco com o resíduo [ $T_{a_{tubo}}$  + resíduo (g)].
8. Calcular o peso do resíduo, utilizando a expressão:  
$$Peso\ resíduo\ (g) = [T_{a_{tubo}} + resíduo\ (g)] - T_{a_{tubo}}\ (g) \quad (58)$$
9. Pesar um balão de fundo plano que contenha algumas pérolas de vidro e registar a sua massa ( $T_{a_{balão}}$ ).
10. Transferir o resíduo para o balão com o auxílio de água, até transferência de todo o resíduo do tubo da centrífuga.
11. Colocar o balão no banho termostatzado.
12. Arrefecer a solução à temperatura ambiente.
13. Adicionar a solução de fortificação.
14. Pesar o balão e adicionar água até que o peso final seja igual a:  
$$T_{a_{balão}} = Peso_{resíduo} + 100\ g\ (massa\ teórica) \quad (59)$$
15. Registar a massa real da  $T_{a_{balão}} + Peso_{resíduo} + 100\ g$ .
16. Rolhar o balão e homogeneizar a solução.

17. Transferir a solução para um tubo de centrifuga e centrifugar a solução durante 10 minutos.
18. Recolher o sobrenadante e filtrar a solução com um filtro de seringa para um frasco (vial), rejeitando os primeiros mililitros do filtrado.
19. Injetar os extratos no dia da extração.

### 5.5.3. Procedimento para as restantes amostras

1. Pesar a amostra homogeneizada para um gobelé e registar a massa da amostra (T).
2. Adicionar água quente, a uma temperatura compreendida entre 50 °C e 60 °C, ao gobelé com a amostra.
3. Introduzir uma barra magnética no gobelé e colocar no agitador magnético sem aquecimento.
4. Após o período de tempo necessário para extração dos açúcares da amostra transferir a solução para um balão volumétrico.
5. Lavar o gobelé e transferir as águas de lavagem para o balão.
6. Adicionar solução de Carrez I e solução de Carrez II.
7. Perfazer o volume do balão com água e homogeneizar.
8. Filtrar a solução por um filtro de papel pregueado para um copo.
9. Remover o papel de filtro e transferir o filtrado para um frasco (vial), com a ajuda de uma pipeta de Pasteur.
10. Injetar os extratos no dia da extração.

### ▪ 5.6. Sistema de HPLC

O sistema de HPLC era composto por um sistema de injeção automático com capacidade para diferentes volumes, uma bomba isocrática de fluxo constante de 1,0 mL/min com injeção automática de 10 µL e tempo de análise de 17 minutos. Possuía ainda um detetor de índice de refração e forno de colunas regulável a  $(35 \pm 5)$  °C. A coluna cromatográfica para determinação de hidratos de carbono utilizada foi a Luna Omega 3 µm SUGAR 100 Å LC Column (250 x 4.6) mm Phenomenex, que permitiu a separação da glucose e galactose, assim como dos restantes monossacarídeos e dissacarídeos em análise.

Existem diversos programas (*softwares*) comerciais que permitem estimar os parâmetros de validação de forma rápido e segura, sendo muito úteis num laboratório que apresenta desafios restritivos como o tempo, o custo e o potencial instrumental.

Antes de iniciar a análise, foi injetada água nas mesmas condições do método de análise, de modo a verificar que não existiam sinais coincidentes com os sinais correspondentes aos açúcares componentes. Se aparecessem picos, deveriam ser efetuadas injeções de solvente até que estes desaparecessem (limpeza do sistema).

A sequência de análise, utilizando o software do equipamento, seguiu a ordem:

- ✓ Branco do equipamento,
- ✓ Padrão de calibração de maior concentração
- ✓ Branco do equipamento
- ✓ Padrões de calibração com concentração crescente
- ✓ Branco do equipamento
- ✓ Branco do processo
- ✓ Padrões de verificação
- ✓ Amostras, adicionando um padrão de verificação a cada 4 amostras analisadas
- ✓ Padrão de menor e maior concentração

## **6. Apresentação e discussão dos resultados**

### **▪ 6.1. Análise qualitativa**

Na análise qualitativa foram identificados os sinais dos açúcares componentes presentes na amostra por comparação dos seus tempos de retenção com os das soluções de calibração, não devendo estes diferir em mais do que  $\pm 0,30$  minutos. Apesar dos tempos de retenção poderem variar em função da coluna, a identificação dos analitos nas amostras foi sempre efetuada com base nos tempos de retenção das soluções de calibração. Os tempos de retenção aproximados foram:

- ✓ Frutose 6 a 7 minutos
- ✓ Glucose 7 a 8 minutos
- ✓ Galactose 8 a 8,5 minutos
- ✓ Sacarose 10 a 11 minutos
- ✓ Maltose 11 a 12 minutos
- ✓ Lactose 13 a 14 minutos

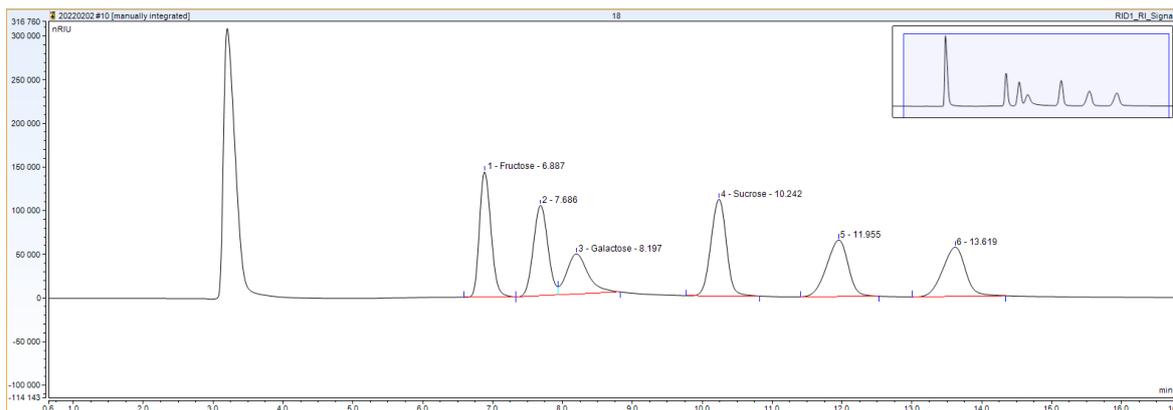


Figura 6: Exemplo de um cromatograma obtido por HPLC de um padrão de concentração 18,00 g/L, com identificação dos picos de cada açúcar respetivos tempos de retenção (em minutos).

## 6.2. Curva de calibração

Após terminadas as leituras no equipamento de HPLC foram obtidos cromatogramas (como o da **Figura 6**) e identificados os compostos pelo seu tempo de retenção. Considerando os cromatogramas dos padrões referidos na **tabela 1** foram traçadas retas de calibração para cada um dos açúcares analisados, sendo representado no eixo das ordenadas a resposta instrumental do equipamento (altura do sinal, em nRIU) e no eixo das abcissas a concentração (em g/L). As curvas de calibração para cada açúcar foram traçadas diariamente e avaliados os seus parâmetros como o declive e o coeficiente de correlação. Na **tabela 2** são apresentados os valores obtidos de concentração de cada padrão e respetiva altura no cromatograma, para a galactose cujo ensaio foi realizado no dia 12 de janeiro de 2022 para construção da reta de calibração. Os cálculos para determinação da incerteza associada a cada padrão de calibração podem ser consultados no **anexo F3**.

Tabela 2: Valores obtidos da altura dos picos obtidos no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da galactose para construção da sua reta de calibração.

Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,090 ± 0,006	178,098
0,23 ± 0,02	527,236
0,90 ± 0,06	1966,567
2,34 ± 0,15	5343,122
6,84 ± 0,45	15622,853
11,34 ± 0,75	25951,713
18,00 ± 1,18	41564,697

Como exemplo é apresentado na **figura 7** a representação gráfica da altura dos picos dos padrões de calibração obtidos no cromatograma em função da concentração dos padrões

utilizados para a galactose. A representação gráfica obtida é uma reta cuja equação é  $\text{Altura do pico} = (2307,00 \pm 77,19) [\text{Concentração}] - (75,11 \pm 9,10)$ .

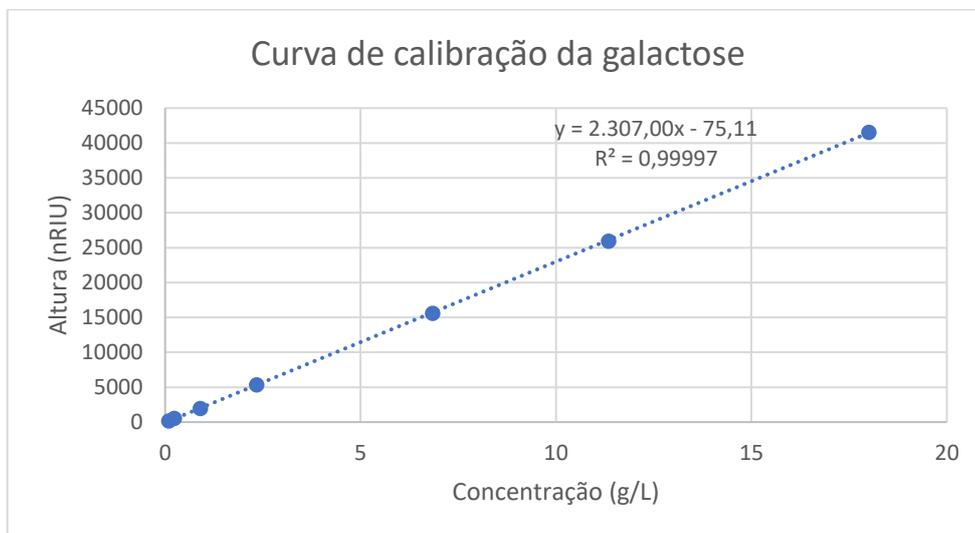


Figura 7: Representação gráfica da reta de calibração da galactose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

O coeficiente de correlação foi determinado pela equação 38, sendo o seu valor de 0,99998 para a representação gráfica da **figura 7**, podendo o seu cálculo ser consultado no **anexo F1**.

Uma vez que o valor do  $r$  obtido foi superior a 0,995 e a representação gráfica era uma reta verifiquei que existia uma relação linear entre a altura dos picos e a concentração de galactose nos padrões utilizados para a calibração. Para reforçar esta afirmação foi ainda realizado o teste  $t$  para  $r$ , sendo o  $t$  calculado pela equação 43 e os dados necessário para aplicação deste teste apresentados na **tabela 3**.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|0,99998| \times \sqrt{7-2}}{\sqrt{1-0,99997}} = 408,25$$

Tabela 3: Dados necessários para aplicação do teste  $t$  para o  $r$  à reta da galactose da figura 7, como o número de padrões utilizados para traçar a curva de calibração ( $n$ ), o coeficiente de correlação do modelo linear ( $r$ ), o valor de  $t$  calculado e o valor de  $t$ -student tabelado para  $n-2$  graus de liberdade e 95 % de confiança

$n$	$r$	$r^2$	$t_{\text{calculado}}$	$t_{\text{tabelado}}$
7	0,99998	0,99997	408,25	2,57

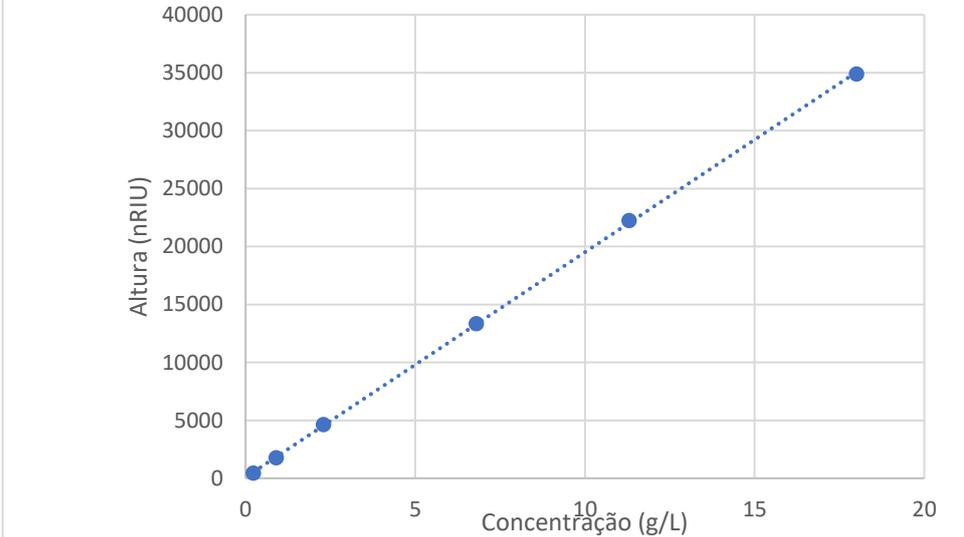
Após análise da **tabela 3**, verifiquei que o  $t$  calculado era superior ao  $t$  tabelado para  $n-2$  graus de liberdade e 95 % de confiança, pelo que existia correlação linear entre a altura dos picos e a concentração de galactose nos padrões de calibração.

Pelos valores de  $r$  e  $r^2$  obtidos, não foi necessário realizar o teste de Mandel para comprovação do modelo linear ser o mais adequado.

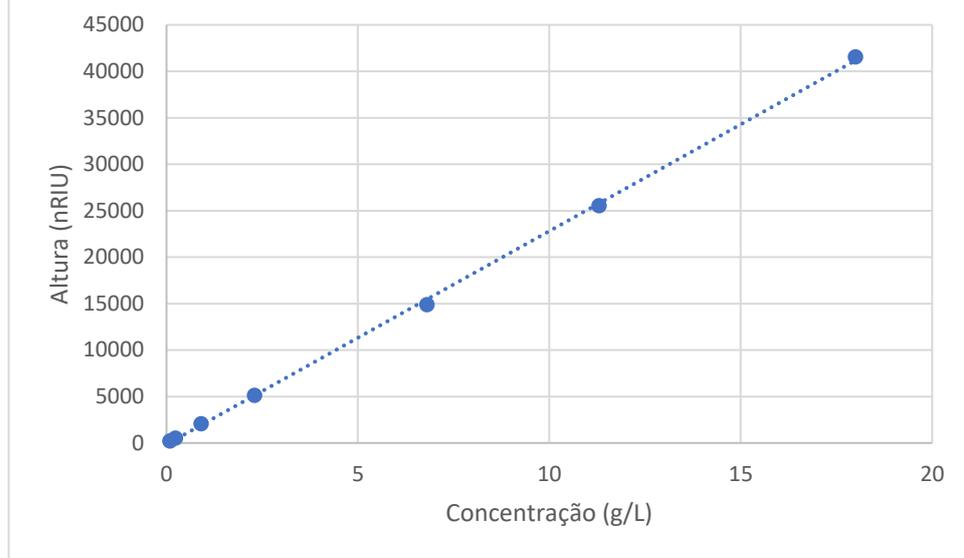
- **6.3. Linearidade**

A avaliação da linearidade foi feita através da representação gráfica, do cálculo e da análise do coeficiente de correlação de, pelo menos, 5 curvas de calibração obtidas em cinco dias distintos. Para a curva de calibração ser aceita a sua representação gráfica teve de ser uma reta e o coeficiente de correlação teve de ser superior a 0,995. Na **tabela 4** são apresentadas as representações gráficas da galactose obtidas em cinco dias distintos.

*Tabela 4: Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade, para o açúcar galactose.*

Data	Representação gráfica da reta	
11-01-2022		
	Declive: 1941,74	$r=0,99995$

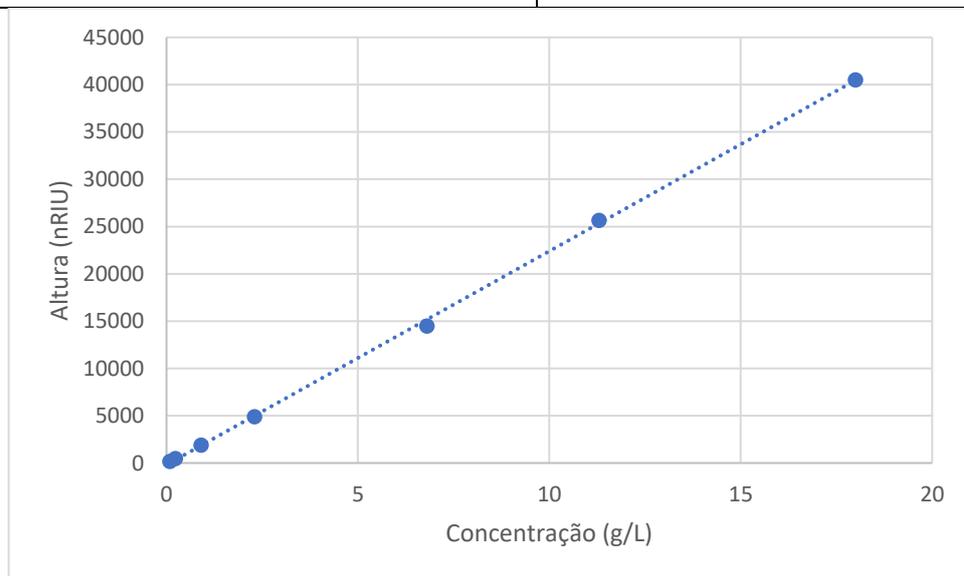
13-01-2022



Declive:2296,43

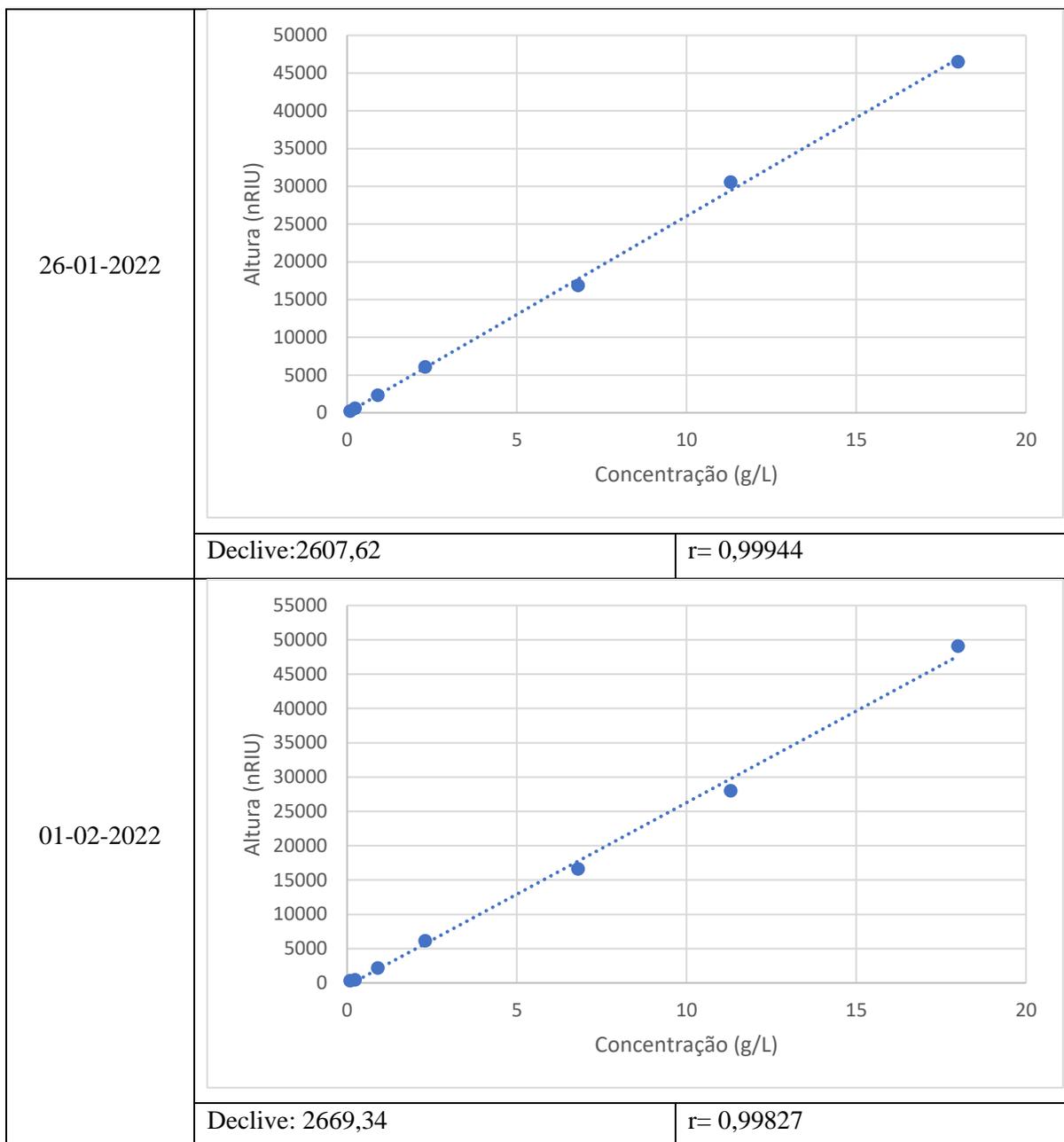
r=0,99980

17-01-2022



Declive:2258,99

r=0,99978



As representações gráficas das curvas de calibração para os restantes açúcares podem ser consultadas no **anexo B**.

Pela análise da **tabela 4**, verifica-se que as representações gráficas obtidas eram retas e que o coeficiente de correlação obtido foi sempre superior a 0,995. Através do controlo do declive foi possível monitorizar a sensibilidade do método, sendo que o declive aumenta com o desgaste da coluna, o que provoca diminuição do número de pratos teóricos e da altura dos picos e aumento do tempo de retenção. Conforme a coluna vai sofrendo desgaste o fluxo deve ser diminuído, o que vai fazer com que os picos se afastem e saiam mais cedo.

#### ▪ 6.4. Análise quantitativa

Após a análise qualitativa, a representação gráfica e análise da curva de calibração, o teor de cada açúcar foi calculado considerando a massa da amostra, o volume, os fatores de diluição e a interpolação da altura de cada açúcar na reta de calibração, e expresso em g/100 g.

##### 6.4.1. Concentração da frutose, glucose, galactose e sacarose expressa em g/100 g de amostra

A concentração da frutose, glucose, galactose e sacarose, expressa em g/100 g de amostra, foi obtida pela equação 64:

$$C_{componente}(g/100 g) = \frac{C(g/L) \times V(L) \times FD}{m(g)} \times 100 \quad (60)$$

sendo  $C_{componente}$  a concentração de frutose, glucose, galactose ou sacarose, C a concentração de frutose, glucose, galactose ou sacarose presente na amostra determinada pela curva de calibração, V o volume final da solução de extração, FD o fator de diluição e m a massa da amostra.

Exemplo de cálculo da concentração de galactose no iogurte (ensaio realizado no dia 13/01/2022):

$$C_{galactose}(g/100 g) = \frac{4,2587(g/L) \times 0,100(L) \times 1}{20,4941(g)} \times 100 = 2,078 g/100 g$$

##### 6.4.2. Concentração da lactose e maltose expressa em g/100 g de amostra

A concentração da lactose e maltose, expressa em g/100 g de amostra, foi obtida pela equação 62:

$$C_{componente}(g/100 g) = \frac{C(g/L) \times V(L) \times FD}{m(g)} \times 100 \times 0,95 \quad (61)$$

sendo  $C_{componente}$  a concentração de lactose ou maltose, C a concentração de lactose ou maltose presente na amostra determinada pela curva de calibração, V o volume final da solução de extração, FD o fator de diluição, m a massa da amostra e 0,95 o fator de conversão do açúcar da forma mono-hidratada para a forma anidra.

Exemplo de cálculo da concentração de lactose na bolacha maria (ensaio realizado no dia 13/01/2022):

$$C_{lactose}(g/100 g) = \frac{0,1923(g/L) \times 0,100(L) \times 1}{5,1153(g)} \times 100 \times 0,95 = 0,357 g/100$$

#### ▪ 6.5. Precisão

A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia.

### 6.5.1. Repetibilidade

Para avaliar a precisão em condições de repetibilidade foram realizados 7 ensaios replicados (n) de 7 matrizes (k), pertencentes a 4 grupos alimentares, sem alteração das condições experimentais, ou seja, os ensaios foram realizados no mesmo dia, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento.

Os resultados obtidos para a galactose encontram-se na **Tabela 5**, podendo ser consultados os resultados dos restantes açúcares no **anexo C**.

*Tabela 5: Resultados obtidos nos 7 ensaios realizados para o estudo da precisão da galactose em condições de repetibilidade das 7 matrizes alimentares estudadas.*

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades
<b>Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados</b>	Bolacha Maria	4,97	4,95	5,17	4,90	4,93	5,07	5,19	g/100 g
<b>Alimentos confeccionados e pré-confeccionados</b>	Molho Bechamel	1,77	1,74	1,77	1,78	1,72	1,74	1,71	g/100 g
<b>Açúcar, produtos açucarados e derivados</b>	Chocolate preto	11,95	12,19	11,95	11,77	11,61	12,03	11,82	g/100 g
	Gelatina	0,32	0,30	0,32	0,30	0,32	0,31	0,29	g/100 g
<b>Leite, produtos lácteos e derivados</b>	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,85	2,75	2,92	2,89	2,90	3,12	3,09	g/100 g
	logurte	4,68	4,76	4,64	4,65	4,70	4,89	4,73	g/100 g
	Leite	0,71	0,69	0,63	0,67	0,68	0,67	0,71	g/100 g

Os valores auxiliares necessários para estudar a precisão do método em condições de repetibilidade são apresentados na **Tabela 6**. Estes valores auxiliares foram a média dos resultados obtidos da concentração de cada açúcar, a variância de repetibilidade ( $s_r^2$ ) utilizando a equação 8, o desvio padrão de repetibilidade ( $s_r$ ) utilizando a equação 7 e o coeficiente de variação (% CV) pela equação 3.

*Tabela 6: : Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão da galactose em condições de repetibilidade para cada matriz analisada*

Grupo	Matriz	Média	Variância ( $s_r^2$ )	Desvio padrão ( $s_r$ )	%CV <sub>r</sub>
<b>Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados</b>	Bolacha Maria	5,026	0,014	0,118	2,353
<b>Alimentos confeccionados e pré-confeccionados</b>	Molho Béchamel	1,748	0,001	0,027	1,540
<b>Açúcar, produtos açucarados e derivados</b>	Chocolate preto	11,902	0,036	0,189	1,589
	Gelatina	0,309	0,000	0,011	3,654
<b>Leite, produtos lácteos e derivados</b>	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,932	0,0172	0,131	4,470
	logurte	4,721	0,007	0,084	1,785
	Leite UHT	0,679	0,001	0,027	4,039

Após ordenar os resultados obtidos por ordem crescente, foi aplicado o teste de Grubbs aos valores extremos (máximo e mínimo) de cada matriz de forma avaliar se os valores obtidos eram relevantes para o estudo ou se algum dos replicados devia ser desprezado.

O valor de G tabelado para n = 7, com 99 % de confiança foi 2,139 (**anexo D1**). Os valores de G calculados para os máximos e mínimos de cada matriz estão apresentados na **tabela 7** e abaixo é apresentado exemplo da aplicação do teste de Grubbs para verificar se o valor mínimo era um valor atípico.

$$G_p \text{ Valor mínimo} = \frac{5,026 - 4,90}{0,118} = 1,061$$

Tabela 7: Valores para aplicação do teste de Grubbs às matrizes alimentares analisadas para o estudo da galactose

Grupo	Matriz	TESTE DE GRUBBS					
		Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	4,93	0,957	Aceitável	5,19	1,423	Aceitável
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Bechamel	1,74	1,118	Aceitável	1,78	1,272	Aceitável
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	11,54	1,463	Aceitável	12,03	1,203	Aceitável
	Gelatina	0,30	1,138	Aceitável	0,32	1,403	Aceitável
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,85	1,852	Aceitável	2,94	1,384	Aceitável
	iogurte	4,68	0,976	Aceitável	4,76	1,397	Aceitável
	Leite	0,65	1,105	Aceitável	0,69	1,583	Aceitável

Como todos os valores de G calculados foram inferiores ao valor G tabelado (2,139), conclui-se com 99 % de confiança que não há valores atípicos, ou seja, nenhum dos valores suspeitos das diversas matrizes analisadas deve ser rejeitado para o cálculo da repetibilidade do método.

De forma a verificar existência de necessidade de eliminação de alguma matriz para calcular a repetibilidade do método foi aplicado o teste C de Cochran utilizando a equação 61. Para n=7 e k=7, com 95 % de confiança, o valor de C tabelado foi 0,3726 (**anexo D2**). A matriz com maior variância, como pode ser verificado na **tabela 6**, foi o chocolate preto e o C calculado para essa matriz foi de 0,473. Como o C calculado é maior que o C tabelado concluí que a matriz chocolate preto devia ser rejeitada para a determinação da repetibilidade.

No entanto, em vez de proceder à eliminação da matriz foi feita a divisão da concentração em três gamas, gama baixa (<2,00 g/100 g), gama intermédia (2,00 g/100 g a 5,00 g/100 g) e gama alta (>2,00 g/100 g). Para cada gama foi determinada não só a precisão em condições de repetibilidade mas também em condições de precisão intermédia e a incerteza do método. Para a divisão em gamas foram considerados valores em que as gamas contivessem aproximadamente o mesmo número de matrizes e que passasse nos testes estatísticos utilizados. Além disso, como a

gama de trabalho considerada inicialmente era muito extensa, ao fazer a sua divisão conseguiu diminuir as variâncias e obter limites de repetibilidade mais ajustados para cada gama. Isto deve-se ao facto dos resultados mais próximos do limite de quantificação apresentarem mais variação do que resultados na gama superior da gama de trabalho, uma vez que em concentrações menores o coeficiente de variação aumenta exponencialmente. Uma vez que é esperado que os resultados da gama baixa apresentem maior variação o seu limite de repetibilidade deve ser superior.

Para a gama de trabalho baixa da galactose foram consideradas as matrizes molho béchamel, gelatina e leite, na gama intermédia as matrizes FAPAS Milkshake powder e iogurte e na gama alta foram consideradas as matrizes bolacha maria e chocolate preto. Os resultados estão apresentados na **tabela 8**, **tabela 9** e **tabela 10**.

Tabela 8: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama baixa da galactose

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	s <sup>2</sup>	s	% CV	Limite de repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	1,77	1,74	1,77	1,77	1,74	1,78	1,74	g/100 g	1,76	0,000	0,017	0,95	0,05	2,66
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,32	0,30	0,32	0,30	0,31	0,30	0,30	g/100 g	0,31	0,00	0,01	2,87	0,02	8,03
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite UHT	0,67	0,69	0,66	0,67	0,65	0,65	0,68	g/100 g	0,67	0,00	0,01	2,25	0,04	6,29

Tabela 9: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da galactose

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	s <sup>2</sup>	s	% CV	Limite de repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	4,97	5,17	5,07	4,93	4,97	4,93	5,19	g/100 g	5,03	0,012	0,11	2,22	0,31	6,21
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	11,95	11,95	11,77	11,61	12,03	11,82	11,54	g/100 g	11,81	0,03	0,18	1,56	0,52	4,36

Tabela 10: Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama intermédia da galactose

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	s <sup>2</sup>	s	% CV	Limite de repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,85	2,90	2,92	2,89	2,91	2,94	2,90	g/100 g	2,90	0,00	0,028	0,95	0,077	2,67
	Iogurte	4,68	4,76	4,74	4,68	4,70	4,68	4,73	g/100 g	4,71	0,001	0,033	0,70	0,092	1,95

Foi realizado o teste C de Cochran para a matriz com maior variância dos resultados na gama alta, o chocolate preto. Nas restantes gamas a variância tem valor igual para todas as matrizes. Para a gama alta o valor de C tabelado para n= 2 e k=7, com 95 % de confiança é de 0,8534 e o valor de C calculado foi 0,731. Verifiquei que o valor de C calculado é inferior ao valor de C tabelado, pelo que pode ser concluído com 95% de confiança que não é necessário eliminar nenhuma matriz dentro da sua gama.

O limite de repetibilidade ( $r_r$ ), expresso em g/100 g, foi calculado através da multiplicação do desvio-padrão por um fator de valor igual a 2,8 (como indicado na equação 5). O limite de repetibilidade relativo ( $CVr_r$  (%)) foi obtido pela equação 6, sendo o seu valor expresso em percentagem. Exemplo de determinação do limite de repetibilidade e limite de repetibilidade relativo para a bolacha maria:

$$r_r = 2,8 \times 0,11 \text{ g/100 g} = 0,31 \text{ g/100 g}$$

$$CVr_r(\%) = 2,8 \times 2,218 = 6,21 \%$$

A média dos limites de repetibilidade, dos limites de repetibilidade relativos e dos coeficientes de variação relativos de todos os açúcares analisados estão apresentados na **tabela 11**.

*Tabela 11: Limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e coeficiente de variação obtidos para todas as gamas dos açúcares analisados*

Componente	Teor (g/100g)	Média dos limites de repetibilidade (g/100 g)	Média dos limites de repetibilidade relativos (%)	Média dos coeficientes de variação relativos (%)
Frutose	≤ 2,49	0,018	4,824	1,723
	≥ 2,50	0,092	2,189	0,782
Glucose	≤ 2,99	0,029	7,146	2,552
	≥ 3,00	0,115	2,243	0,801
Galactose	≤ 1,99	0,038	5,664	2,023
	2,00-4,99	0,085	2,307	0,824
	≥ 5,00	0,414	5,288	1,889
Sacarose	≤ 2,99	0,017	4,073	1,455
	≥ 3,00	0,190	2,466	0,881
Maltose	≤ 1,99	0,034	5,790	2,068
	≥ 2,00	0,113	2,828	1,010
Lactose	≤ 3,99	0,037	3,614	1,291
	≥ 4,00	0,227	2,694	0,962

Pela análise da **tabela 11**, verifiquei que todos os açúcares analisados possuíam um coeficiente de variação inferior ao definido internamente pelo laboratório ( $CV < 10 \%$ ), o que indicou que a repetibilidade é satisfatória na gama de trabalho considerada e que os erros aleatórios não influenciaram a confiança nos resultados obtidos. Os limites de repetibilidade obtidos para cada açúcar e respetiva gama foram baixos, sendo a glucose na gama superior a 3,00

g/100 g o que apresentou maior limite de repetibilidade, com um valor de 0,115 g/100 g. Neste caso, significa que os resultados de glucose superiores a 3,00 g/100 g, quando obtidos em condições de repetibilidade, são aceites se a diferença entre resultados for igual ou inferior a 0,115 g/100 g. O limite de repetibilidade não foi ultrapassado para nenhuma das amostras analisados, pelo que ao manter as condições de análise, os resultados obtidos em medições consecutivas são concordantes. Verifiquei também que os limites de repetibilidade relativos são superiores nas gamas baixas, em comparação com os das gamas altas.

### 6.5.2. Precisão intermédia

Para avaliar a precisão em condições de precisão intermédia foram avaliados um total de 42 resultados de amostras, correspondendo a 6 dias de duplicados de cada matriz, preparadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento, em dias diferentes (estando os resultados sujeitos a mais variações do que em condições de repetibilidade). Determinou-se o valor médio para cada duplicado, assim como o quadrado da diferença entre eles.

Como referido anteriormente, no caso da galactose a gama de trabalho foi dividida em três gamas, tendo sido a precisão intermédia determinada para cada gama. Para a aceitação dos duplicados obtidos para o estudo da precisão intermédia foi utilizado o limite de repetibilidade, uma vez que os duplicados foram obtidos em condições de repetibilidade. Os resultados, e valores auxiliares para o seu cálculo, estão apresentados na **tabela 12** para a gama baixa, na **tabela 13** para a gama intermédia e na **tabela 14** para a gama alta.

*Tabela 12: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama baixa da galactose, para a matriz leite UHT*

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
11-01-2022	Leite UHT	0,65	0,65	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	0,1
12-01-2022	Leite UHT	0,73	0,72	0,01	0,00	0,72	0,00	0,00	0,01	0,8
13-01-2022	Leite UHT	0,85	0,83	0,02	0,00	0,84	0,01	-0,01	0,01	1,4
17-01-2022	Leite UHT	0,81	0,80	0,01	0,00	0,80	0,01	-0,01	0,01	1,3
18-01-2022	Leite UHT	1,05	1,04	0,01	0,00	1,04	0,01	-0,01	0,01	1,0
19-01-2022	Leite UHT	1,05	1,01	0,04	0,00	1,03	0,02	-0,02	0,03	2,8

Tabela 13: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama intermédia da galactose para a matriz iogurte

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
13-01-2022	iogurte	4,68	4,76	0,08	0,01	4,72	-0,04	0,04	0,06	1,2
17-01-2022	iogurte	4,85	4,83	0,02	0,00	4,84	0,01	-0,01	0,01	0,3
18-01-2022	iogurte	4,94	4,83	0,11	0,01	4,89	0,06	-0,05	0,08	1,6
19-01-2022	iogurte	4,96	4,97	0,01	0,00	4,96	-0,01	0,01	0,01	0,2
25-01-2022	iogurte	4,72	4,76	0,04	0,00	4,74	-0,02	0,02	0,03	0,6
26-01-2022	iogurte	4,61	4,52	0,10	0,01	4,57	0,05	-0,05	0,07	1,5

Tabela 14: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia na gama alta da galactose para a matriz bolacha maria

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	4,97	4,95	0,02	0,00	4,96	0,01	-0,01	0,02	0,3
11-01-2022	Bolacha maria	4,95	4,76	0,19	0,04	4,86	0,10	-0,10	0,14	2,8
12-01-2022	Bolacha maria	5,43	5,32	0,11	0,01	5,37	0,06	-0,06	0,08	1,5
13-01-2022	Bolacha maria	5,69	5,89	0,20	0,04	5,79	-0,10	0,10	0,14	2,4
17-01-2022	Bolacha maria	5,77	5,72	0,05	0,00	5,74	0,02	-0,02	0,03	0,6
18-01-2022	Bolacha maria	5,71	6,04	0,32	0,10	5,87	-0,16	0,16	0,23	3,9

Os resultados para as restantes matrizes e açúcares podem ser consultados no **anexo C**.

Para cada açúcar foi ainda determinado o desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) (equação 11), o coeficiente de variação médio ( $CV_{pi}$ ) (equação 3) e o limite de precisão intermédia (equação 12). Como exemplo é demonstrado o cálculo destes parâmetros para a galactose. Os resultados para todos os açúcares analisados estão apresentados na **tabela 15**.

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2 \times 26}} \times 0,36 = 0,0826 \text{ g/100 g}$$

onde  $0,36 = \sum_{j=1}^{26} (y_{j1} - y_{j2})^2$

$$\text{Coeficiente de variação médio (CV}_{pi}) = \frac{S_i}{\text{média}} = \frac{0,0826}{3,53} \times 100 = 2,347 \%$$

$$\text{Limite de precisão intermédia} = \frac{0,0826 \times 2,8}{3,53} \times 100 = 6,55 \%$$

Tabela 15: Valores do coeficiente de variação médio e do limite de precisão intermédia para os açúcares analisados

Componente	Teor (g/100g)	Limite de precisão intermédia relativo (%)	Coeficiente de variação médio relativo (%)
Frutose	≤ 2,49	7,0	2,5
	≥ 2,50	10,0	3,5
Glucose	≤ 2,99	13,0	5,0
	≥ 3,00	8,5	3,0
Galactose	≤ 1,99	5,5	2,0
	2,00-4,99	4,0	1,5
	≥ 5,00	9,0	3,5
Sacarose	≤ 2,99	7,0	2,5
	≥ 3,00	5,0	2,0
Maltose	≤ 1,99	6,5	2,5
	≥ 2,00	9,5	3,5
Lactose	≤ 3,99	3,5	1,5
	≥ 4,00	4,5	1,5

Pela análise da **tabela 15**, verifiquei que o coeficiente de variação médio relativo obtido para todos os açúcares analisados também foi inferior 10 %, pelo que os erros aleatórios observados em análises efetuadas em condições de precisão intermédia não afetam a confiança nos resultados obtidos.

Verifiquei ainda que os coeficientes de variação da precisão intermédia eram superiores aos coeficientes de variação da repetibilidade, o que está de acordo com o esperado uma vez que existe maior variabilidade em condições de precisão intermédia do que em condições de repetibilidade.

#### ▪ 6.6. Incerteza

Para o cálculo da incerteza foram consideradas todas as componentes da justeza, ou seja, o material de referência certificado (FAPAS T25200 Milkshake powder) e os ensaios de recuperação realizados.

Para o cálculo da incerteza utilizando o material de referência certificado, o primeiro passo foi determinar a incerteza padrão da precisão intermédia. Como valores auxiliares para o seu cálculo foi necessário especificar a gama de trabalho, o desvio padrão da precisão intermédia, a média dos resultados obtidos no estudo da precisão intermédia, a população e o coeficiente de variação relativo da precisão intermédia. Exemplo do cálculo da incerteza padrão da precisão intermédia para o açúcar frutose, utilizando a equação 3:

$$\% CV_{pi} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 = \frac{0,1131 \text{ g}/100 \text{ g}}{2,8800 \text{ g}/100 \text{ g}} \times 100 = 3,928 \%$$

O passo seguinte foi determinar a componente da incerteza padrão para o viés. Para isso foram utilizados os dados da precisão em condições de repetibilidade. Os primeiros dados a reunir foram o número de resultados obtidos (neste caso foram utilizados 7 replicados do MRC), o valor médio dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade ( $\bar{x}$ ) e o valor presente no certificado do MRC ( $x_{ref}$ ). Outro dado a retirar do certificado do MRC foi a incerteza associada ao resultado ( $u(C_{ref})$ ). Com estes dados foi calculado o viés relativo utilizando a equação 30, sendo apresentado o exemplo de cálculo para a frutose:

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 = \frac{2,70 - 2,85}{2,85} \times 100 = -5,39 \%$$

De seguida foi determinado o desvio padrão de todos os resultados obtidos na análise do MRC, através da equação 2, tendo sido obtido um valor de 0,0610 para a frutose. Para obter o desvio padrão relativo dividiu-se o desvio padrão pelo valor médio obtido e multiplicou-se por 100, sendo 2,262 o valor para a frutose. Para obter a incerteza relativa do valor do certificado:

$$u(C_{Ref})_{relativo} = \frac{u(C_{Ref})}{VC} \times 100 = \frac{0,040}{2,85} \times 100 = 1,404 \%$$

Após a determinação destas componentes, foi necessário combiná-las para obter a incerteza relativa do viés:

$$u(viés)_{relativo} = \sqrt{(viés_{relativo})^2 + \left(\frac{\sigma_{viés,relativo}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(C_{Ref})_{relativo}^2}$$

que no exemplo da frutose:

$$u(viés)_{relativo} = \sqrt{(-5,3856)^2 + \left(\frac{2,262}{\sqrt{7}}\right)^2 + 1,404^2} = 5,631$$

Após obter este valor, para determinar a incerteza relativa foi combinada a incerteza relativa da precisão intermédia e do viés:

$$u_{relativo} = \sqrt{(CV_{pi,c})^2 + u(bias)_{relativo}^2}$$

que no exemplo da frutose é:

$$u_{relativo} = \sqrt{3,938^2 + 5,631^2} = 6,865$$

Por último, para obter a incerteza expandida, considerando um fator de expansão, k, de 2:

$$U_{relativo} = k \times u_{relativo} = 2 \times 6,865 = 13,73$$

No caso da realização de ensaios de recuperação, a primeira parte de determinação da incerteza dos ensaios de precisão intermédia foi igual. Nesta situação foram utilizadas as 6 matrizes alimentares, precisando do valor teórico esperado da fortificação e do valor médio

obtido experimentalmente. O passo seguinte foi determinar a componente da incerteza relativa à solução de fortificação, utilizando a metodologia passo-a-passo.

Seguindo os passos da metodologia passo-a-passo, a grandeza que se pretendeu medir foi a concentração da solução de fortificação e a massa de amostra, a pureza do reagente, e o volume final da solução de fortificação contribuíram para o cálculo da incerteza combinada. A incerteza da pureza está indicada no certificado do reagente, que teve de ser transformada numa incerteza padrão ao dividir a incerteza do certificado por  $\sqrt{3}$  (assumindo uma distribuição retangular). Para obter a incerteza da massa foi necessário combinar a o erro máximo admissível da balança na zona da tara e na zona de trabalho, considerando que ambas seguem uma distribuição retangular ao transformá-las em incertezas padrão. Foi ainda necessário calcular a incerteza associada ao volume final da solução de fortificação, correspondendo essa à tolerância do balão volumétrico de 100 mL utilizado, que se assume seguir uma distribuição triangular e desprezando as contribuições da temperatura e do acerto do menisco. Após obter as contribuições individuais, estas foram combinadas utilizando a equação 26. Para obter a incerteza expandida, a incerteza combinada foi multiplicada por um fator k de valor 2. No caso da frutose, a incerteza expandida foi 0,58. A incerteza relativa da solução de contaminação foi obtida pelo quociente entre a incerteza da solução de contaminação e a concentração dessa solução. Outra fonte de incerteza a considerar foi a da micropipeta utilizada para a fortificação, cuja incerteza se encontra no certificado de calibração. Com este valor foi calculada a incerteza relativa do volume. Após determinação das fontes individuais que contribuíram para a incerteza, estas foram combinadas. Após determinar a incerteza relativa para cada matriz, elas tiveram de ser combinadas. Para determinar o viés relativo (para cada matriz) utilizou-se a equação 30.

O viés relativo de cada matriz foi combinado para obter a raiz quadrada média (RMS) de todos os viés obtidos. A etapa seguinte foi combinar a incerteza RMS com a incerteza da recuperação. Depois foi necessário combinar a incerteza relativa dos ensaios de recuperação da repetibilidade com os da precisão intermédia. A este valor foi aplicado o fator de expansão 2, obtendo-se a incerteza expandida, que no caso da frutose foi 24,130.

Na **tabela 16** é apresentada a incerteza relativa associada à concentração de cada açúcar analisado.

Tabela 16: Incerteza relativa associada à concentração de cada açúcar analisado, expressa em g/100 g de amostra

Componente	Teor (g/100g)	Incerteza relativa (%)
Frutose	≤ 2,49	7,0
	≥ 2,50	7,0
Glucose	≤ 2,99	12,0
	≥ 3,00	7,0
Galactose	≤ 1,99	11,0
	2,00-4,99	8,0
	≥ 5,00	10,0
Sacarose	≤ 2,99	8,0
	≥ 3,00	5,0
Maltose	≤ 1,99	11,0
	≥ 2,00	9,0
Lactose	≤ 3,99	7,0
	≥ 4,00	5,0

Uma vez que a incerteza dos resultados dentro de cada gama de trabalho foi inferior a 20 % os resultados podem ser aceites. Verifiquei ainda que a incerteza obtida para os diversos açúcares se encontrava compreendida entre 5,0 % e 12,0 %.

#### ▪ 6.7. Ensaios de recuperação

Exemplo de cálculo da percentagem de recuperação da galactose nos ensaios realizados em condições de repetibilidade da bolacha maria:

$$C_{adição} = \frac{49,60 \text{ (g/L)} \times 5,00 \times 10^{-3} \text{ (L)}}{100 \times 10^{-3} \text{ (L)}} = 2,48 \text{ g/L}$$

$$\text{Resultado teórico (g/100 g)} = \frac{2,48 \text{ (g/L)} \times 100,0 \times 10^{-3} \text{ (L)}}{5,148 \text{ (g)}} \times 100 = 4,86 \text{ g/100 g}$$

Considerando que o resultado obtido foi de 4,93 g/100 g e o resultado do branco foi 0,00 g/100 g:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{4,93 - 0,00}{4,86} \times 100 = 103 \%$$

Tabela 17: Resultados obtidos nos ensaios de recuperação em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Açúcares (% Recuperação média)					
		Frutose	Glucose	Galactose	Sacarose	Maltose	Lactose
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	100	100	97	101	91	95
	Gelatina	102	104	107	103	96	95
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho béchamel	98	101	103	102	89	85
Cereais, leguminosas, pseudocereais e derivados	Bolacha Maria	100	103	103	100	91	94
Leite, produtos lácteos e derivados	Iogurte	102	102	107	100	97	97
	Leite	98	102	110	99	92	108

Pela análise da **tabela 17**, verifiquei que foram obtidas percentagens de recuperação entre 94 % e 107 %, o que se encontra dentro do intervalo definido pelo laboratório (80 % a 120 %).

#### 6.8. Seletividade e especificidade

Para avaliar a seletividade e a especificidade foram realizados ensaios de recuperação, de forma a provar que a fortificação da amostra conduzia ao aumento proporcional da adição de analito. Para este ensaio de recuperação foram analisadas em duplicado 20,0000 g de iogurte e determinada a concentração de cada açúcar. A amostra foi também fortificada com 10 mL da solução de fortificação de  $50,02 \pm 0,59$  g/L. Após a análise no HPLC a concentração de cada açúcar foi determinada, assim como a recuperação dos açúcares em cada ensaio.

Foram também analisados os cromatogramas do branco do processo (**figura 8**), do padrão (**figura 9**), de uma amostra sem fortificação (**figura 10**) e de uma amostra fortificada (**figura 11**). São também avaliados os tempos de retenção, a assimetria, a resolução e percentagem de recuperação da amostra fortificada.

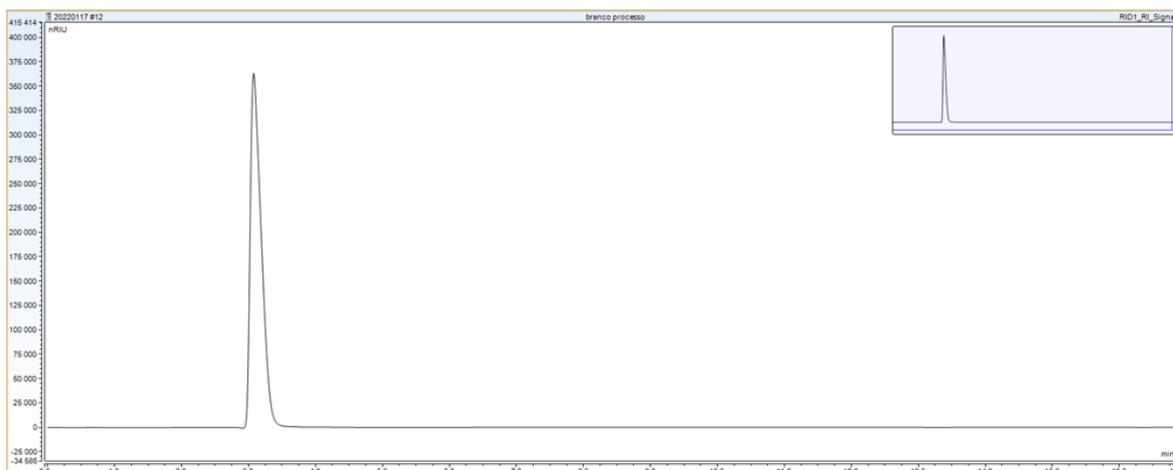


Figura 8: Cromatograma do branco do processo

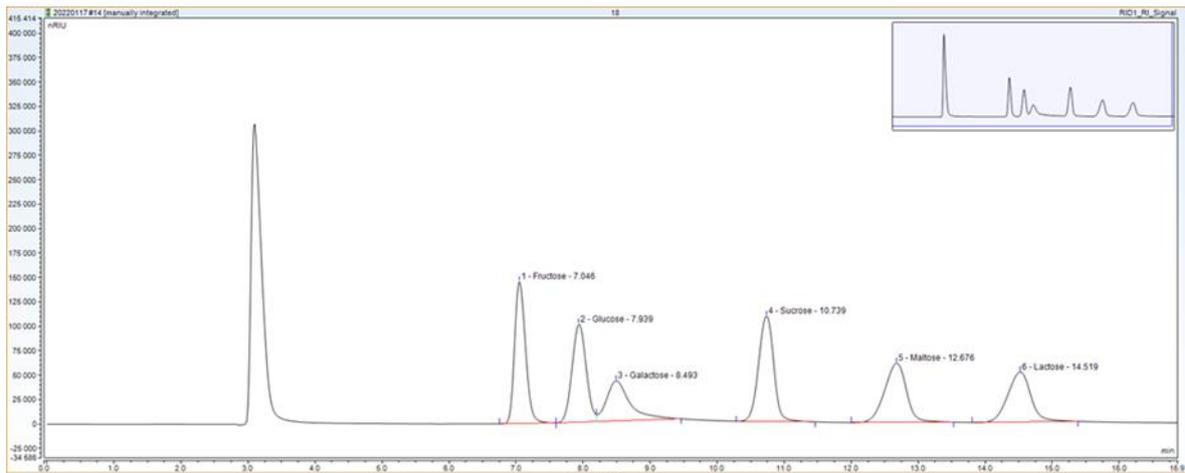


Figura 9: Cromatograma do padrão de 18,00 g/L

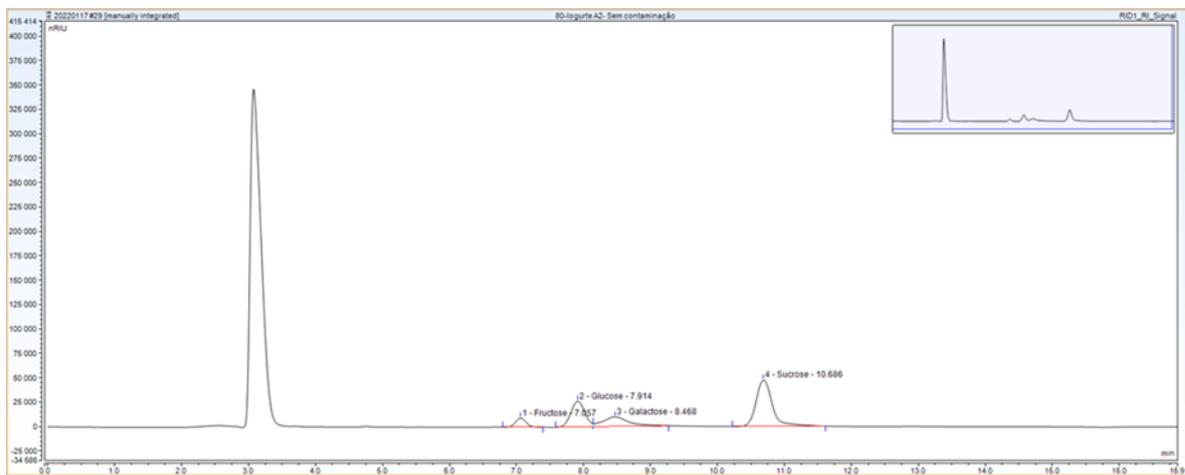


Figura 10: Cromatograma de uma amostra de iogurte sem fortificação

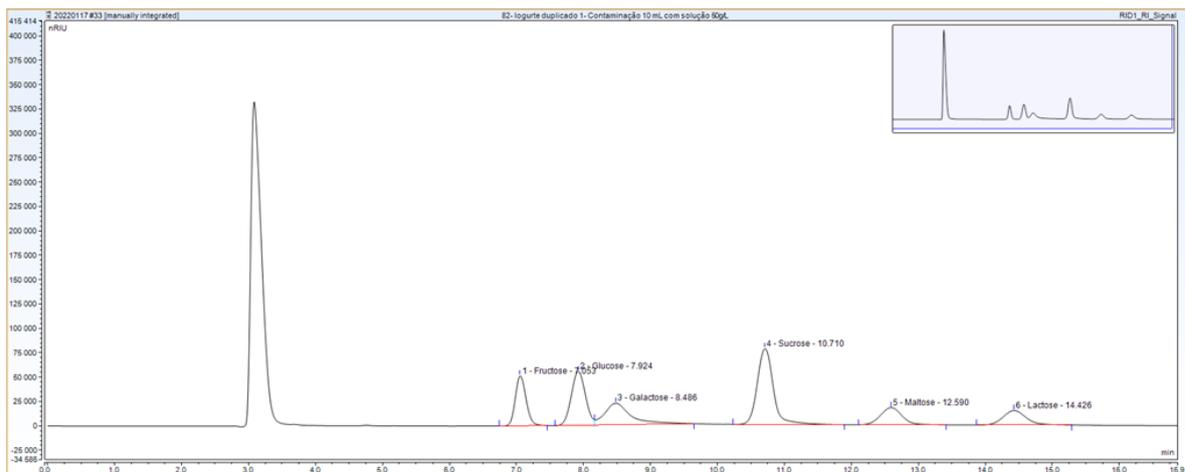


Figura 11: Cromatograma de uma amostra de iogurte fortificada com 10 mL da solução de fortificação de 50,00 g/L

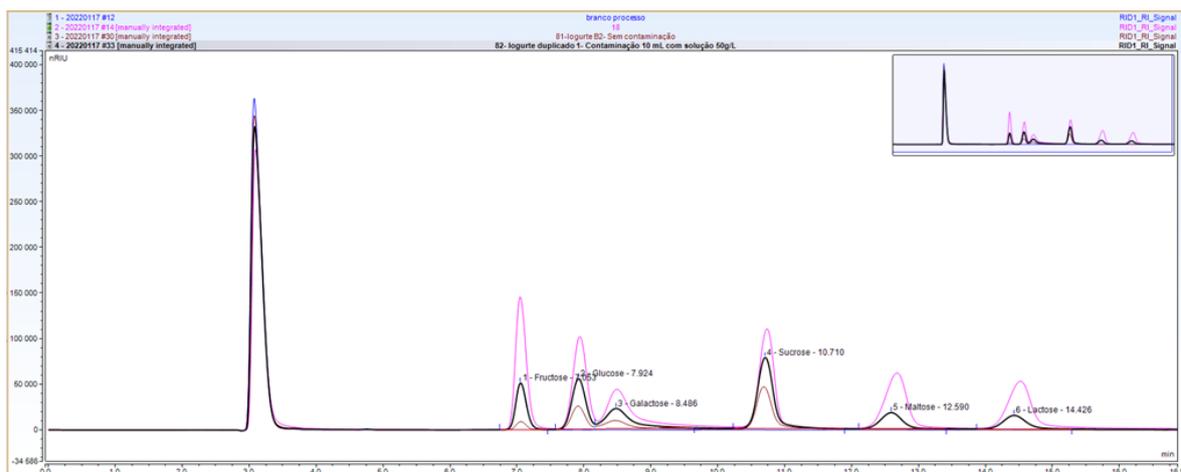


Figura 12: Sobreposição dos quatro cromatogramas

Tabela 18: Resumo dos tempos de retenção, assimetria, resolução e da percentagem de recuperação da amostra fortificada

Cromatograma	Componente	Tempo de retenção (min)	Resolução	Assimetria	% de recuperação
Branco do processo	Frutose	-	-	-	-
	Glucose	-	-	-	-
	Lactose	-	-	-	-
	Maltose	-	-	-	-
	Sacarose	-	-	-	-
	Galactose	-	-	-	-
Padrão	Frutose	7,05	2,61	1,25	-
	Glucose	7,94	1,16	-	-
	Lactose	8,49	4,59	-	-
	Maltose	10,74	3,88	0,97	-
	Sacarose	12,68	3,07	0,94	-
	Galactose	14,52	-	1,02	-
Amostra sem fortificação	Frutose	7,06	2,54	1,12	-
	Glucose	7,91	1,06	-	-
	Lactose	8,48	4,13	-	-
	Maltose	10,69	-	1,37	-
	Sacarose	-	-	-	-
	Galactose	-	-	-	-
Amostra com fortificação	Frutose	7,05	2,56	1,18	104
	Glucose	7,92	1,11	-	105
	Lactose	8,49	4,30	-	112
	Maltose	10,71	3,79	1,18	104
	Sacarose	12,59	3,08	1,08	99
	Galactose	12,43	-	1,17	100

Pela análise dos cromatogramas das **figuras 8 a 12** e da **tabela 18**, foi possível verificar que nenhum açúcar foi detetado no branco do processo. Ao comparar os tempos de retenção do padrão de 18,00 g/L e da amostra, sem e com fortificação, verifiquei que os picos dos açúcares saíam aproximadamente com o mesmo tempo de retenção. Relativamente ao ensaio de

recuperação, verifiquei que foram obtidas percentagens de recuperação entre 99 % e 112 %, pelo que se demonstrou que o método é seletivo.

Após análise da **figura 12**, através da sobreposição dos cromatogramas, verifiquei que há uma correta identificação dos compostos em estudo e que não estão presentes na amostra compostos interferentes com os analitos. Foi também verificado que o método é específico e seletivo, uma vez os valores medidos provêm apenas dos analitos de interesse.

Pela análise da **tabela 18**, verifiquei que os tempos de retenção dos compostos analisados correspondiam aos definidos no capítulo 6.1. e que não eram alterados pela fortificação da amostra. Para uma separação completa das bandas a resolução deveria ser superior a 1,5. Isto não se verificou no caso da glucose, uma vez que não há separação total da banda da glucose e da galactose. No entanto, a resolução da glucose foi sempre superior a 1, o que indicou que as bandas estavam razoavelmente separadas, com apenas 2 % de sobreposição das áreas. A assimetria está relacionada com a eficiência cromatográfica, devendo ser inferior a 2. Com o aumento da assimetria da banda aumenta a dificuldade de integração por ser difícil determinar o início ou fim da banda [43].

Relativamente aos ensaios de recuperação, verificou-se que as percentagens de recuperação (do iogurte) se encontravam entre 99 % e 105 %, estando dentro do intervalo definido internamente pelo laboratório (80 % a 120 %), pelo que não se encontraram interferentes na amostra que aumentassem ou diminuíssem o sinal obtido.

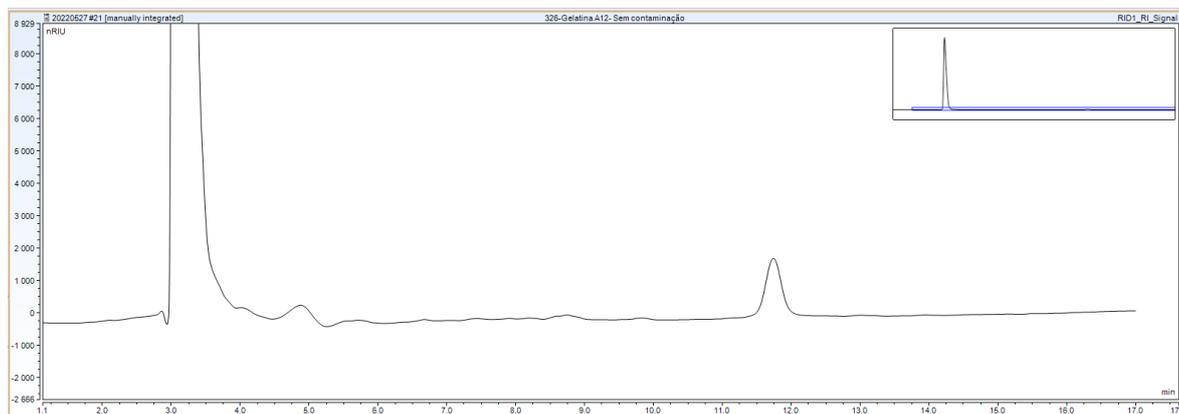


Figura 13: Cromatograma de uma amostra de gelatina sem fortificação

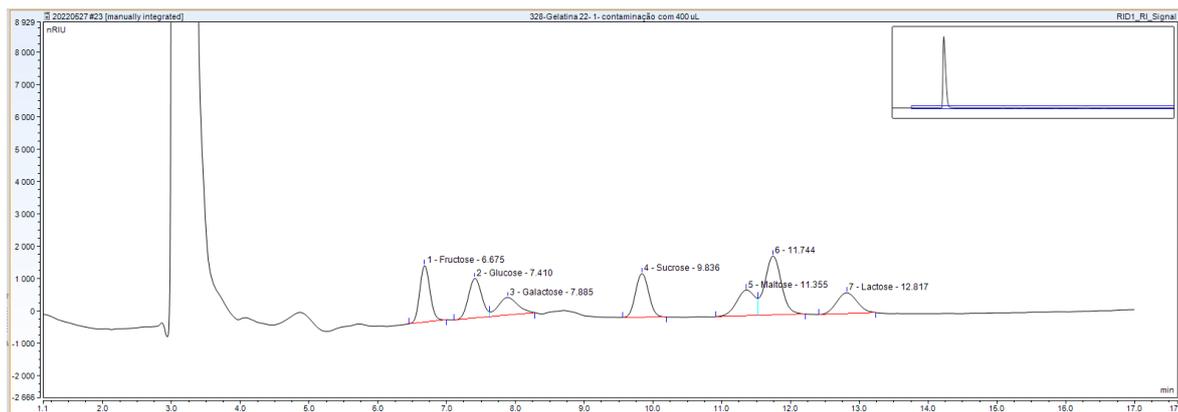


Figura 14: Cromatograma de uma amostra de gelatina fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L

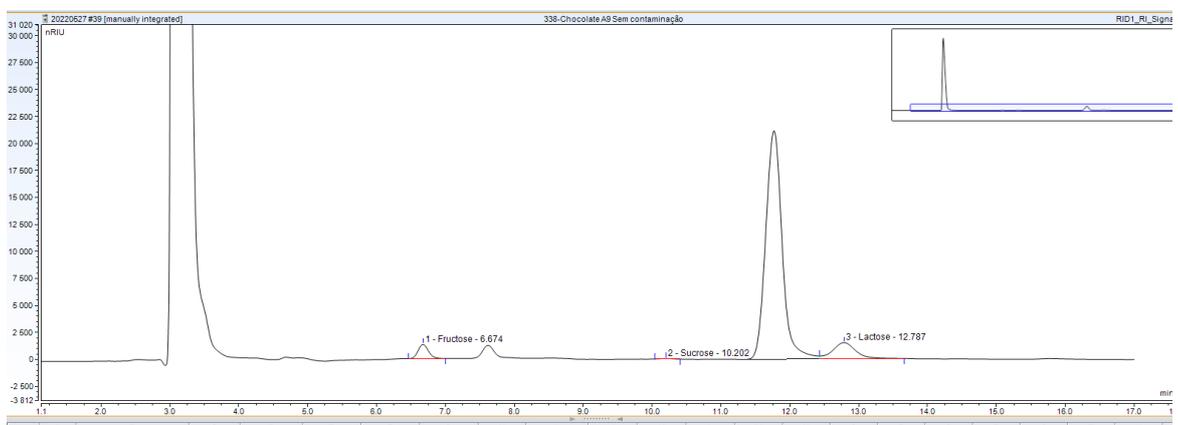


Figura 15: Cromatograma de uma amostra de chocolate sem fortificação

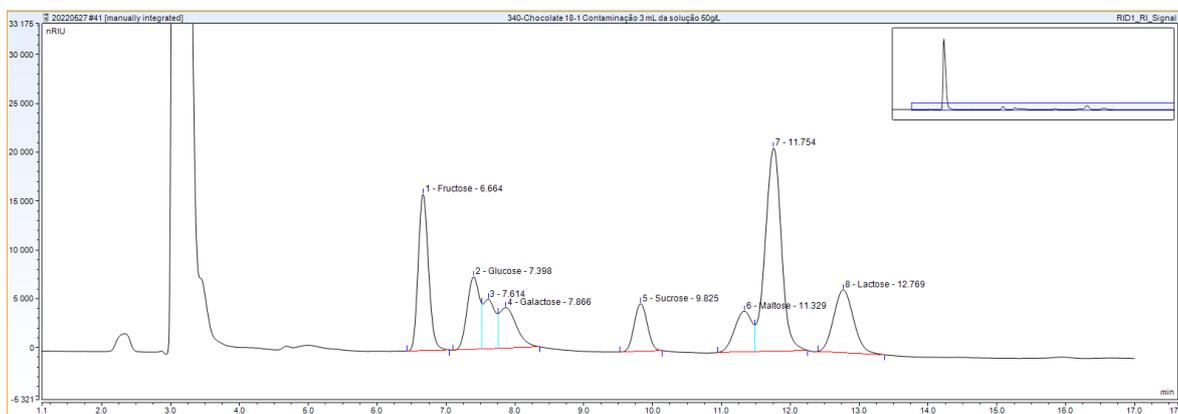


Figura 16: Cromatograma de uma amostra de chocolate fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L

Pela análise das **figuras 13 a 16**, referentes a amostras de gelatina e de chocolate preto, verifiquei que existia interferência do maltitol na detecção de maltose. No entanto, como a integração é por altura e não por área foi possível quantificar a maltose.

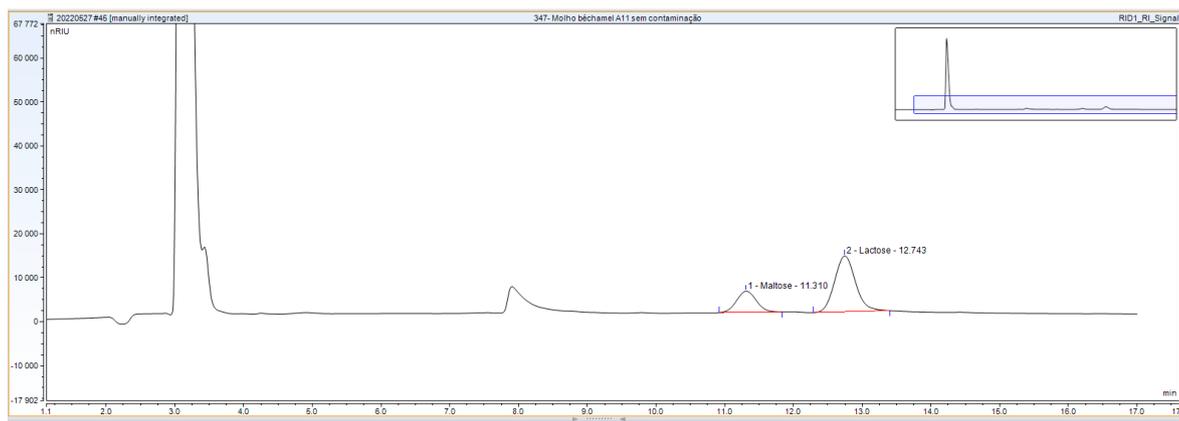


Figura 17: Cromatograma de uma amostra de molho béchamel sem fortificação

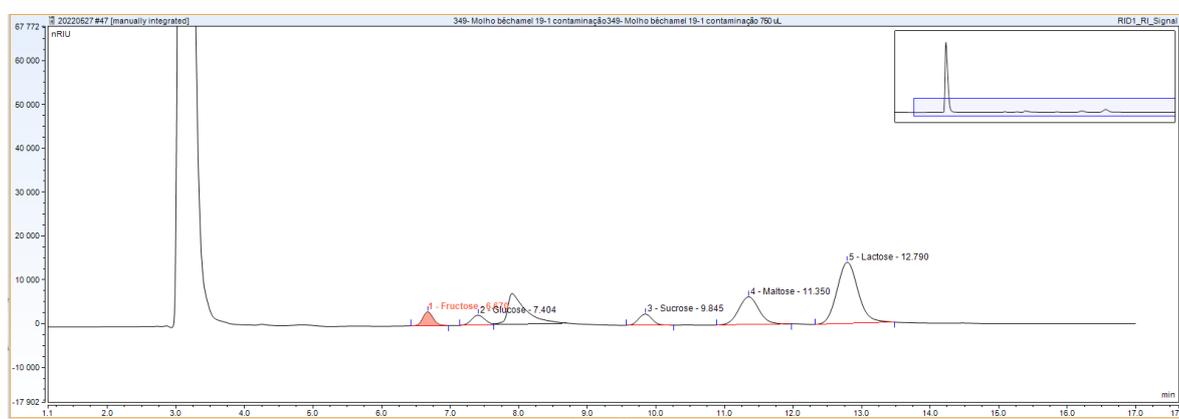


Figura 18: Cromatograma de uma amostra de chocolate fortificada com a solução de fortificação de 50 g/L

Na figura 17 e na figura 18 foi possível verificar que existia uma banda no tempo de retenção da galactose que não correspondia a este açúcar. No caso do molho béchamel, devido à quantidade elevada de sal que possuía, este atuou como interferente na detecção da galactose, não sendo possível na maioria dos ensaios realizados a quantificação deste açúcar, uma vez que havia sobreposição dos picos. Para ultrapassar este problema, poderia ser utilizado nitrato de prata, que iria precipitar com o íon  $\text{Cl}^-$ .

## 6.9. Justeza

A justeza foi demonstrada com base nos resultados obtidos da análise do material de referência e nos resultados dos ensaios de recuperação. O material de referência certificado possui rastreabilidade ao seu certificado, onde é possível consultar a informação necessária para verificar a justeza do método (este certificado pode ser consultado no **anexo E**), onde podem ser consultados os valores de referência e os desvios padrão.

Após análise do material de referência certificado foi calculado o valor-de-z pela equação 31 e os resultados da justeza para todos os açúcares analisados estão apresentados na **tabela 19**.

Tabela 19: Resultados obtidos para as amostras analisadas para determinação da justeza da frutose, glucose, galactose, sacarose, maltose e lactose

Frutose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	2,70	2,85	g/100 g	0,195	-0,78	Aceitável	
Glucose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	3,13	3,17	g/100 g	0,213	-0,21	Aceitável	
Galactose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	2,93	2,66	g/100 g	0,183	1,49	Aceitável	
Sacarose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	3,29	3,41	g/100 g	0,227	-0,52	Aceitável	
Maltose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	3,35	3,41	g/100 g	0,227	-0,25	Aceitável	
Lactose							
Matriz	Valor médio da repetibilidade	Valor de referência	Unidades	Desvio padrão	z-score	Avaliação	
FAPAS T25200 Milkshake powder	18,39	19,1	g/100 g	0,873	-0,81	Aceitável	

Pela análise dos resultados apresentados na **tabela 19**, verifiquei que o valor-de-z foi superior a -2 e inferior a 2, indicando que a justeza dos açúcares analisados foi aceitável, não havendo evidência de erros sistemáticos significativos.

Para além do valor-de-z foi também calculado o desvio, ou seja, o viés entre o valor médio obtido para cada açúcar e o seu valor de referência, sendo os resultados apresentados na **tabela 20**.

Tabela 20: Resultados obtidos para o viés médio para os açúcares analisados.

	Valor médio	Valor referência	Viés	Viés relativo (%)
Frutose	2,71	2,85	0,14	4,98
Glucose	3,12	3,17	0,05	1,70
Galactose	2,90	2,66	0,24	9,10
Sacarose	3,33	3,41	0,08	2,26
Maltose	3,36	3,41	0,05	1,47
Lactose	18,51	19,10	0,59	3,11

O valor do viés relativo, calculado pela equação 30, foi inferior a 10 % (valor definido pelo laboratório) para todos os açúcares analisados, sendo que a maltose possui o menor viés relativo (1,47 %) e a galactose o maior (9,10 %). Uma vez que o critério do laboratório foi cumprido, considere o método justo, o que reforça os resultado do z-score. Desta forma, considere que não há evidências da existência de erros sistemáticos nos resultados obtidos.

Como apenas foi analisado um material de referência certificado para a validação do método, a justeza foi também avaliada através da realização de ensaios de recuperação

(resultados apresentados na **tabela 17**), nos quais foram obtidas percentagens de recuperação médias entre 92 % e 107 %. Como a recuperação média dos ensaios se encontrou entre 80 % e 120 % considerou-se que o método era justo.

▪ **6.10. Limiares analíticos**

**6.10.1. Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi definido como 0,20 g/100g. Para demonstrar experimentalmente o limite de quantificação foram realizados ensaios de recuperação, de forma a demonstrar que o método de análise permite quantificar esse valor de concentração.

Para os ensaios de recuperação foram utilizadas 10,0000 g de gelatina e analisadas em duplicado, tendo sido determinada a concentração de cada açúcar utilizando as retas de calibração correspondentes. A matriz selecionada para a realização destes ensaios foi a gelatina por esta não ter açúcares presentes na sua constituição, pelo que o valor obtido advém exclusivamente da fortificação. O passo seguinte foi fortificar a gelatina com 0,400 mL da solução de fortificação de  $49,68 \pm 0,58$  g/L e analisar a amostra em replicado. Os dados para a frutose estão apresentados na **tabela 21** e dos restantes açúcares no **anexo A4**. Após reunir estes dados, foi determinada a média, o desvio padrão e a percentagem de recuperação média (calculada pela equação 3). Os valores obtidos para os açúcares analisados encontram-se na **tabela 22**.

*Tabela 21: Concentração obtida e esperada de frutose na gelatina*

Matriz	Data	média do branco	Fortificação		Resultados	1	2	3	4	5	6	7
Gelatina	27-05-2022	0	Conc. Sol. Mãe (g/L)	50	Massa (g)	10,0031	10,0491	10,0155	10,0963	10,0235	10,0185	10,0525
			Vol. Sol. Mãe (mL)	0,4	Resultado (g/100 g)	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21
			Conc. Adição (g/L)	0,2	Resultado teórico (g/100 g)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
					% Recuperação	105	109	107	107	106	111	108
					% Recuperação média	107						

Tabela 22: Resultados obtidos para a recuperação média dos açúcares analisados

Açúcar		Média (g/100 g)	Desvio padrão	n.º de resultados	Recuperação média (%)
Frutose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,21	0,00	7	107
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		
Glucose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,22	0,01		111
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		
Galactose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,22	0,01		111
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		
Sacarose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,21	0,01		104
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		
Maltose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,20	0,00		102
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		
Lactose	Concentração de gelatina fortificada obtida	0,20	0,01	98	
	Concentração de gelatina fortificada esperada	0,20	0,00		

A recuperação média de cada açúcar, como verificado na **tabela 22**, está dentro do intervalo 80 % a 120%, definindo internamente pelo laboratório, pelo que se concluiu que era possível quantificar os açúcares na concentração analisada. Uma vez que foi demonstrado laboratorialmente que é possível quantificar os açúcares pretendidos com a concentração de 0,20 g/100 g, este será o limite de quantificação do método.

A equação 37 pode ser utilizada para verificar se o limite de quantificação se mantém estável ao longo do tempo, devendo ser calculado sempre que se traça uma nova curva de calibração. Para o caso da curva de calibração do dia 12/01/2022 (apresentada na **figura 11**) o declive é 2307,00 e o  $S_{y/x}$  é 59,18 nRIU obteve-se um LOQ de:

$$LOQ = \frac{59,18 \times 10}{2307,00} = 0,26 \text{ g/L}$$

### 6.10.2. Limite de deteção

O limite de deteção corresponde a 1/3 do limite de quantificação, ou seja, 0,067. Para demonstrar este valor foi preparado um padrão de 0,067 g/100 g e foram obtidas 10 leituras no HPLC. Como demonstrado pela **figura 19**, o método utilizado consegue distinguir os açúcares do branco, ou seja, estes podem ser detetados.

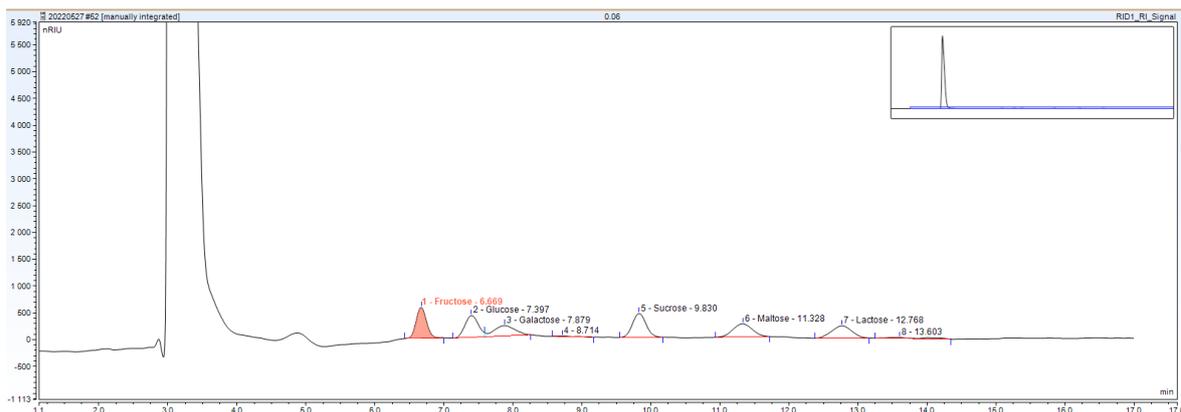


Figura 19: Cromatograma da gelatina fortificada com 0,40 mL da solução de fortificação de 50,00 g/L

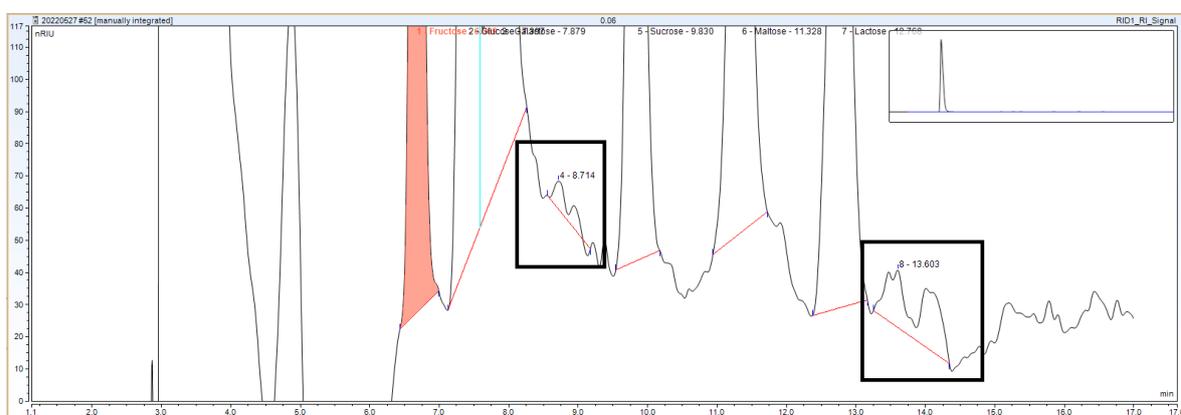


Figura 20: Cromatograma da gelatina com seleção de janelas de ruído

Tabela 23: Dados relativos ao cromatograma das figuras 23 e 24

1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
2	Peak No.	Peak Name	Ret. Time min	Amount g/l	Rel. Area %	Area nRIU*min	Height nRIU	Type	Width (50%) min	Asym. EP	Resol. EP	Plates EP
4	1	Fructose	6.669	0.0068	18.73	99.8772	577.45	BMB*	0.162	1.09	2.27	9447
5	2	Glucose	7.397	0.0331	17.03	90.8387	407.35	BM *	0.217	n.a.	1.02	6451
6	3	Galactose	7.879	0.0926	12.96	69.1188	191.54	MB*	0.342	n.a.	1.96	2936
7	4		8.714	n.a.	0.41	2.2077	8.61	BMB*	0.160	1.97	3.51	16450
8	5	Sucrose	9.830	0.0300	19.13	102.0174	445.42	BMB*	0.215	1.06	3.35	11569
9	6	Maltose	11.328	0.0265	14.92	79.5714	244.89	BMB*	0.312	1.02	2.66	7307
10	7	Lactose	12.768	0.0372	14.57	77.7137	227.47	BMB*	0.326	0.99	1.61	8475
11	8		13.603	n.a.	2.25	12.0074	17.90	BMB*	0.286	1.58	n.a.	1257
12	Maximum			0.0068	18.73	102.0174	577.45		0.162	1.09	2.27	9447
13	Minimum			0.0068	0.41	2.2077	8.61		0.160	0.99	1.02	2936
14	Sum			0.2262	100.00	533.3525	2120.62					
15												
16												

Pela análise da **tabela 23** verifiquei que o sinal do ruído foi sempre inferior a 1/3 da altura dos picos dos açúcares, pelo que é possível aceitar 0,0067 g/100 g como limite de deteção do método.

▪ **6.11. Gama de trabalho**

A gama de trabalho para o método analisado é apresentada para cada açúcar na **tabela 24**. A sua definição é importante uma vez que apenas podem ser quantificadas concentrações de açúcar dentro deste intervalo. O limite inferior da gama correspondeu ao limite de quantificação e o limite superior correspondeu à maior concentração obtida durante a validação do método, ajustada para o múltiplo de 5 mais próximo.

Tabela 24: Gama de trabalho dos açúcares analisados

Componente	De (g/100 g)	Até (g/100 g)
Frutose	0,20	15,0
Glucose	0,20	15,0
Lactose	0,20	15,0
Maltose	0,20	25,0
Sacarose	0,20	15,0
Galactose	0,20	25,0

▪ **6.12. Adequabilidade do sistema**

Para o estudo da adequabilidade do sistema foram realizadas 5 injeções do padrão de 18,00 g/L (último padrão da curva de calibração), sendo os resultados obtidos apresentados na **tabela 25**. Foram também determinados o número de pratos teóricos e o fator de capacidade ( $k'$ ) das injeções do padrão de 18,00 g/L, cujos resultados são apresentados na **tabela 26**.

Tabela 25: Tempo de retenção (expresso em minutos), assimetria e precisão (expressa em percentagem) obtidos de cinco injeções do padrão de 18,00 g/L

Componente	Tempo de retenção (min)						Assimetria						Precisão (%)					
	Fru	Glu	Gal	Sac	Mal	Lac	Fru	Glu	Gal	Sac	Mal	Lac	Fru	Glu	Gal	Sac	Mal	Lac
Injeção 1	6,84	7,86	8,23	10,23	12,07	12,85	1,27	-	-	0,97	0,88	0,93	2,45	1,22	4,54	3,94	3,29	-
Injeção 2	6,88	7,69	9,23	10,28	12,07	12,85	1,29	-	-	0,97	0,89	0,95	2,47	1,20	4,54	3,95	3,30	-
Injeção 3	6,88	7,68	8,22	10,28	12,07	13,85	1,33	-	-	0,95	0,88	0,95	2,47	1,20	4,55	3,94	3,28	-
Injeção 4	6,88	7,68	8,22	10,28	12,06	13,84	1,31	-	-	0,98	0,89	0,97	2,47	1,20	4,54	3,93	3,27	-
Injeção 5	6,88	7,68	8,22	10,27	12,00	13,80	1,32	-	-	0,95	0,87	0,89	2,47	1,20	4,54	3,95	3,30	-
Média	6,87	7,72	8,43	10,27	12,05	13,44	1,30	-	-	0,96	0,88	0,94	2,47	1,20	4,54	3,94	3,29	-
Desvio padrão	0,02	0,08	0,45	0,02	0,03	0,54	0,02	-	-	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	-
CV (%)	0,25	1,04	5,33	0,21	0,24	4,00	1,85	-	-	1,39	0,95	3,23	0,41	0,74	0,10	0,21	0,40	-

Tabela 26: Número de pratos teóricos e fator de capacidade ( $k'$ ) obtidos em cinco injeções do padrão de 18,00 g/L

Componente	Pratos teóricos						Fator de capacidade					
	Fru	Glu	Gal	Sac	Mal	Lac	Fru	Glu	Gal	Sac	Mal	Lac
Injeção 1	9254	6975	3821	12060	8173	10101	1,29	1,56	1,74	2,43	3,02	3,62
Injeção 2	9261	6984	3833	12064	8204	10044	1,29	1,56	1,74	2,43	3,02	3,62
Injeção 3	9240	6963	3804	12064	8147	10030	1,29	1,56	1,74	2,43	3,02	3,62
Injeção 4	9256	6997	3825	11999	8132	9972	1,29	1,56	1,74	2,43	3,02	3,61
Injeção 5	9237	6964	3813	12088	8194	10162	1,29	1,56	1,74	2,42	3,02	3,61
Média	9249,60	6976,60	3819,20	12055,00	8170,00	10061,80	1,29	1,56	1,74	2,43	3,02	3,62

Através da avaliação dos parâmetro de qualidade cromatográfica apresentados nas **tabelas 25 e 26** verificou-se que o tempo de retenção entre injeções não variava em mais de 0,30 minutos e que estavam de acordo com os tempos de retenção especificados para cada açúcar. A assimetria das bandas cromatográficas era inferior a 2 na frutose, sacarose, maltose e lactose. No caso da glucose e da galactose não foi possível determinar a assimetria uma vez que não há separação total das duas bandas, indicando pouca deformação relativamente à forma gaussiana da banda cromatográfica. A assimetria da banda cromatográfica dificulta a sua integração, no entanto, este fator não influencia a determinação destes açúcares uma vez que é utilizada a sua altura e não a sua área. O número de pratos teóricos era superior a 2000 para todos os açúcares e aproximadamente constante para a banda de cada açúcar, indicando que as bandas do cromatograma são estreitas e a coluna eficiente. Verificamos ainda que o coeficiente de variação da precisão era inferior a 2 % em todos os açúcares analisados, indicando que não existia dispersão dos resultados obtidos. O fator de capacidade (k') deveria ser superior a 2 para existir separação total entre as bandas. Isto não se verificou na frutose, glucose e galactose, estando estes açúcares mais sensíveis a variações na composições da fase móvel.

Assim, foi concluído que foram cumpridos os critérios definidos pela empresa e que o sistema analítico utilizado é capaz de reportar picos cromatográficos adequados.

### 6.13. Validação segundo o AS-SOP.025

Para validação dos critérios definidos no AS-SOP.25 foram analisados triplicados de uma matriz por cada família, podendo ser utilizados materiais de referência certificados (preferencialmente) ou ensaios de recuperação quando não estão disponíveis MRC. Essencialmente, este critério é mais uma forma de comprovar a precisão e exatidão dos resultados. É exigido internamente pelo grupo Mérieux NutriSciences a utilização do HorRat para demonstrar que a dispersão dos resultados obtidos para os triplicados é aceitável.

*Tabela 27: Resultados obtidos dos triplicados obtidos em dois dias distintos e determinação dos parâmetros necessários para validação dos critérios definidos no AS-SOP.25*

Data	Família	Matriz	Resultados			Unidades	Média	Desvio-padrão	RSD (%)	Media. Conc. (fracao massa)	PRSDr	2/3PRSDr	HorRat	Limite repetibilidade
			1ª	2ª	3ª									
10-01-2022	Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	4,99	4,94	5,10	g/100 g	5,01	0,09	1,7	5,01E-02	3,14	2,09	0,82	4,81
11-01-2022			4,78	4,88	5,12		4,93	0,17	3,5	4,93E-02	3,15	2,10	1,69	9,92
25-01-2022	Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	0,38	0,36	0,36	g/100 g	0,36	0,01	3,3	3,63E-03	4,66	3,11	1,07	9,26
27-05-2022			0,38	0,37	0,37		0,37	0,006	1,5	3,73E-03	4,64	3,09	0,50	4,33
08-03-2022	Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	6,24	6,70	6,28	g/100 g	6,41	0,25	3,98	6,41E-02	3,02	2,02	1,97	11,14
10-03-2022			7,00	6,50	6,25		6,58	0,38	5,80	6,58E-02	3,01	2,01	2,89	16,24
11-01-2022	Leite, produtos lácteos e derivados	Leite UHT	0,62	0,61	0,58	g/100 g	0,60	0,02	3,2	6,02E-03	4,32	2,88	1,11	8,95
12-01-2022			0,61	0,60	0,60		0,60	0,00	0,7	6,04E-03	4,32	2,88	0,26	2,08
13-01-2022	Leite, produtos lácteos e derivados	Iogurte	3,00	3,03	2,96	g/100 g	2,99	0,04	1,2	2,99E-02	3,39	2,26	0,52	3,28
18-01-2022			2,39	2,37	2,29		2,35	0,05	2,2	2,35E-02	3,52	2,35	0,94	6,17

Uma vez que a recuperação média dos triplicados se encontra dentro do intervalo 80 % a 120 % e o RSD é sempre inferior a 10 %, conclui-se que o método cumpriu os critérios definidos.

## **7. Conclusão**

Com a realização deste trabalho foi possível validar internamente o método para quantificação de açúcares componentes (incluindo a galactose) por HPLC nos grupos alimentares estudados. Para que esta validação fosse possível, foram realizados vários ensaios laboratoriais, a partir dos quais foi possível determinar os parâmetros de desempenho do método, como a linearidade, limiares analíticos, precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, justeza e incerteza do método.

Foi demonstrado que o método analítico apresenta uma correlação linear entre a concentração do analito presente na amostra e a resposta obtida pelo equipamento de HPLC, através do valor de coeficiente de correlação possuir um valor superior a 0,995 mas também evidenciado pelos testes estatísticos realizados.

Após a realização do ensaio de recuperação utilizando a amostra de gelatina como matriz, foi possível demonstrar que o método consegue quantificar todos os açúcares pretendidos a partir de 0,20 g/100, sendo este valor definido como limite de quantificação. O limite de detecção foi estabelecido como 0,067 g/100 g após análise do padrão com essa concentração, no qual era possível detetar a presença dos diversos açúcares.

Após ajuste das gamas de trabalho para o estudo da precisão, verificou-se que os valores do coeficiente de correlação estavam abaixo do limite máximo definido (10 %), pelo que se conclui que não há evidências de existirem erros aleatórios a afetar a confiança dos resultados obtidos. Pelo estudo da justeza, constatei que também não existiam evidências de erros sistemáticos no conjunto de resultados. Os dados obtidos permitiram também concluir que o método é seletivo e específico para os açúcares analisados. Pela determinação da incerteza conclui-se que o método é capaz de fornecer resultados com confiança.

Foi ainda concluído que foram cumpridos todos os requisitos internos para a validação do método, tendo sido validado o AS-SOP.25. Foi também confirmado que a coluna utilizada é eficaz na separação da glucose e da galactose.

Assim, concluí que foi demonstrado com este relatório de validação do método que o mesmo é adequado para a quantificação dos açúcares componentes nas matrizes pretendidas e que os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis, podendo ser implementado no laboratório.

## 8. Bibliografia

- [1] IPAC, “GUIA PARA A APLICAÇÃO DA NP EN ISO/IEC 17025:2018 (OGC001).” pp. 1–28, 2018.
- [2] S. S. Nielsen, Ed., *Food Analysis*. Boston, MA: Springer US, 2010. doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1.
- [3] IPAC, “REGULAMENTO GERAL DE ACREDITAÇÃO (DRC001),” 2019. [Online]. Available: [www.european-accreditation.org](http://www.european-accreditation.org)
- [4] J. Almeida and Â. Pires, “Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração,” *Boletim SPQ*, pp. 34–39, 2016.
- [5] L. Cortez *et al.*, *Guia Relacre 3 - Validação de resultados em laboratórios químicos*. 1996.
- [6] P. S. Rao, P. Singh, V. Sharma, and S. Arora, “Traditional analytical approaches for lactose residues determination in lactose hydrolysed milks: A review,” *LWT*, vol. 151. Academic Press, Nov. 01, 2021. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112069.
- [7] S. Ugidos-Rodríguez, M. C. Matallana-González, and M. C. Sánchez-Mata, “Lactose malabsorption and intolerance: a review,” *Food and Function*, vol. 9, no. 8. Royal Society of Chemistry, pp. 4056–4068, Aug. 01, 2018. doi: 10.1039/c8fo00555a.
- [8] P. D. Silva, R. Cruz, and S. Casal, “Sugars and artificial sweeteners in soft drinks: A decade of evolution in Portugal,” *Food Control*, vol. 120, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107481.
- [9] X. Yan, “HPLC for Carbohydrate Analysis,” 2014. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/301698343>
- [10] R. Maughan, “Carbohydrate metabolism,” *Surgery*, vol. 27, no. 1. pp. 6–10, 2009. doi: 10.1016/j.mpsur.2008.12.002.
- [11] J. H. Cummings *et al.*, “A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 51, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 417–423, 1997. doi: 10.1038/sj.ejcn.1600427.
- [12] R. H. Cotton, P. A. Rebers, J. E. Maudru, and G. Rorabaugh, “The Role of Sugar in the Food Industry.” [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [13] K. R. Goldfein and J. L. Slavin, “Why Sugar Is Added to Food: Food Science 101,” *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 14, no. 5, pp. 644–656, Sep. 2015, doi: 10.1111/1541-4337.12151.
- [14] R. Slimestad and I. M. Vågen, “Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1118, no. 2, pp. 281–284, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.04.087.

- [15] A. H. and S. Rainer, *HPLC for Food Analysis*. Germany: Agilent Technologies, 2011. [Online]. Available: [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)
- [16] “NP EN ISO/IEC 17025:2018 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.” 2018.
- [17] I. Geneva, “ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.”
- [18] U. Örnemark and B. Magnusson, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed. 2014. [Online]. Available: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- [19] R. C. Guy, “International Conference on Harmonisation,” *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, vol. 2, no. November 1994, pp. 1070–1072, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00861-7.
- [20] C. Augusto *et al.*, “RELACRE 13: Validação de métodos internos de ensaio em análise química,” 2000.
- [21] R. Sankar, P. Ravisankar, C. Naga Navya, D. Pravallika, and D. Navya, “A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation Controlling hypertension: A brief review View project A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation View project A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation,” 2015. [Online]. Available: [www.iosrphr.org](http://www.iosrphr.org)
- [22] European Medicines Agency, “ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures,” 2022.
- [23] M. A.T. *et al.*, “Guia Relacre 31- Quantificação da incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos,” 2018.
- [24] E. S. L. R. and W. A., “EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement,” Third Edition., 2012.
- [25] A. *et al.* C.R., “Guia EURACHEM/ RELACRE 1- Exemplos de cálculos de incertezas,” 2002.
- [26] A. Coskun and W. P. Oosterhuis, “Statistical distributions commonly used in measurement uncertainty in laboratory medicine,” *Biochemia Medica*, vol. 30, no. 1, 2020, doi: 10.11613/BM.2020.010101.
- [27] JCGM, “Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement Évaluation des données de mesure-Guide pour l’expression de l’incertitude de mesure,” 2008. [Online]. Available: [www.bipm.org](http://www.bipm.org)
- [28] VIM, “[VIM3] 5.14 Reference material (bipm.org),” <https://www.bipm.org/fr/home>. <https://www.bipm.org/fr/home> (accessed Jan. 14, 2022).

- [29] *Eurachem / CITAC Guide Metrological Traceability in Chemical Measurement*. [Online]. Available: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- [30] L. A. Currie, “Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995),” *Analytica Chimica Acta*, vol. 391, no. 2, pp. 105–126, 1999, doi: 10.1016/S0003-2670(99)00104-X.
- [31] Mérieux NutriSciences, “Validação de métodos em análise química; Procedimento relativo ao controlo de qualidade (PCQ).34,” Nov. 2021.
- [32] Mérieux NutriSciences, “Global standard operating procedure- Development and industrialization of food chemistry methods (AS-SOP-25).” 2020.
- [33] W. Horwitz and R. Albert, “The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision.” [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jaoac/article/89/4/1095/5657708>
- [34] C. Rivera and R. Rodríguez, “HORWITZ EQUATION AS QUALITY BENCHMARK IN ISO/IEC 17025 TESTING LABORATORY.”
- [35] J. N. Miller and J. C. Miller, “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth edition.” [Online]. Available: [www.pearsoned.co.uk/Miller](http://www.pearsoned.co.uk/Miller)
- [36] F. E. Grubbs, “Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples,” vol. 11, no. 1. Feb. 1969.
- [37] M. J. Alrawashdeh, “An adjusted Grubbs’ and generalized extreme studentized deviation,” *Demonstratio Mathematica*, vol. 54, no. 1, pp. 548–557, Jan. 2021, doi: 10.1515/dema-2021-0041.
- [38] Y. Wang *et al.*, “Comparing the Performance of Approaches for Testing the Homogeneity of Variance Assumption in One-Factor ANOVA Models,” *Educational and Psychological Measurement*, vol. 77, no. 2, pp. 305–329, Apr. 2017, doi: 10.1177/0013164416645162.
- [39] R. U. E. ’t Lam, “Scrutiny of variance results for outliers: Cochran’s test optimized,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 659, no. 1–2, pp. 68–84, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.aca.2009.11.032.
- [40] B. Yu. Lemeshko and E. P. Mirkin, “General problems of metrology and measurement technique,” *Springer Science+Business Media*, vol. 47, pp. 10–16, 2004.
- [41] Mérieux NutriSciences, “Procedimento relativo às análises físico-químicas (PAFQ).235 ; Determinação dos açúcares componentes e totais (frutose, glucose, galactose, sacarose, maltose e lactose),” 2022.
- [42] Mérieux NutriSciences, “Método de preparação das amostras para análise; Procedimento relativo às análises físico-químicas (PAFQ).044,” Jul. 2017.

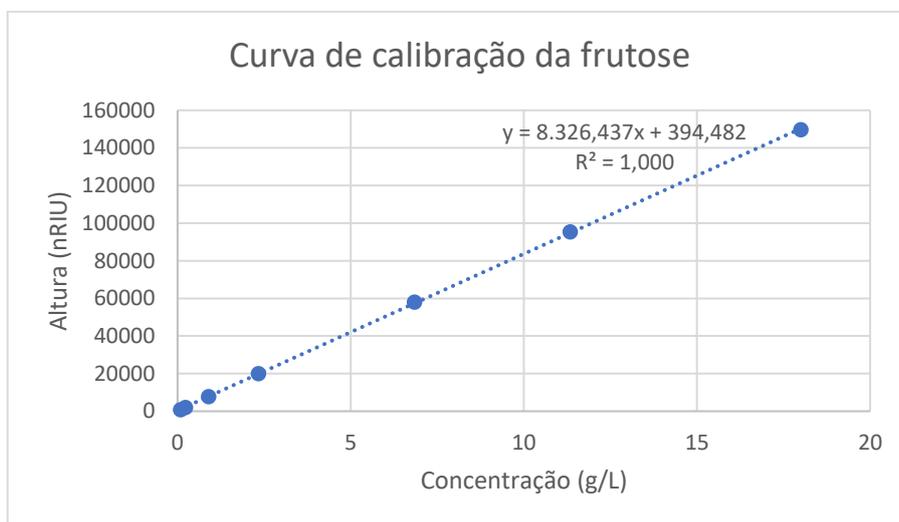
- [43] L. R. Snyder and J. J. (Joseph J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley, 1979.

## Anexos

### A. Curva de calibração

**Tabela A1:** Valores obtidos da altura das bandas obtidas no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da frutose para construção da reta de calibração

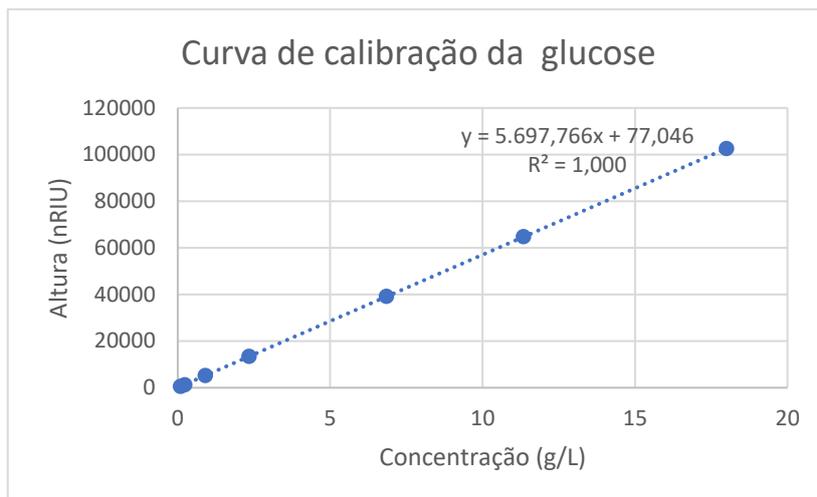
Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,09	791,776
0,23	2020,01
0,90	7733,00
2,34	20010,76
6,84	58104,36
11,34	95354,44
18,00	149639,64



**Figura A1:** Representação gráfica da reta de calibração da frutose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

**Tabela A2:** Valores obtidos da altura das bandas obtidas no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da glucose para construção da reta de calibração

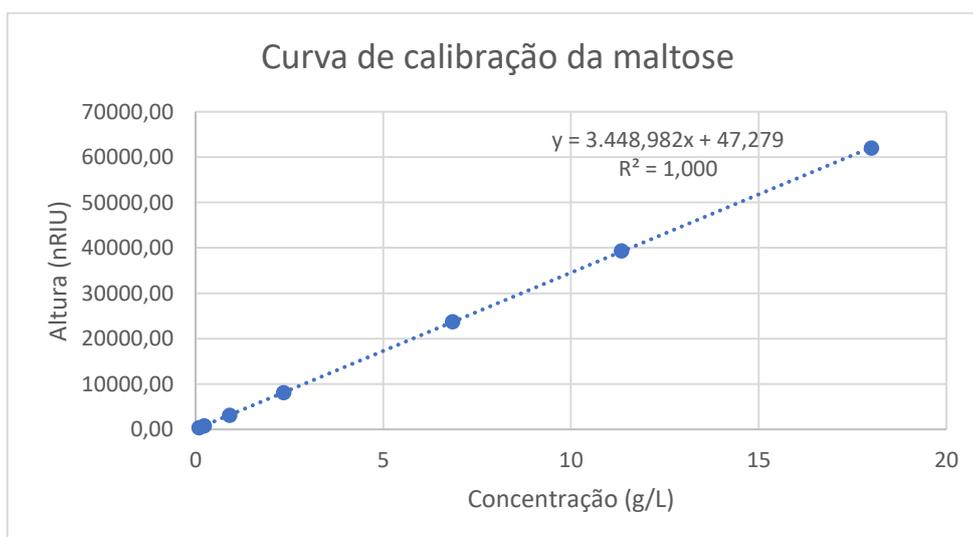
Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,09	531,8244811
0,23	1276,73
0,90	5198,14
2,34	13463,63
6,84	39206,11
11,34	64770,58
18,00	102521,54



**Figura A2:** Representação gráfica da reta de calibração da glucose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

**Tabela A3:** Valores obtidos da altura das bandas obtidas no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da maltose para construção da reta de calibração

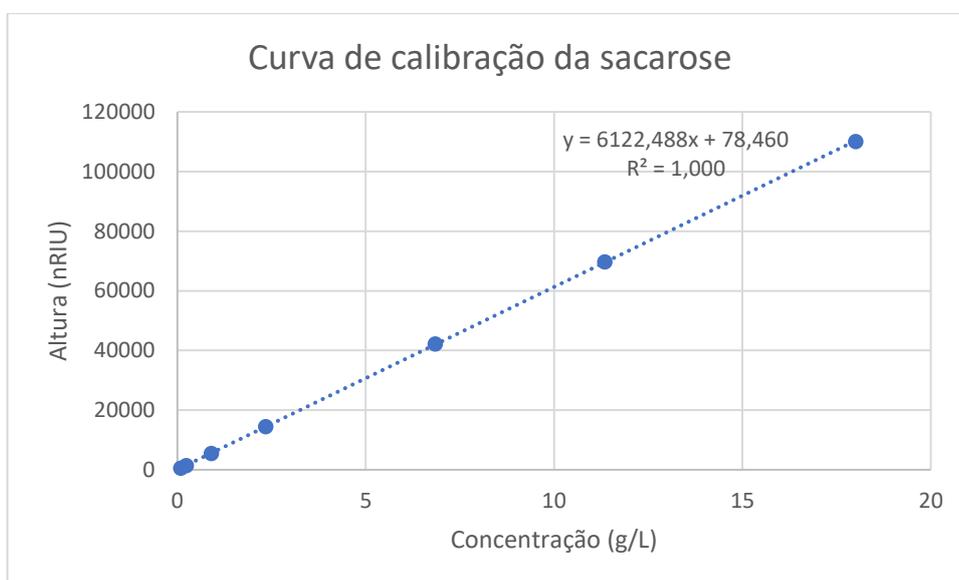
Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,09	538,375
0,23	1443,03
0,90	5502,78
2,34	14443,09
6,84	42140,89
11,34	69690,72
18,00	110098,02



**Figura A3:** Representação gráfica da reta de calibração da maltose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

**Tabela A4:** Valores obtidos da altura das bandas obtidas no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da sacarose para construção da reta de calibração

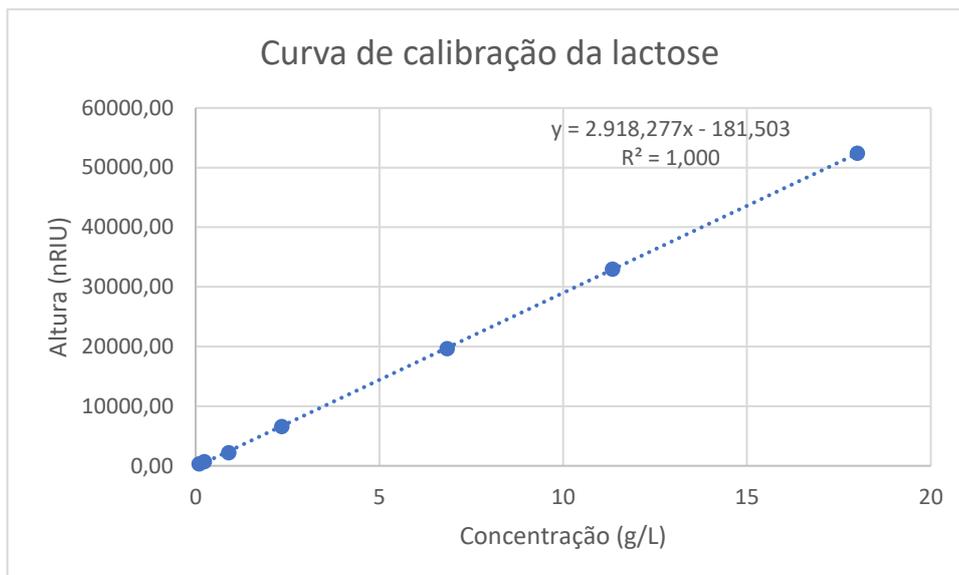
Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,09	338,26
0,23	783,80
0,90	3100,70
2,34	8126,27
6,84	23730,12
11,34	39318,97
18,00	61995,40



**Figura A4:** Representação gráfica da reta de calibração da sacarose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

**Tabela A5:** Valores obtidos da altura das bandas obtidas no cromatograma de 12-01-2022 de cada padrão de calibração da lactose para construção da reta de calibração

Concentração (g/L)	Altura (nRIU)
0,09	282,16
0,23	673,57
0,90	2183,23
2,34	6595,57
6,84	19612,59
11,34	32953,78
18,00	52400,88

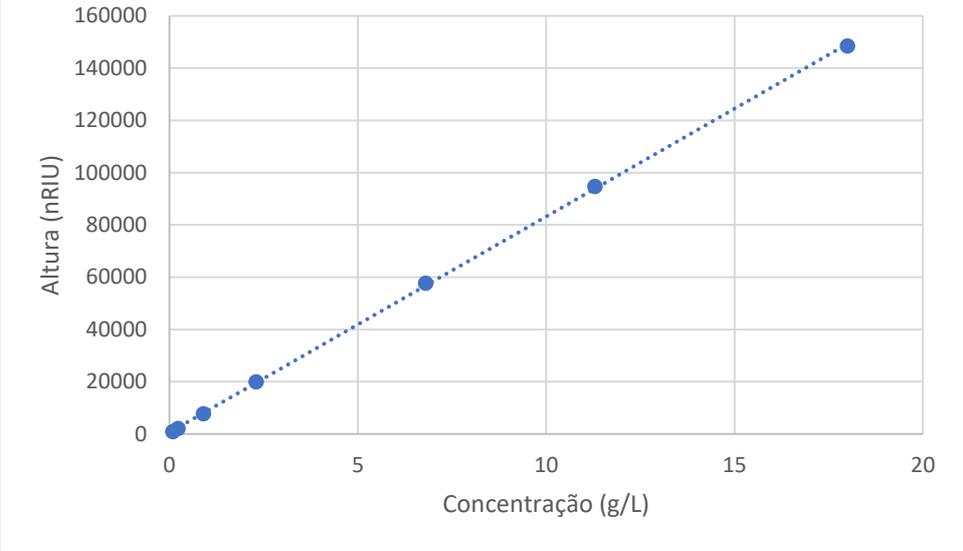
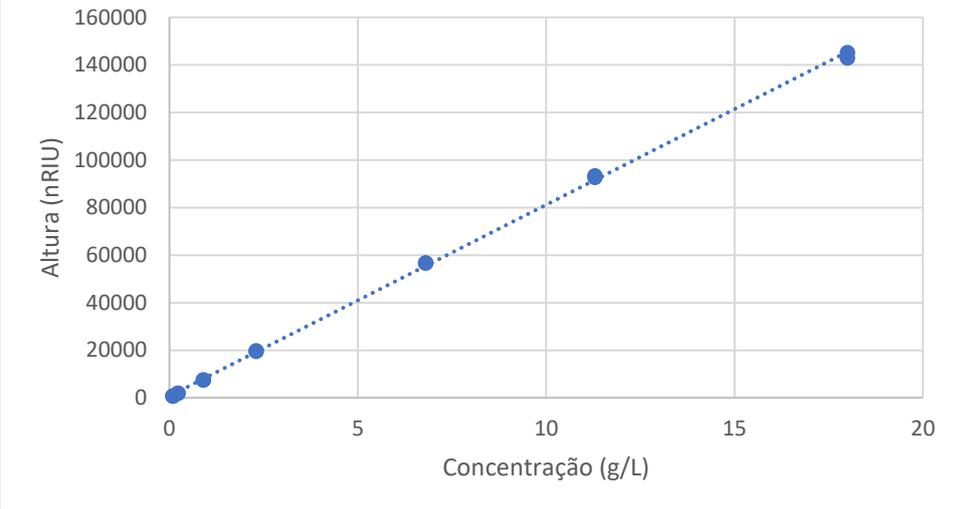


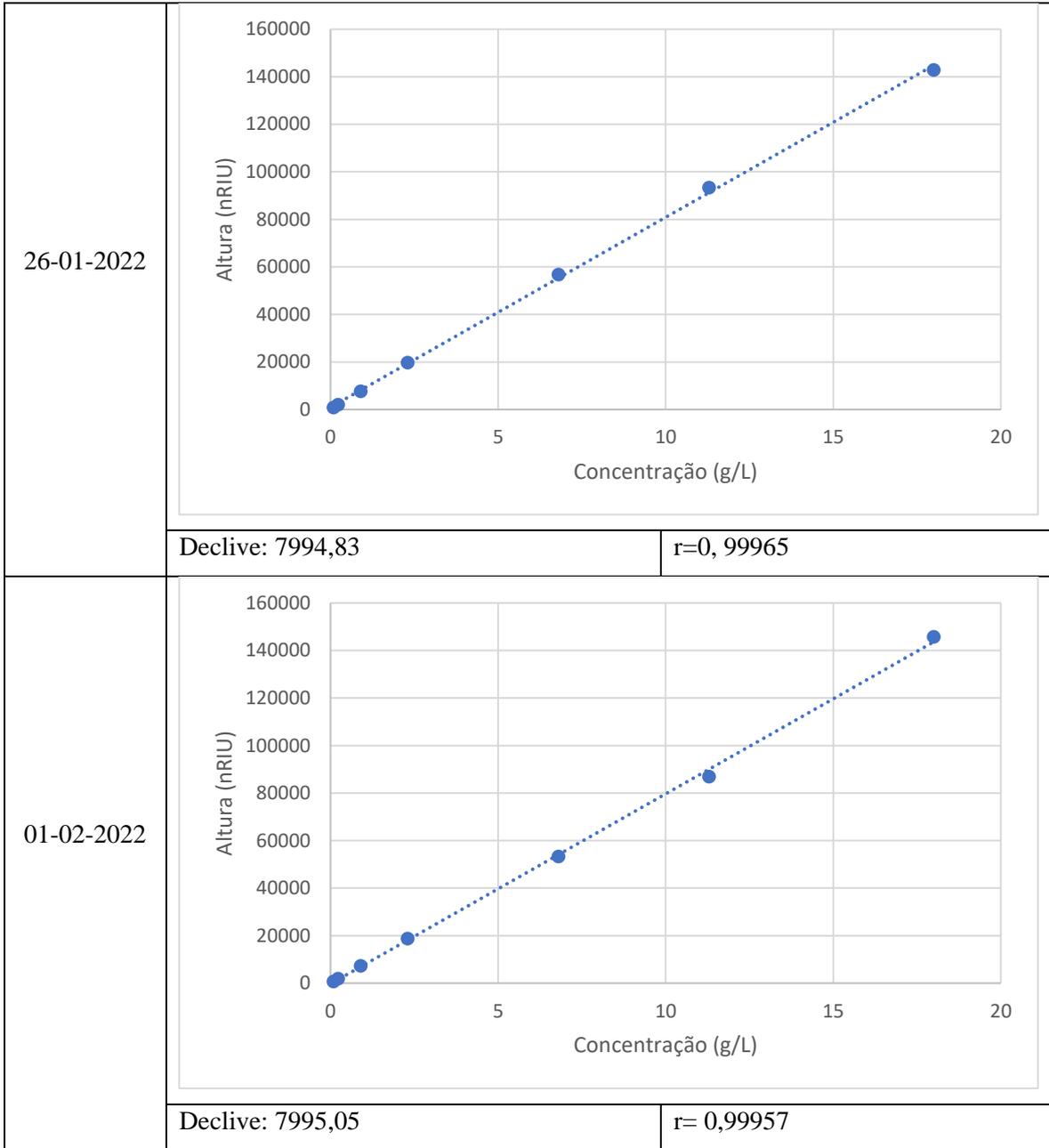
**Figura A5:** Representação gráfica da reta de calibração da lactose, cujo ensaio foi realizado no dia 12-01-2022

### B. Linearidade

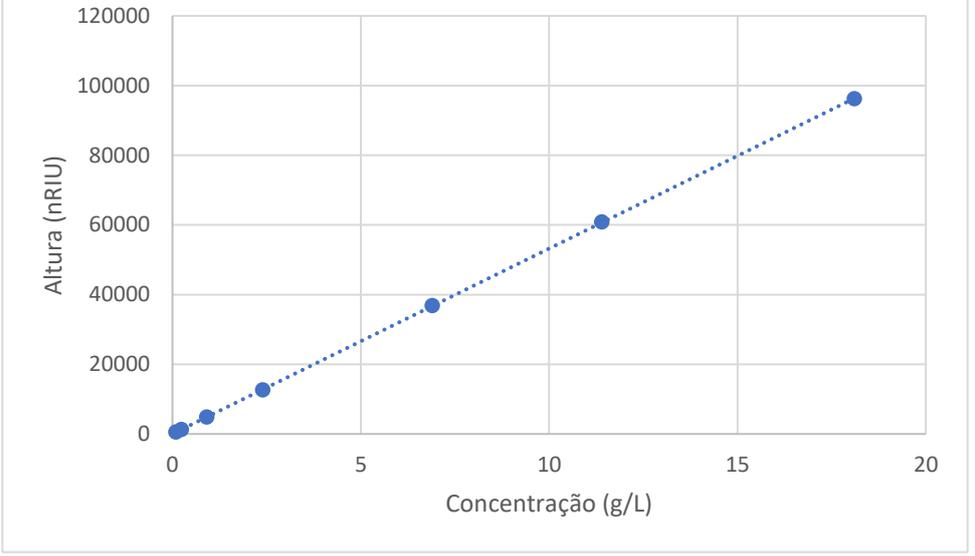
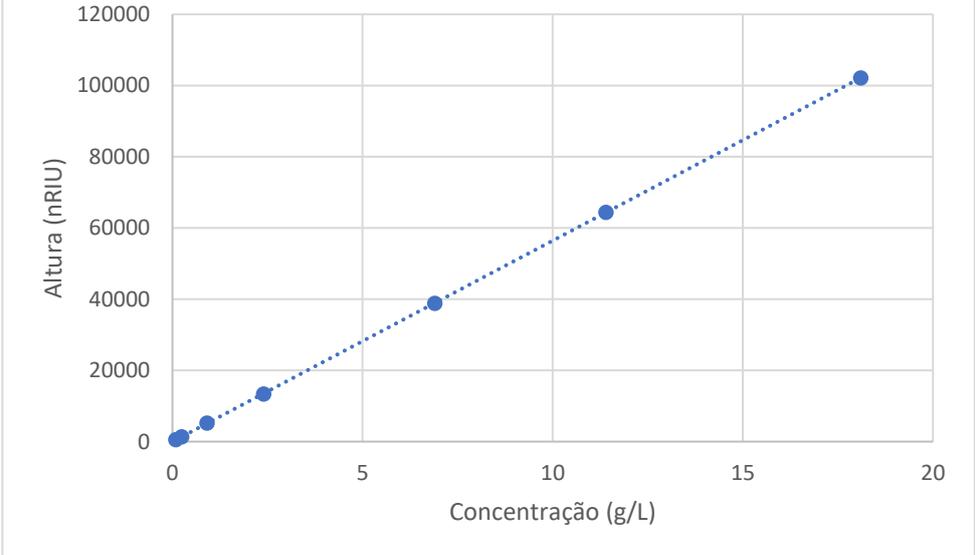
**Tabela B1:** Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade para o açúcar frutose

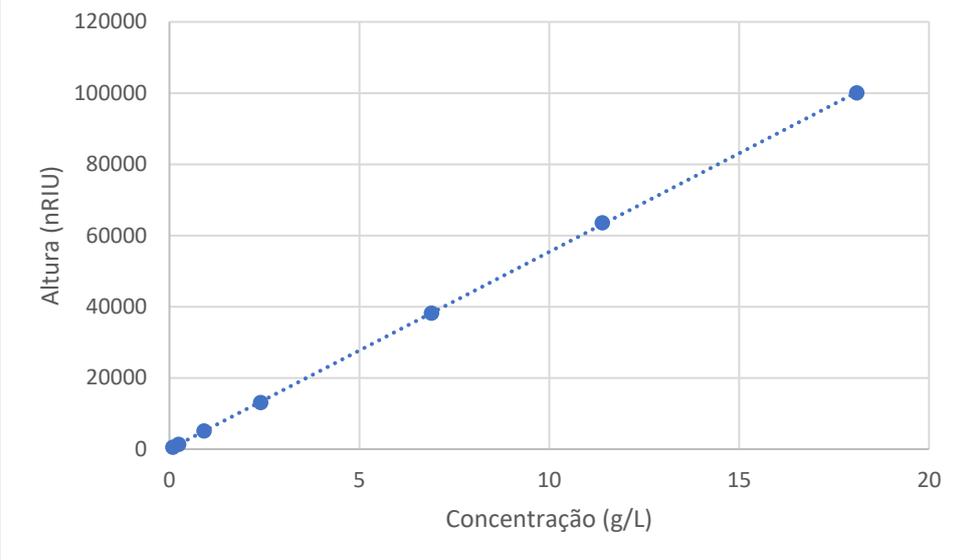
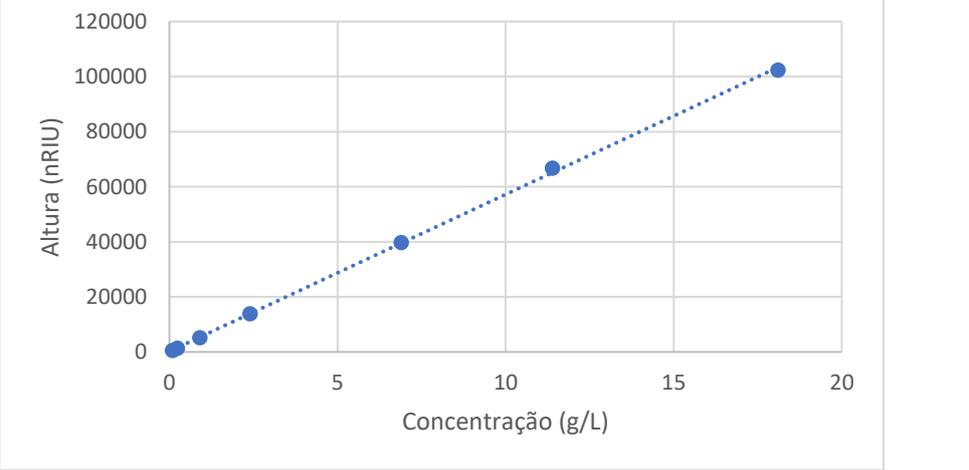
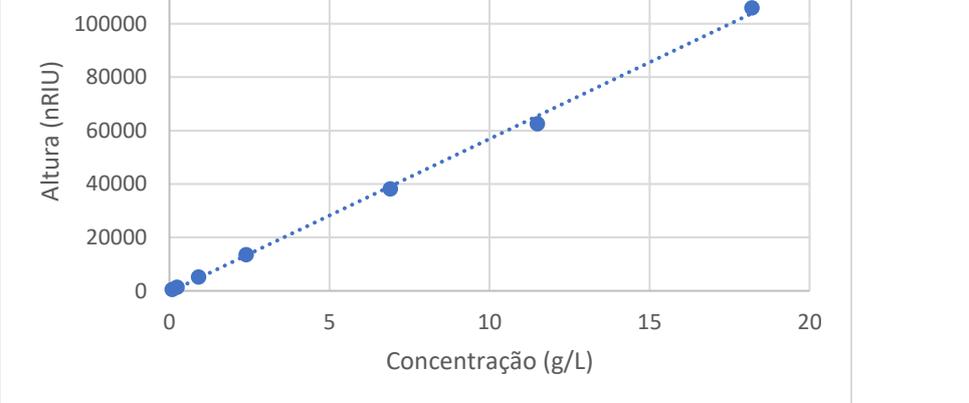
Data	Representação gráfica da reta														
11-01-2022	<p>Altura (nRIU)</p> <p>Concentração (g/L)</p> <p>Declive: 8066,20</p> <p><math>r=0,99995</math></p> <table border="1"> <caption>Dados estimados do gráfico de calibração da frutose (11-01-2022)</caption> <thead> <tr> <th>Concentração (g/L)</th> <th>Altura (nRIU)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>8000</td></tr> <tr><td>2</td><td>16000</td></tr> <tr><td>7</td><td>56000</td></tr> <tr><td>11</td><td>92000</td></tr> <tr><td>18</td><td>146000</td></tr> </tbody> </table>	Concentração (g/L)	Altura (nRIU)	0	0	1	8000	2	16000	7	56000	11	92000	18	146000
Concentração (g/L)	Altura (nRIU)														
0	0														
1	8000														
2	16000														
7	56000														
11	92000														
18	146000														

13-01-2022	
Declive:8261,13	
r=0,99993	
17-01-2022	
Declive: 5537,54	
r= 0,99998	

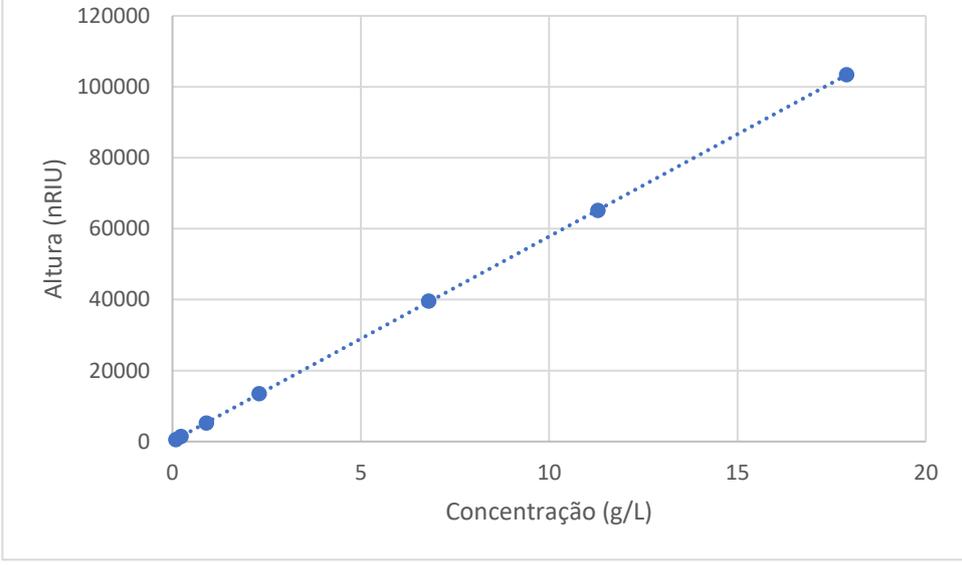
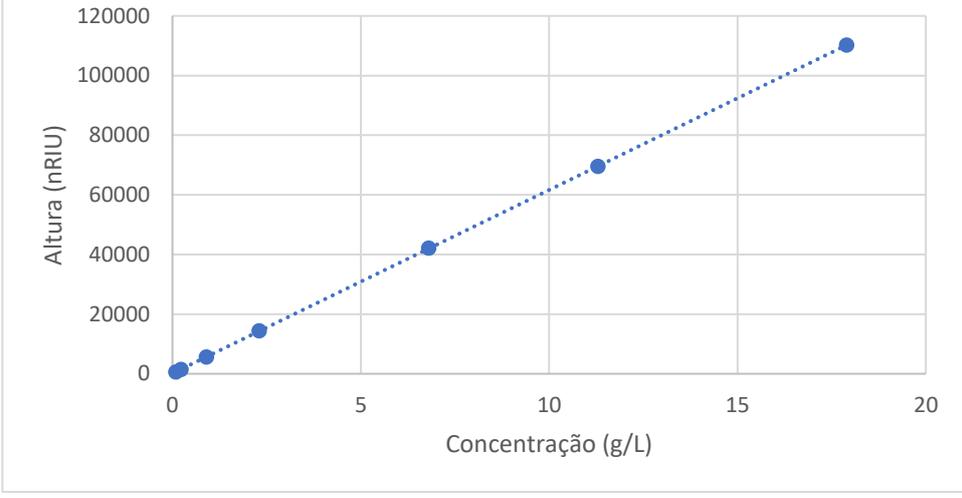


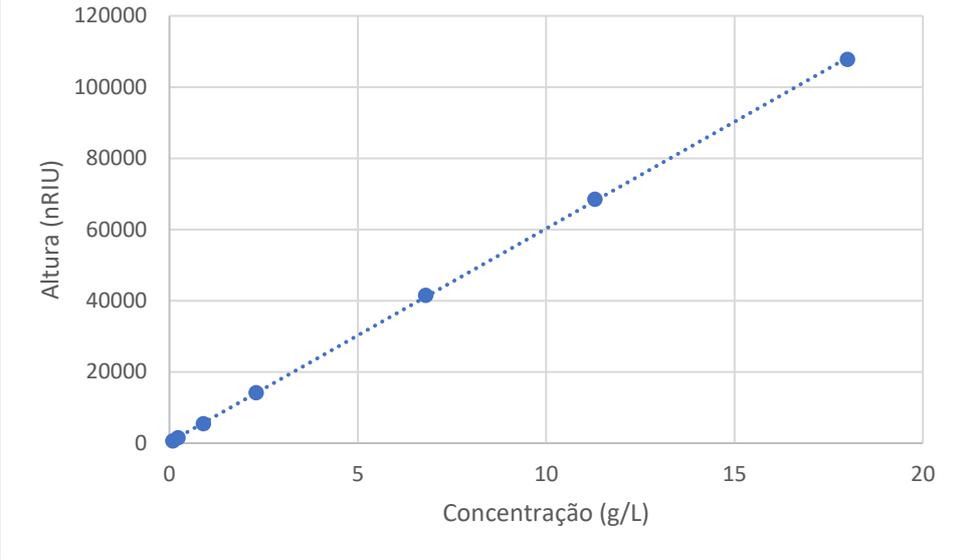
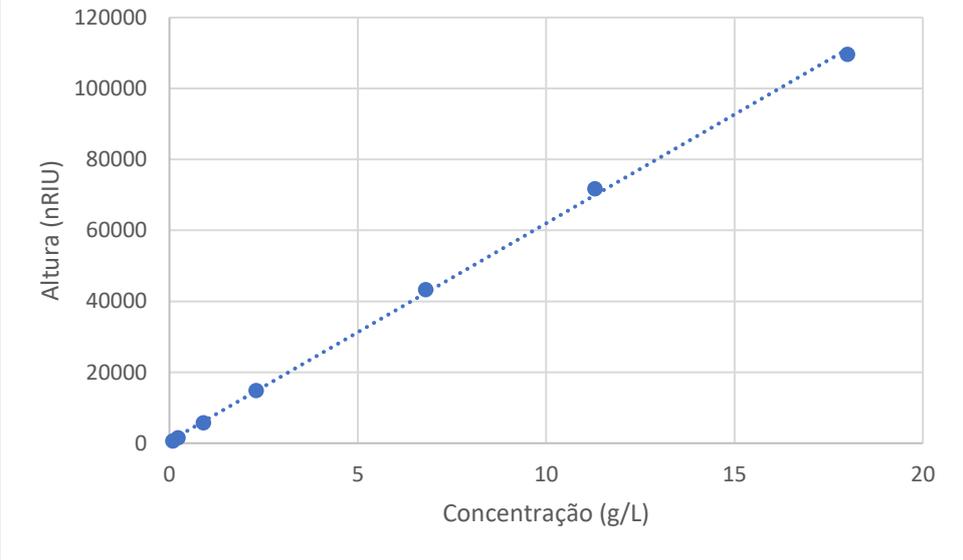
**Tabela B2:** Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade para o açúcar glucose

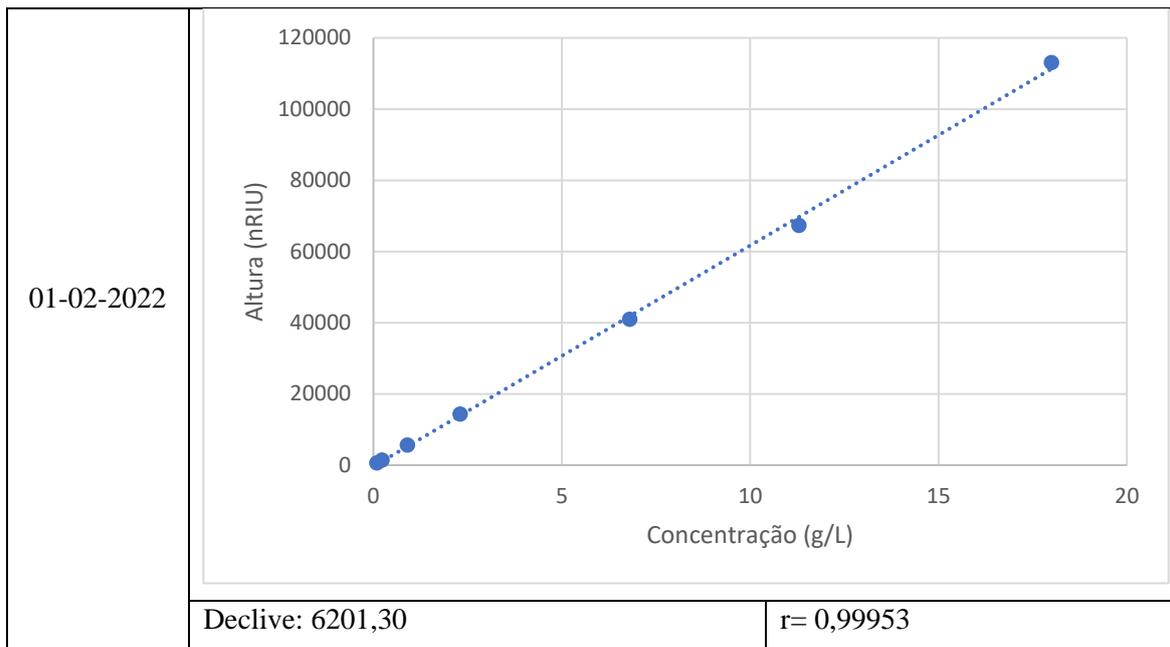
Data	Representação gráfica da reta	
11-01-2022		
	Declive: 5320,66	r=1,00000
13-01-2022		
	Declive:5645,32	r= 1,00000

17-01-2022	
<p>Declive: 5444,19 <span style="float: right;">r= 0,99990</span></p>	
26-01-2022	
<p>Declive: 5696,05 <span style="float: right;">r= 0,99980</span></p>	
01-02-2022	
<p>Declive: 5735,55 <span style="float: right;">r= 0,99923</span></p>	

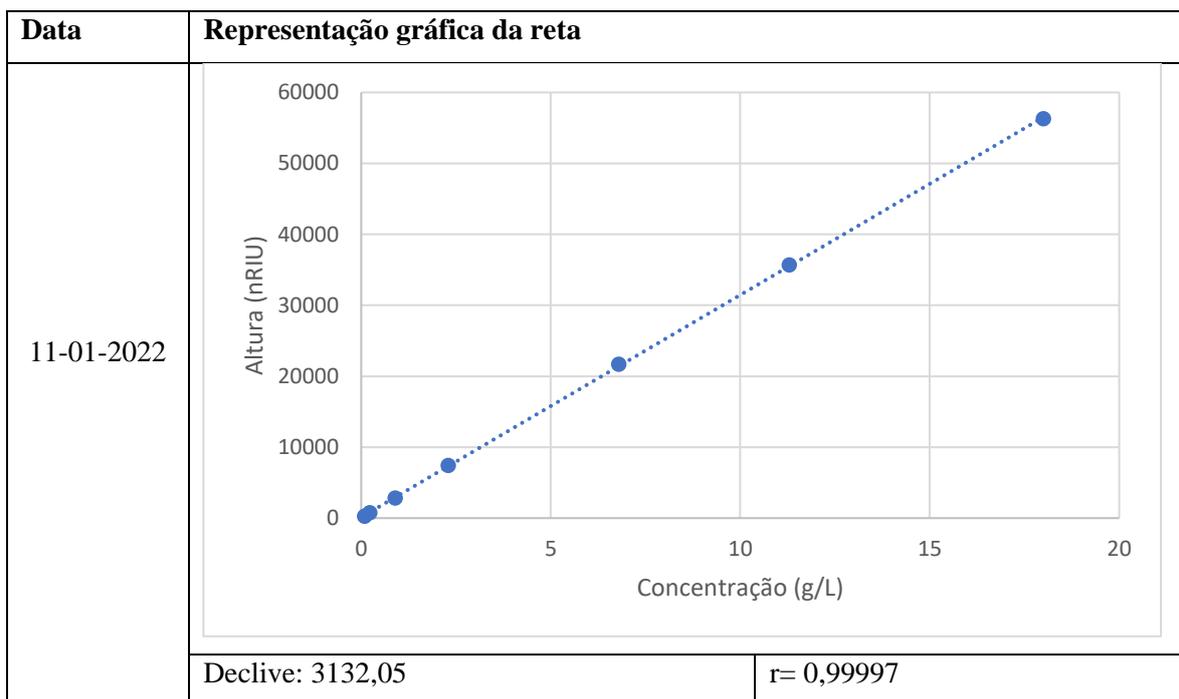
**Tabela B3:** Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade para o açúcar sacarose

Data	Representação gráfica da reta	
11-01-2022		
	Declive: 5767,63	r= 0,99999
13-01-2022		
	Declive: 6151,69	r= 1,00000

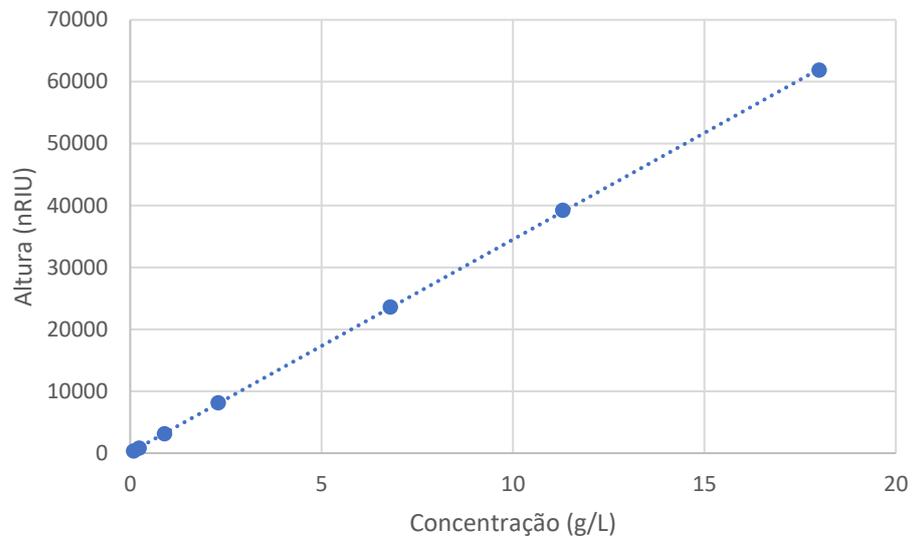
17-01-2022	
Declive: 5998,51	
r= 0,99996	
26-01-2022	
Declive: 6140,04	
r= 0,99968	



**Tabela B4:** Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade para o açúcar maltose



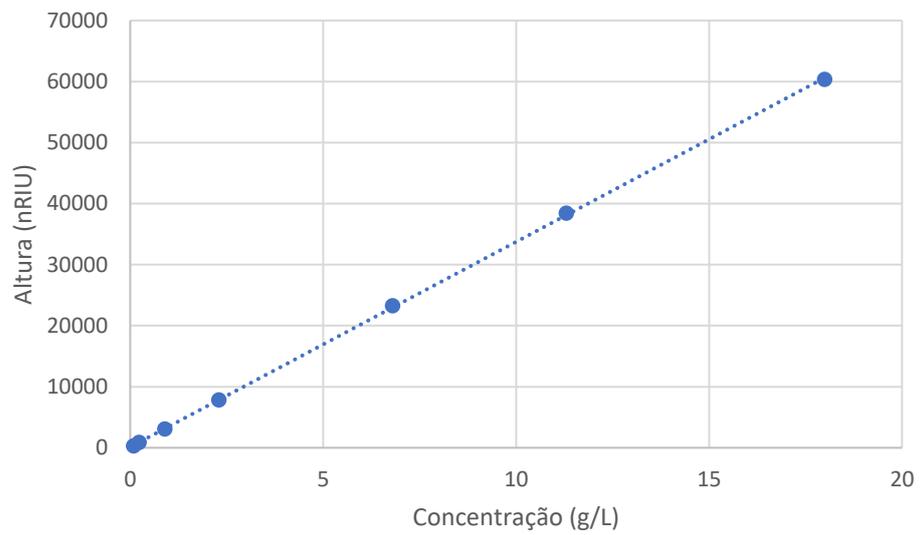
13-01-2022



Declive: 3441,06

r= 0,9998

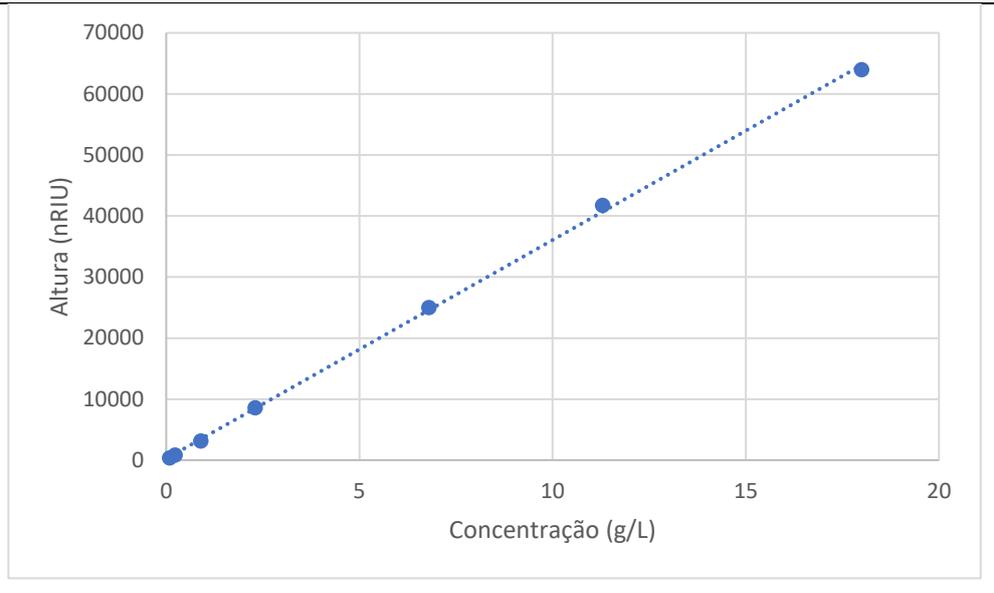
17-01-2022



Declive: 3360,69

r= 0,99995

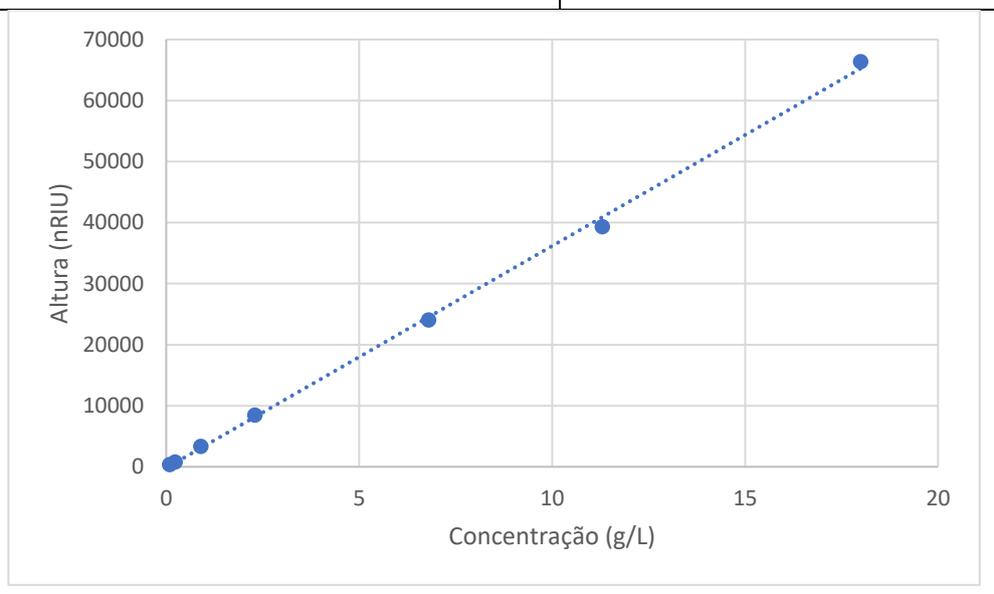
26-01-2022



Declive: 3582,18

$r= 0,99973$

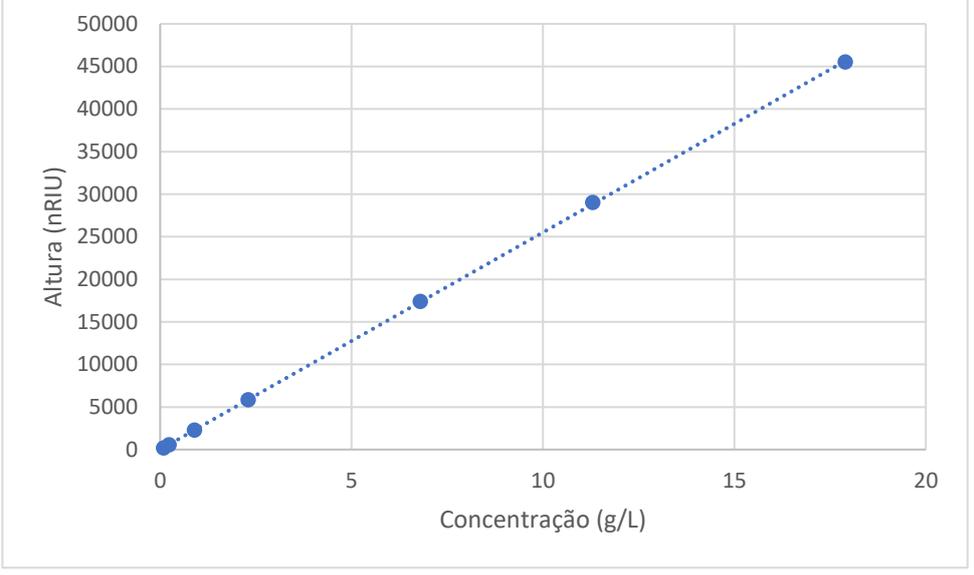
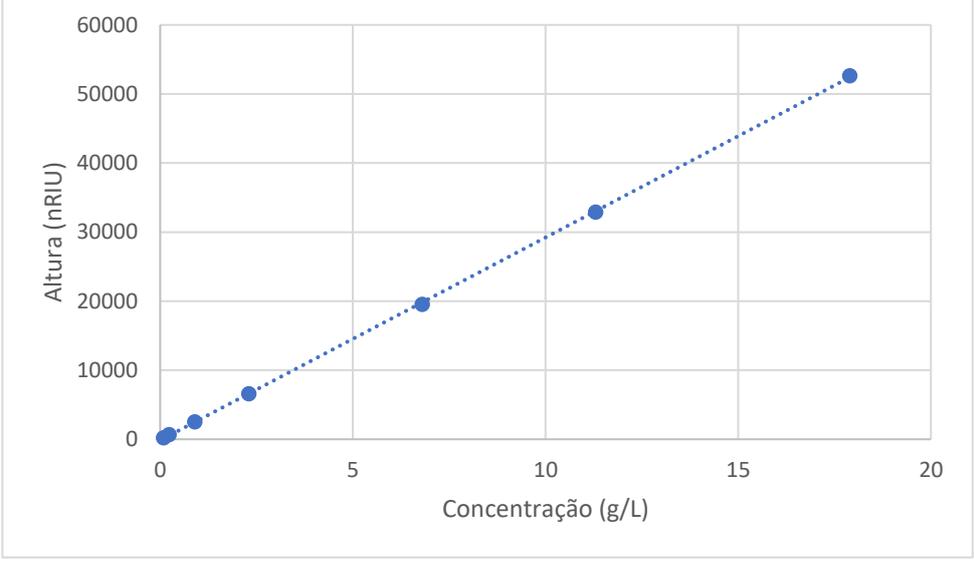
01-02-2022

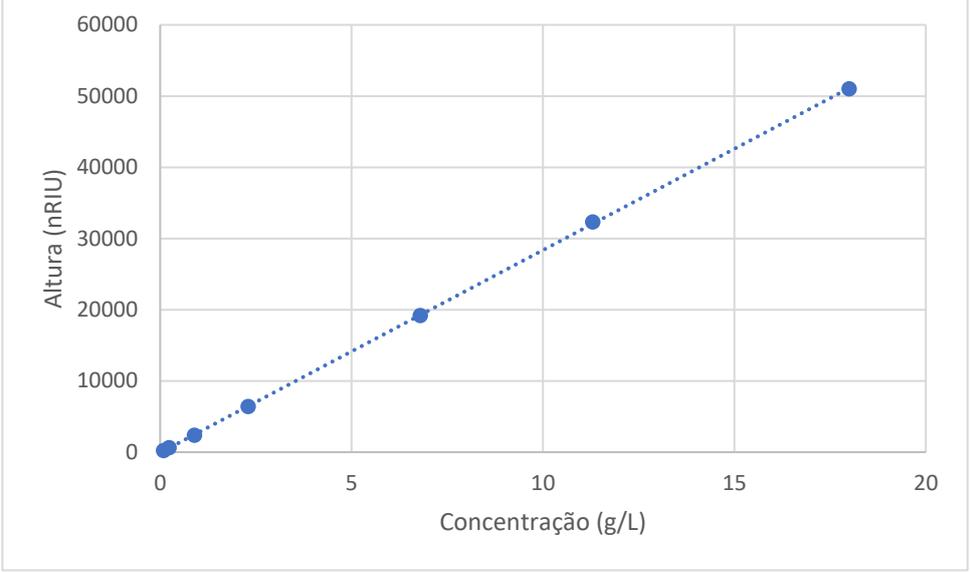
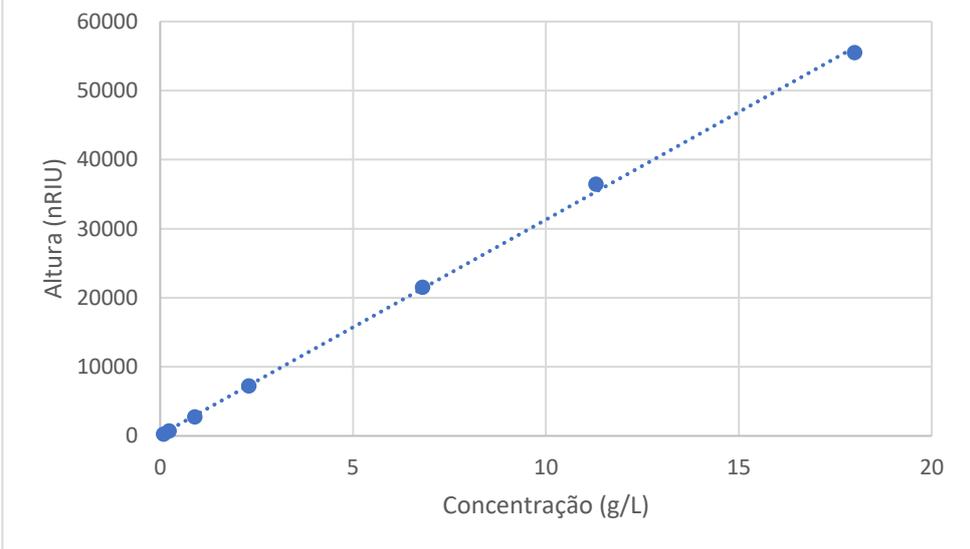


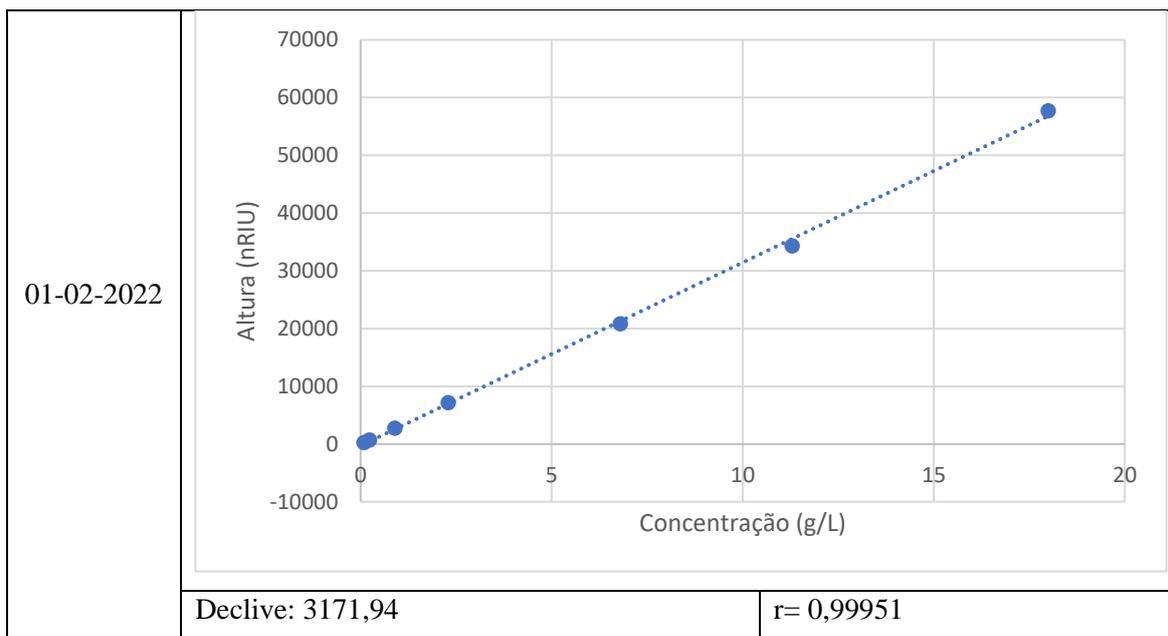
Declive: 3636,40

$r= 0,99945$

**Tabela B5:** Representação gráfica de 5 curvas de calibração em dias distintos para avaliação da linearidade para o açúcar lactose

Data	Representação gráfica da reta	
11-01-2022		
	Declive: 2550,80	r= 0,99998
13-01-2022		
	Declive: 3441,06	r= 0,99998

17-01-2022	
Declive: 2844,72	r= 0,99997
26-01-2022	
Declive: 3116,46	r= 0,99965



### C. Precisão

**Tabela C1:** Resultados obtidos para as matrizes pertencem à gama baixa da frutose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, [%]	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	0,38	0,36	0,36	0,36	0,37	0,37	0,36	g/100 g	0,364	0,000	0,008	2,191	0,022	6,135
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,30	0,29	0,30	0,29	0,29	0,30	0,30	g/100 g	0,296	0,000	0,006	2,046	0,017	5,728
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite	0,59	0,60	0,60	0,60	0,59	0,59	0,59	g/100 g	0,593	0,000	0,006	0,932	0,015	2,609

**Tabela C2:** Resultados obtidos para as matrizes pertencem à gama alta da frutose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, [%]	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	5,14	5,06	5,10	5,05	5,15	5,13	5,05	g/100 g	5,097	0,002	0,044	0,872	0,124	2,441
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,74	2,72	2,71	2,68	2,73	2,65	2,73	g/100 g	2,708	0,001	0,033	1,213	0,092	3,397
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	12,43	12,43	12,46	12,41	12,44	12,43	12,50	g/100 g	12,444	0,001	0,030	0,244	0,085	0,684
Leite, produtos lácteos e derivados	logurte	3,00	3,01	2,96	2,96	3,01	3,00	2,97	g/100 g	2,986	0,001	0,024	0,799	0,067	2,236

**Tabela C3:** Resultados obtidos para as matrizes pertencem à gama baixa da glucose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, [%]	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	0,40	0,38	0,40	0,39	0,39	0,36	0,38	g/100 g	0,386	0,000	0,014	3,623	0,039	10,143
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,30	0,31	0,29	0,29	0,31	0,29	0,29	g/100 g	0,297	0,000	0,010	3,201	0,027	8,963
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite	0,93	0,95	0,94	0,94	0,95	0,95	0,95	g/100 g	0,944	0,000	0,008	0,833	0,022	2,333

**Tabela C4:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da glucose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	6,22	6,23	6,22	6,22	6,31	6,29	6,22	g/100 g	6,24	0,00	0,04	0,62	0,11	1,73
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	12,27	12,26	12,31	12,20	12,30	12,20	12,30	g/100 g	12,26	0,00	0,05	0,38	0,13	1,06
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,07	3,14	3,15	3,02	3,14	3,15	3,14	g/100 g	3,12	0,00	0,05	1,62	0,14	4,55
	logurte	4,78	4,83	4,76	4,81	4,77	4,82	4,82	g/100 g	4,80	0,00	0,03	0,58	0,08	1,63

**Tabela C5:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama baixa da maltose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	1,51	1,54	1,51	1,51	1,54	1,55	1,51	g/100 g	1,524	0,000	0,018	1,189	0,051	3,330
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,28	0,28	0,28	0,26	0,27	0,28	0,29	g/100 g	0,277	0,000	0,010	3,432	0,027	9,610
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite	0,57	0,57	0,56	0,56	0,56	0,58	0,58	g/100 g	0,569	0,000	0,009	1,582	0,025	4,431

**Tabela C6:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da maltose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	4,89	4,96	5,03	4,95	4,91	5,04	4,92	g/100 g	4,96	0,00	0,06	1,17	0,16	3,29
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	11,24	11,23	11,25	11,23	11,20	11,28	11,31	g/100 g	11,25	0,00	0,04	0,32	0,10	0,90
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,39	3,35	3,35	3,38	3,34	3,33	3,38	g/100 g	3,36	0,00	0,02	0,69	0,06	1,92
	logurte	2,41	2,42	2,35	2,37	2,40	2,48	2,36	g/100 g	2,40	0,00	0,04	1,86	0,12	5,20

**Tabela C7:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama baixa da sacarose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV, (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	0,38	0,37	0,38	0,37	0,38	0,38	0,37	g/100 g	0,376	0,000	0,005	1,423	0,015	3,984
Açúcares, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,30	0,30	0,30	0,29	0,29	0,30	0,30	g/100 g	0,297	0,000	0,005	1,642	0,014	4,598
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite	0,62	0,60	0,60	0,60	0,60	0,61	0,61	g/100 g	0,606	0,000	0,008	1,299	0,022	3,637

**Tabela C8:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da sacarose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV. (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade de relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	22,23	22,26	22,50	22,29	22,35	22,45	22,36	g/100 g	22,35	0,01	0,10	0,44	0,28	1,24
Açúcares, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	16,55	16,60	16,52	16,54	16,67	16,69	16,69	g/100 g	16,61	0,01	0,07	0,45	0,21	1,25
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,32	3,26	3,32	3,25	3,39	3,32	3,47	g/100 g	3,33	0,01	0,08	2,28	0,21	6,39
	Iogurte	6,34	6,38	6,33	6,34	6,39	6,35	6,36	g/100 g	6,36	0,00	0,02	0,35	0,06	0,98

**Tabela C9:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama baixa da lactose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV. (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade relativo
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho Béchamel	3,89	3,89	3,88	3,89	3,89	3,86	3,84	g/100 g	3,877	0,000	0,020	0,510	0,055	1,427
Açúcares, produtos açucarados e derivados	Gelatina	0,28	0,28	0,28	0,27	0,28	0,26	0,28	g/100 g	0,276	0,000	0,008	2,854	0,022	7,990
Leite, produtos lácteos e derivados	Iogurte	2,38	2,40	2,37	2,40	2,39	2,38	2,40	g/100 g	2,389	0,000	0,012	0,509	0,034	1,424

**Tabela C10:** Resultados obtidos para as matrizes pertencentes à gama alta da lactose em condições de repetibilidade

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Unidades	Média	Variância	Desvio padrão	CV. (%)	Limite de repetibilidade	Limite repetibilidade relativo
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha Maria	5,08	5,00	5,28	5,08	5,23	5,19	5,17	g/100 g	5,15	0,01	0,10	1,90	0,27	5,33
Açúcares, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto	13,57	13,52	13,51	13,63	13,70	13,60	13,69	g/100 g	13,60	0,01	0,08	0,56	0,21	1,56
Leite, produtos lácteos e derivados	FAPAS T25200 Milkshake powder	18,69	18,50	18,36	18,51	18,40	18,60	18,48	g/100 g	18,51	0,01	0,11	0,61	0,32	1,70
	Leite	4,88	4,94	4,84	4,86	4,94	4,89	4,91	g/100 g	4,89	0,00	0,04	0,78	0,11	2,19

**Tabela C11:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama baixa da frutose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
11-01-2022	Leite UHT	0,62	0,61	0,01	0,00	0,62	0,01	-0,01	0,01	1,15
12-01-2022	Leite UHT	0,61	0,60	0,01	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,74
13-01-2022	Leite UHT	0,62	0,61	0,01	0,00	0,62	0,00	0,00	0,01	1,14
17-01-2022	Leite UHT	0,61	0,59	0,02	0,00	0,60	0,01	-0,01	0,01	1,89
18-01-2022	Leite UHT	0,61	0,60	0,01	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,79
19-01-2022	Leite UHT	0,60	0,57	0,02	0,00	0,59	0,01	-0,01	0,02	2,78
25-01-2022	Molho Béchamel	0,38	0,36	0,02	0,00	0,37	0,01	-0,01	0,01	3,82
26-01-2022	Molho Béchamel	0,33	0,35	0,02	0,00	0,34	-0,01	0,01	0,01	3,80
01-02-2022	Molho Béchamel	0,37	0,37	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,53
02-02-2022	Molho Béchamel	0,37	0,36	0,02	0,00	0,37	0,01	-0,01	0,01	3,32
14-04-2022	Molho Béchamel	0,36	0,37	0,01	0,00	0,36	0,00	0,00	0,01	1,79
22-04-2022	Molho Béchamel	0,36	0,35	0,01	0,00	0,36	0,01	-0,01	0,01	1,99
19-01-2022	Gelatina	0,27	0,27	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
25-01-2022	Gelatina	0,28	0,29	0,01	0,00	0,29	-0,01	0,00	0,01	2,48
08-03-2022	Gelatina	0,29	0,28	0,01	0,00	0,28	0,01	-0,01	0,01	2,56
10-03-2022	Gelatina	0,28	0,30	0,03	0,00	0,29	-0,01	0,01	0,02	6,29
15-03-2022	Gelatina	0,28	0,29	0,01	0,00	0,28	0,00	0,00	0,01	2,48
21-03-2022	Gelatina	0,29	0,29	0,01	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	1,49

**Tabela C12:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama alta da frutose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	4,99	4,94	0,05	0,00	4,97	0,03	-0,02	0,04	0,71
11-01-2022	Bolacha maria	4,85	4,97	0,12	0,01	4,91	-0,06	0,06	0,08	1,73
12-01-2022	Bolacha maria	5,17	5,23	0,06	0,00	5,20	-0,03	0,03	0,04	0,82
13-01-2022	Bolacha maria	5,01	5,27	0,26	0,07	5,14	-0,13	0,13	0,19	3,62
17-01-2022	Bolacha maria	5,08	5,23	0,15	0,02	5,16	-0,08	0,08	0,11	2,10
18-01-2022	Bolacha maria	4,89	5,17	0,27	0,07	5,03	-0,14	0,14	0,19	3,84
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,74	2,72	0,02	0,00	2,73	0,01	-0,01	0,01	0,52
13-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,74	2,65	0,09	0,01	2,70	0,04	-0,04	0,06	2,34
17-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,71	2,63	0,08	0,01	2,67	0,04	-0,04	0,06	2,08
19-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,84	2,75	0,08	0,01	2,79	0,04	-0,04	0,06	2,13
25-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,66	2,79	0,13	0,02	2,72	-0,06	0,06	0,09	3,38
22-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,76	2,74	0,02	0,00	2,75	0,01	-0,01	0,01	0,51
13-01-2022	logurte	3,00	3,03	0,03	0,00	3,02	-0,01	0,02	0,02	0,70
17-01-2022	logurte	3,06	3,05	0,01	0,00	3,06	0,00	0,00	0,00	0,16
18-01-2022	logurte	3,10	3,09	0,01	0,00	3,09	0,00	0,00	0,01	0,21
19-01-2022	logurte	3,05	3,12	0,07	0,00	3,08	-0,03	0,03	0,05	1,59
25-01-2022	logurte	3,07	3,12	0,05	0,00	3,10	-0,02	0,02	0,04	1,14
26-01-2022	logurte	2,99	3,06	0,07	0,01	3,03	-0,04	0,04	0,05	1,75
08-03-2022	Chocolate	7,08	6,70	0,38	0,14	6,89	0,19	-0,19	0,27	3,90
10-03-2022	Chocolate	6,50	6,25	0,25	0,06	6,37	0,12	-0,12	0,17	2,72
15-03-2022	Chocolate	7,64	7,43	0,21	0,04	7,53	0,10	-0,10	0,15	1,97
21-03-2022	Chocolate	7,38	7,23	0,15	0,02	7,31	0,08	-0,08	0,11	1,48
24-03-2022	Chocolate	6,93	7,44	0,52	0,27	7,19	-0,26	0,26	0,37	5,11
07-04-2022	Chocolate	6,68	7,11	0,44	0,19	6,89	-0,22	0,22	0,31	4,47

**Tabela C13:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama baixa da glucose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
12-01-2022	Leite UHT	0,64	0,63	0,01	0,00	0,64	0,01	-0,01	0,01	1,11
13-01-2022	Leite UHT	0,66	0,65	0,01	0,00	0,66	0,01	-0,01	0,01	1,08
17-01-2022	Leite UHT	0,63	0,62	0,01	0,00	0,63	0,01	-0,01	0,01	1,13
18-01-2022	Leite UHT	0,66	0,65	0,01	0,00	0,66	0,01	-0,01	0,01	1,08
19-01-2022	Leite UHT	0,60	0,62	0,02	0,00	0,61	-0,01	0,01	0,01	2,32
14-04-2022	Leite UHT	0,60	0,59	0,01	0,00	0,60	0,01	-0,01	0,01	1,19
25-01-2022	lho Bécha	0,40	0,38	0,02	0,00	0,39	0,01	-0,01	0,01	3,63
26-01-2022	lho Bécha	0,34	0,37	0,03	0,00	0,36	-0,02	0,02	0,02	5,98
01-02-2022	lho Bécha	0,36	0,36	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
02-02-2022	lho Bécha	0,38	0,38	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
08-03-2022	lho Bécha	0,71	0,70	0,01	0,00	0,71	0,01	-0,01	0,01	1,00
14-04-2022	lho Bécha	0,74	0,73	0,01	0,00	0,74	0,01	-0,01	0,01	0,96
19-01-2022	Gelatina	0,28	0,28	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00
25-01-2022	Gelatina	0,28	0,30	0,02	0,00	0,29	-0,01	0,01	0,01	4,88
08-03-2022	Gelatina	0,30	0,27	0,03	0,00	0,29	0,02	-0,02	0,02	7,44
10-03-2022	Gelatina	0,28	0,29	0,01	0,00	0,29	-0,01	0,00	0,01	2,48
15-03-2022	Gelatina	0,27	0,27	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
21-03-2022	Gelatina	0,29	0,29	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabela C14:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama alta da glucose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	6,22	6,15	0,07	0,00	6,19	0,03	-0,04	0,05	0,80
11-01-2022	Bolacha maria	5,37	5,39	0,02	0,00	5,38	-0,01	0,01	0,01	0,26
12-01-2022	Bolacha maria	5,42	5,48	0,06	0,00	5,45	-0,03	0,03	0,04	0,78
13-01-2022	Bolacha maria	5,29	5,53	0,24	0,06	5,41	-0,12	0,12	0,17	3,14
17-01-2022	Bolacha maria	5,33	5,44	0,11	0,01	5,39	-0,05	0,06	0,08	1,44
18-01-2022	Bolacha maria	5,13	5,44	0,31	0,10	5,29	-0,16	0,16	0,22	4,15
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,07	3,14	0,07	0,00	3,11	-0,04	0,04	0,05	1,59
13-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,20	3,17	0,03	0,00	3,19	0,02	-0,02	0,02	0,67
17-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,21	3,22	0,01	0,00	3,22	0,00	0,01	0,01	0,22
19-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,23	3,15	0,08	0,01	3,19	0,04	-0,04	0,06	1,77
25-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,10	3,27	0,17	0,03	3,19	-0,09	0,09	0,12	3,77
22-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,91	3,07	0,16	0,03	2,99	-0,08	0,08	0,11	3,78
13-01-2022	logurte	4,78	4,83	0,05	0,00	4,81	-0,02	0,03	0,04	0,74
17-01-2022	logurte	4,89	4,89	0,00	0,00	4,89	0,00	0,00	0,00	0,00
18-01-2022	logurte	4,96	4,95	0,01	0,00	4,96	0,00	0,00	0,01	0,14
19-01-2022	logurte	4,91	4,95	0,04	0,00	4,93	-0,02	0,02	0,03	0,57
25-01-2022	logurte	4,89	4,93	0,04	0,00	4,91	-0,02	0,02	0,03	0,58
26-01-2022	logurte	4,83	4,87	0,04	0,00	4,85	-0,02	0,02	0,03	0,58
08-03-2022	Chocolate preto	7,37	6,99	0,38	0,14	7,18	0,19	-0,19	0,27	3,74
10-03-2022	Chocolate preto	6,78	6,59	0,19	0,04	6,69	0,09	-0,10	0,13	2,01
15-03-2022	Chocolate preto	7,31	7,00	0,31	0,10	7,16	0,16	-0,15	0,22	3,06
21-03-2022	Chocolate preto	7,29	7,04	0,25	0,06	7,17	0,13	-0,13	0,18	2,47
24-03-2022	Chocolate preto	6,82	7,34	0,52	0,27	7,08	-0,26	0,26	0,37	5,19
07-04-2022	Chocolate preto	6,45	6,95	0,50	0,25	6,70	-0,25	0,25	0,35	5,28

**Tabela C15:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama baixa da galactose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
11-01-2022	Leite UHT	0,65	0,65	0,00	0,00	0,65	0,00	0,00	0,00	0,14
12-01-2022	Leite UHT	0,73	0,72	0,01	0,00	0,72	0,00	0,00	0,01	0,76
13-01-2022	Leite UHT	0,85	0,83	0,02	0,00	0,84	0,01	-0,01	0,01	1,44
17-01-2022	Leite UHT	0,81	0,80	0,01	0,00	0,80	0,01	-0,01	0,01	1,25
18-01-2022	Leite UHT	1,05	1,04	0,01	0,00	1,04	0,01	-0,01	0,01	0,99
19-01-2022	Leite UHT	1,05	1,01	0,04	0,00	1,03	0,02	-0,02	0,03	2,84
19-01-2022	Gelatina	0,30	0,30	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
25-01-2022	Gelatina	0,26	0,24	0,02	0,00	0,25	0,01	-0,01	0,01	5,66
08-03-2022	Gelatina	0,27	0,27	0,01	0,00	0,27	0,00	0,00	0,01	1,89
10-03-2022	Gelatina	0,30	0,29	0,01	0,00	0,30	0,00	0,00	0,01	1,85
15-03-2022	Gelatina	0,25	0,24	0,01	0,00	0,25	0,00	0,00	0,01	2,39
21-03-2022	Gelatina	0,26	0,27	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	1,17

**Tabela C16:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama intermédia da galactose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,85	2,75	0,10	0,01	2,80	0,05	-0,05	0,07	2,53
14-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	2,79	2,77	0,02	0,00	2,78	0,01	-0,01	0,01	0,51
13-01-2022	logurte	4,68	4,76	0,08	0,01	4,72	-0,04	0,04	0,06	1,20
17-01-2022	logurte	4,85	4,83	0,02	0,00	4,84	0,01	-0,01	0,01	0,27
18-01-2022	logurte	4,94	4,83	0,11	0,01	4,89	0,06	-0,05	0,08	1,59
19-01-2022	logurte	4,96	4,97	0,01	0,00	4,96	-0,01	0,01	0,01	0,19
25-01-2022	logurte	4,72	4,76	0,04	0,00	4,74	-0,02	0,02	0,03	0,57
26-01-2022	logurte	4,61	4,52	0,10	0,01	4,57	0,05	-0,05	0,07	1,53
25-01-2022	Molho Béchamel	1,77	1,74	0,02	0,00	1,75	0,01	-0,01	0,02	0,94
26-01-2022	Molho Béchamel	2,24	2,23	0,01	0,00	2,24	0,00	0,00	0,01	0,30
01-02-2022	Molho Béchamel	2,44	2,43	0,01	0,00	2,43	0,01	-0,01	0,01	0,39
02-02-2022	Molho Béchamel	2,55	2,52	0,02	0,00	2,53	0,01	-0,01	0,02	0,59

**Tabela C17:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama alta da galactose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{X}$	A- $\bar{X}$	B- $\bar{X}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	4,97	4,95	0,02	0,00	4,96	0,01	-0,01	0,02	0,31
11-01-2022	Bolacha maria	4,95	4,76	0,19	0,04	4,86	0,10	-0,10	0,14	2,84
12-01-2022	Bolacha maria	5,43	5,32	0,11	0,01	5,37	0,06	-0,06	0,08	1,49
13-01-2022	Bolacha maria	5,69	5,89	0,20	0,04	5,79	-0,10	0,10	0,14	2,41
17-01-2022	Bolacha maria	5,77	5,72	0,05	0,00	5,74	0,02	-0,02	0,03	0,59
18-01-2022	Bolacha maria	5,71	6,04	0,32	0,10	5,87	-0,16	0,16	0,23	3,89
08-03-2022	Chocolate preto	7,58	7,38	0,20	0,04	7,48	0,10	-0,10	0,14	1,88
10-03-2022	Chocolate preto	7,43	7,15	0,28	0,08	7,29	0,14	-0,14	0,20	2,69
15-03-2022	Chocolate preto	7,25	7,11	0,14	0,02	7,18	0,07	-0,07	0,10	1,33
24-03-2022	Chocolate preto	6,75	7,34	0,59	0,35	7,05	-0,30	0,30	0,42	5,92

**Tabela C18:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama baixa da maltose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
11-01-2022	Leite UHT	0,58	0,58	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
12-01-2022	Leite UHT	0,59	0,59	0,00	0,00	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
13-01-2022	Leite UHT	0,60	0,59	0,01	0,00	0,60	0,01	-0,01	0,01	1,19
17-01-2022	Leite UHT	0,58	0,56	0,02	0,00	0,57	0,01	-0,01	0,01	2,48
18-01-2022	Leite UHT	0,57	0,56	0,01	0,00	0,57	0,01	0,00	0,01	1,25
14-04-2022	Leite UHT	0,55	0,55	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,41	3,39	0,02	0,00	3,40	0,01	-0,01	0,01	0,42
25-01-2022	Molho Béchamel	1,51	1,54	0,03	0,00	1,53	-0,01	0,02	0,02	1,39
26-01-2022	Molho Béchamel	1,45	1,48	0,03	0,00	1,47	-0,01	0,02	0,02	1,45
25-01-2022	Molho Béchamel	1,50	1,48	0,02	0,00	1,49	0,01	-0,01	0,01	0,95
26-01-2022	Molho Béchamel	1,65	1,57	0,08	0,01	1,61	0,04	-0,04	0,06	3,51
01-02-2022	Molho Béchamel	1,62	1,63	0,01	0,00	1,63	0,00	0,00	0,01	0,44
02-02-2022	Molho Béchamel	1,65	1,66	0,01	0,00	1,66	0,00	0,01	0,01	0,43
14-04-2022	Gelatina	0,30	0,31	0,01	0,00	0,31	-0,01	0,01	0,01	2,32
22-04-2022	Gelatina	0,29	0,31	0,02	0,00	0,30	-0,01	0,01	0,01	4,71
08-03-2022	Gelatina	0,27	0,27	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
10-03-2022	Gelatina	0,29	0,29	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
15-03-2022	Gelatina	0,30	0,30	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00
14-04-2022	Gelatina	0,28	0,28	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00

**Tabela C19:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama alta da maltose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha Maria	4,89	4,78	0,11	0,01	4,84	0,05	-0,05	0,08	1,61
11-01-2022	Bolacha Maria	4,64	4,74	0,10	0,01	4,69	-0,05	0,05	0,07	1,51
12-01-2022	Bolacha Maria	5,03	5,18	0,15	0,02	5,11	-0,08	0,07	0,11	2,08
13-01-2022	Bolacha Maria	4,79	5,20	0,41	0,17	5,00	-0,21	0,21	0,29	5,80
17-01-2022	Bolacha Maria	4,80	4,94	0,14	0,02	4,87	-0,07	0,07	0,10	2,03
18-01-2022	Bolacha Maria	4,61	4,92	0,31	0,10	4,77	-0,16	0,15	0,22	4,60
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,41	3,39	0,02	0,00	3,40	0,01	-0,01	0,01	0,42
13-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,25	3,23	0,02	0,00	3,24	0,01	-0,01	0,01	0,44
17-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,35	3,31	0,04	0,00	3,33	0,02	-0,02	0,03	0,85
19-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,29	3,21	0,08	0,01	3,25	0,04	-0,04	0,06	1,74
25-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,25	3,21	0,04	0,00	3,23	0,02	-0,02	0,03	0,88
22-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,19	3,20	0,01	0,00	3,20	-0,01	0,00	0,01	0,22
13-01-2022	logurte	2,41	2,42	0,01	0,00	2,42	0,00	0,00	0,01	0,29
17-01-2022	logurte	2,42	2,40	0,02	0,00	2,41	0,01	-0,01	0,01	0,59
18-01-2022	logurte	2,41	2,35	0,06	0,00	2,38	0,03	-0,03	0,04	1,78
19-01-2022	logurte	2,28	2,37	0,09	0,01	2,33	-0,05	0,04	0,06	2,74
25-01-2022	logurte	2,28	2,34	0,06	0,00	2,31	-0,03	0,03	0,04	1,84
26-01-2022	logurte	2,29	2,38	0,09	0,01	2,34	-0,04	0,04	0,06	2,73
08-03-2022	Chocolate preto	7,58	7,86	0,28	0,08	7,72	-0,14	0,14	0,20	2,56
10-03-2022	Chocolate	8,17	7,99	0,18	0,03	8,08	0,09	-0,09	0,13	1,58
21-03-2022	Chocolate preto	7,25	6,98	0,27	0,07	7,12	0,14	-0,14	0,19	2,68
24-03-2022	Chocolate preto	6,56	7,05	0,49	0,24	6,81	-0,25	0,25	0,35	5,09
07-04-2022	Chocolate preto	6,18	6,56	0,38	0,14	6,37	-0,19	0,19	0,27	4,22

**Tabela C20:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama baixa da sacarose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
11-01-2022	Leite UHT	0,62	0,62	0,00	0,00	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00
12-01-2022	Leite UHT	0,62	0,61	0,01	0,00	0,62	0,01	-0,01	0,01	1,15
13-01-2022	Leite UHT	0,63	0,63	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00
17-01-2022	Leite UHT	0,61	0,59	0,02	0,00	0,60	0,01	-0,01	0,01	2,36
18-01-2022	Leite UHT	0,62	0,60	0,02	0,00	0,61	0,01	-0,01	0,01	2,32
14-04-2022	Leite UHT	0,60	0,60	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00
25-01-2022	Molho Béchamel	0,38	0,37	0,01	0,00	0,38	0,01	-0,01	0,01	1,89
26-01-2022	Molho Béchamel	0,34	0,37	0,03	0,00	0,36	-0,02	0,02	0,02	5,98
01-02-2022	Molho Béchamel	0,38	0,37	0,01	0,00	0,38	0,01	-0,01	0,01	1,89
02-02-2022	Molho Béchamel	0,39	0,37	0,02	0,00	0,38	0,01	-0,01	0,01	3,72
14-04-2022	Molho Béchamel	0,37	0,39	0,02	0,00	0,38	-0,01	0,01	0,01	3,72
22-04-2022	Molho Béchamel	0,38	0,38	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00	0,00	0,00
19-01-2022	Gelatina	0,27	0,27	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00
25-01-2022	Gelatina	0,28	0,29	0,01	0,00	0,29	-0,01	0,00	0,01	2,48
08-03-2022	Gelatina	0,30	0,27	0,03	0,00	0,29	0,02	-0,02	0,02	7,44
10-03-2022	Gelatina	0,29	0,29	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
15-03-2022	Gelatina	0,27	0,28	0,01	0,00	0,28	-0,01	0,01	0,01	2,57
21-03-2022	Gelatina	0,28	0,29	0,01	0,00	0,29	-0,01	0,00	0,01	2,48

**Tabela C21:** Estudo da precisão em condições de precisão intermédia da gama alta da sacarose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	22,23	22,05	0,18	0,03	22,14	0,09	-0,09	0,13	0,57
11-01-2022	Bolacha maria	22,96	23,07	0,11	0,01	23,02	-0,05	0,05	0,08	0,34
12-01-2022	Bolacha maria	23,48	23,68	0,20	0,04	23,58	-0,10	0,10	0,14	0,60
13-01-2022	Bolacha maria	23,41	23,73	0,32	0,10	23,57	-0,16	0,16	0,23	0,96
17-01-2022	Bolacha maria	23,31	23,46	0,15	0,02	23,39	-0,07	0,08	0,11	0,45
18-01-2022	Bolacha maria	23,22	23,71	0,49	0,24	23,47	-0,25	0,25	0,35	1,48
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,32	3,26	0,06	0,00	3,29	0,03	-0,03	0,04	1,29
13-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,39	3,14	0,25	0,06	3,27	0,13	-0,13	0,18	5,41
17-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,25	3,15	0,10	0,01	3,20	0,05	-0,05	0,07	2,21
19-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,47	3,17	0,30	0,09	3,32	0,15	-0,15	0,21	6,39
14-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,69	3,44	0,25	0,06	3,57	0,13	-0,13	0,18	4,96
22-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,52	3,25	0,27	0,07	3,39	0,14	-0,14	0,19	5,64
13-01-2022	logurte	6,34	6,38	0,04	0,00	6,36	-0,02	0,02	0,03	0,44
17-01-2022	logurte	6,33	6,32	0,01	0,00	6,33	0,00	0,00	0,01	0,11
18-01-2022	logurte	5,96	5,95	0,01	0,00	5,96	0,00	0,00	0,01	0,12
19-01-2022	logurte	5,79	5,92	0,13	0,02	5,86	-0,07	0,06	0,09	1,57
25-01-2022	logurte	5,69	5,71	0,02	0,00	5,70	-0,01	0,01	0,01	0,25
26-01-2022	logurte	5,50	5,57	0,07	0,00	5,54	-0,04	0,04	0,05	0,89
08-03-2022	Chocolate preto	9,48	9,28	0,20	0,04	9,38	0,10	-0,10	0,14	1,51
10-03-2022	Chocolate preto	8,64	8,41	0,23	0,05	8,53	0,12	-0,12	0,16	1,91
15-03-2022	Chocolate preto	10,22	9,80	0,42	0,18	10,01	0,21	-0,21	0,30	2,97
21-03-2022	Chocolate preto	9,82	9,63	0,19	0,04	9,73	0,09	-0,10	0,13	1,38
24-03-2022	Chocolate preto	9,34	9,85	0,51	0,26	9,60	-0,25	0,26	0,36	3,76
07-04-2022	Chocolate preto	9,03	9,60	0,57	0,32	9,32	-0,29	0,29	0,40	4,33

**Tabela C22:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama baixa da lactose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha Maria	5,08	5,00	0,08	0,01	5,04	0,04	-0,04	0,06	1,12
13-01-2022	logurte	2,38	2,40	0,02	0,00	2,39	-0,01	0,01	0,01	0,59
17-01-2022	logurte	2,44	2,41	0,03	0,00	2,43	0,02	-0,01	0,02	0,87
18-01-2022	logurte	2,39	2,37	0,02	0,00	2,38	0,01	-0,01	0,01	0,59
19-01-2022	logurte	2,34	2,43	0,09	0,01	2,39	-0,04	0,05	0,06	2,67
25-01-2022	logurte	2,41	2,45	0,04	0,00	2,43	-0,02	0,02	0,03	1,16
26-01-2022	logurte	2,29	2,34	0,05	0,00	2,32	-0,02	0,02	0,04	1,53
25-01-2022	Molho Béchamel	3,89	3,89	0,00	0,00	3,89	0,00	0,00	0,00	0,00
26-01-2022	Molho Béchamel	3,73	3,71	0,02	0,00	3,72	0,01	-0,01	0,01	0,38
01-02-2022	Molho Béchamel	3,81	3,77	0,04	0,00	3,79	0,02	-0,02	0,03	0,75
14-04-2022	Molho Béchamel	2,60	2,63	0,03	0,00	2,62	-0,02	0,01	0,02	0,81
22-04-2022	Molho Béchamel	2,64	2,68	0,04	0,00	2,66	-0,02	0,02	0,03	1,06
19-01-2022	Gelatina	0,25	0,26	0,01	0,00	0,26	-0,01	0,01	0,01	2,77
25-01-2022	Gelatina	0,28	0,25	0,03	0,00	0,27	0,02	-0,02	0,02	8,00
10-03-2022	Gelatina	0,26	0,24	0,02	0,00	0,25	0,01	-0,01	0,01	5,66
15-03-2022	Gelatina	0,26	0,26	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00
21-03-2022	Gelatina	0,27	0,29	0,02	0,00	0,28	-0,01	0,01	0,01	5,05
14-04-2022	Gelatina	0,28	0,27	0,01	0,00	0,28	0,01	-0,01	0,01	2,57

**Tabela C23:** Estudo da precisão em condições de precisão intermedia da gama alta da lactose

Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	A-B  <sup>2</sup>	$\bar{x}$	A- $\bar{x}$	B- $\bar{x}$	Desvio padrão	CV (%)
10-01-2022	Bolacha maria	22,23	22,05	0,18	0,03	22,14	0,09	-0,09	0,13	0,57
11-01-2022	Bolacha maria	22,96	23,07	0,11	0,01	23,02	-0,05	0,05	0,08	0,34
12-01-2022	Bolacha maria	23,48	23,68	0,20	0,04	23,58	-0,10	0,10	0,14	0,60
13-01-2022	Bolacha maria	23,41	23,73	0,32	0,10	23,57	-0,16	0,16	0,23	0,96
17-01-2022	Bolacha maria	23,31	23,46	0,15	0,02	23,39	-0,07	0,08	0,11	0,45
18-01-2022	Bolacha maria	23,22	23,71	0,49	0,24	23,47	-0,25	0,25	0,35	1,48
12-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,32	3,26	0,06	0,00	3,29	0,03	-0,03	0,04	1,29
13-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,39	3,14	0,25	0,06	3,27	0,13	-0,13	0,18	5,41
17-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,25	3,15	0,10	0,01	3,20	0,05	-0,05	0,07	2,21
19-01-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,47	3,17	0,30	0,09	3,32	0,15	-0,15	0,21	6,39
14-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,69	3,44	0,25	0,06	3,57	0,13	-0,13	0,18	4,96
22-04-2022	FAPAS T25200 Milkshake powder	3,52	3,25	0,27	0,07	3,39	0,14	-0,14	0,19	5,64
13-01-2022	logurte	6,34	6,38	0,04	0,00	6,36	-0,02	0,02	0,03	0,44
17-01-2022	logurte	6,33	6,32	0,01	0,00	6,33	0,00	0,00	0,01	0,11
18-01-2022	logurte	5,96	5,95	0,01	0,00	5,96	0,00	0,00	0,01	0,12
19-01-2022	logurte	5,79	5,92	0,13	0,02	5,86	-0,07	0,06	0,09	1,57
25-01-2022	logurte	5,69	5,71	0,02	0,00	5,70	-0,01	0,01	0,01	0,25
26-01-2022	logurte	5,50	5,57	0,07	0,00	5,54	-0,04	0,04	0,05	0,89
08-03-2022	Chocolate preto	9,48	9,28	0,20	0,04	9,38	0,10	-0,10	0,14	1,51
10-03-2022	Chocolate preto	8,64	8,41	0,23	0,05	8,53	0,12	-0,12	0,16	1,91
15-03-2022	Chocolate preto	10,22	9,80	0,42	0,18	10,01	0,21	-0,21	0,30	2,97
21-03-2022	Chocolate preto	9,82	9,63	0,19	0,04	9,73	0,09	-0,10	0,13	1,38
24-03-022	Chocolate preto	9,34	9,85	0,51	0,26	9,60	-0,25	0,26	0,36	3,76
07-04-2022	Chocolate preto	9,03	9,60	0,57	0,32	9,32	-0,29	0,29	0,40	4,33

#### D. Valores de testes estatísticos

**Tabela D1:** Valores críticos para o teste de Grubbs, com 99 % de confiança

População	Valor crítico a 1%
3	1,155
4	1,436
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

**Tabela D2:** Valores críticos para o teste C de Cochran, com 95 % de confiança

n° matrizes	valores críticos para teste C de Cochran								
	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

### E. Material de Referência certificado FAPAS T25200 Mikshake powder

E1: Relatório do material de referência certificado FAPAS T25200 Milkshake powder:



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	T25200QC
Matrix	Milkshake Powder
Weight / Volume of Contents	50g

Analyte	Assigned Value, $X_a$	Range for $ z  \leq 2$	Units	No. of data points producing $X_a$
Fructose	2.85	2.46 - 3.24	g/100g	55
Glucose	3.17	2.75 - 3.60	g/100g	55
Lactose	19.1	17.3 - 20.8	g/100g	55
Maltose	3.41	2.95 - 3.86	g/100g	52
Sucrose	3.41	2.95 - 3.86	g/100g	55
Galactose	2.66	2.29 - 3.02	g/100g	47

E2: Dados do relatório do FAPAS relativos ao Milkshake powder para o cálculo da justeza

analyte	data points, $n$	assigned value, $x_a$ g/100g	uncertainty, $u$	standard deviation for proficiency, $\sigma_p$
Fructose	55	2.85	0.04	ffp 0.195
Glucose	55	3.17	0.04	ffp 0.213
Lactose	55	19.1	0.2	ffp 0.873
Maltose	52	3.41	0.05	ffp 0.227
Sucrose	55	3.41	0.08	ffp 0.227
Galactose	47	2.66	0.03	ffp 0.183

ffp = fitness-for-purpose criteria

### F. Cálculos auxiliares

F1: Cálculo do coeficiente de correlação

O coeficiente de correlação da figura 11 é calculado utilizando os valores da tabela F1:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum((x_i - \bar{x})^2)][\sum((y_i - \bar{y})^2)]}} = 0,99998$$

**Tabela F1:** Valores auxiliares necessários para o cálculo do coeficiente de correlação da figura 11

	Concentração (g/L)	Altura (nRIU)	$(x_i - \bar{x})$	$(y_i - \bar{y})$
	0,09	178,10	5,59	12843,94
	0,23	527,24	5,45	12494,80
	0,90	1966,57	4,78	11055,47
	2,34	5343,12	3,34	7678,92
	6,84	15622,85	1,16	2600,81
	11,34	25951,71	5,66	12929,67
	18,00	41564,70	12,32	28542,66
média	5,68	13022,04	-	-
somatório	-	-	38,30	88146,28
somatório <sup>2</sup>	-	-	1466,67	7769766632,69

## F2. Determinação da incerteza associada à concentração dos padrões de calibração

Para determinação da incerteza associada ao cálculo da concentração da solução mãe de calibração (padrão de 18,00 g/L) são identificadas e quantificadas as grandezas que contribuem para o seu cálculo. Assim, tomando a galactose como exemplo, foram pesadas 1,8157 g do reagente D-(+)-Galactose, cuja pureza é 99,0 % para um balão volumétrico de 100,0 mL. Assim, a concentração da solução mãe é de 17,98 g/L.

A incerteza da pureza é indicada no certificado do reagente, sendo o seu valor de 0,01. De forma a ser convertida numa incerteza padrão, consideramos que segue uma distribuição retangular, ou seja,  $U_{pureza} = \frac{0,1}{\sqrt{3}} = 0,01$ .

Relativamente à incerteza associada à massa da toma, como referido anteriormente, tem de ser considerada a e.m.a. da balança na zona da tara e na zona de trabalho, correspondendo a 0,002 e 0,001 (respetivamente). Para obter a incerteza padrão ambas as incertezas têm de ser convertidas na incerteza padrão correspondente e combinadas:

$$U_{massa} = \sqrt{\left(\frac{0,002}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,001.$$

Para determinação da incerteza associada ao balão volumétrico utilizado é desprezada a incerteza associada ao acerto do menisco e da variação da temperatura. A tolerância do balão volumétrico é indicada pelo fabricante, tendo um valor de 0,1 para o balão de 100,0 mL. Para converter numa incerteza padrão consideramos que segue uma distribuição triangular, ou seja,  $U_{volume} = \frac{0,1}{\sqrt{6}} = 0,04$ .

Combinando todas as grandezas que contribuem para a incerteza global desta solução:

$$u_{sol.fort.} = 17,98 \times \sqrt{\left(\frac{0,01}{0,99}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1,8}\right)^2 + \left(\frac{0,04}{100,0}\right)^2} = 0,59$$

A incerteza expandida desta solução é:  $U = 2 \times 0,59 = 1,18 \text{ g/L}$

Para obter a incerteza de cada padrão de calibração também é seguida a metodologia passo-a-passo, considerando como grandezas a concentração da solução mãe, o volume retirado da solução mãe e o volume final do padrão. A incerteza da solução mãe é a referida anteriormente, a incerteza do balão volumétrico e da micropipeta utilizada para transferir o volume retirado da solução mãe são indicados nos respectivos certificados dos fabricantes. Assim:

$$u_{padr\tilde{a}o\ 0,09} = 0,09 \times \sqrt{\left(\frac{0,59}{17,98}\right)^2 + \left(\frac{0,00051}{0,1}\right)^2 + \left(\frac{0,1}{100,0}\right)^2} = 0,0030$$

A incerteza expandida desta solução é:  $U = 2 \times 0,0030 = 0,006 \text{ g/L}$

A incerteza dos restantes padrões é realizada da mesma forma, alterando o volume final do balão e o volume transferido da solução mãe.