

Joana Raquel Simões Brito

Perfil de ácidos gordos nos alimentos
Validação de um método analítico



Joana Raquel Simões Brito

Perfil de ácidos gordos nos alimentos

Validação de um método analítico

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



• U • C • 2014

Joana Raquel Simões Brito

**PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NOS
ALIMENTOS**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO
ANALÍTICO**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, área
de especialização em Controle Químico da Qualidade e Ambiente

Professor Doutor Jorge Costa Pereira

Doutor Pedro Pato

Junho 2014

Universidade de Coimbra

“Pões quanto és no mínimo que fazes”

(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Ao longo do nosso percurso académico, são muitas as pessoas que nos marcam quer pelos conhecimentos que nos transmitem, quer pelas amizades que construímos ou até mesmo pelas lições de vida adquiridas, e é a estas pessoas que quero agradecer agora no fim do meu percurso académico.

É com enorme prazer que vou agradecer a todas as pessoas que tornaram possível o desenvolvimento e conclusão da minha tese de Mestrado, porque sem elas não teria conseguido desenvolver este projecto que foi fruto da colaboração e empenho de pessoas do Departamento de Química e da empresa Controlvet.

Ao Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira por me ter recebido de braços abertos na orientação deste trabalho, pelos ensinamentos científicos que me transmitiu, pelo apoio ajuda e disponibilidade e por me ter dado a força e coragem necessária na luta dos meus objectivos.

Ao Doutor Pedro Pato, a título de orientador do laboratório de Química da ControlVet, por me ter recebido nas instalações deste laboratório e ter tornado possível o desenvolvimento deste trabalho, por toda a ajuda e disponibilidade e também por todas as suas palavras de ânimo e força que me soube dizer em todas as situações oportunas.

À Engenheira Márcia Cabral, responsável pela cromatografia na ControlVet, pela confiança que sempre depositou em mim, e pela alegria que transmite a todas as pessoas com quem trabalha.

A todas a restante equipa da Controlvet, que sempre me tratou bem e sempre estiveram disponíveis para todas as minhas dúvidas e questões, em especial às técnicas: Ana Lúcia Prata, Carla Oliveira, Joana Lopes e Sandra Ferraz.

Aos meus colegas de curso, em especial à Joana Pragana, Teresa Valada, Filipa Pires, Ângela Varela, Diana Freitas, Filipa Correia, Cláudia Duarte e Joana Virgíneo, que de uma forma ou outra me marcaram e ajudaram neste crescimento. Pelos risos e lágrimas, pelas lutas que fomos vencendo e pelos grandes momentos que levaremos para a vida.

Por último, mas não menos importante, um grande obrigado aos meus pais, por toda a educação, ajuda, e sacrifícios que fizeram para eu poder chegar aqui, e também ao meu namorado por todo o carinho e paciência que teve para comigo e grande amizade.

E agradeço a ti COIMBRA, por teres sido o palco desta parte da minha vida...

Objectivos

O tema de partida do projeto laboratorial desenvolvido na empresa Controlvet, para a realização da tese de Mestrado teve como objectivo, desenvolver e validar um método interno de quantificação de gordura total em alimentos, e do seu perfil de ácidos gordos em GC-FID.

O laboratório de química apresentava uma grande dificuldade com o método de extracção semicontínua de Soxhlet, em manter as amostras durante 6h num refluxo de extracção contínua, com uma mistura de éter de petróleo, isto porque é necessário estar sempre a encher a coluna de extracção, para a amostra não secar e também porque é um método muito demorado e “tempo é dinheiro”.

A validação de outro método mais rápido, com a possibilidade de reduzir erros grosseiros e mais preciso, seria útil na determinação de gordura total e do seu perfil de ácidos gordos em amostras alimentares.

Resumo

Tem existido, cada vez mais, a necessidade de minimizar tempo, gastos e extensão dos ensaios laboratoriais em laboratórios de análises químicas, e no laboratório de segurança alimentar-Controlvet, não é exceção.

Esta dissertação foca-se numa tentativa de junção de dois métodos que a empresa utiliza em separado: uma para obtenção de gordura total, através do método de soxhlet e outro que utiliza essa gordura para quantificar o perfil de ácidos gordos utilizando a instrumentação analítica de cromatografia gasosa com um detector de ionização em chama.

Fundamentalmente este estudo foi baseado num método da AOAC que nos permite obter a percentagem total de gorduras e o perfil de ácidos gordos de uma só vez utilizando o GC-FID.

Palavras chave

Validação, acreditação, ácidos gordos, perfil ácidos gordos, GC, estatística, normas, alimentação.

Abstract

It is noticeable that there is a need to minimize time, expense and lab trials within chemical labs and in the food control labs, Controlvet is not an exception.

This focus in an attempt to join two methods that this laboratory has been used separately, one in order to obtain total fat content through the soxhelt method and the other that uses that fat content to quantify the fat acids profile using an Chromatographic analyses with a heated ionized detector.

This study was based using the AOAC method, which allows us to obtain a percentage of total fats and its profile in one test only, using the GC-FID.

Keywords

This research is based in a set of relevant issues to its development and comprehension. Its those words: Validation, accreditation, fat acids, fat acids profile, GC, statistics, norms and food.

Preâmbulo

Esta dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos aos quais foram acrescentados alguns anexos onde consta alguma informação adicional.

No primeiro capítulo, introdução, faz-se uma referência à empresa Control-Vet - Segurança Alimentar que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho e também às boas práticas de um laboratório de segurança alimentar.

No capítulo seguinte, fundamentação, compilou-se, em forma de resumo sistemático, a informação teórica subjacente a este estudo: desde uma breve revisão relacionada com os ácidos gordos, os métodos analíticos utilizados, indo culminar com a validação dos mesmos.

No terceiro capítulo, sistematizou-se a informação mais relevante relacionada com a parte experimental deste trabalho, nomeadamente o que se refere ao material e métodos utilizados bem como alguns dos procedimentos utilizados no tratamento e análise de resultados.

No quarto capítulo, estão descritos e sistematizadas as informações mais relevantes relacionadas com os resultados obtidos experimentalmente, incluindo alguns comentários pertinentes.

Por fim no capítulo cinco encontra-se a conclusão de todo este estudo e projecto laboratorial.

No sentido de simplificar o tratamento da informação e sua transferência entre as ferramentas de cálculo (folha de cálculo e programa Octave) para o texto foi adoptada a notação padrão Americana para a representação dos valores numéricos em que o separador decimal foi substituído pelo ponto.

Nomenclature

- $\%CV$ - coeficiente de variação (sob a forma de valor percentual)
- $\%RI$ - taxa de recuperação (do Inglês, Recovery index)
- $\%RSD$ - desvio padrão relativo (sob a forma percentual)
- $\%TAG$ - fracção total de ácidos gordos (em percentagem)
- α - nível de significância ou de diferença significativa (traduz a probabilidade de erro tipo I - rejeição abusiva)
- \bar{x} - valor da abcissa do centróide da curva de calibração
- \bar{y} - valor da ordenada do centróide da curva de calibração
- \bar{Y}_A - valor médio obtido para o sinal instrumental referente à amostra com M réplicas de amostra
- β - potência do teste (traduz a probabilidade de erro tipo II - aceitação abusiva)
- Δv - variação no número de graus de liberdade introduzida por uma alteração voluntária (não aleatória)
- ΔSS - variação na soma de quadrados introduzida por uma alteração voluntária (não aleatória)
- v - número de graus de liberdade (número de valores estatisticamente independentes)
- ρ_{XY} - correlação entre as variáveis X e Y
- $\sigma(X_A)$ - erro padrão do teor da amostra
- σ^2 - variância (diferença quadrática média)

- σ_0^2 - variância interna (contribuição puramente aleatória)
- σ_A^2 - variância externa (contribuição devida ao factor)
- σ_{fit} - desvio padrão do ajuste (estimativa do erro aveatório inerente ao ajuste do modelo aos valores experimentais)
- σ_{pe} - estimativa da contribuição puramente aleatória (dispersão)
- a_3 - estimador de simetria ($a_3 = \sum(z_i)^3/N$)
- a_4 - estimador de curtose ($a_4 = \sum(z_i)^4/N$)
- b_0 - ordenada na origem (termo constante do modelo)
- b_1 - declive do modelo P01 (traduz a dependência do sinal com a concentração)
- b_2 - parâmetro de segunda ordem de P012 (traduz a dependência do sinal com a concentração ao quadrado)
- b_j - parâmetros do modelo; $j \in \{0, 1, 2, \dots\}$
- e_i - erro do modelo ou erro do ajuste
- $f(x_i; b_j)$ - função de resposta instrumental
- Fr_i - factor de resposta do componente i (traduz a sensibilidade relativa do analito em relação ao padrão interno)
- H_0 - hipótese nula (assumida por defeito)
- H_1 - hipótese alternativa (válida quando se rejeita a hipótese nula, H_0)
- M - número de réplicas de amostra
- N - tamanho da amostra (número de pontos da curva de calibração)
- $p[H_0]$ - valor de prova; traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula (H_0)
- p - número de parâmetros do modelo
- P_{012} - polinómio de segundo grau ($f(x_i; b_0, b_1, b_2) = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2$)
- P_{01} - polinómio de primeiro grau ($f(x_i; b_0, b_1) = b_0 + b_1 \cdot x_i$)
- $P_{SC11:0}$ - área do sinal cromatográfico (pico) referente ao padrão interno, ácido undecanóico (C11:0)

- Ps_i - área do sinal cromatográfico (pico) referente ao componente i
- RSU - Incerteza padrão relativa (do Inglês, Relative Standard Uncertainty)
- SS - soma de quadrados (somatório da diferença quadrática em torno do valor estimado)
- SS_T - soma total de quadrados (dispersão total em torno da média global)
- SS_0 - soma de quadrados interna (estimativa da aleatoriedade interna)
- SS_A - soma de quadrados devida ao factor em estudo
- T_{R_i} - tempo de retenção obtido para o analito
- T_{RR} - tempo de retenção relativo, estimado com base no do padrão interno ($T_{RR} = T_R/T_{R(PI)}$)
- TV - valor de teste calculado (do Inglês, Test Value)
- U - Incerteza expandida; traduz o intervalo de confiança para a mensuranda considerando as contribuições totais de incertezas
- u - Incerteza padrão (erro padrão ou incerteza da estimativa)
- u_c - Incerteza padrão combinada; traduz a incerteza resultante de diferentes contribuições
- W_i - concentração referente ao componente i da msitura (MIX)
- $W_{C11:0}$ - concentração referente ao padrão interno, ácido undecanóico (C11:0)
- X_A - concentração estimada para o analito
- x_i - valores experimentais (variável independente)
- X_{LD} - limite de detecção (menor quantidade de analito que pode ser detectada)
- X_{LQ} - limite de quantificação (menor quantidade de analito que pode ser quantificada com rigor analítico)
- X_{PI} - concentração do padrão interno
- y_i - valores experimentais obtidos (variável dependente)
- y_{PI} - valor do sinal instrumental obtido na análise do padrão interno (em cromatografia corresponde geralmente à área integrada do sinal cromatográfico)

- ADH - ácido docohexaenóico
- AEP - ácido eicosapentanóico
- AG - ácidos gordos
- AGE - ácidos gordos essenciais
- AGMI - ácidos gordos monoinsaturados
- AGPI - ácidos gordos poli-insaturados
- AGS - ácidos gordos saturados
- ALC - ácido linoleico conjugado
- ANOVA - Análise de Variância (do Inglês, ANalysis Of VAriance)
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists
- CG - cromatografia gasosa
- FID - detector de ionização em chama (do Inglês, Flame Ionization Detector)
- GC-FID - cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (do Inglês, Gas Chromatography with Flame Ionization Detector)
- ICH - International Conference Harmonization
- IEC - International Electrotechnical Commission
- IPAC - Instituto Português de Acreditação
- IPQ - Instituto Português da Qualidade
- ISO - International Organization for Standardization
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
- LD - limite de detecção
- LMR - Limite Máximo de Resíduo
- LQ - limite de quantificação
- MQ-CQA - Mestrado em Química, ramo opcional em Contolo Químico e Ambiente

- PI - Padrão Interno
- S/N - quociente sinal/ruído (do Inglês, signal-to-noise)
- SI - Sistema Internacional de Unidades
- TG - triglicerídeos (gorduras compostas por glicerol e três ácidos gordos)
- USP - United States Pharmacopeia
- USP - instituto de química
- VIM -Vocabulário Internacional Metroológico
- PCR - Polymerase Chain Reaction
- TG – Triglicerídeos

Conteúdo

1	Introdução	1
1.1	Motivação	1
1.2	A empresa	2
1.3	Qualidade em laboratórios	3
1.4	Qualidade alimentar	4
1.5	ISO 17025	5
1.5.1	Objectivo e campo de aplicação da norma ISO 17025	6
1.5.1.1	Requisitos	6
1.5.1.2	Métodos de ensaio, calibração e validação de métodos	7
1.5.1.3	Vantagens económicas da norma ISO 17025	8
2	Fundamentação	9
2.1	Lípidos	9
2.1.1	Funções	12
2.2	Ácidos Gordos	13
2.2.1	Saturados	16
2.2.2	Insaturados	16
2.2.3	Monoinsaturados	18
2.2.4	Poli-insaturados	18
2.2.5	Poli-insaturados w3 e w6	19
2.3	Métodos analíticos	20
2.3.1	Cromatografia	20
2.3.1.1	Cromatografia gasosa	21
2.4	Tratamento de resultados	24
2.4.1	Testes estatísticos	24
2.4.1.1	Nível de confiança e nível de significância	24
2.4.1.2	Procedimento	25
2.4.1.3	Testes baseados nas distribuições estatísticas	27
2.4.1.4	Outros testes	29
2.5	Calibração e quantificação	32

2.5.1	Curva de calibração	34
2.5.2	Adição de padrão	36
2.5.3	Padrão interno	37
2.6	Validação	38
2.6.1	Especificidade e selectividade	41
2.6.2	Gama de trabalho	42
2.6.3	linearidade	42
2.6.4	Sensibilidade	43
2.6.5	Limiares analíticos	43
2.6.5.1	Limite de detecção	43
2.6.5.2	Limite de quantificação	44
2.6.6	Precisão	45
2.6.7	Exactidão	46
2.6.8	Robustez	47
2.6.9	Coerência	47
2.7	Quantificação da incerteza	47
2.7.1	Nomenclatura	48
2.7.2	Pressupostos	48
2.7.3	Estimativa da incerteza	49
3	Parte experimental	53
3.1	Materiais e equipamentos	54
3.2	Preparação das soluções	55
3.3	Procedimentos	56
3.3.1	Preparação das amostras	56
3.3.2	Condições cromatográficas	57
3.4	Tratamento de resultados	57
3.4.1	Estimativa	58
3.4.2	Cálculos	59
3.4.2.1	Identificação de AG	60
3.4.2.2	Factor de resposta	60
3.4.2.3	Concentração de cada AG	60
3.4.2.4	Gordura total	61
3.4.2.5	Estimativa da concentração de cada AG	61
3.4.2.6	Percentagem de AGS	61
3.4.2.7	Percentagem da AGMI e AGPI	61
4	Resultados e discussão	63
4.1	Validação	63
4.1.1	Avaliação prévia	63
4.1.1.1	Selectividade	78

<i>CONTEÚDO</i>	xv
4.1.1.2 Sensibilidade	79
4.1.1.3 Limiares analíticos	79
4.1.1.4 Gama analítica	79
4.1.1.5 Precisão	80
4.1.1.6 Exactidão	81
4.2 Estudo de uma amostra	87
5 Conclusões	90
A Tabelas	96

Capítulo 1

Introdução

Este capítulo inicial contém essencialmente alguma informação sobre a empresa no qual decorreu o desenvolvimento deste projecto de Mestrado (MQ-CQA) bem como algumas considerações sobre a qualidade nos laboratórios de ensaio referentes à avaliação da qualidade alimentar. Serão ainda focados alguns dos aspectos mais essenciais relacionados com a norma ISO 17025 [1], relacionada com a acreditação laboratorial.

1.1 Motivação

É de todo o interesse que os laboratórios de controlo da qualidade no ramo alimentar sejam capazes de fornecer análises correctas aos seus clientes. No nosso caso em concreto, sobre a percentagem de gordura existente numa amostra alimentar bem como a percentagem de cada um dos seus componentes, ácido gordo individual, isto porque cada um tem propriedades e características diferentes na influência das boas práticas alimentares, e por isso, era de grande interesse que o laboratório fosse capaz de, através de um método fiável, responder a esta necessidade.

Assim sendo, como tema inicial deste projecto foi proposto o estudo da implementação de um método cromatográfico no laboratório da ControlVet e sua validação.

1.2 A empresa



Figura 1.1: Logotipo Controlvet-Segurança alimentar.

A ControlVet é um grupo empresarial de visão ibérica que desenvolve a sua actividade na área da Segurança Alimentar, Ambiente e Biotecnologia. O grupo iniciou a sua actividade em Março de 1999, na Zona Industrial de Tondela. Actualmente é constituído por um conjunto de empresas localizadas em zonas como Tondela, Aveiro, Coimbra, Beja e Madrid (Espanha); nomeadamente a ControlVet Segurança Alimentar (CSA), ControlVet Consultoria Técnica (CCT), Inogen, Ecogeo, ControlVet Genetics e Alicontrol, em Espanha (ControlVet – Segurança Alimentar, 2009). A ControlVet presta serviços de assistência técnica à produção primária, serviços de consultoria e formação, e é um organismo independente de controlo (OIC), com reconhecimento do Ministério da Agricultura. A expansão da ControlVet caracteriza-se pela sua solidez empresarial, pela dedicação e empenho ao Cliente e pela inovação de processos e serviços, o que tem permitido o crescimento sustentado e a preferência de mais de 3.500 clientes. Com base no valor da marca ControlVet, no Know-how que possui na experiência acumulada, houve o crescimento em sistema Franchising através da ControlVet-CT – Consultadoria Alimentar. E no final do ano 2006, abriram as primeiras unidades franchisadas. A ControlVet usufrui de uma unidade laboratorial acreditada pelo IPAC – Instituto Português de Acreditação e equipada com tecnologia avançada que é colocada aos serviços dos clientes, permitindo uma melhor satisfação dos mesmos.

A unidade laboratorial está constituída por três secções: Microbiologia, Biologia Molecular e Química.

Este laboratório, ao nível da segurança alimentar, é um centro tecnológico de referência, sendo o único laboratório privado em Portugal que possui e utiliza a tecnologia PCR Real time, o que possibilita desenvolver serviços inovadores que são usados na pesquisa de patogénicos em microbiologia, detecção de fraudes, identificação de espécies, pesquisa de organismos geneticamente modificados (OMG's) e melhoramento animal.

Este laboratório analisa cerca de 100.000 amostras por ano, desde alimentação humana e animal, soros, águas e efluentes, recorrendo a mais de 500 métodos

implementados, realizados por uma equipa cerca de 25 colaboradores, onde 11 realizam as suas competências na área da microbiologia e os restantes na da química [2].

Na figura (1.1) encontra-se uma fotografia exterior do edifício relacionado com o desenvolvimento de métodos de caracterização físico-química.



Figura 1.2: Perspectiva exterior do edifício do laboratório de análises Físico-Químicas.

1.3 Qualidade em laboratórios

Nos dias de hoje a qualidade está no topo da excelência de todos os produtos e serviços prestados ao cliente [“customer”]. Para essa qualidade ser testada e aprovada existem laboratórios analíticos creditados que demonstram periodicamente o seu desempenho e prestação na mais correcta análise e credibilidade dos resultados apresentados perante uma enorme competitividade com o mercado e a concorrência.

O conceito Qualidade encontra-se associado ao sentido de bem-estar, satisfação do cliente, garantia de satisfação e fiabilidade do produto. A evolução da Qualidade ao longo do Século XX é um processo gradual, que pode ser descrita muito brevemente em quatro etapas distintas: inspeção, controlo da qualidade, garantia da qualidade e gestão da qualidade total [3].

A etapa da inspeção da qualidade surgiu com a Revolução Industrial, assistindo-se à massificação da produção, levando a uma quantidade elevada de produção defeituosa, que era detectada pelos inspectores da qualidade, que se limitavam a separar os produtos não conformes dos produtos conformes. Por volta dos anos 30, surge a etapa do controlo de qualidade, a partir da qual se inicia a aplicação de algumas técnicas estatísticas, bem como a supervisão das técnicas de controlo de amostragem e as causas que levam à produção de produtos não conformes. A etapa da garantia da qualidade surgiu no decurso da década de 60, onde o termo Garantia da Qualidade funcionava como forma de assegurar a qualidade final do

produto ou serviço prestado. No final dos anos 80, surgiu a etapa da gestão da qualidade total, completamente focado nas pessoas, que visava o aumento contínuo da satisfação dos clientes, a custos reais e cada vez mais baixos, envolvendo todas as áreas funcionais da empresa, bem como todos os seus colaboradores, fornecedores e clientes [4].

Actualmente, grande parte dos laboratórios de ensaio tentam assegurar a capacidade de obter resultados fidedignos que garantam a satisfação dos seus clientes, neste caso relacionada com a real caracterização das suas amostras.

Para conseguir este objectivo devem cumprir com diversos requisitos técnicos, tais como:

- O recurso a métodos validados,
- Controlo da qualidade,
- Participação em programas de ensaios interlaboratoriais e
- Acreditação segundo os requisitos descritos na norma portuguesa, NP EN ISO/IEC 17025:2007 [1].

A acreditação do laboratório em determinadas competências relacionadas com processos analíticos garante, através de um acompanhamento constante, a competência técnica na realização dos ensaios e a respectiva autenticidade desses resultados. Por sua vez, os requisitos normativos ajudam no controlo do rigor na obtenção dos resultados de modo que estes sejam verídicos e confiáveis, expressos na incerteza da medição realizada.

1.4 Qualidade alimentar

O termo “qualidade” é definido de acordo com a família de normas ISO 9000 como a totalidade das características relevantes e a capacidade de um produto satisfazer as suas necessidades [3]. No entanto, o conceito de qualidade alimentar deve ser considerado como uma base muito mais ampla tendo em conta as diferentes exigências do fabricante, o consumidor, a vigilância e os órgãos legislativos devem ser tomados em consideração a fim de obter produtos com qualidade sem deixar de parte questões como o valor económico e ecológico relacionadas com a qualidade dos alimentos.

O consumidor deseja consumir produtos saudáveis, com alto valor nutricional, tendo em conta macronutrientes como proteínas, carboidratos, gorduras e fibras,

bem como nutrientes menores como as vitaminas e outros elementos mais vestigiais. Esses produtos devem também ser superiores no paladar, sabor e textura. Em terceiro lugar, como o comportamento do consumidor em constante mudança, assim como a sociedade, as pessoas também tendem a favorecer alimentos pré-embalados para a preparação de alimentos e com datas de validade mais extensas [5].

A evolução da Qualidade ao longo do Século XX foi um processo gradual, que pode ser descrita muito sucintamente em quatro etapas distintas: inspeção, controlo da qualidade, garantia da qualidade e gestão da qualidade total.

A etapa da inspeção da qualidade surgiu com a Revolução Industrial, assistindo-se à massificação da produção, levando a uma quantidade elevada de produção defeituosa, que era detectada pelos inspectores da qualidade, que se limitavam a separar os produtos não conformes dos produtos conformes.

Por volta dos anos 30, surge a etapa do controlo de qualidade, a partir da qual se inicia a aplicação de algumas técnicas estatísticas, bem como a supervisão das técnicas de controlo de amostragem e as causas que levam à produção de produtos não conformes.

A etapa da garantia da qualidade surgiu no decurso da década de 60, onde o termo “Garantia da Qualidade” funcionava como forma de assegurar a qualidade final do produto ou serviço prestado.

Já no final dos anos 80, surgiu a etapa da gestão da qualidade total, completamente focado nas pessoas, que visava o aumento contínuo da satisfação dos clientes, a custos reais e cada vez mais baixos, envolvendo todas as áreas funcionais da empresa, bem como todos os seus colaboradores, fornecedores e clientes [6].

1.5 ISO 17025

A ISO 17025 [1], foi produzida como resultado de ampla experiência na implementação da ISO Guia 25 [7] e da EN 45001:1989 [8], que são canceladas e substituídas, de modo a serem utilizados textos idênticos nos níveis internacional e regionalmente. Esta Norma estabelece os critérios para aqueles laboratórios que desejam demonstrar sua competência técnica, que possuem um sistema da qualidade efectivo e que são capazes de produzir resultados tecnicamente válidos.

A acreditação de um laboratório é um processo bastante complexo já que são vários os requisitos que o mesmo laboratório terá de cumprir para ser acreditado. Esta acreditação é reconhecida e fiscalizada pelo IPQ – organismo nacional de acreditação e pelo IPAC. A interpretação desta norma tem de ser bastante clara para a acreditação do Laboratório.

A norma ISO 17025 [1] é talvez a mais importantes da série ISO 17000. Esta

norma regulamenta os laboratórios no que respeita ao pessoal, acomodação e ambiente, métodos de teste e métodos de validação, incerteza na medida, registos, equipamentos, materiais de referência e padrões químicos, amostragem, tratamento e preparação das amostras e controlo de qualidade. Fornece a orientação específica na certificação de laboratórios, testando aptidão dos trabalhadores e dos laboratórios que se preparam para a acreditação, é um documento autoritário em casos de disputa, cada corpo individual deve adjudicá-lo em caso de matérias não resolvidas. Este documento é concebido com resultados de testes de qualidade, não é concebido especificamente com matérias de saúde e segurança, as práticas de laboratório devem estar em conformidade com os regulamentos nacionais de saúde e segurança, os corpos de acreditação apenas certificam os laboratórios que tenham toda a documentação válida [9].

1.5.1 Objectivo e campo de aplicação da norma ISO 17025

A presente norma internacional específica os requisitos gerais de competência para realizar ensaios e/ou calibrações, incluindo a amostragem. Abrange os ensaios e as calibrações realizados segundo métodos normalizados, não normalizados e métodos desenvolvidos pelos próprios laboratórios. É aplicável a todos os laboratórios, independentemente da actividade, número de pessoas. Não cumprindo uma ou mais actividades abrangidas pela norma, os requisitos da mesma norma não se lhes aplicam, mas cumprindo os laboratórios de ensaio e calibração os requisitos desta norma, o seu sistema da qualidade cumpre igualmente os requisitos da norma ISO 9001 quando realizam actividades de concepção e desenvolvimento de novos métodos, ou desenvolvimento de programas de ensaio que combinem métodos normalizados com não normalizados e cumpre os requisitos da norma ISO 9002 quando usa métodos normalizados [9].

1.5.1.1 Requisitos

É necessário o cumprimento de alguns requisitos na realização das actividades de ensaio e calibração de modo a satisfazer as necessidades do cliente. Isto é conseguido através do trabalho de pessoal qualificado para o desempenho de certas funções, bons gestores que assumam a responsabilidade, de modo a obter uma forte confiança do cliente e também uma boa satisfação.

O laboratório deve garantir um sistema de qualidade adequado no âmbito das suas actividades, deve assumir um compromisso, não só quanto às boas práticas profissionais e à qualidade dos seus ensaios e calibrações fornecidas aos clientes como também ao cumprimento da presente norma. Deverá existir um bom sistema de documentação, de modo a ter o seu próprio controlo, um registo de todas as suas actividades e se necessário a melhorar algo que desperte o sentido do cliente.

Existem vários factores que determinam a exactidão e fiabilidade dos ensaios e/ou calibrações por um laboratório, tais como: factores humanos, métodos de ensaio e calibração e validação de métodos, rastreabilidade das medições, amostragem.

A extensão com que estes factores contribuem para a incerteza total da medição varia consideravelmente consoante os ensaios e as calibrações. O laboratório deve ter em conta estes factores no desenvolvimento de métodos e procedimentos de ensaio e calibração, na formação e qualificação do pessoal e na selecção e calibração do equipamento usado [9].

1.5.1.2 Métodos de ensaio, calibração e validação de métodos

O laboratório deve utilizar métodos e procedimentos adequados para a realização de todos os ensaios e/ou calibrações dentro do seu âmbito de actividade.

Estes métodos deverão dar total satisfação ao cliente, respeitando as normas internacionais. Deve existir um procedimento que faça uma estimativa de incerteza da medição no método.

No que respeita à validação de método, deve existir um exame que confirme que são cumpridos os requisitos específicos relativos a uma dada utilização. A gama e a exactidão dos valores que podem ser obtidos através de métodos validados (por exemplo, a incerteza dos resultados, o limite de detecção, a selectividade do método, a linearidade, os limites de repetibilidade e/ou reprodutibilidade, a robustez a influências externas, e a sensibilidade cruzada, a interferências de matriz da amostra e objecto de ensaio), tal como foi avaliado para a utilização pretendida, devem ser relevantes face às necessidades de um cliente.

O papel, as responsabilidades e as exigências devem ser documentados, o laboratório manterá um sistema de registo modernizado [1, 10].

Garantia da qualidade dos resultados de ensaio e de calibração

O laboratório deve ter procedimentos de controlo da qualidade para monitorizar a validação dos ensaios e/ou calibrações realizados. Os dados daí resultantes devem ser registados para que se possam detectar tendências e, sempre que praticável serem aplicadas técnicas estatísticas na análise dos resultados.

Os resultados devem ser geralmente apresentados num relatório de ensaio ou certificado de calibração e incluir todas as informações solicitadas pelo cliente e necessárias para a interpretação dos resultados do ensaio ou calibração, bem como todas as informações exigidas pelo método utilizado. Deverão existir relatórios de ensaio, certificados de calibração assim como uma correcção actualizada respeitando, claro, os requisitos da presente norma.

O nível do controle de qualidade deve ser suficiente para demonstrar a validade dos resultados. Existem muitas referências cruzadas à presente norma tais como,

as normas ISO 9001 e ISO 9004 sendo a principal diferença o facto de a norma 17025 abranger diversos requisitos de competência técnica não abrangidos pelas normas ISO 9001 e ISO 9002 [3, 9].

1.5.1.3 Vantagens económicas da norma ISO 17025

Actualmente, aproxima-mo-nos cada vez mais de uma economia global, daí que a padronização se assume cada vez mais como fundamental, na afirmação dos laboratórios e das empresas, além de viabilizar e incrementar as trocas comerciais no âmbito nacional e internacional. Sendo que as organizações que desenvolvem as suas actividades operam os seus processos produtivos de acordo com as normas e processos harmonizados e aceites como padrões, estarão em condições mais favoráveis de superar possíveis barreiras não tarifárias e atender a requisitos técnicos especificados. Logo neste contexto, a aplicação da ISO 17025 é de grande relevância económica, pois confere um valor diferenciado aos certificados de calibração e aos relatórios de ensaio emitidos por laboratórios, cuja competência técnica é reconhecida por um organismo credenciado. Esse reconhecimento poderá se reverter em vantagens económicas para os laboratórios, tais como:

- Diferencial competitivo e factor de divulgação e marketing;
- Fidelização de clientes e a atracção de novos clientes;
- Segurança, confiança e fiabilidade nos resultados;
- Reconhecimento Internacional, cooperação entre laboratórios e outros organismos, aprovação de resultados por outros países [9].

Capítulo 2

Fundamentação

Neste capítulo vamos sistematizar o resultado da revisão bibliográfica relacionada e necessária ao bom entendimento dos assuntos essenciais ao desenvolvimento do restante trabalho.

2.1 Lípidos

Ao contrário do que por vezes se pensa, os lípidos, mais conhecidos por gorduras, não são, por si só, prejudiciais à saúde. Bem pelo contrário, são muito importantes para a renovação celular e para a sua integridade, uma vez que são constituintes essenciais nas membranas celulares, da produção e armazenamento de energia, na síntese hormonal e na protecção mecânica dos vários órgãos.

Os lípidos constituem um grupo heterogéneo e caracterizam-se por possuírem uma estrutura molecular básica composta por duas partes - parte polar e parte apolar. A parte polar¹ é constituída por um grupo ácido carboxílico (-COOH) enquanto que a parte apolar² está relacionada com a cadeia hidrocarbonada, ver figura (2.1).

¹Designa-se de parte polar porque possui um momento dipolar não nulo.

²Neste caso em concreto a cadeia carbonada embora constituída por átomos com electronegatividades distintas (H e C), devido à sua elevada simetria espacial, os momentos dipolares associados a cada ligação covalente C-H são mutuamente cancelados conduzindo a uma resultante global quase nula.

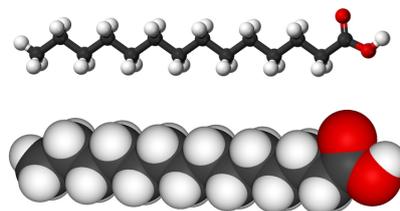


Figura 2.1: Esquema geral de um ácido gordo saturado (apenas contendo ligações simples C-C) dando ênfase às suas partes apolar (cadeia carbonada assinalada a preto (átomos de C) e branco (átomos de H), do lado esquerdo, e a parte polar (grupo -COOH, contendo 2 átomos de oxigénio, assinalados a vermelho), do lado direito da figura.

Regra geral, os ácidos gordos (AG) presentes nos alimentos possuem uma cadeia carbonada com pelo menos oito átomos.

Na maioria dos casos, o ácido gordo esterifica com um álcool, geralmente o glicerol formando-se neste caso um glicerídeo, ver figura (2.2).

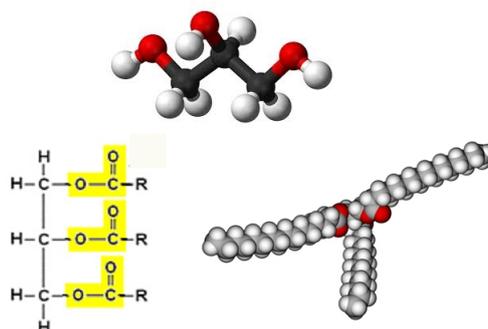


Figura 2.2: Exemplificação da estrutura de ésteres de ácidos gordos: no topo e ao centro encontra-se uma representação estrutural (3D) do glicerol (1,2,3-propanotriol); em baixo, do lado esquerdo a fórmula estrutural de um triglicerídeo que se encontra representado do lado direito da figura, agora segundo uma estrutura de modelo tridimensional.

Existem na natureza ainda alguns casos em que os ácidos orgânicos se encontram associados a compostos nitrogenados (grupos amínicos) estabelecendo ligações do tipo peptídico ($R1-C(=O)-NH-R2$) ou a uma amina alcoólica ($R1-C(=O)-ONH-R2$).

Sendo estes compostos resultantes da associação de uma parte polar (ex: glicerol) com outras partes anfifílicas³, ainda assim, devido à enorme contribuição da

³O termo anfifílico refere-se à presença de um comportamento físico-químico intermédio que conjuga duas situações extremas, aqui, neste caso, trata-se de um composto que reúne na mesma

componente apolar, característica essencial dos lípidos é a sua ínfima solubilidade em água e a grande solubilidade em solventes orgânicos, como o éter, a acetona, o álcool, o sulfureto de carbono e o tetracloreto de carbono.

Embora as gorduras abranjam um grupo heterogêneo de substâncias podemos grosseiramente, dividi-las em duas classes, as gorduras neutras e as anfipáticas.

As gorduras neutras, que incluem os triglicerídeos (TG), colesterol, outros grupos de esteróides e isoprenos com os respectivos ésteres, são as mais insolúveis no meio aquoso e tendem a encontrar-se associadas formando ambientes hidrofóbicos (ex: reservas de tecido adiposo). A sua principal função no organismo Humano está relacionada com reserva energética [11, 12].

As gorduras anfipáticas são aquelas que têm uma componente polar razoável que permitem, desde modo, criar interfaces entre o meio aquoso e ambientes hidrofóbicos. O melhor exemplo deste tipo de composto são os fosfolípidos compostos por duas cadeias de ácido gordo, um grupo glicerol e um grupo fosfato que lhe confere maior polaridade e carga negativa, ver figura (2.3).

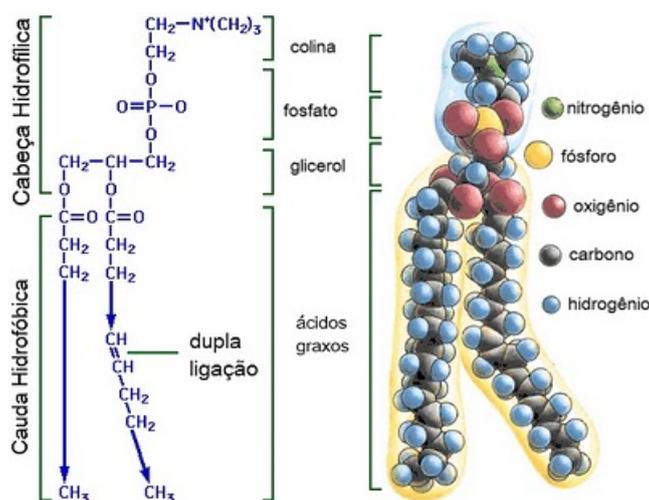


Figura 2.3: Exemplificação da estrutura de um fosfolípido (neste caso uma fosfo-colina) segundo um modelo de representação tridimensional: na parte inferior da figura vê-se duas cadeias hidrocarbonadas correspondentes a dois ácidos gordos esterificados com o grupo glicerol (no ponto de reunião) associado ao grupo fosfato e, por sua vez associado a uma amina (colina).

Devido a esta capacidade extrema de facilmente poderem interagir com o meio aquoso e com o ambiente hidrofóbico, a sua função é essencialmente estrutural - molécula uma parte polar (possui um significativo momento dipolar localizado não nulo) e outra apolar (momento dipolar nulo ou muito próximo de zero).

estão maioritariamente associados às biomembranas, permitindo a segmentação de espaços ao nível celular (membrana celular) e ao nível intra-celular (organelos celulares)[11, 12].

Com base nestas características, estes compostos são classificados em dois grupos distintos de gorduras no nosso organismo: as gorduras de reserva e as estruturais.

Como foi visto anteriormente, as gorduras de reserva são essencialmente triglicéridos (TG), acumulados em depósitos específicos nos tecidos das plantas e dos animais. Estas gorduras constituem a maior reserva de energia do organismo, e nos animais são também fonte de nutrientes essenciais. A composição de ácidos gordos nestes TG está relacionada com o tipo de alimentação.

Quantitativamente são o segundo constituinte estrutural mais importante dos tecidos moles do organismo [13].

2.1.1 Funções

As gorduras encontram-se presentes em quase todas as células constituintes dos organismos vivos e representam uma parte importante da sua estrutura, armazenamento e funções metabólicas. As suas funções mais relevantes estão relacionadas com:

- fornecimento de ácidos essenciais (AGE);
- reserva de energia em forma de tecido adiposo;
- constituintes principais das membranas celulares (fosfolípidos);
- camada protectora dos órgãos;
- fornecimento de energia às células: as gorduras são oxidadas para fornecerem energia e são a forma mais concentrada de energia da alimentação;
- veículo de transporte para as vitaminas lipossolúveis e antioxidantes;
- protecção contra a perda de calor por meio de reservas de gordura subcutâneas;
- suporte estrutural dos tecidos cerebrais;
- substrato para a síntese de hormonas e prostaglandinas.

Na figura (2.4) apresenta-se, sob a forma esquemas representativos, algumas das estruturas de tipos de gorduras supra citadas.

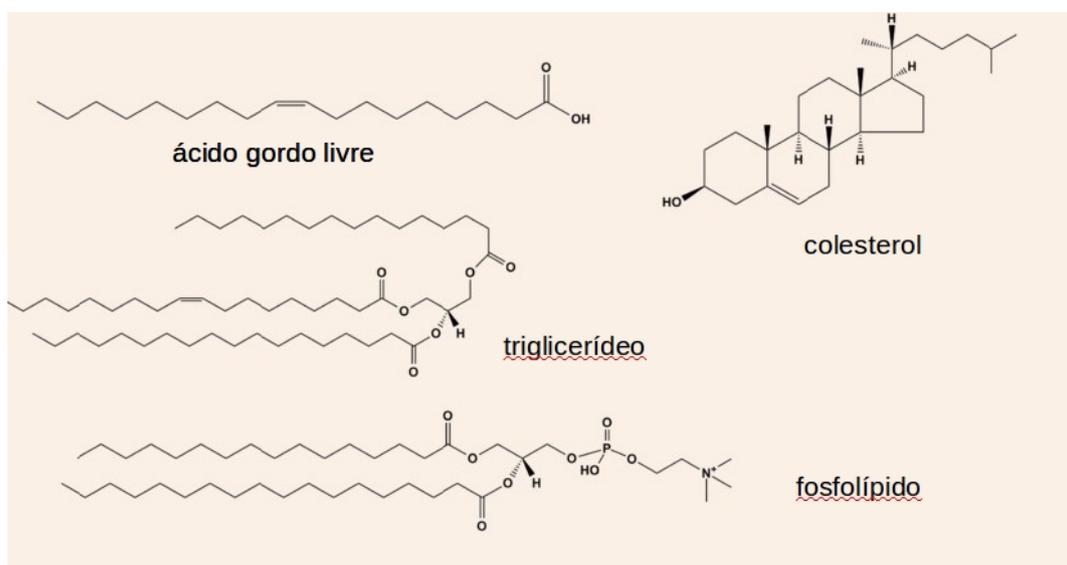


Figura 2.4: Breve sistematização de alguns dos lípidos mais comuns evidenciando suas estruturas moleculares.

2.2 Ácidos Gordos

Os AG caracterizam-se por serem compostos por cadeias de átomos de carbono ($-CH_2-$) com um grupo metil ($-CH_3$) numa extremidade e na outra extremidade possuírem um grupo carboxilo ($-COOH$). Na natureza, as gorduras contem quase sempre só AG com um determinado número de carbonos. Nas cadeias de átomos de carbono predominam as ligações simples podendo coexistir algumas ligações duplas, o que lhes permite serem agrupados em três tipos principais: ácidos gordos saturados (AGS), ácidos gordos monoinsaturados (AGMI) e ácidos gordos poli-insaturados (AGPI).

Uma dieta típica contem uma mistura de ambos os ácidos gordos, saturados e insaturados [13, 14] e podem ser encontrados cerca de vinte e um tipos diferentes em quantidades significativas, mas os mais prevalentes são os ácidos gordos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico e araquidónico.

Além de serem conhecidos por esses nomes comuns, os ácidos gordos também têm um nome sistemático baseado na sua estrutura. Por exemplo o ácido eicosapentanóico (AEP), um AGPI encontrado nos óleos de peixes, reflete o facto de este ácido gordo conter 20 átomos de carbono (eicosa) e cinco (penta) duplas ligações [14].

Devido a estas diferentes formas de eles se apresentarem, é consensual o recurso a três formas de denominação:

1. através do nome comum ou trivial, que tem sido usada ao longo de muitos anos;
2. pelo seu nome sistemático, que é o mais recente e tem a vantagem de descrever a estrutura do AG a que pertence;
3. ou com recurso ao sistema de ómega, que classifica os AG de acordo com a posição da primeira ligação dupla, contando a partir da extremidade metil da molécula. Este sistema foi desenvolvido para classificar as famílias de ácidos gordos que podem ser sintetizados a partir de outro.

Exemplos de todos os três nomes de alguns dos ácidos gordos mais comuns são dadas na tabela (2.1). Os ácidos gordos também podem ser indicadas por dois números: o primeiro número significa o de átomos de carbono na cadeia e o segundo indica o número da dupla ligação. Por exemplo, o ácido oleico, que contém 18 átomos de carbono e 1 ligação dupla, pode ser escrito como 18:1 [14].

Tabela 2.1: Identificação de ácidos gordos mais relevantes, sua codificação química e algumas das suas proveniências mais relevantes.

ID#	Nome comum	Nome sistemático	Abreviatura	Fonte
1	Butírico	Butanóico	C4:0	Gordura láctea
2	Capróico	Hexanóico	C6:0	Gordura láctea
3	Caprílico	Octanóico	C8:0	Óleo de coco
4	Cáprico	Decanóico	C10:0	Óleo de palma
5	Undecanóico	Undecanóico	C11:0	
6	Láurico	Dodecanóico	C12:0	Óleo de coco
7	Tridecanóico	Tridecanóico	C13:0	Óleo de palma e manteiga
8	Mirístico	Tetradecanóico	C14:0	Óleo de coco, de palma, gorduras animais e vegetais
9	Miristoleico	9-Tetradecenóico	C14:1	Óleo de coco, de palma, gorduras animais e vegetais
10	Pentadecanóico	Pentadecanóico	C15:0	gordura animal e vegetal
11	cis-10- Pentadecenóico	cis-10- Pentadecenóico	C15:1	gordura animal e vegetal
12	Palmítico	Hexadecanóico	C16:1	gordura animal e vegetal
13	Palmitoleico	9-Hexadecenóico	C16:1	gordura animal e vegetal
14	Margárico	Heptadecanóico	C17:0	gordura animal e vegetal
15	Margaroleico	cis-10-Heptadecenóico	C17:1	gordura animal e vegetal
16	Esteárico	Octadecanóico	C18:0	gordura animal e manteiga de cacau
17	Oleíco	cis-9-Octadecenóico	C18:1n9c	Azeite
18	Elaídico	trans-9-Octadecenóico	C18:1n9t	Gordura láctea
19	Linoleico	cis-9,12-Octadecadienóico	C18:2n6c	Óleo de amendoim, soja e milho
20	Linolelaídico	trans-9,12- Octadecadienóico	C18:2n6t	Óleo de soja
21	Gama-Linolénico	6,9,12-Octadecatrienóico	C18:3n6	Borragem
22	Linolénico	9,12,15-Octadecatrienóico	C18:3n3	Borragem
23	Araquídico	Eicosanóico	C20:0	Óleo de amendoim
24	Gadoleico	cis-11-Eicosenoico	C20:1	Óleo de amendoim
25	Heneicosanoico	Heneicosanoico	C21:0	Gordura animal (banha)
26	cis-11,14-Eicosadienóico	cis-11,14-Eicosadienóico	C20:2	Gordura animal (banha)
27	cis-8,11,14-Eicosatrienóico	cis-8,11,14-Eicosatrienóico	C20:3n3	Gordura animal (banha)
28	cis-11,14,17-Eicosatrienóico	cis-11,14,17-Eicosatrienóico	C20:3n3	Gordura animal (banha)
29	Araquidónico	5,8,11,14-Eicosatetraenóico	C20:4n6	Gordura animal (banha)
30	EPA	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentenóico	C20:5n3	Alguns óleos de peixe
31	Beénico	Docosanóico	C22:0	Óleo amendoim, óleo de colza
32	Tricosanoico	Tricosanoico	C23:0	Óleo amendoim, girassol
33	Erúico	13-Docosenoico	C22:1n9	Couve de Bruxelas, brócolos e mostarda
34	cis-13-16-Docosadienóico	cis-13-16-Docosadienóico	C22:2	Óleo de girassol, de milho, linhaça, carne animal
35	Linhocérico	Tetrasanoico	C24:0	Óleo amendoim, óleo de colza
36	DHA	cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexenóico	C22:6n3	Alguns óleos de peixe
37	Nervónico	12-Tetrasenoico	C24:1	produtos ricos em ómega 9

2.2.1 Saturados

Todos os óleos e gorduras naturais contêm misturas complexas de todos os três tipos de ácidos gordos: os saturados, os mono-insaturados e os poli-insaturados [15].

Os AGS são aqueles que não possuem dupla ligação entre os seus átomos de carbono ou outro grupo funcional ao longo da cadeia carbonada. Geralmente possuem uma forma linear, o que permite que o seu armazenamento seja de forma muito eficiente. O termo "saturado" refere-se ao hidrogénio, ou seja, um AGS é aquele no qual todos os carbonos (da cadeia de hidrocarbonetos) estão ligados a dois hidrogénios, excepto ao último carbono que deve estar ligado a três hidrogénios.

Apresentam uma elevada temperatura de fusão e geralmente são sólidos à temperatura ambiente, são quimicamente estáveis, tanto no corpo humano, como quando estão presentes nos alimentos. Obtêm-se do armazenamento de gorduras nos animais e produtos derivados destes, como por exemplo: leite, manteiga, queijo, natas e gordura de carne.

Os alimentos de origem vegetal também apresentam este tipo de AG mas em menor quantidade, mas existem algumas excepções como o óleo de coco e o óleo da palma. As margarinas e os derivados de manteigas, produzidos com óleos vegetais, também contem quantidades significativas de AGS.

2.2.2 Insaturados

Os ácidos gordos insaturados seguem o mesmo padrão dos ácidos gordos saturados, excepto pela existência de uma ou mais duplas ligações ao longo da cadeia carbonada. A dupla ligação ocorre entre carbonos (-CH=CH-) e de forma alternada, isto é, um único átomo de carbono só forma uma dupla ligação (do tipo -CH=CH-CH=CH- e nunca -CH=C=CH).

A dupla ligação pode ter duas configurações: se o AG adquirir uma forma "linear", apresenta uma configuração *trans*, mas se o AG forma uma "quina" a ligação possui configuração *cis*, ver esquema da figura (2.5).



Figura 2.5: Esquema exemplificativo da diferença entre uma configuração *cis* e *trans* devida à presença de uma ligação dupla: à esquerda os grupos substituintes (R1 e R2) apresentam-se do mesmo lado da ligação dupla designando-se de isômero *cis* enquanto que à direita estes se encontram em posições diametralmente opostas formando o isômero *trans*.

Quando se fala em configuração “*cis*” pretende-se explicitar que os átomos de carbonos adjacentes estão do mesmo lado da dupla ligação. Devido à rigidez da dupla ligação, a sua presença na cadeia carbonada do AG torna-o menos flexível.

Já uma configuração do tipo “*trans*” significa que os dois átomos de carbonos em ambas as extremidades da dupla ligação estão do lado oposto, relativamente ao posicionamento da ligação insaturada. Como consequência, não há dobramento de cadeia, e a sua conformação é muito semelhante à de um AGS.

Os AGI de ocorrência natural, normalmente possuem configuração *cis*. A maioria dos AG de configuração *trans* não é encontrada na natureza e sim em gorduras que foram submetidas a processos artificiais, especialmente como produto minoritário da hidrogenação de gorduras insaturadas (que consiste em reduzir as ligações duplas de ácidos *cis* a ligações simples).

Alimentos que contêm AGI podem sofrer, por exposição prolongada ao ar, oxidação nas ligações duplas, resultando na quebra da cadeia de carbonos na zona dessa ligação e conseqüente formação de aldeídos de cadeia curta, de sabor e odor desagradável (o ranço).

Tanto a cadeia de ácidos saturados, quanto a cadeia de ácidos insaturados são importantes para manterem a membrana em equilíbrio e assim desenvolverem as suas funções.

O ácido linoleico conjugado (ALC) é um derivado isomérico do grupo do ácido linoleico (C18:2), com ligações duplas conjugadas, a maioria com 9 e 11 ou 10 e 12 átomos de carbono, com todas as ligações *cis* e *trans* possíveis, cf. figura (2.6).

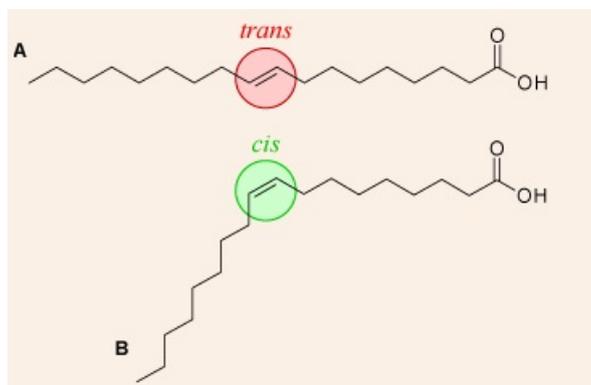


Figura 2.6: Representação estrutural dos isômeros do ácido linoleico; em A uma estrutura do tipo *trans* enquanto que em B se indica a estrutura típica do isômero *cis*.

Este ácido gordo apresenta-se maioritariamente na gordura do leite. O seu isômero predominante é o *cis*-9,*trans*-11 ALC. Também se encontra presente em óleos vegetais e óleos parcialmente hidrogenados embora em menores quantidades.

2.2.3 Monoinsaturados

Os AGMI apresentam apenas uma ligação dupla na sua molécula. São gorduras estáveis que podem ser submetidas a altas temperaturas e também protegem os AGPI da sua oxidação.

O ácido oleico (18:1c9) é o ácido gordo monoinsaturado mais abundante na Natureza, representando cerca de 40% das gorduras alimentares, sendo acompanhado nas gorduras vegetais e sobretudo nas gorduras de animais marinhos. Sendo o seu homólogo, do ácido palmítico, o ácido palmitoleico, com 16 átomos de carbono.

O consumo elevado de ácido oleico diminui o nível do colesterol comparativamente com dietas contendo baixo teor de ácido oleico.

2.2.4 Poli-insaturados

Os AGPI, por sua vez apresentam mais que uma ligação dupla na sua estrutura, sendo o número destas ligações muito variável (2,3,4,5 ou superior), e a forma *cis* a mais predominante.

Os ácidos gordos essenciais são ácidos gordos poli-insaturados que não podem ser sintetizados pelo organismo humano: os ácidos linoleico, α -linolénico e araquidónico. O ácido linoleico tem importantes funções, fundamentalmente na síntese de prostaglandinas. Este ácido abunda em óleos de sementes (milho,

girassol e soja) e noutros alimentos vegetais . O ácido α -linolénico é muito importante para a formação de estruturas celulares do sistema nervoso, podendo (a partir dele) sintetizar-se ácidos gordos n-3, fundamentais para o organismo, pela sua acção protectora cardiovascular, e que também abundam nos peixes gordos [16].

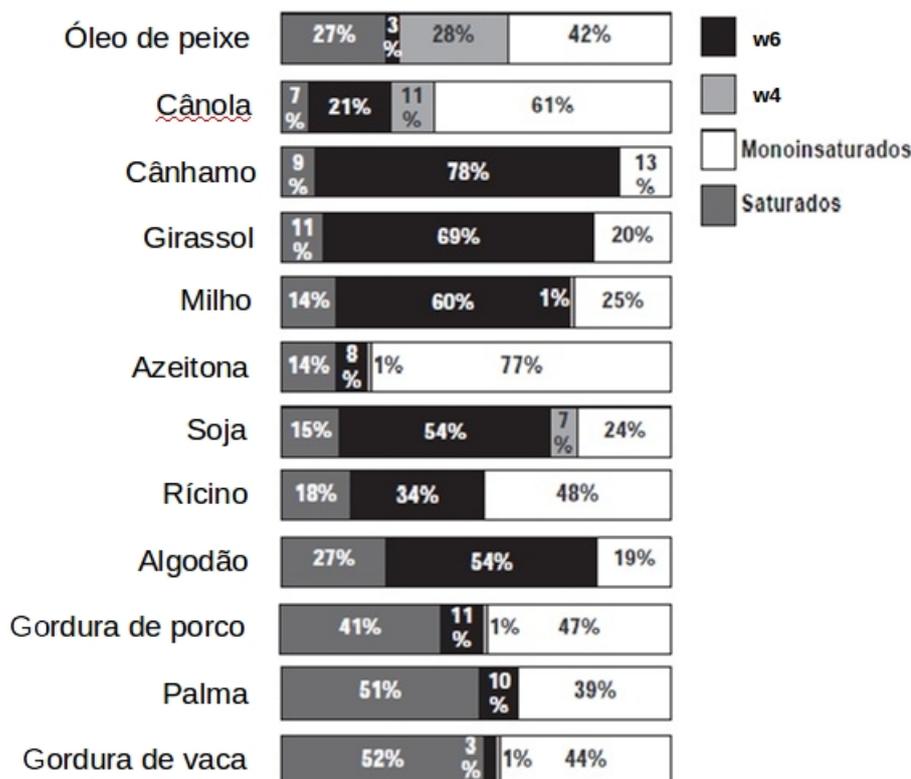


Figura 2.7: Percentagem total de lípidos em alguns dos alimentos mais comuns.

2.2.5 Poli-insaturados w3 e w6

A maior parte da gordura poli-insaturada apresenta-se na forma de ácidos gordos poli-insaturados ómega 3, principalmente ácido linoleico derivado de óleos vegetais.

Existem alguns derivados importantes destes ácidos gordos (conhecidos por ómega 6) como o ácido γ -linoleico (C20:4 w6) e o ácido araquidónico (C20:4 w6). Estes ácidos gordos estão presentes na alimentação apesar de em baixas quantidades, e são maioritariamente sintetizados a partir do AL.

O ácido gordo α -linoleico, ácido gordo polinsaturado ómega-3, e seus derivados principais de cadeia longa, AEP e ácido docohexaenóico (ADH) representam

uma pequena porção dos AGPI da alimentação, mas apresentam efeitos fisiológicos importantes [14, 16].

2.3 Métodos analíticos

Existem na literatura muitos métodos para a extração de matéria gordos em alimentos, dependendo da matriz que se quer analisar. Na determinação de AG em alimentos, a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia em camada fina impregnada com nitrato de prata e espectrofotometria de infravermelho são as técnicas mais utilizadas [17].

A análise por cromatografia gasosa utiliza colunas capilares com fase estacionária de elevada polaridade, que possibilitam a separação de isómeros *cis* e *trans*.

A CG tem sido o método de eleição para a análise de AG em alimentação humana. Este tipo de análise instrumental continua a fazer parte das técnicas tradicionais mais utilizadas, mas representa agora novos desafios face às alterações legais e normativas relacionadas com a evolução dos conhecimentos ao nível do impacto da alimentação na saúde Humana, estendendo-se à evolução da indústria alimentar.

De acordo com um estudo recente, foi detectada uma modificação da composição de AG nos alimentos tem vindo a ser observada ao longo dos tempos, pela alteração que a indústria tem introduzido e que oferece boas possibilidades de produzir alimentos mais equilibrados.

2.3.1 Cromatografia

A cromatografia tem vindo a ocupar ao longo dos últimos anos um lugar de destaque entre os métodos analíticos de destaque, devido à sua facilidade em separar, identificar e quantificar uma grande variedade de espécies químicas em misturas complexas. A cromatografia pode ser utilizada separadamente ou em conjunto com outras técnicas complementares, sendo o método mais poderoso e de aplicação generalizada.

O termo cromatografia é difícil de ser definido rigorosamente porque o nome tem sido aplicado a diversos sistemas e técnicas. Todos esses métodos contudo, apresentam em comum o uso de uma fase estacionária e uma fase móvel. Os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel [18].

2.3.1.1 Cromatografia gasosa

A CG foi o método de eleição para análise de AG, por mais de meio século. Tem sido uma técnica analítica de referência desde que se começaram a dar os primeiros passos na aplicação desta técnica para a determinação da composição em AG em sementes de plantas, biossíntese e metabolismo humano [19]. A análise por CG continua a fazer parte das técnicas tradicionais mais utilizadas, mas apresenta agora novos desafios face às novas mudanças. Desde que são conhecidos os efeitos na saúde, mesmo quando se ingerem pequenas quantidades de AG, os seus efeitos não podem ser esquecidos e deve ser dada a importância devida ao estudo das suas necessidades e dos seus efeitos.

Na CG, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência da sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por CG, a amostra é vaporizada e injectada na cabeça da coluna cromatográfica.

A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, em muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; a sua única função é transportar o analito através da coluna [18].

Existem dois tipos de cromatografia gasosa: a cromatografia gás líquido e a cromatografia gás sólido, sendo a GC a cromatografia gás líquido. A cromatografia gás-líquido é baseada na partição do analito entre a fase móvel gasosa e uma fase líquida immobilizada na superfície de um material sólido inerte de recheio ou nas paredes de um tubo capilar [18].

Um equipamento de CG é essencialmente constituído por: um sistema de gás de arraste, o sistema de injeção da amostra e pelo detector. Os componentes básicos de um equipamento que permite a realização da análise por CG, são mostrados na figura (2.8).

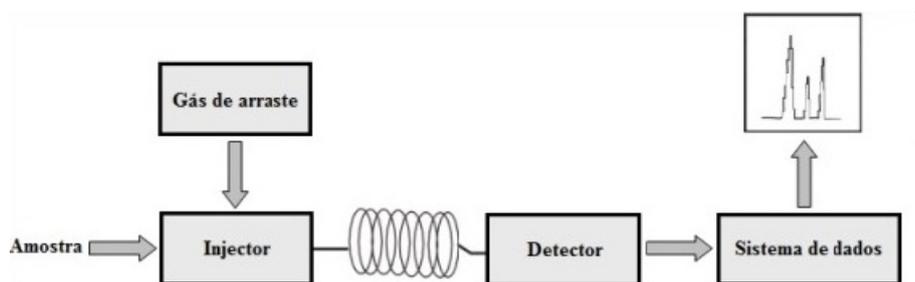


Figura 2.8: Diagrama funcional de um equipamento para cromatografia gasosa evidenciando os seus componentes principais sob a forma de diagrama em blocos.

Em CG, a fase móvel é um gás (ou mistura gasosa). Os gases de “arraste”

mais utilizados são o hélio, o azoto, e o hidrogénio. A escolha da mistura gasosa para a fase móvel mais adequada implica que esta seja quimicamente inerte e a sua escolha depende da disponibilidade, pureza, consumo e tipo de detector utilizado.

Injector

As amostras a resolver por CG podem ser gasosas, líquidas ou sólidas, sendo o método de injeção diferente para cada caso. O método mais comum de injeção envolve o uso de micro-seringas, injectando a amostra através de um orifício de borracha ou silicone localizado no topo da coluna. A temperatura do injector deve ser suficiente para que a amostra líquida vaporize rapidamente sem decomposição ou fraccionamento. Sendo normalmente mantida cerca de 50 °C acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra [20].

Coluna

A separação dos componentes da amostra é feita na coluna. Em cromatografia gasosa, as colunas podem dividir-se em, colunas capilares e empacotadas. Estas variam em comprimento de 2 a 50 metros, sendo construídas por aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou teflon. As colunas capilares são mais eficientes que as empacotadas, obtendo-se melhores separações a baixa temperatura e a intervalos de tempo menores. A temperatura da coluna é uma variável importante que deve ser controlada. A temperatura óptima da coluna depende do ponto de ebulição da amostra e do grau de separação que se deseja. De grosso modo, uma temperatura igual ou ligeiramente acima do ponto de ebulição duma amostra, resulta um tempo de eluição de 10 a 30 minutos.

Quando se pretende separar amostras com volatilidades diferentes, é necessário criar uma rampa de temperatura. Porque os componentes com um ponto de ebulição baixo são eluídos rapidamente, enquanto as espécies menos voláteis levam mais tempo a eluir [18].

Detector

A função do detector, situado à saída da coluna, é registar e medir pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e levados pelo fluxo do gás de arraste. A resposta do detector a cada componente é registada na forma de um cromatograma (abundância relativa vs. Tempo). Os dados são depois processados com recurso a ferramentas informáticas específicas para o efeito.

A escolha do detector depende de vários factores, nomeadamente: sensibilidade adequada; boa estabilidade e reprodutibilidade; resposta linear para os anali-

tos, que permita utilizar várias ordens de grandeza; intervalo de temperaturas, que abranja desde a temperatura ambiente até, pelo menos, 400 °C; similaridade na resposta para todos os analitos ou uma resposta alternativa previsível e selectiva para uma ou mais classes desses analitos; e por fim não destruir a amostra [21].

O detector de ionização em chama é o mais aplicado em GC. O efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogénio. A maioria dos compostos orgânicos produz iões e electrões quando pirolizados á temperatura de uma chama ar/hidrogénio. A detecção envolve o registo da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. Poucas centenas de volts são aplicadas entre a ponta do queimador e um eléctrodo, localizado acima da chama, serve para coletar os iões e electrões. A corrente resultante é medida com um picoamperímetro.

O detector de ionização em chama exhibe alta sensibilidade, larga faixa linear de resposta e baixo ruído. Geralmente é robusta e fácil de usar. Uma desvantagem do detector é destruir a amostra durante a etapa de combustão [18].

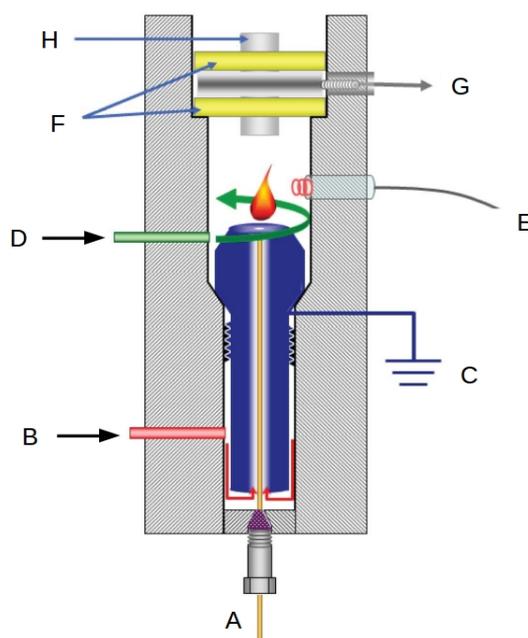


Figura 2.9: Esquema detalhado de um detector de ionização em chama num equipamento CG evidenciando a entrada do gás no detector (A), a entrada de H^+ gerado (B), ligação à terra (C), entrada de ar (D), a fonte de ignição da chama (E), isoladores (F), saída do sinal (corrente eléctrica) para o amplificador (G) e colectar de iões (-200V, H).

2.4 Tratamento de resultados

De seguida vamos resumir algumas questões fundamentais referentes à calibração, quantificação e restante tratamento de resultados e suporte estatístico para a tomada de decisão.

2.4.1 Testes estatísticos

Toda a análise estatística de resultados parte de um certo conjunto de pressupostos essenciais que condicionam drasticamente os resultados e convém por isso enunciar: *a)* ausência de erro sistemático, *b)* erro aleatório com distribuição normal e *c)* erro não correlacionado.

2.4.1.1 Nível de confiança e nível de significância

Ainda que a estimativa central esteja correcta⁴, devido à componente aleatória intrinsecamente envolvida na quantificação, há sempre uma certa margem de possibilidade de se cometer um erro de juízo na avaliação estatística de hipóteses já que trata-se de um evento binomial onde existe uma hipótese inicial (H_0) e uma hipótese alternativa (H_1) que lhe é complementar,

$$p[H_0] + p[H_1] = 1 \quad (2.1)$$

Dado que a hipótese nula (H_0) é concebida no sentido da igualdade, esta será aceite por defeito, se não for demonstrada a sua falsidade. Assim sendo, três situações distintas podem ocorrer no que diz respeito à decisão estatística sobre a validade das hipóteses em estudo, ver tabela 2.2.

Tabela 2.2: Teste estatístico de hipóteses: tipos de erros que podem ocorrer na tomada de decisão.

realidade decisão tomada	$H_0 = V$ ($H_1 = F$)	$H_0 = F$ ($H_1 = V$)
aceitar H_0	\checkmark ($1 - \alpha$)	erro do tipo II (β) (aceitação abusiva)
aceitar H_1	erro do tipo I (α) (rejeição abusiva)	\checkmark ($1 - \beta$)

Desta tabela conclui-se que existem duas situações correctas e duas anómalas.

Nas situações correctas a decisão tomada está em conformidade com a realidade enquanto que nas situações de erro a decisão tomada é antagónica.

⁴Estimativa concordante com o valor correcto.

Assim, os erros estatísticos cometidos podem ser de dois tipos:

a) **erro por excesso** - refere-se a uma falsa rejeição (rejeição abusiva da hipótese quando esta deveria ter sido aceite). Este erro chama-se de erro do tipo I (α) - a hipótese nula estava correcta e foi abusivamente rejeitada por ter sido considerada falsa;

b) **erro por defeito** - refere-se a uma falsa aceitação (aceitação abusiva da hipótese que estava incorrecta). Este erro designa-se por erro do tipo II (β) - a hipótese nula estava errada e foi abusivamente aceite como verdadeira.

Por uma questão de segurança estatística, é preferível cometer um erro por rejeição abusiva (erro do tipo I) do que um erro devido a uma aceitação abusiva (erro do tipo II).

A probabilidade máxima com que se pretende proceder à rejeição abusiva (erro do tipo I) é designada de nível de significância do teste e é designada de α (geralmente indicado em termos percentuais por $100\alpha\%$). A probabilidade de aceitação da hipótese correcta designa-se de nível de confiança e corresponde à probabilidade de $(1 - \alpha)$ (expressa em termos percentuais por $100(1 - \alpha)\%$).

Chama-se de valor de prova a probabilidade de aceitação da hipótese nula, $p[H_0]$.

Na formulação de hipóteses estatísticas, a hipótese nula (inicial, H_0) vai no sentido de não haver diferença significativa: no sentido de pertencer ao grosso da distribuição também designado de $(1 - \alpha)$; a hipótese alternativa (H_1) visa essencialmente a diferença significativa (α): o complemento da hipótese nula.

2.4.1.2 Procedimento

Os testes estatísticos servem para, com critérios estatísticos, auxiliar a tomar decisões na interpretação dos resultados. Os testes estatísticos devem ser efectuados com base numa certa sequência lógica de procedimento.

Formulação do problema Em primeiro lugar deve-se efectuar uma análise do evento por forma a racionalizar a questão e poder testar. Procura-se deste modo traduzir a questão experimental para a lógica estatística: o que é que se pretende provar?

Escolha do teste Com base no que se pretende verificar, o teste é escolhido atendendo à distribuição estatística que melhor se adequa a este tipo de teste. As distribuições estatísticas mais comuns para efectuar testes estatísticos são a normal, t -student, F -Fisher e qui-quadrado.

Estabelecimento do nível de significância Antes de mais, previamente te que ser estabelecido o nível de significância com que se pretende tirar conclusões - prever qual o erro máximo admissível para se tirar conclusões erradas por rejeição abusiva (α).

Regra geral o nível de significância refere-se a $\alpha = 0.05$ podendo também ser baixado para $\alpha = 0.01$ para serem tiradas conclusões mais definitivas, como no caso de testes que impliquem decisões críticas, tais como escolher o melhor modelo de calibração ou retirar pontos da curva de calibração, o nível de significância de referência é o valor $\alpha = 0.01$.

Hipóteses de trabalho As hipóteses colocadas devem ser antagónicas e disjuntas (não sobreponíveis) por forma a abranger o universo do evento.

A hipótese nula (H_0) deve ser formulada no sentido de não haver diferença (está tudo correcto); a hipótese alternativa (H_1) incide sobre a diferença significativa (procura demonstrar a não conformidade) e é estabelecida de forma a abranger o universo complementar da hipótese nula.

Simetria do teste Um vez que a hipótese nula vai sempre no sentido da igualdade, a simetria do teste a efectuar depende da hipótese alternativa formulada. Se o que se pretende é um teste de desigualdade ($H_1 : x_i > x_j$) apenas se está interessado em comparar a sobreposição unilateral de caudas (valores extremos) das duas distribuições o que corresponde a um teste unilateral. Se o que se pretende é um teste de igualdade ($H_0 : x_1 \simeq x_2$), está-se interessado em comparar a sobreposição central do corpo das distribuições (valores interiores, intervalo de confiança) o que irá corresponder a um teste bilateral (as áreas de rejeição situam-se nas duas zonas extremas à distribuição).

Cálculo do teste O valor experimental da função discriminante, TV (parâmetro estatístico) é calculado com base na expressão da distribuição estatística subjacente. Em geral os testes estatísticos baseiam-se nas distribuições t -student, F de Fisher e χ^2 .

Comparação com valores críticos Os valores críticos estão tabelados de acordo com o nível de significância e com o número de graus de liberdade. Estes valores permitem definir as regiões de aceitação e de rejeição das hipóteses formuladas.

Sempre que possível deve-se estimar o respectivo valor de prova, $p[H_0]$, no sentido de confirmar a conclusão anteriormente assumida.

Conclusão No caso do valor experimental exceder os limites tabelados (entrar na região de rejeição) diz-se que ao nível de confiança $100(1 - \alpha)\%$ há diferença

significativa e a hipótese inicial deve ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa (complementar); caso contrário, não há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula.

As normas ISO referentes à qualidade recomendam testes de significância aos níveis de 5% ($\alpha = 0.05$, probabilidade de efectuar 1 insucesso em cada 20 decisões) e 1% ($\alpha = 0.01$, probabilidade de taxa de insucesso de 1/100).

Assim, três situações podem ser obtidas,

$$\begin{cases} TV \leq X_{0.05(v)} & \implies H_0 \text{ aceite} \\ X_{0.05(v)} < TV \leq X_{0.01(v)} & \implies H_0 \text{ dúbia} \\ TV > X_{0.01(v)} & \implies H_1 \text{ aceite} \end{cases} \quad (2.2)$$

2.4.1.3 Testes baseados nas distribuições estatísticas

As distribuições estatísticas (t -student, F e χ^2) estão muito relacionadas com o teste de hipóteses já que estas, devido a serem bem caracterizadas, podem ser utilizadas como termo de comparação em diversas situações reais, providenciando os valores críticos necessários.

> Distribuição t -student Quando está em causa a comparação de estimativas de posição, assumindo que se trata de distribuições normais e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \leq t_{\alpha(n-1)} \quad (2.3)$$

e compara-se este resultado com o valor crítico da distribuição t -student ao nível de confiança de $100 \cdot (1 - \alpha)\%$. Se a hipótese nula assumir a igualdade de valores a hipótese alternativa assume a desigualdade,

$$\begin{cases} H_0 : \bar{x} = \mu \\ H_1 : \bar{x} \neq \mu \end{cases} \iff \begin{cases} H_0 : \bar{x} = \mu \\ H_1 : \bar{x} < \mu \vee \bar{x} > \mu \end{cases} \quad (2.4)$$

e conseqüentemente o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral (hipótese centrada assumindo eventual diferença nos extremos). Caso se procure demonstrar que o valor estimado é superior ao valor correcto, a hipótese nula assume a situação da igualdade (valor inferior ou igual a) enquanto que a hipótese alternativa dá conta desta diferença,

$$\begin{cases} H_0 : \bar{x} \leq \mu & p[H_0] \sim (1 - \alpha) \\ H_1 : \bar{x} > \mu & p[H_1] \sim (\alpha) \end{cases} \quad (2.5)$$

Os valores críticos correspondem à distribuição cumulativa unilateral (hipótese marginal).

> **Distribuição F de Fisher** Quando está em causa a comparação de variâncias de distribuições normais aleatórias e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (2.6)$$

que, no caso de distribuições normais e independentes, deve seguir uma distribuição de Fisher. Como hipóteses assume-se como hipótese inicial (H_0) que não há diferença significativa entre as variâncias (diferença puramente aleatória),

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \end{array} \right. \iff \left\{ \begin{array}{l} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H_1 : \sigma_1^2 < \sigma_2^2 \vee \sigma_1^2 > \sigma_2^2 \end{array} \right. \quad (2.7)$$

o que corresponde a efectuar um teste bilateral para o quociente das variâncias. A hipótese nula (H_0) assume que não há diferença significativa entre variâncias e a hipótese alternativa (H_1) assume que se houver diferença significativa, a variância do numerador excede a do denominador.

O teste F também pode ser efectuado de forma diferencial, também conhecido como teste de Mandel. Este processo consiste em comparar a alteração da variabilidade ($\Delta\sigma^2 = \Delta SS/\Delta v$), o aumento da variabilidade resultante de uma diminuição do número de graus de liberdade, ($v_1 - v_2 > 0$) com uma estimativa puramente aleatória da dispersão ($\sigma_{pe}^2 = \sigma_2^2$)

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta SS/\Delta v}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(v_1 \times \sigma_1^2 - v_2 \times \sigma_2^2)/(v_1 - v_2)}{\sigma_2^2} \quad (2.8)$$

Como hipóteses considera-se H_0 : os objectos/parâmetros removidos não afectam significativamente a variância da população⁵ caso contrário H_1 : estes afectam significativamente a variabilidade final⁶.

> **Distribuição qui-quadrado** Neste caso o valor teste a calcular pode assumir uma das três expressões seguintes, que estão relacionados com a distribuição

⁵Se se tratar de objectos, estes pertencem à distribuição (não são outliers), se se tratar de parâmetros do modelo, estes são supérfluos (não melhoram significativamente a qualidade do ajuste).

⁶No caso de objectos, estes podem ser outliers um vez que a sua remoção diminui drasticamente a variabilidade final; no caso de parâmetros, estes são considerados importantes dado que melhoram significativamente a qualidade do ajuste.

qui-quadrado e que facultam diferentes tipos de abordagens,

$$TV = \begin{cases} \sum_i^N z_i^2 = \sum_i^N \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^2 & \leftrightarrow \text{normalidade (qualidade do ajuste)} \\ \frac{(n-1) \times s^2}{\sigma^2} & \leftrightarrow \text{intervalos de confiança (variância)} \\ \sum_i^N \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} & \leftrightarrow \text{comparação directa (frequências)} \end{cases} \quad (2.9)$$

sendo a primeira opção utilizada na avaliação da normalidade das distribuições.

2.4.1.4 Outros testes

Há diversos testes que não se baseiam nas distribuições estatísticas anteriores mas nem por isso deixam de ser relevantes para a avaliação estatística e tomada de decisão ao nível do controlo da qualidade.

> **Teste de Grubbs** Dado que as estimativas paramétricas são sensíveis a valores “contaminados”, estes valores “outliers” produzem em geral erros de estimativa quer na posição (enviesamento) quer na dispersão (inflação da imprecisão) afectando deste modo tanto a exactidão como a dispersão.

O teste de Grubbs[22, 23] é recomendado pela IUPAC, ISO 17025 e ASTM E-178. Um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central exceder um valor múltiplo do desvio padrão global. Como H_0 assume-se que o valor em causa ($x_?$) não difere significativamente da estimativa central. O valor a calcular é,

$$G = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.10)$$

em que \bar{x} é a média e s_x o desvio padrão dos N valores experimentais (incluindo o valor em causa, $x_?$).

Este valor só é excluído se exceder o valor crítico tabelado referente a 95% de confiança e para n valores experimentais, tabela A.1.

> **Teste de simetria e curtose** Uma vez que a estatística paramétrica convencional está baseada na presunção de que os valores aproximam-se de uma distribuição normal, é de todo conveniente avaliar esta hipótese já que pode comprometer a representatividade da estimativa em termos de posição do valor central (mais provável) bem como do respectivo intervalo de valores (assimetria da distribuição).

O perfil da distribuição normal é testado calculando o valor

$$TV(SC) = \left(\frac{a_3}{\sigma(a_3)} \right)^2 + \left(\frac{a_4}{\sigma(a_4)} \right)^2 \quad (2.11)$$

onde a_3 e a_4 representam as estimativas de simetria e de curtose da distribuição e

$$\sigma^2(a_3) \simeq \frac{6(N-2)}{(N+1)(N+3)} \quad (2.12)$$

$$\sigma^2(a_4) \simeq \frac{4N(N-3) \times \sigma^2(a_3)}{(N+1)(N+5)} \quad (2.13)$$

representam as respectivas variâncias.

A amostra em causa terá um perfil normal se o valor obtido ($TV(SC)$) não exceder o valor crítico previsto pela distribuição qui-quadrado ($\chi_{\alpha(2)}^2$), com dois graus de liberdade, referente ao nível de confiança de $100(1 - \alpha)$.

> **Teste de Cochran** Este teste permite verificar se uma determinada variância máxima (s_{max}^2) (eventual outlier de dispersão) excede estatisticamente os valores de um conjunto de variâncias populacionais. Como hipótese inicial assume-se que não há diferença estatística entre variâncias

$$\begin{cases} H_0 : & s_{max}^2 \leq s_i^2 \\ H_1 : & s_{max}^2 > s_i^2 \end{cases} \quad (2.14)$$

e calcula-se o valor experimental,

$$TV = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (2.15)$$

que não deve exceder o valor crítico tabelado a 95% de confiança referente a N variâncias calculadas com base em M réplicas, tabela A.2.

> **ANOVA** A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada (σ_T^2). Permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatória (σ_0^2) e contribuições sistemáticas entre amostras (σ_A^2).

A ANOVA de factor único baseia-se na decomposição da dispersão total (SS_T) em duas parcelas: a dispersão interna ou puramente aleatória (SS_0)⁷ e a dispersão

⁷Esta dispersão traduz a variabilidade não explicada pelo factor.

causada pelo efeito em estudo (SS_A)⁸

$$SS_T = SS_0 + SS_A \quad (2.16)$$

em que SS significa soma de quadrados.

No caso de haver m_i réplicas em cada nível de factor, a variância interna de cada nível (variabilidade dentro das amostras) é estimada através de,

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{(m_i - 1)} \quad (2.17)$$

em que \bar{x}_i representa o valor médio desse nível.

A variância dentro dos N grupos (variabilidade interna média dos diferentes níveis do factor) é dada pelo somatório das variâncias internas de todos os grupos,

$$s_0^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s_i^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (m_i) - N} \quad (2.18)$$

No caso de o número de réplicas ser idêntico em cada nível do factor em estudo, ($m_i = M$),

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N(M - 1)} \quad (2.19)$$

A variância entre amostras (entre os diferentes níveis do factor A) é dada pela dispersão das médias de cada um dos níveis \bar{x}_i em relação à media global \bar{x} ,

$$s_A^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.20)$$

No caso de o número de réplicas ser idêntico, ($m_i = M$),

$$s_A^2 = \frac{M \cdot \sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.21)$$

Se o factor em estudo (factor A) não influi de modo significativo, ambas as dispersões (dentro dos níveis e entre níveis do factor) são estimativas da variância da componente aleatória. Quando o factor influi de modo significativo, a dispersão devida ao factor A (s_A) torna-se maior que a componente puramente aleatória (s_0).

As hipóteses estatísticas formuladas são:

$$\begin{cases} H_0 : & s_A^2 \leq s_0^2 \\ H_1 : & s_A^2 > s_0^2 \end{cases} \quad (2.22)$$

⁸Relacionada com a variabilidade explicada pelo efeito do factor.

Deste modo, pode ser calculado o teste F para comparar as dispersões,

$$TV = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(N-1, N(M-1))}^u \quad (2.23)$$

2.5 Calibração e quantificação

Nos métodos instrumentais correntes, o detector utilizado produz um sinal que se pretende que seja o mais selectivo possível para um determinado analito de interesse que se pretende quantificar.

Assim sendo, a estimativa do teor do analito na amostra faz-se através de um método comparativo - procura-se inicialmente descrever a função de resposta instrumental ao analito através de uma função matemática designada de modelo. Em termos instrumentais e metrológicos⁹, designa-se de calibração a operação de verificação e ajuste do sinal instrumental de modo a que o valor reportado pelo equipamento corresponda a uma determinada unidade definida no sistema internacional de unidades (SI). No laboratório, usualmente recorre-se a este termo para definir a função que relaciona a concentração de padrões¹⁰ e o sinal instrumental gerado pelo detector do equipamento.

Em termos numéricos a calibração consiste em definir uma função de resposta ($f(x_i; b_j)$) capaz de descrever a dependência do sinal instrumental (y_i) da variável independente (concentração, x_i) manifestada através de alguns parâmetros (b_j) de modo minimizar o erro do modelo (e_i),

$$e_i = y_i - f(x_i; b_j) \quad (2.24)$$

O erro total do ajuste do modelo de calibração (SS) pode ser estimado com base em

$$SS = \sum_{i=1}^N (e_i)^2 = \sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; b_j))^2 \quad (2.25)$$

Como modelos de funções de resposta ($f(x_i; b_j)$) regra geral usa-se polinómios de baixo grau (1º ou 2º graus) de forma a conseguir traduzir, de modo computacionalmente facilitado¹¹, a resposta instrumental.

⁹A metrologia refere-se à ciência que lida com a quantificação e estimativa de valores.

¹⁰Soluções padrão são soluções que contêm um teor bem conhecido de determinado analito.

¹¹As funções polinomiais permitem descrever, de modo simples, uma resposta que linear ou inclusivamente com determinada curvatura. A maior vantagem deste tipo de funções é que os seus parâmetros são linearmente dependentes e que, por este facto, as derivadas parciais do modelo em função aos respectivos parâmetros são independentes destes o que permite estimar com todo rigor os parâmetros do modelo directamente, através de operações matriciais e sem recurso a métodos iterativos de aproximação.

Diferentes estratégias podem ser seguidas de forma a minimizar o erro do ajuste, eq.(2.25), de entre as quais se consideram a a) a estimativa robusta e b) a estimativa por mínimos quadrados.

No primeiro caso, a estimativa robusta [24], os parâmetros do modelo são estimados separadamente com base em derivadas numéricas (desde o grau igual ao polinómio até ao grau zero) usando a mediana¹² como método de estimativa robusta. Contudo, esta abordagem não tem suporte estatístico (via modelo de erro) mas terá tanto mais significado quanto maior for a dimensão da amostra considerada ($N \sim \infty$).

Já no segundo caso, a estimativa por mínimos quadrados, implica uma estimativa paramétrica baseada em todos os N valores experimentais ($N < 20$). Este facto confere alguma vulnerabilidade deste tipo de abordagem já que, a presença de valores discrepantes (anómalos ou “outliers”) frequentemente produz erros sistemáticos¹³ nas estimativas de posição e inflação das estimativas de incerteza obtidas por esta via.

Foi anteriormente referido que as funções mais convenientes para utilizar como modelo de calibração são polinómios de baixo grau. No caso de ser um polinómio de primeiro grau (P_{01})

$$P_{01} : f(x_i; b_0, b_1) = b_0 + b_1 \cdot x_i \quad (2.26)$$

ou de segundo grau (P_{012})

$$P_{012} : f(x_i; b_0, b_1, b_2) = b_0 + b_1 \cdot x_i + b_2 \cdot x_i^2 \quad (2.27)$$

a estimativa média de erro do modelo

$$\sigma_{f\hat{u}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - f(x_i; b_j))^2}{(N - p)}} \quad (2.28)$$

é muitas vezes utilizada para estimar incertezas quer na estimativa do teor do analito quer na estimativa dos limiares analíticos do método.

Como iremos ver de seguida, há diferentes estratégias analíticas que permitem estabelecer a relação entre o teor do analito e o respectivo sinal instrumental gerado.

¹²A mediana corresponde ao percentil 50%. este facto confere-lhe uma elevada robustez já que o seu ponto de quebra está muito próximo de 50% (ligeiramente a baixo deste valor).

¹³Enviesamento do valor estimado em relação ao valor correcto.

2.5.1 Curva de calibração

A forma mais usual de se executar a calibração de um instrumento é através da curva analítica (ou curva de calibração). Este processo consiste em preparar padrões com concentrações bem conhecidas do analito e matriz (veículo de suporte onde coexiste o analito) o mais próximo da realidade da amostra em estudo. Estas soluções são introduzidas no equipamento e o respectivo sinal instrumental gerado é registado.

Se se considerar uma grande amplitude de concentrações, regra geral, a resposta analítica apresenta um certo encurvamento, ver figura (2.10).

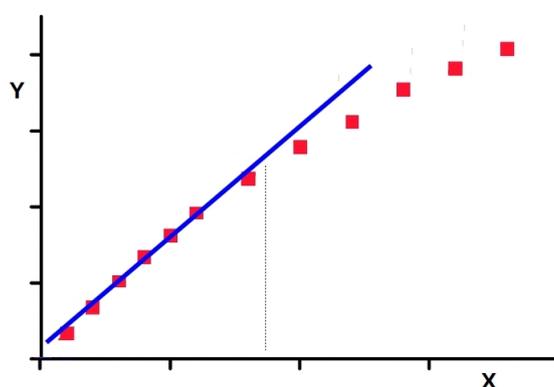


Figura 2.10: Curva de calibração exemplificativa da perda de linearidade da resposta instrumental (Y) em função do teor de analito (X): a curva a azul sobreposta representa uma dependência linear (P_{01}) e o tracejado vertical delimita a região de resposta linear.

Nestes casos, o modelo de calibração mais adequado deve ser por isso um polinómio de segundo grau (P_{012} , eq.(2.27)). Contudo, este modelo conduz a estimativas paramétricas difíceis de implementar.

A solução mais conveniente passa quase sempre por restringir a gama analítica a uma zona de resposta mais linear, ver figura (2.10). Deste modo as estimativas paramétricas são muito mais convenientes e fáceis de calcular.

Através de métodos numéricos diversos procura-se definir uma função que descreva a dependência da resposta instrumental em função da concentração do analito contido nos padrões, ver figura (2.11).

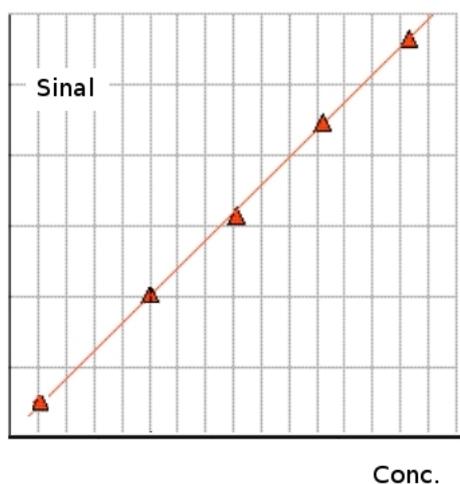


Figura 2.11: Esquema simplificado de exemplificação de uma curva de calibração: os valores experimentais (triângulos a vermelho) representam as leituras instrumentais (sinal) em função da respectiva concentração; a linha contínua traduz a função de calibração que relaciona o sinal instrumental com a concentração do analito em causa.

No sentido de facilitar a quantificação do teor do analito nas amostras, na calibração pretende-se estabelecer uma relação linear entre concentração do analito e o respectivo sinal de resposta do equipamento.

Neste caso os cromatogramas para os padrões são obtidos, e as áreas são utilizadas para a obtenção de um gráfico em função da concentração para se obter a curva analítica. Este gráfico deve obter uma reta que passe pela origem que depois irá servir para a obtenção dos valores para a análise quantitativa. A calibração deve ser frequente para maior exatidão [18].

Uma vez definida a calibração do equipamento com uma função P_{01} , eq.(2.26), pode-se agora fazer a quantificação do analito utilizando-se para o efeito a função inversa da calibração - com base no sinal instrumental obtido (\bar{Y}_A) com a amostra pretende-se estimar o teor do analito (X_A) presente através de

$$X_A = \frac{\bar{Y}_A - b_0}{b_1} \quad (2.29)$$

e a respectiva incerteza (erro padrão, $\sigma(X_A)$) estimada através de

$$\sigma(X_A) = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{Y}_A - \bar{y})^2}{b_1^2 \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.30)$$

onde \bar{Y}_A é o valor médio do sinal da amostra (obtido através de M réplicas) e (\bar{x}, \bar{y})

são as coordenadas do centróide¹⁴ da curva de calibração.

Uma vez obtidas as estimativas paramétricas do teor e respectiva incerteza, equações (2.29) e (2.30), após a respectiva correcção ao factor de diluição, utiliza-se os valores da distribuição *t-student* bilateral ao nível de significância $\alpha = 0.05$ com $(N - 2)$ graus de liberdade para estimar os respectivos intervalos de confiança a 95%.

2.5.2 Adição de padrão

Por vezes a quantificação através de curva de calibração não é viável - em certos casos a matriz da amostra produz desvios sistemáticos significativos que têm de ser compensados. Nestes casos recomenda-se o método de adição de padrão.

O seu procedimento genérico consiste em registar o sinal directo (sem qualquer alteração da amostra). De seguida são incrementadas doses de analito sobre a amostra inicial e, em cada um desses casos avaliado o respectivo sinal instrumental conduzindo a um gráfico do tipo da figura (2.12).

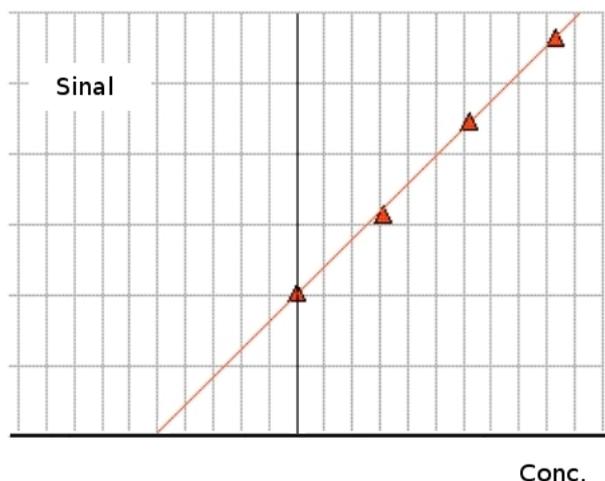


Figura 2.12: Esquema simplificado exemplificativo de uma curva de calibração aplicando o método de adição de padrão: nas ordenadas representa-se o sinal instrumental obtido em função da quantidade de analito adicionada à amostra.

¹⁴Estas coordenadas correspondem aos valores médios obtidos para o sinal ($\bar{y} = \sum y_i / N$) e concentração ($\bar{x} = \sum x_i / N$).

A determinação da concentração do componente em estudo é obtida através de

$$X_A = -\frac{b_0}{b_1} \quad (2.31)$$

que corresponde ao valor obtido por extrapolação da curva analítica até o eixo das abcissas (variável independente, regra geral uma concentração), considerando esse valor em módulo.

Este método é mais moroso e vai requerer maior quantidade da amostra e tempo de execução. Por outro lado, todas as amostras preparadas estarão submetidas às mesmas condições de matriz, minimizando ao máximo interferências na análise desta natureza.

2.5.3 Padrão interno

Existem ainda outras condições analíticas que dificultam a correcta quantificação. Por vezes o processo analítico envolve diversos processos de tratamento da amostra (ex: extracções, redissoluções,...) ou existe baixo rigor na sub-amostragem (ex: micro volumes injectados).

O modo mais usual de contornar esta dificuldade passa por fazer a adição prévia de um padrão (ou vários) à amostra, previamente ao processo responsável pela redução do rigor analítico.

O Padrão Interno (PI) é uma substância que tem de estar ausente na amostra. É adicionada em quantidade constante a todas as amostras, brancos e padrões [18]. O facto de se utilizar uma técnica separadora, como é o caso da cromatografia, o PI também tem de ser facilmente discriminado dos restantes analitos presentes na amostra.

A quantificação baseia-se no pressuposto de que, a sensibilidade da resposta ao analito e ao PI se mantêm constantes durante a análise. Deste modo o quociente de áreas dos sinais analito/PI (Y_A/Y_{PI}) é a variável dependente a utilizar e o quociente de concentrações (X_A/X_{PI}) a variável independente. Assumindo uma resposta do tipo P_{01} , eq.(2.26),

$$\left(\frac{Y_A}{Y_{PI}}\right) = b_0 + b_1 \cdot \left(\frac{X_A}{X_{PI}}\right) \quad (2.32)$$

Para se estimar a respectiva concentração na amostra (X_A) usa-se

$$X_A = \left[\frac{\left(\frac{Y_A}{Y_{PI}}\right) - b_0}{b_1} \right] \cdot X_{PI} \quad (2.33)$$

e a respectiva incerteza virá como uma propagação de erro do tipo

$$\sigma(X_A) = \sqrt{\sigma^2(calib) + \sigma^2(PI)} \quad (2.34)$$

em que $\sigma(calib)$ e $\sigma(PI)$ traduzem as contribuições de erro devidas à calibração (expressão similar à eq.(2.30)) e ao PI utilizado (valor inscrito no respectivo certificado).

Em CG a maior forma de se obter uma boa precisão é através da utilização de padrões internos porque as incertezas introduzidas pela injeção da amostra na coluna são desta forma minimizadas [18, 25]. Neste tipo de análise o que se faz é adicionar uma quantidade conhecida de uma substância estranha (padrão interno) à amostra a analisar e garantir que existe um coeficiente de resposta fixo dessa substância acrescentada. Dado que o sinal cromatográfico integrado é proporcional à quantidade de analito injectada, as variações de volume de injeção podem ser compensadas usando-se o padrão interno como referência, permitindo deste modo compensar os erros cometidos no volume injetado [25]. Neste caso a razão entre a área do pico do analito (ou sua altura do pico) e a área do pico do padrão interno (ou sua altura) é utilizada como parâmetro analítico.

Para que este método seja bem sucedido, é necessário que o sinal cromatográfico do padrão interno esteja bem resolvido (separado) em relação aos sinais dos restantes componentes da amostra. Contudo este deve situar-se próximo ao sinal do analito a quantificar para garantir que as condições de quantificação são similares.

O padrão interno tem que ter alto grau de pureza, não ter propriedades que interfiram com a amostra, tem que ser estável, apresentar uma faixa linear aceitável e não estar inicialmente presente na amostra [26].

2.6 Validação

Para garantir que o método AOAC (Association of Official Analytical Chemists) desenvolvido por cromatografia gasosa é adequado e fiável para a análise de gordura total em alimentação humana, foi utilizado o processo de validação de metodologia analítica.

A necessidade de se evidenciar a qualidade de medições químicas é cada vez mais exigida e reconhecida e esta é geralmente avaliada em termos de compatibilidade, rastreabilidade e confiabilidade.

Por outro lado resultados analíticos não confiáveis podem levar a: decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para controlar estes resultados e

garantir que o método nos dará resultados interpretáveis e confiáveis sobre a amostra em questão esta tem que passar por algumas etapas de avaliação denominadas de validação.

Ter validado um resultado significa que o procedimento, que inclui desde as condições de operação do equipamento até toda a sequência analítica, seja aceito como correto. Para isso, estabelecem-se níveis de exigência que podem definir a aprovação do produto ou espécie em estudo.

Para tanto, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos que utilizam conduzem a resultados confiáveis, que garantam qualidade, idoneidade e credibilidade de seus produtos e/ou serviços. É importante enfatizar que qualquer alteração de métodos normalizados implica em revalidar o método [27].

Segundo a norma ISO/IEC 17025 [1], “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” [9].

Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se portanto de um termo não-específico. determinado o método, este considera-se validado se os pré-requisitos forem comprovados através das experiências obtidas. o objetivo da validação é comprovar e demonstrar que o método analítico é adequado ao seu propósito. consideração o processo validado se este for desenvolvido ou for adaptado segundo metodologias que já tenham sido validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos [27].

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados. Nenhum dos objetivos dos ensaios será devidamente alcançado se o teste não for confiável e não apresentar, no mínimo: precisão, exatidão e repetitividade dos resultados. O conhecimento dos factores que afectam os ensaios e seu controle favorece a obtenção de resultados reprodutíveis.

Os elementos para a validação que permitem o bom desempenho das técnicas são descritas na literatura especializada (para métodos quantitativos) segundo a Farmacopeia /USP) são [28]:

- Especificidade e seletividade;
- Gama de trabalho e linearidade da curva de calibração;
- Sensibilidade;
- Limites de quantificação: decisão, detecção e quantificação;

- Precisão: repetibilidade intermédia e reprodutibilidade;
- Exactidão;
- Robustez;
- Coerência.

Para diferentes tipos de procedimentos analíticos existem algumas características que podem sofrer algumas alterações. a tabela seguinte lista essas características consideradas como as mais importantes. Esta lista deve ser considerada de modelo para os procedimentos de análise citados, mas existem exceções pontuais que têm de ser analisadas com mais cuidado. O último parâmetro da validação, a robustez, não se encontra na tabela, mas deve ser considerado numa fase adequada no processo analítico.

Depois de um método ter sido validado este não é definitivo, nem para sempre, devido a qualquer alteração na preparação do composto que constitui a amostra, na mudança do procedimento analítico, alterações na composição do produto ou simplesmente devido a desfasamentos temporais, este procedimento deve ser sujeito a uma nova revalidação.

A validação de um método analítico não tem necessariamente que passar por todas as etapas anteriormente citadas - por vezes é suficiente apenas demonstrar algumas delas, fazendo uma validação parcial do método. Na tabela (2.3) apresenta-se a sugestão da ICH em termos de validação parcial de métodos analíticos.

Tabela 2.3: Processos de validação de acordo com o tipo de ensaio em questão.

Tipo de procedimento analítico	Identificação	Teste de impurezas	Doseamento	
	Quantificação		Limite	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermédia	-	+	-	+
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de deteção	-	- (3)	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	+
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

- Significa que esta característica não é normalmente avaliada; + Significa que esta característica é normalmente avaliada;

(1) nos casos em que a reprodutibilidade, foi realizada, precisão intermédia não é necessário verificar;

(2) a falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por apoio a outros procedimentos analíticos;

(3) pode ser necessária em alguns casos.

2.6.1 Especificidade e selectividade

Segundo a Decisão 2002/657/CE da Comunidade Europeia [29] a especificidade é a capacidade de um método distinguir a substância a analisar de outras substâncias. Já a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)[30] e o Vocabulário Internacional Metrológico (VIM)[31] apresentam uma definição para selectividade que é a extensão em que o método pode ser usado para determinar certos analitos em uma mistura ou matrizes sem a interferência de outros compostos semelhantes e não recomendam o termo especificidade.

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar inequivocamente o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito [32].

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes [27]. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende no entanto do tipo de compostos a analisar. outra maneira de avaliar a especificidade envolve a adição de padrão analítico ou a comparação com padrão externo [33].

A especificidade pode ser determinada sobre a forma de erro sistemático através da contabilização da influencia de dopantes no sinal do analito. este erro

sistemático pode ser avaliado sob a forma de: erro absoluto, erro relativo e taxa de recuperação.

Outra forma de avaliar a especificidade/selectividade é através da relação entre a concentração recuperada e a de fortificação, que deve ser linear. Assim, estima-se a capacidade do método em desviar-se linearmente da recuperação ideal (100%) [33].

2.6.2 Gama de trabalho

Segundo a International Conference Harmonization (ICH) [34] a gama de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a concentração superior e inferior do analito na amostra para os quais é demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exactidão e linearidade, devendo abranger a faixa de aplicação para a qual o método vai ser usado e são necessários no mínimo cinco padrões para estabelecer a gama de linearidade.

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações onde o analito pode ser determinado com precisão, exactidão e linearidade através desse método analítico [32]. Para os métodos que apresentam boa linearidade, é suficiente construir uma curva de calibração.

Quando se utiliza uma metodologia que envolva uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias. Para tal, recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 para modelos lineares [35] e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau [36]. Em ambos casos, de modo consensual, para a construção da curva de calibração segundo estas normas é recomendável um mínimo de 10 padrões e 10 réplicas de branco do padrão.

2.6.3 linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada gama de aplicação. Apesar de só dois pontos definirem uma recta, na prática as funções de calibração devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o valor referente ao padrão de concentração nula (branco).

A avaliação da linearidade faz-se através de um teste estatístico - Teste de Mandel [35, 37] - através da comparação do desempenho no ajuste dos valores experimentais com polinómio de primeiro (P_{01}) e segundo graus (P_{012}).

O valor de teste (TV) é estimado através de

$$TV = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(\Delta SS/\Delta v)}{\sigma_{fit(P_{012})}^2} \quad (2.35)$$

onde $\Delta\sigma_{fit}^2 = \Delta SS / \Delta v$ representa a variação no erro quadrático do ajuste, eq.(2.28), e σ_{pe}^2 é uma estimativa de erro puramente aleatório, regra geral, dado pela variância do ajuste com o modelo com maior número de parâmetros, que neste caso é o P_{012} ($\sigma_{fit(P_{012})}^2$).

2.6.4 Sensibilidade

A sensibilidade é a medição da capacidade de um método ou aparelho distinguir pequenas diferenças de concentração do analito presente numa amostra. Em métodos que envolvam uma curva de calibração, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração numa determinada zona de concentração [34], tal como é indicado na equação 2.36

$$E = \frac{dy}{dx} \quad (2.36)$$

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito faz com que ocorra uma grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade medida, causada por um pequeno aumento na concentração ou quantidade do analito. devido a isto, tornou-se usual a utilização desse termo para designar os métodos com baixo limite de detecção [38].

2.6.5 Limiares analíticos

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de detecção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração, ou seja a um nível de concentração baixo. Estes valores de concentração são estimados com base na incerteza da quantificação do analito e podem ser obtidos através de: réplicas do branco, incerteza dos parâmetros da curva de calibração e incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração.

Sempre que possível deve-se estimar os limites inferiores com base nas leituras de réplicas de branco de padrão. No caso de não se dispor de brancos de padrão ou algum destes limites conduzir a uma concentração sem significado físico deve-se utilizar os parâmetros da recta de calibração. Só em último caso deve ser utilizado o desvio padrão do ajuste para este propósito [34].

2.6.5.1 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à concentração mínima da substância a analisar que pode ser detectada pelo método (X_{LD}) com precisão e exactidão adequadas e que pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica.

Existem várias definições e critérios para a obtenção do limite de detecção. Para o ICH,[34] o LD de um procedimento individual analítico é a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exacto - pressupõe uma chance de $\alpha = 0.05$ e $\beta = 0.05$ para os erros de falsa detecção e falsa não-detecção, respectivamente.

Pode ser estimado através:

- de avaliação visual - por análise de amostras com concentrações conhecidas do analitos e estabelecendo o nível mínimo em que o analito pode ser confiavelmente detectado;
- da análise de réplicas de brancos - o valor médio do sinal obtido pode ser convertido em limiar analítico;
- da ordenada na origem (b_0) - no caso do modelo possuir o termo independente com significado estatístico¹⁵;
- do desvio padrão do ajuste (σ_{fit}) - se a função de calibração corresponde a P_{01} através da seguinte equação:

$$X_{LD} = \frac{3.30 \sigma_{fit}}{b_1} \quad (2.37)$$

- na relação sinal-ruído (S/N), que é determinada por comparação de sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito com os de amostras em branco; e no desvio padrão da amostra e inclinação da curva analítica[34].

2.6.5.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração da substância a analisar (X_{LQ}) que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exactidão. Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para se ter a certeza se a exactidão e precisão obtidas são satisfatórias. Segundo a directiva 2002/657/EC o intervalo de concentração deverá ser 3 vezes o LMR¹⁶ e a relação sinal/ruído (S/N) maior ou igual a 10.

Na prática, quando a curva de calibração já se encontra bem definida ou verificada, corresponde normalmente, ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, depois de ter sido determinado, deve ser testado

¹⁵Diz-se que um determinado parâmetro tem significado estatístico quando o seu valor não é nulo ou seja, o seu intervalo de confiança da estimativa não contém o valor nulo.

¹⁶Este parâmetro diz respeito à quantidade máxima de resíduo específico para cada analito.

para averiguar se a exactidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da determinação, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar da quantificação.

De modo similar o limite de quantificação pode ser estimado através de expressões similares ao limite de detecção.

A expressão mais corrente para limite de quantificação é dada pela seguinte equação

$$X_{LQ} = \frac{10.0 \sigma_{fit}}{b_1} \quad (2.38)$$

2.6.6 Precisão

A precisão do método analítico indica o grau de proximidade relativa dos valores obtidos através da repetição dos ensaios analíticos nas mesmas condições.

De acordo com a literatura os critérios experimentais usados na avaliação da precisão são a seguir referidos para: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A repetibilidade consiste no grau de concordância entre os resultados obtidos de medições sucessivas de uma mesma experiência, efectuadas nas mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade como por exemplo: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo laboratório e repetições em curto espaço de tempo.

De acordo com a ICH [34], deve ser realizado um mínimo de 9 determinações dentro do limite estabelecido (3 níveis 3 repetições para cada uma) ou um mínimo de 6 determinações. A precisão intermédia expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a alterações das condições em que se realiza a experiência, como, diferentes equipamentos, dias, analistas, etc. A reprodutibilidade refere-se aos resultados obtidos de colaboração entre diferentes laboratórios [33], ensaios interlaboratoriais, reflete a amplitude de erros aleatórios de quantificação à escala mundial e avalia a concordância de resultados entre ensaios sobre a mesma amostra em condições operacionais bem definidas.

A norma ISO 8466-1:1990 [35] permite estimar a precisão média da estimativa da concentração do analito através de

$$V_X = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \quad (2.39)$$

onde b_1 representa a sensibilidade obtida através do ajuste dos valores obtidos na calibração com um polinómio de primeiro grau (P_{01}).

Esta imprecisão pode ainda ser dada em termos relativos através de

$$\%CV_X = 100 \times \frac{V_X}{\bar{X}} \quad (2.40)$$

onde \bar{X} representa o valor médio da concentração dos padrões utilizados na calibração (abscissa do centroide da curva de calibração).

A expressão (2.40) é mais vantajosa porque, sendo esta relativa, pode ser mais facilmente utilizada na comparação de desempenhos entre métodos.

No caso de se se tratar de um conjunto de medidas obtidas por quantificação directa é usual exprimir a imprecisão em termos de coeficiente de variação

$$\%CV = 100 \times \frac{\sigma}{\bar{X}} \quad (2.41)$$

uma vez que este valor relativo permite a sua fácil comparação entre amostras e entre métodos.

2.6.7 Exactidão

A exactidão diz respeito à proximidade entre o resultado de um ensaio e o seu valor de referência aceite como verdadeiro. A exactidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, obtidos em laboratório está dependente de erros sistemáticos. A ICH [34] recomenda avaliar a exactidão com um mínimo de nove determinações/ensaios e contendo no mínimo três níveis de concentração definidos e diferentes de forma a abranger um intervalo estabelecido. Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método são: amostras de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Por sua vez a Directiva 2002/657/EC recomenda avaliar a exactidão contendo por exemplo, 18 porções de ensaio em branco que pode ser seleccionado com 6 padrões 1, 1.5 e 2 vezes o LMR, de forma a abranger um intervalo estabelecido [39].

A exactidão pode ser estimada internamente ao laboratório através de ensaios de recuperação sendo esta expressa através da taxa de recuperação ($\%RI$), estimada com base em

$$\%RI = 100 \times \frac{C_2 - C_0}{C_1} \quad (2.42)$$

onde C_2 representa o valor obtido na concentração da amostra final, C_0 o valor inicial da concentração na amostra (antes da fortificação) e C_1 o valor da concentração adicionada à amostra analisada de forma a obter o valor final C_2 .

2.6.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida da capacidade do método em se manter inalterável no seu desempenho analítico face a pequenas variações nos seus parâmetros experimentais. Ou seja, um método diz-se robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado onde tem que se ter conta todo o procedimento laboratorial e os erros associados.

Para tal pode-se recorrer ao tratamento de Youden [40, 41], que permite não só avaliar a robustez de um método, como também verificar a influência de cada uma das variações nos resultados obtidos. Uma maior robustez de um método revela maior insensibilidade (dependência) de factores experimentais deliberadamente alterados, o que é vantajoso, pois o método continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações efectuadas. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método quanto à sua precisão.

A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iónica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extracção, agitação, etc.

2.6.9 Coerência

A coerência do método analítico diz respeito à concordância de valores ao serem introduzidas aleatoriamente variações nas condições experimentais do método. De acordo com a USP, esta pode ser medida através da reprodutibilidade dos resultados obtidos sob a variação de diversas condições experimentais (ex: diferenças dentro do laboratório, analistas, instrumentos, reagentes, períodos de trabalho, etc) e pode ser expressa sob a forma de %RSD [28].

2.7 Quantificação da incerteza

A validação de um método analítico não poderia estar completa sem se proceder à avaliação da incerteza global do método no sentido de demonstrar que o método apresenta a fiabilidade desejada e cumpre os seus objectivos.

Nesta secção vamos abordar a nomenclatura própria, provenientes da metrologia, para esta abordagem analítica. Posteriormente iremos efectuar alguns diagnósticos das fontes de incerteza que contribuem para a incerteza total do método, o tratamento de incertezas do tipo *A* e *B*, a estimativa da incerteza combinada (u_c) e obtenção da estimativa de incerteza expandida (U).

Antes de fazer um resumo sistemático do procedimento da quantificação da incerteza convém definir alguns termos fundamentais com ela relacionados.

2.7.1 Nomenclatura

Em metrologia, chama-se incerteza ao parâmetro associado à medição que permite caracterizar a dispersão dos valores experimentais obtidos e é utilizada no processo de quantificação dessa propriedade.

A estimativa da incerteza da medida deve considerar as componentes de erro aleatório e de erro sistemático em relação ao valor normal (real, conhecido, valor de referência, valor consensual, previsto, verdadeiro, etc.).

O erro aleatório não pode ser corrigido enquanto que o erro sistemático pode ser compensado ou eliminado.

A imprecisão e o erro sistemático (desvio) são características de qualquer medição efectuada.

Incerteza padrão A incerteza padrão (u) é dada pelo erro padrão associado a uma medição - pode referir-se ao desvio padrão no caso de ensaio único ($M = 1$).

Incerteza relativa A incerteza relativa (RSU) é uma incerteza adimensional normalizada com a estimativa central em valor absoluto.

Incerteza padrão combinada A incerteza padrão combinada (u_c) traduz o erro padrão associado ao resultado de uma medição em particular (ou série de medições) e toma em consideração diversas componentes da incerteza.

Incerteza expandida A incerteza expandida (U) é uma incerteza padrão combinada multiplicada por um termo constante k que lhe garante uma certa taxa de cobertura estatística (nível de confiança) da distribuição referente à incerteza da estimativa.

2.7.2 Pressupostos

Para se proceder à quantificação da incerteza da medida efectuada assumem-se os seguintes pressupostos:

i) cada componente de incerteza é traduzida e quantificada através do respectivo erro padrão¹⁷,

¹⁷Todas as incertezas padrão possuem unidades e devem ser reportadas nas mesmas unidades que as expressas na expressão determinando.

ii) todos os desvios estão supostamente corrigidos (no bias, $\Delta \simeq 0$) por forma a que todas as incertezas coincidem com a incerteza da correcção,

iii) todos os intervalos de incerteza são simétricos,

iv) as componentes da incerteza são classificadas em dois tipos de grupos dependendo da sua origem e não do tipo de erro. Há dois tipos de incertezas a considerar:

- incerteza do **Tipo A** - diagnóstico da componente da incerteza recorrendo a métodos estatísticos,

- incerteza do **Tipo B** - componentes da incerteza avaliadas por outros meios (outros laboratórios, entidades, etc.),

v) a incerteza combinada (u_c) representa o erro padrão global do valor a reportar; resulta da combinação de todas as incertezas (A e B) sob a forma da adição de variâncias,

vi) a incerteza expandida (U) resulta do produto da incerteza combinada pelo respectivo valor de t -student para um certo nível de confiança e referente a um determinado número de graus de liberdade

$$U = k \times u_c = t_{\alpha(v)}^b \times u_c \quad (2.43)$$

Em geral a incerteza é reportada ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$). Para um grande número de graus de liberdade ($n > 15$), o pode ser utilizado o valor $k = 2$ para aproximar a cobertura ao nível de confiança de 95% do valor estimado.

2.7.3 Estimativa da incerteza

Para se proceder à estimativa da incerteza total na quantificação do analito é necessário: especificar a mensuranda, identificar as diversas fontes de incerteza, quantificar cada uma das componentes da incerteza, estimar a incerteza combinada e calcular a incerteza expandida.

1. Especificação da mensuranda

Antes de mais é necessário definir a expressão utilizada na quantificação, que conduz ao cálculo em questão, evidenciando os termos que contêm incertezas associadas. Se o valor a reportar não pode ser directamente avaliado mas é estimado através da comparação com valores da substância de referência (padrões), a equação que combina as várias quantidades deve ser definida.

2. Identificação das fontes de incerteza

A incerteza global apresenta diversas fontes e deve-se essencialmente a:

- amostragem (ex: falta de representatividade devido à falta de homogeneidade)
- pré-tratamento, acondicionamento e armazenamento (ex: perdas e contaminações, estabilidade do analito)
- efeitos instrumentais (ex: calibração e manutenção do equipamento)
- desvios do método (ex: estequiometria do processo, reacções paralelas e incompletas, ...)
- pureza dos reagentes (ex: efeitos não controlados)
- condições experimentais (ex: temperatura ambiente, luminosidade, ...)
- efeitos de matriz (amostra)
- incertezas no cálculo (curva de calibração, réplicas, ...)
- efeito do operador (analista)
- efeitos não controlados (aleatórios)

3. Quantificação das fontes de incerteza

Diagnóstico da incerteza do **tipo A**:

O erro do tipo A (erro estimado internamente, no laboratório) contém duas componentes - aleatória (que não pode ser corrigida) e sistemática (que teoricamente, pode ser corrigida). A incerteza do tipo A é expressa sob a forma de desvio padrão da média.

Diagnóstico da incerteza do **tipo B**:

Esta fonte de incerteza depende de estimativas efectuadas previamente por outras entidades (organismos, fabricante, ...) nas condições usuais de procedimento. Geralmente vem expressa sob a forma de intervalo de confiança ($\pm a$). Em geral duas situações podem surgir:

a) o intervalo de confiança indicado foi estimado para um certo nível de confiança

Neste caso assume-se uma distribuição normal e estima-se a incerteza ($u(x)$) com base nos respectivos valores da distribuição bilateral de t -student; se não forem conhecidas o número de réplicas em que o cálculo se baseou, considera-se um número infinito de réplicas.

b) o intervalo de confiança especificado não tem nível de confiança associado

Assume-se que o nível de confiança é de 99%. De acordo com o tipo de distribuição prevista para a variável em causa e estima-se a respectiva imprecisão.

A distribuição uniforme é assumida para o caso de a variável em questão poder apresentar com uma certa frequência os valores extremos

$$(x \pm a) \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (2.44)$$

Se se suspeitar de que os valores extremos são pouco frequentes deve-se aceitar a distribuição triangular como representante desta fonte de erro aleatório

$$(x \pm a) \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (2.45)$$

São exemplos as estimativas de erro com material volumétrico aferido.

Se for expressamente indicado de que a dispersão aleatória é normal ou se existir uma forte suspeita de esta resultar de diversas fontes de erro independente, a incerteza deve ser estimada assumindo uma distribuição normal

$$(x \pm a)_{\alpha=0.01} \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{9}} = \frac{a}{3} \quad (2.46)$$

$$(x \pm a)_{\alpha=0.05} \Rightarrow u(x) = \frac{a}{\sqrt{4}} = \frac{a}{2} \quad (2.47)$$

4. Estimativa da incerteza combinada

Regra geral, a incerteza é combinada sob a forma de estimativa de erro indeterminado e independente. Se se assumir que o determinando possui a seguinte expressão

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_p)$$

a incerteza combinada referente ao determinando é dada através da expressão de propagação de erro indeterminado

$$u_c = u(f(x_1, x_2, \dots, x_p)) \Rightarrow u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \times u(x_i) \right)^2 \quad (2.48)$$

onde $(\partial f / \partial x_i)$ representa o coeficiente de sensibilidade da função determinado em relação à variável x_i .

No caso de existir erro indeterminado correlacionado, a expressão anterior vem

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \cdot u(x_i) \right)^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j>i}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \cdot u(x_i) \right) \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_j} \right) \cdot u(x_j) \right) \cdot r_{ij} \quad (2.49)$$

em que r_{ij} representa o coeficiente de correlação dos erros indeterminados entre as variáveis i e j .

5. Estimativa da incerteza expandida

A incerteza expandida (U) calcula-se através da multiplicação da incerteza combinada pelo factor de cobertura desejado

$$U = k \times u_c \quad (2.50)$$

O factor de cobertura (k) tem por finalidade expandir a incerteza combinada (u_c) por forma a definir um intervalo de confiança ao qual está associada uma determinada probabilidade. A taxa de cobertura geralmente é calculada para o nível de confiança de 95% ($\alpha = 0.05$).

Se o número de graus de liberdade for baixo ($\nu < 15$) deve-se utilizar os valores da distribuição t -student (bilateral) como factor de cobertura. Caso contrário, assume-se $k = 2$.

A indicação do resultado analítico deve ser sob a forma de intervalo de confiança

$$\mu_X = \bar{X} \pm U \quad (2.51)$$

Capítulo 3

Parte experimental

Neste capítulo apresenta-se a descrição dos reagentes e equipamentos utilizados, os procedimentos e as condições experimentais usadas nos métodos aplicados à detecção da gordura total e dos AG em alimentação humana.

O método analítico estudado permite quantificar uma série de componentes da gordura contida nos alimentos através de CG.

Neste estudo o padrão interno é o ácido undecanóico, que apresenta a fórmula molecular $C_{11}H_{22}O_2$ e a estrutura representada na figura (3.1).

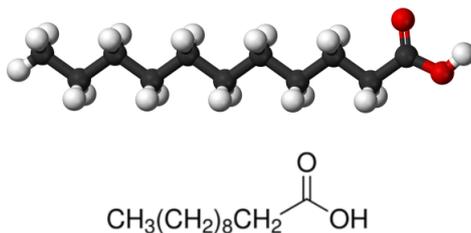


Figura 3.1: Representação da fórmula estrutural e estrutura 3D do PI, ácido undecanóico.

Foi utilizado um CRM (MIX) adquirido à Sigma-Aldrich com a composição descrita na tabela (3.1).

Tabela 3.1: Composição química do CRM utilizado.

Composto	%w	Composto	%w
cis-13,16-Docosadienoic acid methyl ester	2	Methyl heptadecanoate	2
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	2	Methyl linoleate	2
cis-11,14-Eicosadienoic acid methyl ester	2	Methyl linolelaidate	2
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	2	Methyl linolenate	2
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid methyl ester	2	Methyl myristate	4
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid methyl ester	2	Methyl myristoleate	2
cis-11-Eicosenoic acid methyl ester	2	Methyl oleate	4
Methyl cis-10-heptadecenoate	2	Methyl octanoate	4
Methyl hexanoate	4	Methyl palmitate	6
Methyl γ -linolenate	2	Methyl palmitoleate	2
Methyl arachidate	4	Methyl pentadecanoate	2
Methyl arachidonate	2	Methyl cis-10-pentadecenoate	2
Methyl behenate	4	Methyl stearate	4
Methyl butyrate	4	Methyl tricosanoate	2
Methyl decanoate	4	Methyl tetracosanoate	4
Methyl dodecanoate	4	Methyl tridecanoate	2
Methyl elaidate	2	Methyl undecanoate	2
Methyl erucate	2	Methyl cis-15-tetracosenoate	2
Methyl heneicosanoate	2		

Este CMR é do fornecedor Supelco e contém os 37 componentes em 100mg.

3.1 Materiais e equipamentos

Neste ponto descrevem-se os reagentes, solventes utilizados, o material e equipamentos mais relevantes.

Os materiais de vidro mais utilizados foram: balões de fundo redondo e de evaporação, frascos do tipo vial (2 mL), material volumétrico de rigor (pipetas e balões de diluição de classe A) além de outros materiais comuns (ex: espátula, esguicho, copos de vidro, esferas de vidro,...).

Sempre que possível os reagentes utilizados eram de grau de pureza o mais elevado possível. Na tabela (3.2) listam-se alguns dos reagentes mais relevantes e algumas das suas características.

Tabela 3.2: Lista de reagentes mais relevantes utilizados no decurso deste trabalho.

Nome	Fórmula	Fabricante	Pureza%	Mw (g/mol)	d (kg/dm ³)
Ácido clorídrico	HCl	Fisher chemical	37	36.46	1.64
Cloreto de sódio	NaCl	PROLAB	99,9	58.44	2.16
Sulfato de sódio anidro	Na ₂ SO ₄	CHEM-LAB	99,2	142.04	1.46
2,2,4-trimetilpentano; isooctano	C ₈ H ₁₈	Fisher chemical	99.5	114.22	0.69
Ácido pirogálico	C ₆ H ₆ O ₃	Sigma-Aldrich	98	126.11	1.45
Dietiléter	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	Sigma-Aldrich	99,9	74.12	0.71
Etanol	C ₂ H ₆ O	Sigma-Aldrich	95	46.06	0.79
Tolueno	C ₆ H ₅ CH ₃	Sigma-Aldrich	99,9	92.14	0.87
Clorofórmio	CHCl ₃	Fisher chemical	99.8	119.38	1.48
Trifluoreto de Boro	BF ₃	Fisher chemical	99	103.837	1.64
Undecanóico	CHCL ₃	Sigma-Aldrich	99	186.29	0.89
F.A.M.E Mix	C ₄ -C ₃₄	Sigma-Aldrich	99.7	Variável	

As soluções foram preparadas com água de elevada pureza obtida através do sistema de purificação de água (PURELAB Maxima).

De entre os equipamentos mais relevantes utilizados neste trabalho contam-se:

- GG-2010 Gas Chromatograph, SHIMADZU CORPORATION, com detetor FID;
- Coluna Phenomenex; COLUMNNA CAPILAR TRB-FFAP (15 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m);
- Balança analítica METLER TOLEDO;
- Micropipetas variáveis BRAND (100-1000 μ L);
- Soxhlet extrator;
- Evaporador rotativo;
- Centrifugadora;
- Vortex.

3.2 Preparação das soluções

HCL de 12 M e 8.3 M

Retirar 250 mL de HCl comercial (~12 M) para balão volumétrico e adicionar 110 mL de água agitando bem. Manter à temperatura ambiente (entre 20-24 °C);

Padrão interno: undecanoico – C11:0: 5 mg/mL em triclorometano

Pesar 0.25 g de ácido undecanóico num balão volumétrico de 50 mL. Adicionar

triclorometano e dissolver, agitando bem várias vezes. Manter a solução no frio a uma temperatura de 2 – 8 °C.

3.3 Procedimentos

De seguida será explicado o procedimento experimental, utilizado para a preparação das amostras.

3.3.1 Preparação das amostras

Para um balão de fundo redondo pesa-se rigorosamente uma massa de amostra previamente triturada, de 3 g e adiciona-se 100 mg de ácido pirogálico, para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos gordos, 2 mL da solução de padrão interno, 2 a 3 esferas de vidro como reguladores de ebulição, e mais 2 mL de etanol (agente metilador). Agita-se muito bem a solução até ficar homogénea.

De seguida adiciona-se 10 mL da solução de HCl 8.3 M preparada anteriormente e torna-se a agitar.

Leva-se o balão de fundo redondo ao soxhlet a uma temperatura entre 70 a 80 °C com agitação durante cerca de 40 minutos.

No final da digestão mistura-se bem o conteúdo com a ajuda do vortex e deixa-se arrefecer a mistura à temperatura ambiente.

Ao final de algum tempo, para auxiliar a amostra a arrefecer, até atingir a temperatura ambiente, adiciona-se uma porção de etanol e agita-se suavemente.

Após esta primeira fase procede-se à metilação dos AG presentes na amostra.

Para tal adiciona-se 25 mL de dietiléter e agita-se a solução. Nesta fase vai-se poder verificar a formação de 2 fases, visto o dietileter ser imiscível com a solução anterior. Assim os AG presentes na amostra irão ficar na fase superior que se decanta para um balão de evaporação.

Evapora-se o dietileter em corrente de azoto e no final da evaporação total redissolve-se o resíduo em 2 mL de clorofórmio e mais 2 mL de dietileter; de seguida leva-se a evaporar (evaporador rotativo) a uma temperatura de 40 °C, seguida de corrente de azoto.

Adiciona-se depois 1.2 mL de triflureto de boro e 1 mL de tolueno e leva-se o balão ao soxhlet durante 30 minutos.

Ao fim desse tempo retira-se o balão e deixa-se arrefecer à temperatura ambiente agitando-se, se for necessário com a ajuda do vórtex.

Adiciona-se 5 mL de água, 1 mL de isoctano e 1 g de sulfato de sódio anidro. Tornam-se a formar 2 fases, devido à junção do isoctano, que já contém os AG

metilados. Esta fase superior transfere-se para um tubo de ensaio juntamente com mais 1 g de sulfato de sódio anidro, que tem o papel de agente secante.

Ao fim deste procedimento transfere-se uma porção da parte superior do tubo de ensaio para o vial e injeta-se no GC-FID.

3.3.2 Condições cromatográficas

De forma a otimizar o método, foram testados alguns parâmetros para a obtenção de um cromatograma do MIX onde se obtivessem todos os ácidos gordos e de forma a que a sua identificação, quer visual quer em termos de tempos retenção/áreas, fosse bastante perceptível, para a posterior análise das nossas amostras.

As condições cromatográficas de trabalho foram as seguintes:

- Fluxo: 40.0 mL/seg;
- Temperatura: a análise inicia-se com uma temperatura de 70 °C na coluna que vai aumentando até à temperatura máxima de 240 °C. O detector inicia o programa de análise ($\Delta t = 16$ min) com uma temperatura de 30 °C até chegar à temperatura final de 260 °C. O injetor atinge uma temperatura de 240 °C;
- Volume de injeção: 1 μ L;
- Tempo de corrida: 16 min;

Outro parâmetro testado foi também a diluição do MIX, para uma possível diminuição de volume utilizado em cada injeção, mantendo uma boa resolução dos picos dos ácidos gordos.

3.4 Tratamento de resultados

Segundo o método AOAC, para a obtenção de gordura (total, saturada e insaturada) em alimentos através de cromatografia gasosa as gorduras e ácidos gordos são extraídos dos alimentos através de métodos de hidrólise (hidrólise ácida na maioria dos produtos, hidrólise alcalina para produtos lácteos e ambas para queijos). Neste estudo não se testou em produtos lácteos nem em queijos.

Utilizou-se como padrão interno o ácido undecanóico (C11:0).

O total de gordura foi calculado como a soma dos ácidos gordos individuais e os saturados e monoinsaturados são obtidos através da soma dos respectivos ácidos gordos.

Após a preparação das amostras e posterior injeção destas e do MIX de ácidos gordos, que é necessário para otimizar os cromatogramas, procedeu-se à análise dos picos e respectivos tempos de retenção.

Todos estes testes foram efectuados com uma coluna capilar (Coluna Phenomenex; COLUMNNA CAPILAR TRB-FFAP (15m€0,25mm€0.25µm)), o isoocetano como solvente e o ácido gordo undecanoico como padrão interno. A análise iniciou-se com uma temperatura de 70 °C na coluna que aumentou gradualmente até à temperatura de 240 °C, enquanto a chama do detector inicia com uma temperatura de 30° até atingir a final de 260 °C. O injector por sua vez, atinge uma temperatura de 250 °C, com uma pressão de 59.2 kPa. Em termos de gases de arraste temos o hidrogénio e o ar reconstituído com um fluxo de 40.0 mL/min. O volume de injeção da amostra é de 1.0 µL.

[JCP] A detecção de sinais cromatográficos e respectiva integração foi realizada através do software próprio do equipamento tendo sido previamente estabelecidos os critérios de início e termo do sinal (pico) cromatográfico.

Já a identificação de cada componente fez-se por comparação com os tempos de retenção relativos (T_{RR}) quer recorrendo ao método publicado pela AOAC quer através do estudo de uma amostra contendo uma mistura (MIX) muito bem conhecida (CRM).

3.4.1 Estimativa

Sempre que possível, no caso de resultados provenientes de diferentes análises sobre a mesma amostra (repetições e réplicas), antes de proceder a qualquer estimativa paramétrica foi realizado o teste de Grubbs, eq.(2.10), para avaliar a detecção de eventuais outliers ($\alpha = 0.05$). No nosso entender é de todo conveniente detectar e eliminar eventuais valores discrepantes já que estes produzem um enviesamento na estimativa central e têm também um enorme impacto sobre a dispersão, comprometendo a eficiência das determinações.

Após esta triagem, foi realizado o teste simultâneo de simetria e curtose, eq.(2.11), para avaliar a normalidade das distribuições. Este passo é importante para garantir que a estimativa central coincide com o valor mais provável e que o intervalo de confiança estatisticamente previsto está conforme os valores experimentais obtidos.

Em termos de calibração, o sinal analítico foi processado em termos de quociente de áreas ($P_{S_i}/P_{S_{C11:0}}$) e os teores em termos de quociente de concentrações ($W_i/W_{C11:0}$) entre cada analito e o padrão primário (ácido undecanoico, C11:0).

A curva de calibração de cada analito foi avaliada em termos de: a) homogeneidade da variância (comparação da dispersão nos extremos da curva de calibração, eq.), b) eventuais outliers (teste de mandel, eq.(2.35)).

Para avaliar a interdependência da variável dependente (y_i) com a variável independente (x_i) foi avaliada através do coeficiente de correlação de Pearson [42, 43]

$$\rho_{XY} = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3.1)$$

Quanto maior for esta interdependência assim maior será o valor absoluto de ρ_{XY} .

Este estimador de interdependência não permite tirar grandes conclusões estatísticas mas, pode ser usado para avaliar o grau de interdependência quando testado contra o valor unitário ($H_0 : |\rho_{XY}| = 1$)

$$TV = \frac{||\rho_{XY}| - 1| \cdot \sqrt{N-2}}{\sqrt{1 - \rho_{XY}^2}} \quad (3.2)$$

em que os valores críticos respectivos provêm da distribuição t -student bilateral.

3.4.2 Cálculos

Com a utilização deste método, é necessário efectuar diversos cálculos para a obtenção da gordura total presente na amostra, que é obtida pela soma de todos os ácidos gordos quantificáveis e também para a obtenção da quantidade de cada ácido gordo individual.

Inicialmente calcula-se o factor de resposta de cada ácido gordo. Depois, como as amostras são metiladas e cada ácido gordo é transformado no seu éster de metil, é necessário através de factores de conversão que se encontram tabelados, reverter esta situação para se obter o resultado em ácidos gordos e não em ésteres de metil.

Por fim obtemos as percentagens de cada ácido gordo individual e de gordura total.

Todas as equações necessárias, encontram-se a seguir.

3.4.2.1 Identificação de AG

De acordo com o método descrito pela AOAC[44], a identificação de cada analito faz-se com base na determinação do tempo de retenção relativo (T_{RR})

$$T_{RR} = \frac{T_{R_i}}{T_{R_{(C11:0)}}} \quad (3.3)$$

usando como referência o tempo de retenção do padrão interno, neste caso o ácido undecanóico ($T_{R_{(C11:0)}}$) como correcção do tempo de retenção obtido para um determinado analito (T_{R_i}).

3.4.2.2 Factor de resposta

O factor de resposta para cada um dos sinais instrumentais (Fr_i) é dado por

$$Fr_i = \frac{Ps_i}{Ps_{C11:0}} \times \frac{W_{C11:0}}{W_i} \quad (3.4)$$

onde Ps_i representa a área do pico do ácido gordo individual, retirado do MIX, $Ps_{(c11:0)}$ a área do pico do ácido undecanoico, Padrão interno (C11:0), $W_{C11:0}$ a sua concentração e W_i representa a concentração de cada ácido gordo individual.

3.4.2.3 Concentração de cada AG

Antes de se obter a concentração de cada AG presente na mistura calcula-se o W_{FAMEi} , concentração dos ésteres metílicos dos ácidos gordos, através da seguinte equação:

$$W_{FAMEi} = \frac{Pt_i \times W_{t_{(C11:0)}} \times 1.0067}{Pt_{(C11:0)} \times Fr_i} \quad (3.5)$$

Onde Pt_i corresponde à área do pico do ácido gordo na amostra, $W_{t_{(C11:0)}}$ a concentração do Padrão interno na amostra, 1.0067 é o factor de conversão dos ésteres metilados em ácidos gordos, e Fr_i o factor de resposta calculado anteriormente.

Agora para se obter a concentração de cada AG utiliza-se a seguinte equação:

$$W_{TG_i} = W_{FAMEi} \times f_{TG_i} \quad (3.6)$$

onde f_{TG_i} representa o factor de conversão de cada éster metilado em ácido gordo (tabelado).

3.4.2.4 Gordura total

Esta quantidade de gordura total é obtida através da soma de todos os ácidos gordos (%TAG).

$$\%TAG = \left(\sum \frac{W_{TG_i}}{\text{massa}(g)} \right) \quad (3.7)$$

onde W_{TG_i} é a soma das concentrações obtidas para todos os ácidos gordos calculados em 3.6, e a massa diz respeito á quantidade pesada de amostra.

3.4.2.5 Estimativa da concentração de cada AG

A estimativa da concentração de cada AG(W_i) é dada por

$$W_i = W_{FAME_i} \times f_{FA_i} \quad (3.8)$$

onde: f_{FA_i} = fator de conversão do éster metilado no ácido gordo correspondente em AG e W_{FAME_i} a concentração obtida em 3.5.

3.4.2.6 Percentagem de AGS

Esta percentagem é obtida pela soma de todos os ácidos gordos saturados: $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, etc...

$$\%GorduraSaturada = \left(\sum \frac{W_i \text{Saturados}}{\text{massa}} \right) \times 100 \quad (3.9)$$

onde $W_i \text{Saturados}$ são os valores obtidos em 3.8 só para os AG Saturados e massa é a quantidade de amostra pesada.

3.4.2.7 Percentagem da AGMI e AGPI

Obtida pela soma dos ácidos gordos monoinsaturados ou polisaturados presentes na amostra

$$\%GorduraMonosaturada = \left(\sum \frac{W_i \text{Monosaturados}}{\text{massa}} \right) \times 100 \quad (3.10)$$

$$\%GorduraPolisaturada = \left(\sum \frac{W_i \text{Polisaturada}}{\text{massa}} \right) \times 100 \quad (3.11)$$

nestas duas equações como na anterior, W_i diz respeito aos valores obtidos na equação 3.8 onde se utiliza os valores só dos AG Monosaturados ou polisaturados, dividindo pelo valor da massa pesada da amostra.

Com estas equações obtem-se os valores necessários para o estudo deste método.

Capítulo 4

Resultados e discussão

Neste capítulo irão ser apresentados os resultados obtidos mais relevantes para a avaliação e validação do método de quantificação e determinação do perfil de gorduras em alimentos por GC-FID.

4.1 Validação

São apresentados de seguida os resultados obtidos na validação do método para a quantificação da percentagem de gordura em amostras de alimentação humana, bem como o perfil de ácidos gordos.

4.1.1 Avaliação prévia

No sentido de avaliar o desempenho do método implementado na análise de gorduras em alimentos foi utilizado um CRM (MIX), ver tabela (3.1). Deste modo pode-se avaliar a calibração simultânea do método e a sua capacidade de quantificação na presença de diversos analitos.

Este material certificado utilizado apresenta como maior vantagem o de ser representativo de misturas de ácidos gordos que ocorrem naturalmente nos alimentos. Além disso, esta amostra já contém o padrão interno (C11:0) e os valores certificados no CRM correspondem aos teores de ácidos esterificados, não sendo necessário realizar o tratamento da amostra (metilação dos grupos ácidos).

Neste estudo preliminar de avaliação da capacidade de quantificação do método descrito [44], foram efectuadas diferentes diluições do MIX com isooctano

de foram a obter as amostras a 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% e 5%.

Deste modo pretendeu-se explorar, de forma rápida e expedita, a capacidade de quantificação em misturas reais contendo mais de 30 ácidos gordos distintos.

Sem pretender ser exaustivo mas apenas a título exemplificativo, nas figuras (4.1) a (4.4) encontram-se representados apenas os cromatogramas obtidos para o MIX nas diluições de 100%, 50%, 10% e 5%.

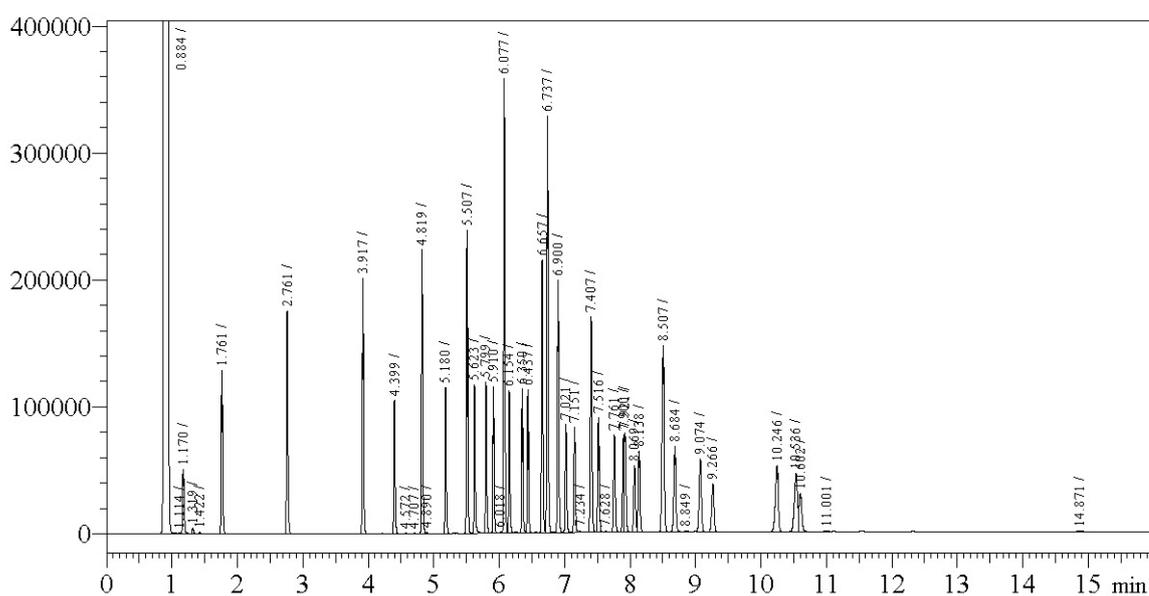


Figura 4.1: Cromatograma obtido da injeção do MIX não diluído (100%) utilizando o método analítico de quantificação por GC-FID.

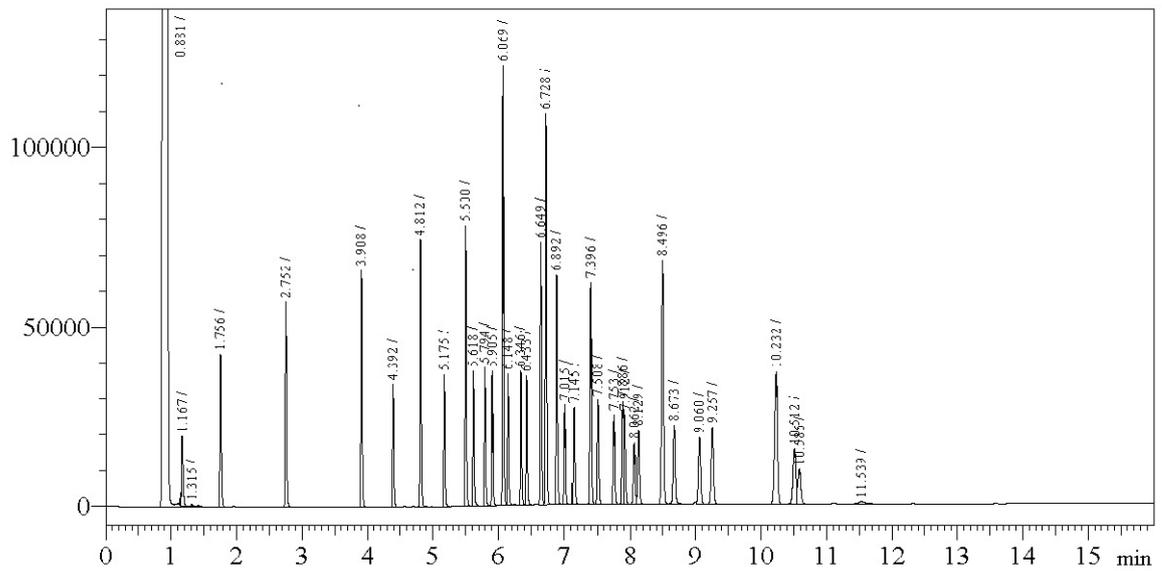


Figura 4.2: Cromatograma obtido da injeção do MIX diluído a 50% utilizando o método analítico de quantificação por GC-FID.

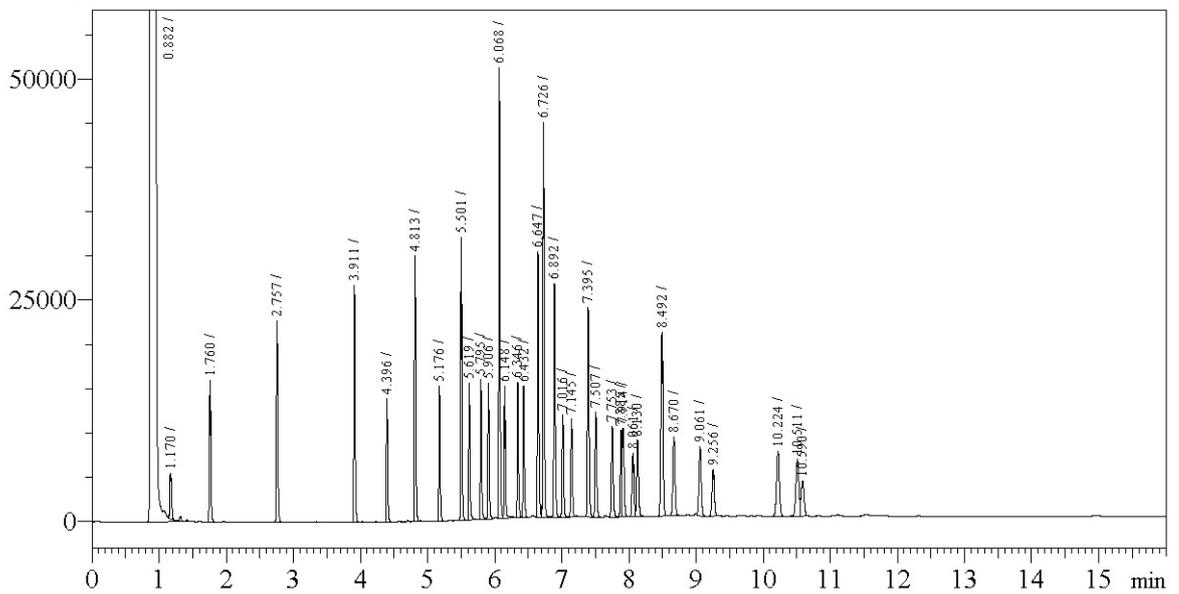


Figura 4.3: Cromatograma obtido da injeção do MIX diluído a 10% utilizando o método analítico de quantificação por GC-FID.

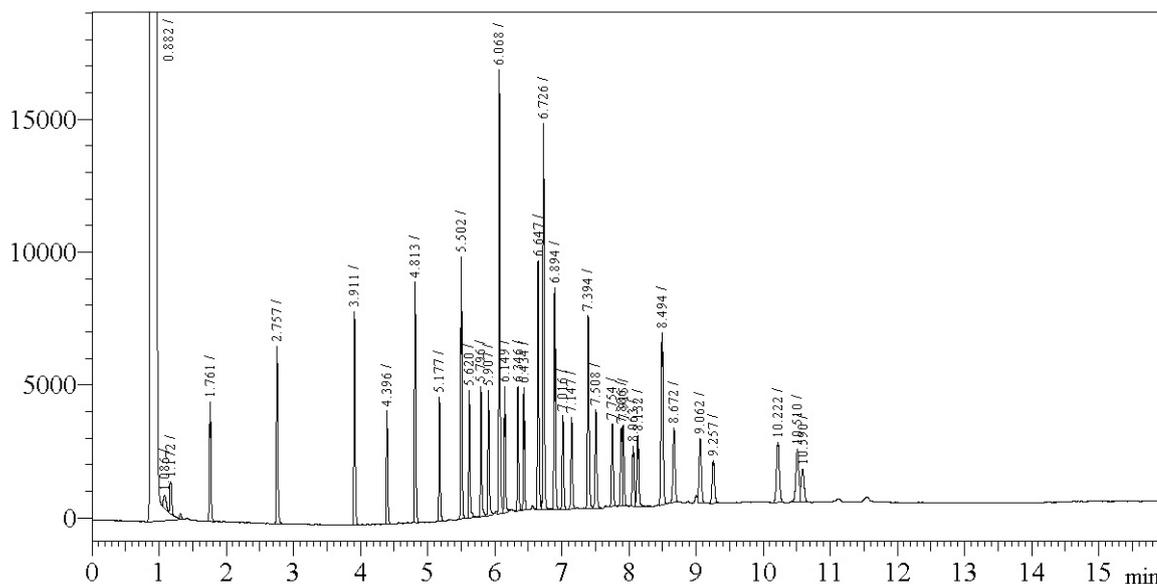


Figura 4.4: Cromatograma obtido da injeção do MIX diluído a 5% utilizando o método analítico de quantificação por GC-FID.

Na tabela (4.1) encontram-se sistematizados os resultados directos obtidos em termos de tempo de retenção (T_{R_i}) e área do sinal cromatográfico (Pt_i) de cada analito detectado, identificados e devidamente rotulados (ID#).

Corrigindo os tempos de retenção (T_{R_i}) para os respectivos valores relativos (T_{RR_i}), eq.(3.3), usando o ácido undecanóico como padrão interno e corrigindo o sinal analítico para o seu valor relativo ($Pt_i/Pt_{C_{11:0}}$), os valores foram sistematizados na tabela (4.2).

Sendo este um caso de análise múltipla (análise simultânea de diversos analitos), no sentido de não ser demasiado fastidioso foram representadas as dependências do sinal identificado (ID#) e integrado (valor relativo, $Pt_i/Pt_{C_{11:0}}$) em relação ao teor do respectivo analito (w , g/g), ver figuras (4.5) a (4.10).

Não havendo uma informação muito detalhada sobre a repetibilidade do sinal nos extremos da curva de calibração para cada analito identificado, assumiu-se que havia homogeneidade de erro experimental na gama analítica utilizada¹. Assim sendo as curvas de calibração foram directamente ajustadas utilizando a aproxi-

¹ Acreditamos que esta simplificação possa estar correcta já que a cromatografia GC-FID caracteriza-se por apresentar excelentes respostas instrumentais numa vasta amplitude de concentrações, 3 a 4 ordens de grandeza, sendo a gama testada inferior a 2 ordens de grandeza.

mação do método de mínimos quadrados para o caso homocedástico².

Em termos da escolha do melhor modelo, a norma ISO 8466-1:1990 [35] sugere a tomada de decisão entre os modelos P_{01} e P_{012} no sentido de verificar qual o que melhor ajusta os valores experimentais.

Ao ajustar os valores referentes a cada um dos analitos em análise, valores da tabela (4.2), verificou-se que das 33 curvas de calibração apenas duas destas (ID# 2 e 23) apresentavam melhor ajuste com o polinómio de segundo grau³. Ainda assim, no sentido de simplificar a análise e quantificação o modelo mais simples (P_{01} , $p = 2$) foi escolhido como modelo de calibração.

No sentido de melhorar as estimativas na quantificação, quer na exactidão quer na precisão [35, 1], foi realizada a avaliação de eventuais valores discrepantes (outliers).

Em cada caso (ID#) foi feito o diagnóstico prévio por regressão robusta [24] tendo esta sido utilizada para obter uma listagem de valores a testar⁴.

A sequência de valores para testar sua rejeição foi posteriormente avaliada, de modo sequencial, recorrendo ao teste de Mandel, comparando os resultados sucessivos entre os ajustes com (N) pontos em relação a ($N - 1$) valores, por supressão do valor a testar.

²O ajuste considera a contribuição individual de cada valor experimental com a mesma relevância (método não ponderado).

³Por observação mais detalhada destas duas curvas de calibração verifica-se que o encurvamento da resposta se deve quase que exclusivamente ao valor referente ao maior teor já que este que se apresenta ligeiramente abaixo do valor esperado por P_{01} .

⁴dado que a regressão robusta é muito insensível a valores discrepantes (outliers) o ajuste dos valores experimentais permite identificar uma listagem para teste de rejeição com base na amplitude do erro encontrado (desvio do valor experimental em relação ao valor previsto pelo modelo).

Tabela 4.1: Valores obtidos referentes ao T_{R_i} (min.) e sinal (Pt_i) - reporte do valor médio e desvio padrão referente ao tempo de retenção e áreas obtidas em função do teor do MIX utilizado.

ID#	TR	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5
1	1.170	87795.4	104825.0	93676.1	80516.5	66900.6	34760.2	32663.6	27053.9	19203.1	9708.0	2392.8
2	1.759	185965.9	159941.9	142666.2	125081.4	106347.1	62143.8	77842.8	64716.0	45629.8	23908.4	6894.9
3	2.757	243128.3	196295.6	174568.4	153641.2	130773.3	78881.0	104505.3	86953.8	60952.3	31888.9	9411.9
4	3.913	271590.7	218499.2	193926.6	170640.5	145442.7	87958.2	117339.9	97608.4	68129.7	35659.1	10776.5
5	4.397	136273.0	109215.3	97035.9	85261.4	72708.0	44178.1	58955.5	49067.1	34386.2	18114.7	5537.7
6	4.815	288671.4	230641.9	204846.5	180480.3	153835.1	93339.1	125185.3	104004.3	72484.9	37925.3	11484.7
7	5.178	142904.5	114237.0	101454.3	89310.6	76071.4	46216.0	61958.5	51559.8	36104.9	19004.5	5893.8
8	5.504	299736.3	239488.4	213470.3	187476.3	159843.9	97354.0	130534.8	108650.6	75742.6	39832.9	12404.6
9	5.621	147588.9	117805.4	105095.4	91975.3	78402.8	47950.2	63856.0	53962.8	37163.4	19755.9	6293.1
10	5.797	147217.0	117746.0	105079.7	92144.6	78409.6	47939.1	63801.3	54196.4	37388.3	19951.2	6501.2
11	5.908	144310.1	115626.1	103272.8	90572.5	77043.9	47022.2	62431.9	53939.1	36571.2	19566.5	6282.3
12	6.072	467649.8	369266.5	329572.5	290099.6	249335.8	153761.5	205962.1	172591.4	120235.3	64256.0	21492.0
13	6.151	144224.6	115512.4	103694.6	90632.5	77420.2	46903.6	62153.8	58006.7	36548.2	19966.6	6371.1
14	6.348	148738.2	118720.8	105957.7	92861.8	78888.5	47907.5	64130.3	54616.9	37226.1	19818.4	6270.7
15	6.435	150881.8	120395.2	107946.4	94084.3	79507.4	47587.1	64357.8	55481.0	37440.0	19808.6	6107.3
16	6.652	306220.5	242761.0	217369.4	191103.5	162371.4	99640.2	133164.4	112650.6	77464.0	41280.5	12984.1
17	6.732	464921.1	365988.0	326834.6	287225.3	246624.4	152369.1	203788.2	170238.6	118610.2	63204.9	20933.7
19	6.897	292250.4	230145.8	204911.0	179839.7	153930.7	94294.3	127216.8	106592.4	74108.5	39360.1	12486.8
21	7.019	128816.5	103741.3	92520.7	80711.8	68588.6	41832.3	55709.2	47055.4	32634.3	17296.6	5363.0
22	7.149	127673.9	102608.4	91354.4	79867.3	67893.8	41578.6	55457.4	46586.2	32494.3	17287.4	5451.7
23	7.402	286306.6	239942.0	214589.4	189979.1	162320.3	99730.9	124076.4	103421.7	72443.3	38245.1	11831.4
24	7.512	147813.5	118048.3	104896.8	91529.8	77912.0	47905.5	63853.6	53509.9	37521.8	20002.1	6371.9
25	7.758	134390.8	107080.1	95198.6	83719.1	71497.6	43817.8	58306.2	48812.9	34396.9	18327.2	5468.0
26	7.893	126010.6	118802.2	106435.3	95564.0	83045.8	48963.6	53480.0	44927.5	30771.6	16268.0	4921.9
27	7.918	127243.2	97168.9	87129.0	76729.2	64964.7	42236.0	56460.1	47337.5	33809.7	18229.0	5513.5
28	8.067	100093.8	79766.0	70915.3	62654.1	53900.6	33030.1	43628.2	36721.2	25767.4	13758.9	4293.0
29	8.135	124532.8	98663.3	87836.9	77505.1	66129.1	40668.9	54285.1	45641.3	31825.0	17035.8	5283.3
30	8.503	333042.7	324030.4	294279.0	265955.0	230556.8	143457.4	143981.1	120323.4	84414.2	44465.7	13719.7
32	8.680	149480.1	117342.3	104840.2	92160.6	82258.8	48822.1	64240.5	54396.6	38317.4	20146.6	6212.4
33	9.069	136088.7	108441.5	97027.9	85287.2	72819.6	44820.1	59495.8	49795.8	35101.2	18724.2	5856.4
34	9.265	92831.3	112018.0	103642.0	95891.0	83981.8	53127.3	40710.8	34117.0	24050.3	12809.4	4047.4
35	10.245	158721.3	224529.0	209912.5	196725.0	173427.9	110075.4	69306.6	58124.6	40956.3	21808.6	6743.7
36	10.529	151685.9	120076.6	106108.8	93405.3	79021.1	48501.2	64883.7	54532.9	38048.8	20312.5	6314.2
37	10.595	86842.0	69940.3	63104.0	55607.8	48413.2	29769.9	39598.2	33161.9	23444.1	12449.8	3915.3

ID#: (1) butírico, (2) capríco, (3) caprílico, (4) cáprico, (5) undecanoíco, (6) láurico, (7) tridecanoíco, (8) mirístico, (9) miristoleico, (10) pentadecanoíco, (11) cis-10-pentadecenoíco, (12) palmítico, (13) palmitoleico, (14) margárico, (15) margaroleico, (16) esteárico, (17) oleíco, (19) linoleico, (21) gama-linolénico, (22) linolénico, (23) araquídico, (24) gadoleico, (25) heneicosanoíco, (26) cis-11,14-eicosadienoíco, (27) cis-8,11,14-eicosatrienoíco, (28) cis-11,14,17-eicosatrienoíco, (29) araquidónico, (30) EPA, (32)tricosanoíco, (33) erúxico, (34) cis-13,16-docosadienoíco, (35) linhocérico, (36) DHA e (37) nervónico

Tabela 4.2: Valores corrigidos referentes ao T_{RR} e sinal ($Pt_i/Pt_{C11:0}$) com base no PI (C11:0) - reporte de valores mínimo, máximo e desvio relativo em TRR, e areas corrigidas em função do teor do MIX.

ID#	T_{RRi}	T_{RRf}	%RE	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5
1	0.2657	0.2666	0.34	1.0644	0.8638	0.7723	0.6610	0.5521	0.3934	0.2216	0.1654	0.1117	0.0536	0.0216
2	0.3998	0.4006	0.19	1.3647	1.3180	1.1762	1.0269	0.8776	0.7033	0.5281	0.3957	0.2654	0.1320	0.0623
3	0.6266	0.6276	0.17	1.7841	1.6176	1.4392	1.2614	1.0792	0.8928	0.7090	0.5316	0.3545	0.1760	0.0850
4	0.8897	0.8904	0.09	1.9930	1.8006	1.5988	1.4010	1.2002	0.9955	0.7961	0.5968	0.3963	0.1969	0.0973
6	1.0949	1.0956	0.07	2.1183	1.9006	1.6888	1.4818	1.2695	1.0564	0.8494	0.6359	0.4216	0.2094	0.1037
7	1.1774	1.1783	0.07	1.0487	0.9414	0.8364	0.7332	0.6278	0.5231	0.4204	0.3152	0.2100	0.1049	0.0532
8	1.2514	1.2523	0.07	2.1995	1.9735	1.7599	1.5392	1.3191	1.1018	0.8856	0.6643	0.4405	0.2199	0.1120
9	1.2782	1.2791	0.08	1.0830	0.9708	0.8664	0.7551	0.6470	0.5427	0.4332	0.3299	0.2162	0.1091	0.0568
10	1.3182	1.3192	0.08	1.0803	0.9703	0.8663	0.7565	0.6471	0.5426	0.4329	0.3314	0.2175	0.1101	0.0587
11	1.3434	1.3445	0.08	1.0590	0.9528	0.8514	0.7436	0.6358	0.5322	0.4236	0.3298	0.2127	0.1080	0.0567
12	1.3803	1.3818	0.11	3.4317	3.0430	2.7171	2.3817	2.0576	1.7402	1.3974	1.0552	0.6993	0.3547	0.1941
13	1.3985	1.3998	0.09	1.0584	0.9519	0.8549	0.7441	0.6389	0.5308	0.4217	0.3547	0.2126	0.1102	0.0575
14	1.4435	1.4449	0.10	1.0915	0.9783	0.8736	0.7624	0.6510	0.5422	0.4351	0.3339	0.2165	0.1094	0.0566
15	1.4631	1.4647	0.11	1.1072	0.9921	0.8900	0.7724	0.6561	0.5386	0.4367	0.3392	0.2178	0.1094	0.0551
16	1.5121	1.5139	0.12	2.2471	2.0005	1.7921	1.5690	1.3399	1.1277	0.9035	0.6888	0.4506	0.2279	0.1172
17	1.5300	1.5319	0.12	3.4117	3.0160	2.6945	2.3581	2.0352	1.7245	1.3827	1.0409	0.6899	0.3489	0.1890
19	1.5678	1.5692	0.09	2.1446	1.8965	1.6894	1.4765	1.2703	1.0672	0.8631	0.6517	0.4310	0.2173	0.1127
21	1.5960	1.5972	0.08	0.9453	0.8549	0.7628	0.6626	0.5660	0.4735	0.3780	0.2877	0.1898	0.0955	0.0484
22	1.6253	1.6268	0.09	0.9369	0.8456	0.7532	0.6557	0.5603	0.4706	0.3763	0.2848	0.1890	0.0954	0.0492
23	1.6820	1.6842	0.13	2.1010	1.9773	1.7692	1.5597	1.3395	1.1287	0.8418	0.6323	0.4214	0.2111	0.1068
24	1.7077	1.7095	0.10	1.0847	0.9728	0.8648	0.7515	0.6429	0.5422	0.4332	0.3272	0.2182	0.1104	0.0575
25	1.7636	1.7653	0.09	0.9862	0.8824	0.7849	0.6873	0.5900	0.4959	0.3956	0.2984	0.2001	0.1012	0.0494
26	1.7937	1.7961	0.14	0.9247	0.9790	0.8775	0.7846	0.6853	0.5542	0.3628	0.2747	0.1790	0.0898	0.0444
27	1.8003	1.8015	0.07	0.9337	0.8007	0.7183	0.6300	0.5361	0.4780	0.3831	0.2894	0.1966	0.1006	0.0498
28	1.8337	1.8356	0.10	0.7345	0.6573	0.5847	0.5144	0.4448	0.3738	0.2960	0.2245	0.1499	0.0760	0.0388
29	1.8494	1.8511	0.09	0.9138	0.8130	0.7242	0.6363	0.5457	0.4603	0.3683	0.2791	0.1851	0.0940	0.0477
30	1.9318	1.9357	0.20	2.4439	2.6702	2.4261	2.1835	1.9026	1.6236	0.9769	0.7357	0.4910	0.2455	0.1239
32	1.9722	1.9752	0.15	1.0969	0.9670	0.8643	0.7566	0.6788	0.5526	0.4359	0.3326	0.2229	0.1112	0.0561
33	2.0612	2.0639	0.13	0.9986	0.8936	0.7999	0.7002	0.6009	0.5073	0.4037	0.3045	0.2042	0.1034	0.0529
34	2.1056	2.1093	0.18	0.6812	0.9231	0.8545	0.7873	0.6930	0.6013	0.2762	0.2086	0.1399	0.0707	0.0365
35	2.3253	2.3330	0.33	1.1647	1.8503	1.7306	1.6151	1.4312	1.2458	0.4702	0.3554	0.2382	0.1204	0.0609
36	2.3908	2.3965	0.24	1.1131	0.9895	0.8748	0.7669	0.6521	0.5489	0.4402	0.3334	0.2213	0.1121	0.0570
37	2.4086	2.4118	0.14	0.6373	0.5764	0.5203	0.4565	0.3995	0.3369	0.2687	0.2028	0.1364	0.0687	0.0354

ID#: (1) butírico, (2) capríco, (3) caprílico, (4) cáprico, (6) láurico, (7) tridecanóico, (8) mirístico, (9) miristoleico, (10) pentadecanóico, (11) cis-10-pentadecenóico, (12) palmítico, (13) palmitoleico, (14) margárico, (15) margaroleico, (16) esteárico, (17) oleico, (19) linoleico, (21) gama-linolénico, (22) linolénico, (23) araquídico, (24) gadoleico, (25) heneicosanoico, (26) cis-11,14-eicosadienóico, (27) cis-8,11,14-eicosatrienóico, (28) cis-11,14,17-eicosatrienóico, (29) araquidónico, (30) EPA, (32) tricosanoico, (33) erúxico, (34) cis-13,16-docosadienóico, (35) linhocérico, (36) DHA e (37) nervónico.

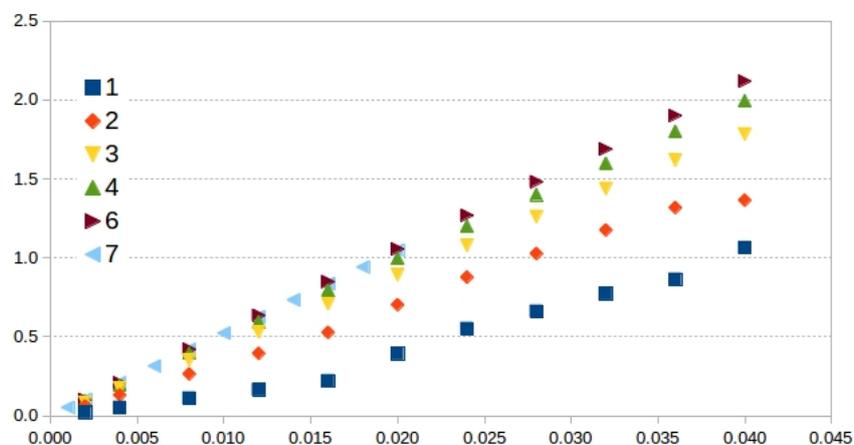


Figura 4.5: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (1) butírico, (2) capríco, (3) caprílico, (4) cáprico, (6) láurico e (7) tridecanóico.

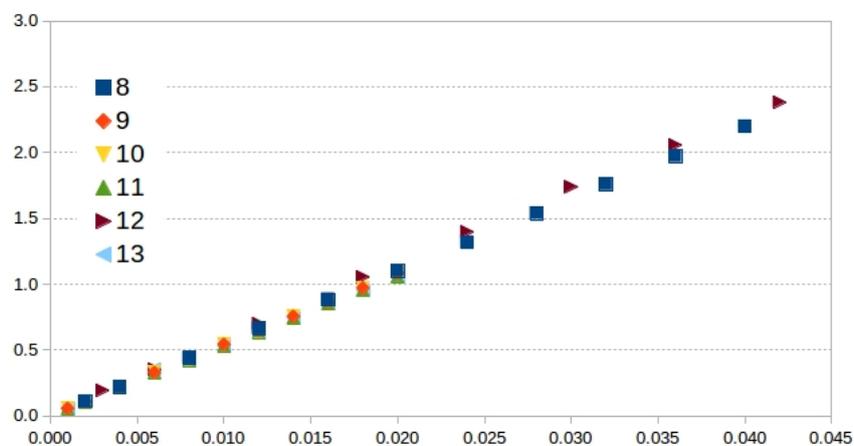


Figura 4.6: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (8) mirístico, (9) miristoleico, (10) pentadecanóico, (11) cis-10-pentadecenóico, (12) palmítico e (13) palmitoleico.

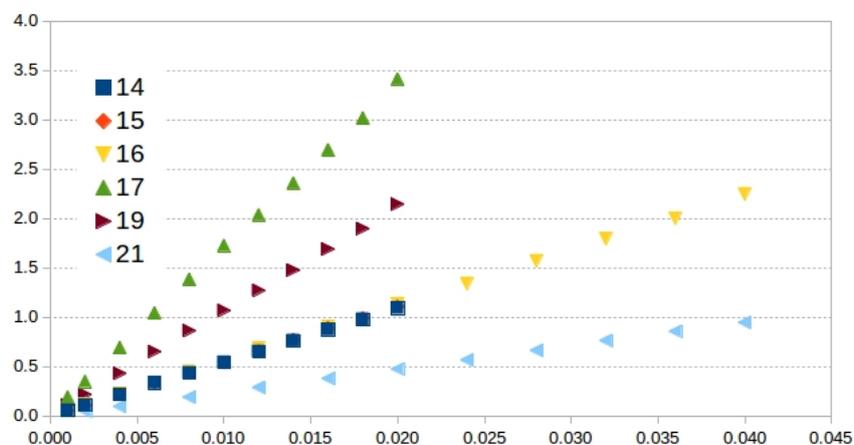


Figura 4.7: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (14) margárico, (15) margaroleico, (16) esteárico, (17) oleíco, (19) linoleico e (21) γ -linolénico.

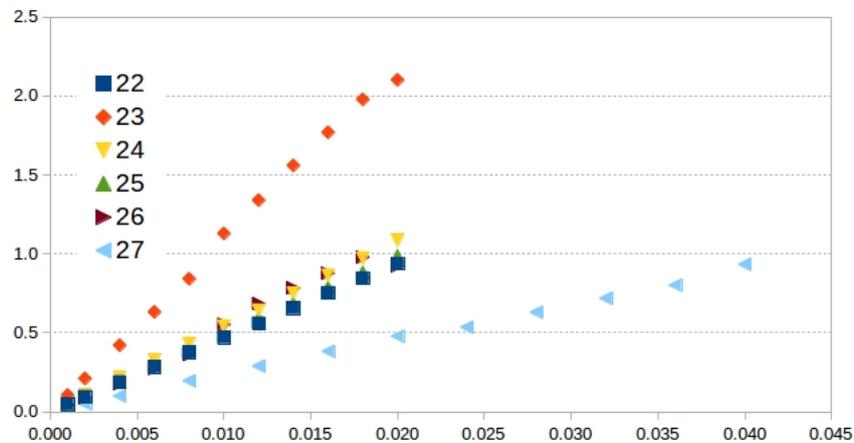


Figura 4.8: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (22) linoléico, (23) araquídico, (24) gadoleico, (25) heneicosanoíco, (26) cis-11,14-eicosadienóico e (27) cis-8,11,14-eicosatrienóico.

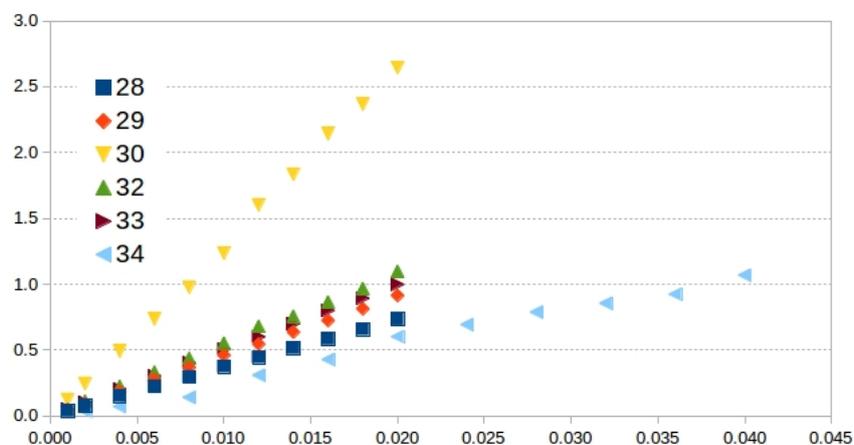


Figura 4.9: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (28) cis-11,14,17-eicosatrienóico, (29) araquidónico, (30) EPA, (32) tricosanoíco, (33) erúico e (34) cis-13,16-docosadienóico.

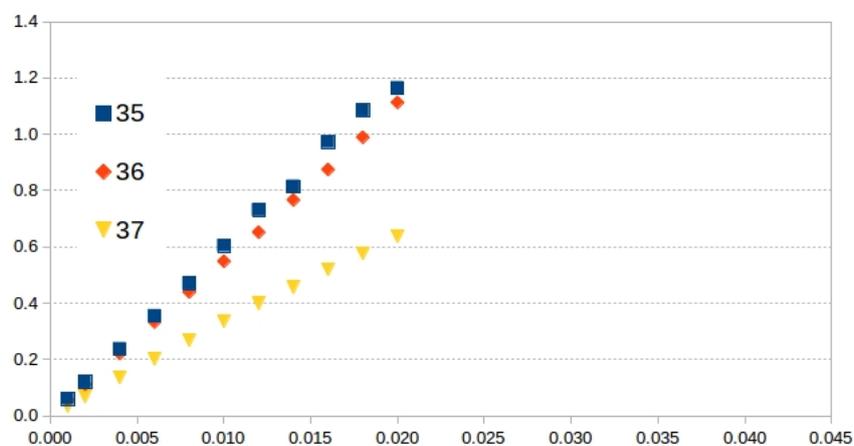


Figura 4.10: Curvas de calibração obtidas com o MIX: área integrada obtida para cada analito identificado (P_s) em função do respectivo teor (%W, g/g) referente aos ácidos (35) linhocérico, (36) DHA e (37) nervónico.

O teste de Mandel apenas evidenciou alguma dificuldade na avaliação do valor extremo superior (X_N) nas curvas de calibração previamente identificadas (ID# 2

e 23). Contudo este teste não foi conclusivo quanto à rejeição desses valores ($0.01 < p[H_0] < 0.05$). Como tal os valores questionáveis foram mantidos.

Das figuras (4.5) a (4.10) é patente que há uma tendência para que as rectas de calibração se sobreponham mas, em alguns casos, essa disparidade é obviamente notória.

Sabe-se que o detector de ionização em chama (FID) é um detector genérico - é sensível à quantidade de iões produzidos na chama enquanto a matéria orgânica arde. Este tipo de detector é especialmente sensível à presença de elementos electronegativos (ex: azoto, oxigénio, flúor) quando presentes na composição do analito.

Como tal, esperar-se-ia obter uma sensibilidade similar com todos os compostos aqui estudados uma vez que este conjunto de analitos possui em comum a presença de um grupo ácido carboxílico (-COOH) diferindo apenas na cadeia carbonada (tanto no tamanho como na sua saturação).

Importa agora tentar determinar e explicar as discrepâncias patentes e tentar racionalizar esse facto com o base no tipo de composto em causa.

Na tabela (4.3) apresenta-se, de uma forma compacta e sistematizada, algumas das características mais relevantes relacionadas com o ajuste dos valores experimentais com o modelo P_{01} .

Desta tabela verifica-se que a qualidade do ajuste é boa quando comparada com o valor do sinal no centro da curva de calibração - o erro relativo médio (%RSE) é de 0.4% sendo os valores extremos 0.1% e 3.9%. Os valores mais altos obtidos referem-se aos analitos ID# 1 (3.9%), ID# 26 (1.8%) e ID# 30 (1.6%).

Observando agora o significado estatístico do termo independente (b_0) do modelo de calibração usado (P_{01}), da tabela (4.3) é também patente que o erro relativo associado a esta estimativa (%RSE(B_0)) é bastante elevado - a estimativa média deste erro é de 56.9%, oscilando entre 27.4% e 3002.1%. Em termos práticos isto revela que o termo “ordenada na origem” do polinómio de primeiro grau não tem grande significado estatístico sendo por isso prescindível do modelo. Este facto está de acordo com o tipo de detector utilizado revelando ainda que a “corrente de fundo”, relacionada com o sinal instrumental não específico, não é significativa - não existe erro sistemático constante no sinal medido.

Ainda assim, em conformidade com a norma ISO 8466-1:1990 [35] para a calibração com modelo linear, o modelo P_{01} foi preservado.

A tabela (4.4) sistematiza alguns dos parâmetros de calibração mais relacionados com a quantificação dos diversos analitos.

De um modo geral verifica-se que a sensibilidade na quantificação é um parâ-

metro com bastante rigor analítico - a sua incerteza relativa ($\%RSE$) média é de 0.4%, variando entre os valores extremos de 0.1% a 4.7%.

Comparando agora os valores da sensibilidade (b_1) obtidos, verifica-se que existem diversos AG com sensibilidades muito próximas do valor obtido como mediana (52.9), nomeadamente: (4) cáprico, (6) láurico, (7) Tridecanóico, (8) mirístico, (9) miristoleico, (10) pentadecanóico, (11) cis-10-pentadecenoico, (12) palmítico, (13) palmitoleico, (14) margárico, (15) margaroleico e (16) esteárico.

Já os valores mais elevados correspondem aos AG (17) oleico (167.8), (30) EPA (155.0), (23) araquídico (109.0) e (19) linoleico (105.6).

Tabela 4.3: Compilação de resultados obtidos da análise das curvas de calibração.

AG	ID#	<i>Corr</i>	<i>TV</i>	pH_0	<i>SS</i>	σ_{fit}	b_0	$\sigma(b_0)$	%RSE	pH_0
Butírico	1	0.99033	0.21	0.839	0.02279	0.0503	-0.0953	0.0290	30.5	0.009
Capróico	2	0.99935	0.05	0.958	0.00308	0.0185	-0.0334	0.0107	31.9	0.012
Caprílico	3	0.99996	0.01	0.990	0.00025	0.0053	-0.0052	0.0031	58.6	0.122
Cáprico	4	0.99999	0.01	0.996	0.00006	0.0025	-0.0031	0.0015	46.3	0.059
Láurico	6	0.99999	0.01	0.996	0.00005	0.0024	-0.0010	0.0014	145.0	0.508
Tridecanóico	7	1.00000	0.00	0.997	0.00001	0.0010	0.0008	0.0006	74.9	0.214
Mirístico	8	0.99999	0.01	0.996	0.00007	0.0028	0.0032	0.0016	50.6	0.080
Miristoleico	9	0.99998	0.01	0.993	0.00004	0.0022	0.0023	0.0013	56.9	0.113
Pentadecanóico	10	0.99998	0.01	0.993	0.00004	0.0022	0.0041	0.0013	30.4	0.009
cis-10- Pentadecenóico	11	0.99995	0.01	0.989	0.00011	0.0035	0.0043	0.0020	46.6	0.061
Palmitico	12	0.99988	0.02	0.982	0.00279	0.0176	0.0298	0.0102	34.0	0.017
Palmitoleico	13	0.99952	0.05	0.964	0.00111	0.0111	0.0096	0.0064	66.3	0.166
Margárico	14	0.99997	0.01	0.991	0.00008	0.0030	0.0012	0.0017	145.6	0.510
Margaroleico	15	0.99986	0.02	0.981	0.00036	0.0063	-0.0024	0.0036	149.9	0.522
Esteárico	16	0.99995	0.02	0.988	0.00053	0.0077	0.0086	0.0044	51.6	0.085
Oleico	17	0.99986	0.02	0.981	0.00327	0.0191	0.0239	0.0110	45.9	0.057
Linoleico	19	0.99988	0.02	0.982	0.00116	0.0113	0.0088	0.0065	74.1	0.210
gama-Linolénico	21	0.99997	0.01	0.992	0.00005	0.0024	0.0008	0.0014	160.9	0.550
Linolénico	22	0.99999	0.01	0.994	0.00003	0.0017	0.0022	0.0010	43.8	0.048
Araquídico	23	0.99876	0.07	0.942	0.01238	0.0371	-0.0007	0.0214	3002.1	0.974
Gadoleico	24	0.99996	0.01	0.990	0.00009	0.0032	0.0023	0.0018	81.0	0.248
Heneicosanoico	25	0.99998	0.01	0.992	0.00004	0.0022	0.0030	0.0013	43.0	0.045
cis-11,14-Eicosadienóico	26	0.99621	0.13	0.899	0.01002	0.0334	-0.0296	0.0193	65.1	0.159
cis-8,11,14-Eicosatrienóico	27	0.99883	0.07	0.944	0.00198	0.0148	0.0139	0.0085	61.7	0.139
cis-11,14,17-Eicosatrienóico	28	0.99994	0.02	0.988	0.00006	0.0026	0.0045	0.0015	33.9	0.016
Araquidónico	29	0.99994	0.02	0.987	0.00010	0.0034	0.0047	0.0020	41.4	0.039
EPA	30	0.99736	0.11	0.916	0.05364	0.0772	-0.0843	0.0445	52.9	0.091
Tricosanoico	32	0.99961	0.04	0.967	0.00097	0.0104	0.0059	0.0060	101.1	0.349
Erúico	33	0.99997	0.01	0.991	0.00007	0.0027	0.0057	0.0016	27.4	0.005
cis-13-16-Docosadienóico	34	0.99768	0.10	0.921	0.00242	0.0164	0.0033	0.0095	286.9	0.735
Linhocérico	35	0.99933	0.06	0.957	0.00200	0.0149	0.0027	0.0086	315.4	0.758
DHA	36	0.99989	0.02	0.982	0.00029	0.0057	0.0002	0.0033	2079.2	0.968
Nervónico	37	0.99959	0.04	0.967	0.00035	0.0062	0.0104	0.0036	34.5	0.018

ID# - identificador; *Corr* - coeficiente de correlação de Pearson; *TV* - valor de teste para ($Corr = 1$);

Tabela 4.4: Compilação de resultados obtidos da análise das curvas de calibração.

AG	ID#	b_1	$\sigma(b_1)$	%RSE	X_{LD}	X_{LQ}	X_N	V_X	%CV $_X$
Butírico	1	26.26	1.23	4.7	0.0065	0.0087	0.964	0.00192	0.44
Capróico	2	37.47	0.45	1.2	0.0027	0.0043	1.465	0.00049	0.07
Caprílico	3	44.99	0.13	0.3	0.0005	0.0014	1.784	0.00012	0.01
Cáprico	4	50.03	0.06	0.1	0.0002	0.0006	1.993	0.00005	0.01
Láurico	6	52.91	0.06	0.1	0.0002	0.0005	2.118	0.00005	0.00
Tridecanóico	7	52.31	0.05	0.1	0.0001	0.0002	1.049	0.00002	0.00
Mirístico	8	54.87	0.07	0.1	0.0001	0.0005	2.200	0.00005	0.00
Miristoleico	9	53.92	0.11	0.2	0.0001	0.0004	1.083	0.00004	0.01
Pentadecanóico	10	53.77	0.11	0.2	0.0001	0.0004	1.080	0.00004	0.01
cis-10- Pentadecenóico	11	52.77	0.17	0.3	0.0002	0.0006	1.059	0.00007	0.01
Palmítico	12	56.29	0.29	0.5	0.0006	0.0029	3.432	0.00031	0.02
Palmitoleico	13	52.52	0.54	1.0	0.0006	0.0021	1.058	0.00021	0.04
Margárico	14	54.39	0.14	0.3	0.0002	0.0006	1.091	0.00005	0.01
Margaroleico	15	55.33	0.31	0.6	0.0005	0.0013	1.107	0.00011	0.02
Esteárico	16	55.72	0.19	0.3	0.0004	0.0014	2.247	0.00014	0.01
Oleico	17	167.82	0.93	0.6	0.0003	0.0011	3.412	0.00011	0.01
Linoleico	19	105.61	0.55	0.5	0.0003	0.0011	2.145	0.00011	0.01
gama-Linolénico	21	23.67	0.06	0.2	0.0003	0.0011	0.945	0.00010	0.02
Linolénico	22	46.78	0.08	0.2	0.0001	0.0004	0.937	0.00004	0.01
Araquídico	23	108.98	1.81	1.7	0.0013	0.0037	2.101	0.00034	0.03
Gadoleico	24	53.88	0.15	0.3	0.0002	0.0006	1.085	0.00006	0.01
Heneicosanoíco	25	49.00	0.11	0.2	0.0001	0.0004	0.986	0.00005	0.01
cis-11,14-Eicosadienóico	26	55.89	1.63	2.9	0.0027	0.0041	1.047	0.00060	0.11
cis-8,11,14-Eicosatrienóico	27	22.36	0.36	1.6	0.0018	0.0037	0.934	0.00066	0.14
cis-11,14,17-Eicosatrienóico	28	36.45	0.13	0.4	0.0001	0.0007	0.735	0.00007	0.02
Araquidónico	29	45.18	0.17	0.4	0.0002	0.0007	0.914	0.00008	0.02
EPA	30	155.04	3.76	2.4	0.0024	0.0060	2.944	0.00050	0.03
Tricosanoíco	32	54.14	0.51	0.9	0.0006	0.0020	1.097	0.00019	0.03
Erúico	33	49.60	0.13	0.3	0.0001	0.0005	0.999	0.00005	0.01
cis-13-16-Docosadienóico	34	17.58	0.40	2.3	0.0022	0.0059	0.681	0.00093	0.26
Linhocérico	35	59.36	0.73	1.2	0.0009	0.0027	1.165	0.00025	0.04
DHA	36	55.02	0.28	0.5	0.0004	0.0011	1.113	0.00010	0.02
Nervónico	37	31.75	0.30	1.0	0.0004	0.0018	0.637	0.00020	0.06

Em contrapartida os menores valores de sensibilidade foram obtidos com (34) cis-13,16-docosadienóico (17.6), (27) cis-8,11,14-eicosatrienóico (22.4), (21) γ -linolénico (23.7) e (1) butírico (26.3).

Curiosamente, se se tomar em linha de conta o valor da mediana ($\simeq 53$) com correspondendo a 100%, o valor mais baixo ($\simeq 18$) representa cerca de 1/3 desse valor e o valor mais alto ($\simeq 168$) representa o triplo do valor de referência.

Para melhor se evidenciar esta diferença nas sensibilidades, na figura (4.11) encontram-se representadas as estimativas obtidas com os respectivos intervalos de confiança estimados ao nível de confiança de 95%.

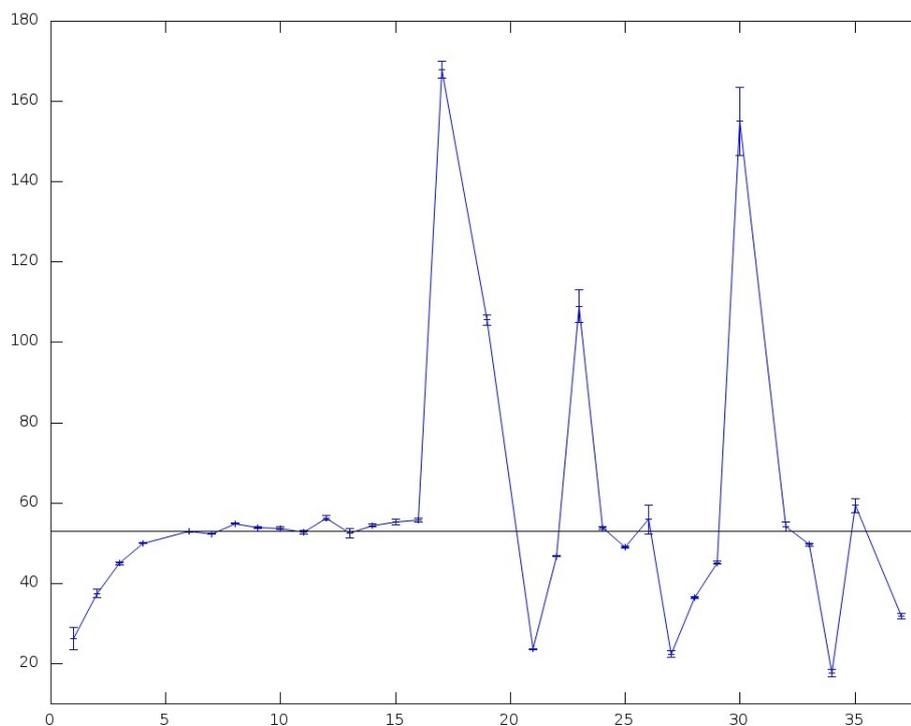


Figura 4.11: Representação da sensibilidade na detecção dos diferentes AG (b_1) sob a forma de barras de erro, estimadas ao nível de confiança de 95%, em função do índice identificador da espécie (ID#). A linha horizontal assinala o valor da mediana (52.91) dos valores de sensibilidade obtidos.

A figura (4.11) confirma o que foi anteriormente dito sobre a uniformidade e discrepância de valores estimados para a sensibilidade das curvas de calibração.

Importa agora tentar racionalizar o fenómeno dos extremos de valores obtidos.

Comparando os resultados obtidos com as respectivas formulas moleculares, ver tabelas (2.1) e (3.1), apenas se evidencia que, de um modo geral, os maiores valores de sensibilidade estão relacionados com AG de cadeia longa (C18 e C20) com diferentes tendência para poucas ligações duplas; já os de menor sensibilidade parecem estar relacionados com estruturas também de cadeia longa (C18 a C22) mas mais insaturados. A avaliar pela proximidade do valor de cadeia curta (ácido butírico, C4:0), este estranho fenómeno pode eventualmente estar relacionado com o mecanismo de degradação térmica deste grupo de compostos de baixa enquanto são oxidados por combustão.

Atendendo ainda à figura (4.11), verifica-se que os AG de cadeia curta (C4, C6 e C8) apresentam sensibilidades baixas que vão progressivamente crescendo até atingir um valor aproximado da média (com o C10) o que nos sugere que, no caso dos AG com baixa sensibilidade a carbonada possa fragmentar-se dando origem a fragmentos de hidrocarbonetos de cadeia curta contendo heteroátomos, sendo estes os responsáveis pela detecção com baixa sensibilidade.

Já os valores mais elevados podem estar relacionados com o facto de os AG de cadeia mais longa e poliinsaturados consigam preservar e estabilizar a sua estrutura durante o decurso da combustão.

Vejamos agora, ao nível da validação, o que se consegue demonstrar sobre este método GC-FID para a quantificação de AG com base no uso do CRM (MIX).

4.1.1.1 Selectividade

De um modo geral o coeficiente de correlação obtido (ρ_{XY}) é elevado - o valor médio é da ordem de 0.99994 sendo os valores extremos 0.990327 e 0.999996. Ainda assim, para garantir que esta correlação é de facto eficaz e obter desse modo a confirmação de que o sinal se deve ao analito em causa, foi realizado um teste *t*-student para a correlação assumindo como hipótese nula a correlação unitária ($H_0 : |\rho_{XY}| = 1$).

Ainda da tabela (4.3) verifica-se que os valores calculados (*TV*, eq.(3.2)) se situam entre 0.00 e 0.21 o que se traduz por uma elevada probabilidade da hipótese nula ser verdadeira ($p[H_0]$), situada entre 83.9 e 99.7% de probabilidade.

Atendendo ainda às restantes características instrumentais reveladas neste estudo com o MIX, fica demonstrado que o sinal obtido não só está intimamente relacionado com cada um dos analitos em particular bem como, neste tipo de amostra complexa, a resolução instrumental dos sinais é suficientemente boa para garantir e permitir quantificar cada um dos analitos individualmente sendo inequívoca a sua identificação com base nos tempos de retenção relativos (T_{RR}).

4.1.1.2 Sensibilidade

A sensibilidade traduz a aptidão do método analítico para reagir a incrementos de concentração através da geração de uma resposta directamente proporcional, eq.(2.36).

Como já foi previamente avaliado, a detecção com FID deste tipo de compostos é fácil e rigorosa - os valores estimados com base na modelação com polinómio de primeiro grau (P_{01}) são muito precisos, apresentando boa fiabilidade estatística na gama de concentração testada.

Verificou-se também que o sistema de detecção utilizado é genérico (permite detectar o grupo de compostos submetido a análise) e as respectivas sensibilidades tendem para um valor comum muito próximo. Contudo existem alguns casos extremos (4 valores máximos e 6 mínimos) que fogem a esta regra.

4.1.1.3 Limiares analíticos

Não sendo possível avaliar a detecção e a quantificação com amostras em branco e também não sendo estatisticamente fiável a estimativa da ordenada na origem (b_0) do modelo utilizado na calibração (P_{01}), ver tabela (4.3), teve-se que estimar os limiares analíticos com base na estimativa de erro do modelo, equações (2.37) e (2.38).

Os valores obtidos para os respectivos limites de detecção (X_{LD}) e limites de quantificação (X_{LQ}) referentes a cada um dos analitos testados encontram-se sistematizados na tabela (4.4).

De uma forma genérica, em termos de detecção os valores encontrados apresentam uma média de 0.0003 (g/g), oscilando entre 0.0001 (g/g) até 0.0065 (g/g). Já a quantificação aponta para valores da ordem de 0.0011 (g/g), variando entre 0.0002 (g/g) e 0.0087 (g/g).

4.1.1.4 Gama analítica

Com base na amostra mista utilizada (MIX) ficou demonstrado que a gama analítica testada (variando quase duas ordens de grandeza no teor de cada componente da mistura, desde 5% a 100%) é linear em toda a sua amplitude testada e pode ser modelada através de um polinómio de primeiro grau (P_{01}).

Confrontando o valor do limite de quantificação com os valores respectivos dos padrões testados de menor concentração, apenas se detecta algumas anomalias no caso da quantificação do ácido butírico (ID# = 1) já que os dois primeiros padrões ($X_1= 0.002$ e $X_2= 0.004$) se situam a baixo do limite de detecção

($X_{LD}=0.0065$) devendo por isso a gama analítica apenas ser considerada a partir do terceiro padrão testado ($X_3= 0.008$) - apesar deste valor ser ligeiramente inferior ao limite de quantificação encontrado ($X_{LQ}= 0.0107$), a norma ISO 8466-1:1990 [35] considera esta situação aceitável dado que o padrão seguinte ($X_4=0.012$) já apresenta um valor bem acima do limite de quantificação estimado.

Pensamos que esta anomalia esteja relacionada com a dificuldade previamente encontrada quanto à escolha do melhor modelo de calibração para este padrão - devido a um desvio mais significativo no valor obtido para o padrão de maior teor (X_N) o erro do ajuste do modelo de calibração é inflacionado tendo como consequência este aumento dos limiares analíticos.

De um modo geral pode-se dizer então que, com base nos padrões utilizados, a gama analítica situa-se entre o limite de quantificação estimado (X_{LQ}) e o último padrão testado (X_N).

4.1.1.5 Precisão

Com base na norma ISO 8466-1:1990 [35] foi estimada a incerteza média do método em termos absolutos (V_X , eq.(2.39)) e relativos ($\%CV_X$, eq.(2.40)) sendo estes últimos mais vantajosos para permitir a comparação de estimativas entre métodos.

Na tabela (4.4) encontra-se os valores obtidos para a imprecisão relativa esperada para a quantificação de cada analito - os valores obtidos apontam para um valor médio de imprecisão relativa da ordem de 0.02%, variando entre os extremos 0.00% e 0.44%, sendo o pior valor obtido no caso ID# = 1, que já se tinha revelado como algo problemático.

Destes valores se conclui que a quantificação é muito rigorosa atingindo valores de imprecisão inferiores a 0.5%, evidenciando que esta quantificação é muito eficiente⁵.

Já numa segunda abordagem para a estimativa da precisão foram efectuadas oito injeções consecutivas de uma solução contendo a mesma amostra e da solução padrão, em condições de repetibilidade⁶. A repetibilidade foi avaliada através da

⁵Um método analítico diz-se tanto mais eficiente quanto menor for a estimativa da incerteza relacionada com a quantificação do analito

⁶As soluções que continham a amostra foram preparadas segundo o método em estudo da AOAC descrito no capítulo 3. Fez-se uma correção das áreas obtidas da amostra em estudo pelas injeções no GC, com a área obtida correspondente à do padrão interno utilizado, o ácido undecanóico. Efectuaram-se os cálculos através das equações 3.4 e 3.5, de onde se obteve o valor da concentração para cada AG na amostra em estudo. Através destas concentrações pode-se avaliar a repetibilidade do método. Tanto a preparação da amostra como as injeções foram efectuadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e sob as mesmas condições cromatográficas.

análise do coeficiente de variação de um conjunto de réplicas consecutivas da mesma amostra (%CV, eq.(2.41)).

Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela 4.5.

Tabela 4.5: Resultados obtidos para a concentração e o respectivo coeficiente de variação para os AG representados no Padrão e na amostra.

AG	Padrão		Amostra	
	Teor (mg/ml)	CV(%)	Teor (mg/ml)	CV(%)
Palmitico	0.029 (0.0291)	0.10	0.01 (0.0016)	0.33
Palmitoleico	0.010 (0.0006)	0.06	0.05 (0.0226)	0.44
Linolénico	0.010 (0.0003)	0.03	0.02 (0.0232)	1.29
EPA	0.009 (0.0030)	0.30	0.02 (0.0105)	0.53
DHA	0.009 (0.0013)	0.14	0.02 (0.0074)	0.39

Através desta estimativa de imprecisão, pode-se concluir que o método é preciso em termos de repetibilidade se este for inferior a 0.1%.

Através dos sinais obtidos pelo método GC-FID, pode-se então calcular o CV, pelo quociente entre o desvio padrão e a média das concentrações obtidas para cada um dos ácidos gordos.

Pela análise da tabela e dos respectivos coeficientes de variação, pode-se concluir que o método em termos de repetibilidade está validado para todos os ácidos gordos aqui representados, menos para o linolénico obtido na amostra. Isto porque este apresenta um coeficiente de repetibilidade maior que 1,0%. Para todos os outros o método é preciso quer no padrão, quer na amostra.

4.1.1.6 Exactidão

Tratando-se o MIX de um material certificado (CRM), este permite avaliar directamente a exactidão do método por via da validação externa sem ter necessidade de participar num ensaio interlaboratorial o que é extremamente vantajoso atendendo aos custos envolvidos e tempo despendido nessa actividade.

Assim sendo, duas abordagens foram utilizadas: a avaliação do MIX por reamostragem, utilizando estimativas por interpolação sobre os valores da curva de calibração e a avaliação com base em testes de recuperação.

Estimativa por reamostragem

Foi utilizado o método de “jakknife” (também conhecido por “Leave-one-out”)[45].

O procedimento foi por realização iterativa.

Para cada curva de calibração existem 11 valores de padrões - desde o mais baixo (X_1) ao mais alto (X_{11}).

Para poder utilizar a calibração como método de estimativa por interpolação, foi retirado 1 dos pontos do interior da curva de calibração (valores X_2 a X_{10}) e foi ajustado o modelo de calibração (P_{01}).

De seguida, usando a informação do sinal do valor removido (y_i) foi estimada a concentração do padrão (\hat{x}_i). A inexactidão foi então avaliada com base no erro relativo

$$\%RE = 100 \times \frac{(\hat{x}_i - x_i)}{x_i} \quad (4.1)$$

onde x_i é o valor nominal (reportado pelo certificado do CRM) da concentração desse padrão.

Na tabela(4.6) faz-se um resumo sistematizado dos resultados encontrados.

AG	ID	RE ₂	RE ₃	RE ₄	RE ₅	RE ₆	RE ₇	RE ₈	RE ₉	RE ₁₀	Min	Max
Butírico	1	1.5	3.3	2.9	2.7	-1.9	-4.6	-1.3	-1.5	4.8	-4.6	4.8
Capróico	2	0.2	0.9	1.1	1.3	-1.7	-1.3	-1.6	-0.3	1.4	-1.7	1.4
Caprílico	3	0.2	0.3	0.5	0.4	-0.2	-0.8	-0.6	-0.1	0.7	-0.8	0.7
Cáprico	4	0.1	0.1	0.2	0.2	-0.2	-0.2	-0.1	-0.2	-0.1	-0.2	0.2
Láurico	6	-0.2	-0.2	0.1	0.0	-0.1	0.4	0.3	-0.2	-0.6	-0.6	0.4
Tridecanóico	7	-0.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.3	0.2	0.0	-0.4	-0.4	0.3
Mirístico	8	-0.2	0.1	0.0	-0.1	0.1	0.5	0.4	-0.4	-1.3	-1.3	0.5
Miristoleico	9	-0.2	0.2	-0.3	-0.4	0.2	-0.1	1.3	-0.8	-1.0	-1.0	1.3
Pentadecanóico	10	-0.2	0.2	0.0	-0.4	0.1	-0.3	1.4	-0.8	-1.4	-1.4	1.4
cis-10-Pentadecenóico	11	-0.2	0.3	0.1	-0.3	0.0	-0.7	2.8	-1.3	-1.8	-1.8	2.8
Palmítico	12	-0.9	-0.5	-0.5	0.1	1.3	1.2	1.2	-0.9	-1.8	-1.8	1.3
Palmitoleico	13	-0.3	0.6	-0.1	-0.2	-0.8	-0.9	0.5	-0.4	-1.2	-1.2	0.6
Margárico	14	-0.2	-0.2	0.0	0.4	0.5	0.3	-2.0	1.0	0.5	-2.0	1.0
Margaroleico	15	-0.1	0.8	0.0	-0.8	-1.2	-0.8	0.9	-0.5	1.0	-1.2	1.0
Esteárico	16	-0.7	0.0	0.0	-0.4	0.4	0.4	0.7	-0.8	-1.6	-1.6	0.7
Oleico	17	-1.0	-0.5	-0.7	-0.1	1.3	1.2	1.0	-0.8	-1.2	-1.2	1.3
Linoleico	19	-0.7	-0.6	-0.7	-0.5	0.2	1.1	1.5	-0.1	-1.3	-1.3	1.5
gama-Linolénico	21	0.2	0.6	-0.2	-0.5	-0.2	-0.4	1.0	-0.2	-0.1	-0.5	1.0
Linolénico	22	0.2	0.3	-0.2	-0.6	0.1	-0.1	0.7	-0.2	-0.4	-0.6	0.7
Araquídico	23	0.8	1.5	0.3	-0.5	0.6	-0.4	-1.2	0.2	-1.8	-1.8	1.5
Gadoleico	24	0.1	0.1	-0.7	-0.9	0.2	0.0	0.5	0.2	0.4	-0.9	0.5
Heneicosanoíco	25	-0.3	-0.3	-0.2	-0.2	0.6	0.2	0.5	0.6	0.2	-0.3	0.6
cis-11,14-Eicosadienóico	26	0.3	1.4	1.1	0.6	1.4	-1.2	-0.3	-0.7	0.8	-1.2	1.4
cis-8,11,14-Eicosatrienóico	27	-2.2	-1.5	-1.6	0.7	-0.8	-0.2	0.7	0.2	-2.0	-2.2	0.7
cis-11,14,17-Eicosatrienóico	28	-0.5	-0.5	-0.1	0.7	1.3	0.0	0.6	-0.3	-1.9	-1.9	1.3
Araquidónico	29	-0.6	-0.5	-0.2	-0.2	0.8	0.6	1.2	-0.2	-1.2	-1.2	1.2
EPA	30	-1.3	1.2	0.5	1.8	-0.2	-0.7	-0.9	-1.2	2.3	-1.3	2.3
Tricosanoíco	32	-1.4	-0.9	1.0	0.6	1.0	-0.7	0.6	0.2	-1.8	-1.8	1.0
Erúico	33	-0.6	0.1	0.0	0.0	1.1	0.3	0.4	0.0	-1.6	-1.6	1.1
cis-13,16-Docosadienóico	34	-2.1	1.5	0.5	1.2	-0.5	-1.0	0.7	-0.9	-2.2	-2.2	1.5
Linhocérico	35	1.3	2.2	-2.2	2.3	1.4	-1.6	-1.0	-0.8	-0.9	-2.2	2.3
DHA	36	-0.1	-0.7	-0.5	-1.3	-0.3	0.0	0.9	0.5	1.8	-1.3	1.8
Nervónico	37	-1.0	0.4	0.4	1.1	0.8	1.7	1.0	-0.8	-2.1	-2.1	1.7

Tabela 4.6: Resultados obtidos na avaliação da exactidão por reamostragem seguindo o método de jackknife.

Observando os resultados da tabela (4.6), verifica-se que, regra geral o desvio estimado é inferior a 2%, não considerando muito significativos os valores obtidos com o componente ID# = 1 (valores algo problemáticos).

Recuperação

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito, em particular, numa mistura complexa sem interferência de outros componentes.

Para avaliar as interferências de matriz efectua-se testes de recuperação utilizando uma amostra real representativa do tipo de matriz e sempre que possível com valor quantificável.

Neste estudo utilizou-se uma amostra real de uma refeição pré cozinhada de uma marca comercializada numa grande superfície comercial. Esta amostra foi preparada segundo o procedimento experimental, bem como o padrão para posterior fortificação das amostras.

Inicialmente efectuou-se a injeção da amostra, para estimar o valor da concentração inicial para cada AG, obtendo-se o cromatograma representado na figura 4.12

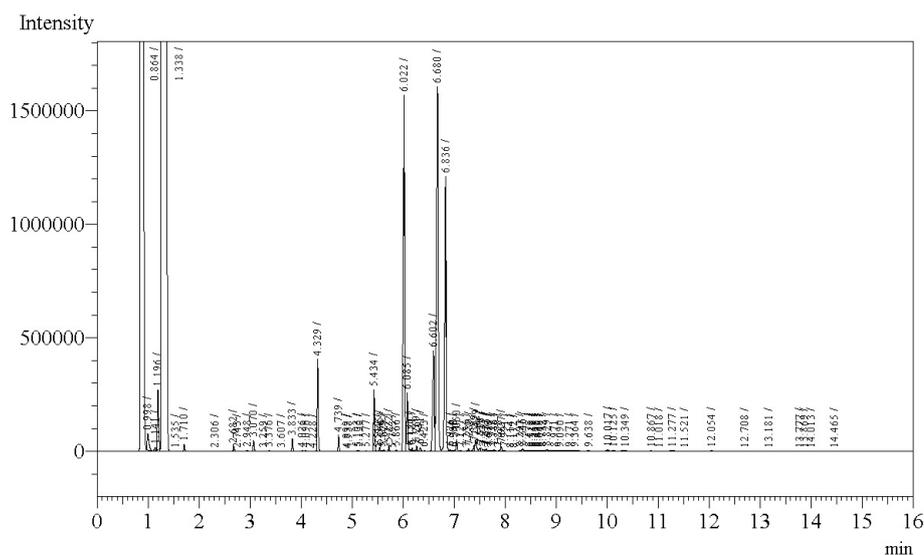


Figura 4.12: Cromatograma obtido no GC-FID para a amostra em estudo

Depois disto fortificou-se a amostra com o analito, ou seja com o padrão, também submetido ao mesmo procedimento que a amostra, numa certa concentração conhecida e obteve-se o seguinte cromatograma, 4.13.

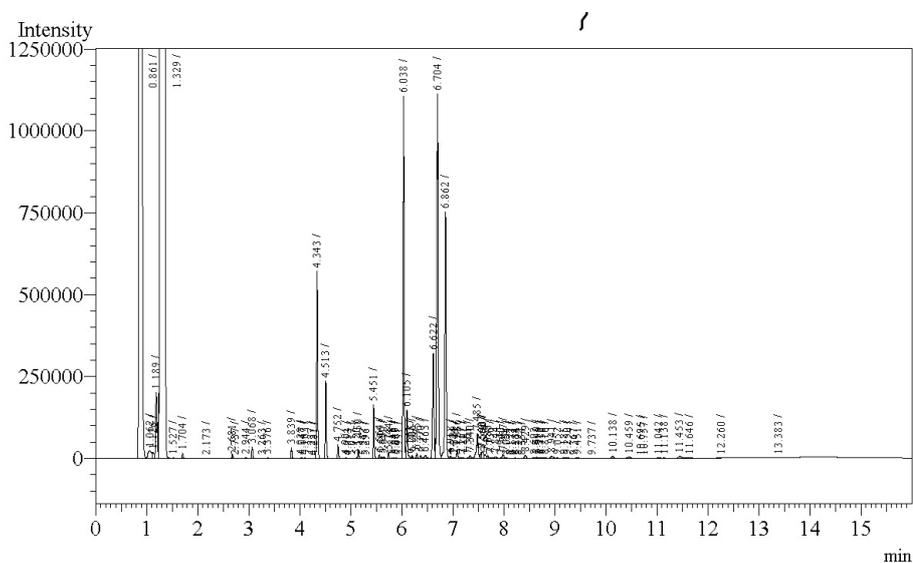


Figura 4.13: Cromatograma obtido por GC-FID para a amostra fortificada com analito de 50%

É de referir pela análise dos cromatogramas, que uma amostra real, pode não conter na sua constituição todos os 37 AG possíveis que acabam por não ser quantificáveis nessa amostra. Esses AG que não fazem parte da constituição da amostra, só são detectáveis no cromatograma da amostra fortificada, isto porque se adicionou o padrão que contém os AG na totalidade. E também é de salientar a visualização de um aumento da intensidade dos picos.

Vão ser representados três AG de cada gama analítica: gama alta, média e intermédia, obtidos pela análise da figura (4.11).

Os resultados obtidos para a recuperação do método ($\%RI$, eq. (2.42)) encontram-se sistematizados na tabela (4.7).

Tabela 4.7: Valores obtidos para a percentagem da recuperação dos AG na amostra.

ID	AG	Dia	%RI			
17	Oleico	1	98.7	99.0	102.3	100.0
		2	99.5	99.0	100.7	102.8
19	Linoleico	1	101.3	103.2	105.9	105.9
		2	104.0	106.6	105.1	105.8
30	EPA	1	100.9	103.6	106.4	103.7
		2	103.8	107.6	105.6	100.2
4	Cáprico	1	101.2	102.3	100.8	101.9
		2	104.0	106.5	108.5	105.8
6	Láurico	1	100.3	103.6	105.3	104.3
		2	106.2	101.6	108.6	104.9
8	Mirístico	1	100.2	101.7	99.9	105.9
		2	104.5	103.2	101.4	101.4
1	Butírico	1	104.2	101.6	100.5	105.8
		2	101.9	100.3	101.4	102.7
21	γ -Linolénico	1	101.2	101.3	101.5	100.5
		2	100.8	101.4	100.9	99.5
34	cis-13,16-Docosadienóico	1	100.5	101.3	103.0	102.8
		2	99.9	108.7	101.9	101.3

Nesta tabela como representantes da gama analítica alta temos os AG: 17-Oleico, 19-Linoleico e 30-EPA, para a gama intermédia 4-Cáprico, 6-Láurico e 8-Mirístico e por último para a gama mais baixa o 1-Butírico, 21-Gama-Linolénico e o 34-cis-13-16-docosadienóico.

Pela análise destes valores podemos afirmar que o método apresenta uma boa percentagem de recuperação.

Para testar se estes resultados eram influenciados por valores extremos, efectuou-se o teste de Grubbs, para cada AG e em cada dia de análises. Concluiu-se que não existiam níveis extremos que afectassem a recuperação para um nível de 95%, visto que para o AG 17-oleico, obteve-se um $G_{\text{máximo}}$ de 0.77 para o dia 1 e 0.90 para o dia 2, e um $G_{\text{mínimo}}$ de -1.41 e -1.36 respectivamente, para o 30-EPA no dia 1 teve um $G_{\text{máximo}}$ de 1.22 e $G_{\text{mínimo}}$ de -1.05, e no dia 2, 1.30 para o valor máximo e -1.05 para o mínimo e por último o AG 19-Linoleico, apresenta um valor de $G_{\text{máximo}}$ 1.38 e $G_{\text{mínimo}}$ de 0.91 para o dia 1 e 1.45 e -0.82 para o dia 2.

Para a gama analítica intermédia também não se verificaram anomalias, tendo-se verificado todos os valores inferiores ao valor crítico para um $N=4$, 1.48, visto que para o 4-Cáprico se obteve um $G_{\text{máximo}}$ de 0.78 para o dia 1 e 0.95 para o

dia 2 e para o Gmínimo um valor de -1.38 e -1.00, para os respectivos dias. Em relação ao AG 6-Laurico apresenta um valor de 1.37 e 1.39 de Gmáximo e -1.01 e -0.90 para o Gmínimo e o 8-Mirístico, último representante da gama intermédia tem um Gmáximo de 0.74 e 0.79 e para o Gmínimo -1.42 e -1.38.

Por último os três AG da gama baixa, também não apresentaram nenhum valor discrepante, tendo o 1-Butírico para o dia 1 um Gmáximo de 0.95 e Gmínimo de -1.39 e para o dia 2, um valor de 0.97 para Gmáximo e -1.36 para o Gmínimo, em relação ao AG 21-Gama Linolénico apresenta um Gmáximo de 1,06 e Gmínimo de -1.20 para o dia 1 e para o dia 2 um Gmáximo de 1.35 e Gmínimo de -0.81 e por último para o AG 34-Cis-13-16-docosadienóico tem um valor de 1.02 e -1.19 de Gmáximo e Gmínimo para o dia 1 e 0.62 e -1.47 respectivamente para o dia 2.

4.2 Estudo de uma amostra

Agora que o método se encontra validado, vai-se proceder á análise de uma amostra real de alimentação humana e concluir-se qual os AG que apresenta na sua constituição, qual a sua percentagem de gordura total, de ácidos gordos saturados, monosaturados e polissaturados.

Todos estes cálculos foram efectuados através de uma folha de excel, construída com todas as equações representadas no capítulo 3 que permite ir alterando os valores obtidos para cada injeção de GC, e obter logo todos os valores necessários á apresentação final dos resultados para cada matriz, ou seja, que o laboratório tem que reportar para cada cliente.

De muitas amostras testadas com este método de alimentação humana: como sopas, sandes, refeições, vários tipos de peixe, carnes entre outras, vai-se representar neste estudo os resultados obtidos para uma amostra de uma refeição com salmão.

Inicialmente póde-se fazer um estudo prévio para cada tipo de matriz de onde se obtém uma estimativa de quais AG se vai detectar através da injeção e também qual a percentagem de cada tipo de AG que se deve obter. Este estudo nos laboratórios vai-se construindo com o tempo e com todas as análises de diferentes matrizes que se analisam. Assim na hora de fazer o relatório para o cliente, o responsável pode fazer uma breve análise dos resultados e ver se estão conforme o previsto ou detetar se houve algum tipo de problema com a análise em questão.

Após a moagem da nossa amostra, e preparação segundo o método[44], injectou-se no GC-FID, seguindo as condições cromatográficas apresentadas no capítulo 3 e obteve-se o seguinte cromatograma da figura 4.14

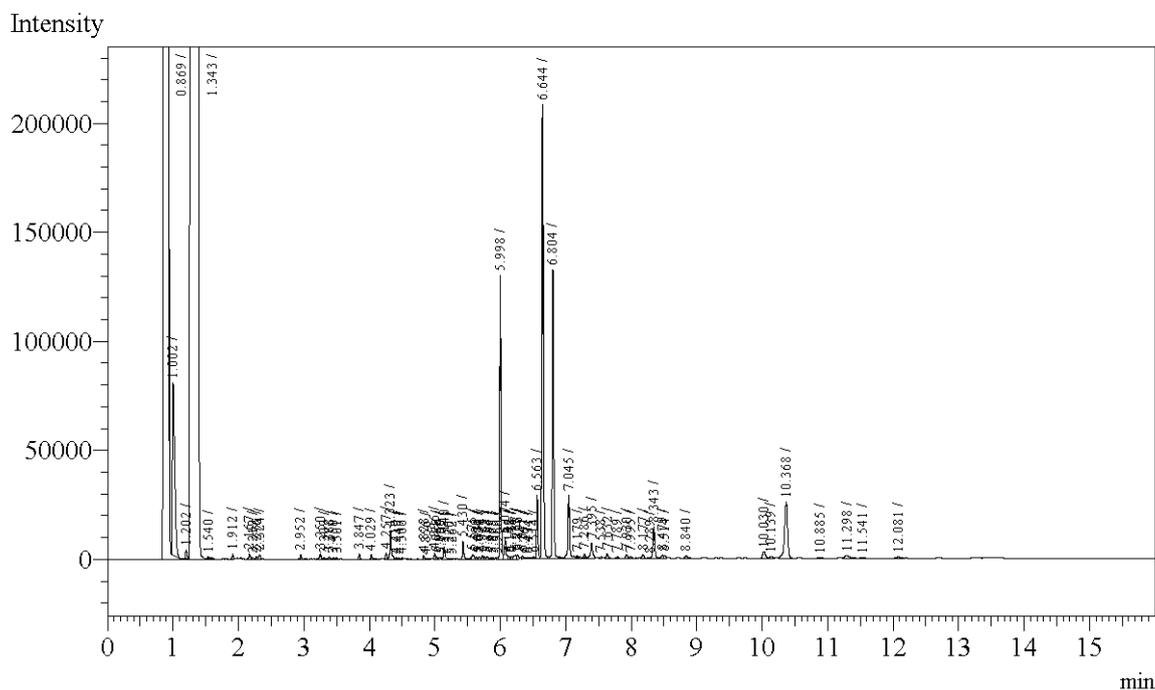


Figura 4.14: Cromatograma obtido para a amostra real da refeição pré cozinhada

Através da injeção do Padrão, identificam-se quais os picos que correspondem aos AG e assim obtém-se os tempos de retenção e as áreas dos picos correspondentes a cada AG na amostra.

De seguida utilizando a folha de excel construída anteriormente, fez-se uma actualização de dados: dos tempos de retenção e áreas para o padrão e para a amostra, obtendo-se então a concentração de cada ácido gordo, a percentagem de AG nonosaturados, saturados e polisaturados na amostra e também a percentagem de gordura total.

Os valores obtidos para esta amostra foram de: 12.4% de gordura total, 3.08% de ácidos gordos saturados, 12.16% de ácidos gordos monosaturados e 3.08% de ácidos gordos monosaturados.

Por vezes existem clientes que especificam a detecção e quantificação de alguns AG específicos. Nesta matriz que contém salmão, poderíamos reportar o valor dos AG característico do omega 3 e omega 6, que existem num nível considerado no salmão. Estes AG polinsaturados de omega 3 são o ácido γ -linoleico, o ácido araquidónico, o ácido cis-5,8,11,14,17-Eicosapentenóico (EPA) e ácido docohexaenóico (DHA).

Esta amostra contém uma concentração de 3,78% de linoleico, 0,10% de araquidónico, do EPA apresenta 0,52% e do AG DHA 2,90%. A soma de todos estes

AG é de 7,3% o que nos leva a concluir que existe esta percentagem de omega 3 e 6 na amostra em estudo.

Assim pode-se retirar qualquer informação de qualquer AG presente em cada amostra.

Capítulo 5

Conclusões

O objectivo deste trabalho visava a validação do método da AOAC para a detecção de gordura total, e também em forma de ácidos gordos saturados e insaturados em matrizes de alimentação humana, por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama.

Iniciou-se este estudo pela preparação de uma solução padrão (CRM), que continha 37 ácidos gordos existentes na alimentação humana que o nosso organismo ingere todos os dias. Desta solução efectuaram-se 11 diluições de 100% a 5%, de modo a diminuir a concentração inicial.

A primeira fase consistiu numa avaliação prévia utilizando o CRM (MIX) com as diferentes diluições, de onde se obtiveram as curvas de calibração referentes aos Ácidos Gordos presentes no CRM, para se testar a capacidade de quantificação do método.

Com estas curvas de calibração pode-se concluir que todas seguem o modelo polinomial de primeiro grau, e apenas duas curvas referentes ao Ácido Gordo Caprónico e Araquídico apresentaram melhor ajuste ao polinómio de segundo grau, mesmo depois da realização do teste de Mandel.

Destas curvas de calibração concluiu-se também que algumas delas têm uma grande tendência para a sua sobreposição, ou seja, apresentam uma grande sensibilidade, isto porque todos os analitos em estudo têm em comum o grupo carboxilo, diferindo apenas a cadeia carbonada que poderá ser o motivo para alguns ácidos gordos de cadeia carbonada longa, apresentarem uma sensibilidade mais baixa, porque a sua cadeia carbonada pode originar hidrocarbonetos de cadeia mais curta contendo heteroátomos.

Em termos de sensibilidade concluiu-se que alguns ácidos gordos apresentam uma sensibilidade muito próxima, podendo-se agrupar os ácidos gordos em tres grupos: ácidos gordos com sensibilidade de gama alta, de gama intermédia e de gama baixa.

Os ácidos gordos cis-13,16-docosadienóico, cis-8,11,14-eicosatrienóico, γ -linolénico e butírico apresentam os menores valores de sensibilidade, o cáprico, láurico, tri-decanóico, mirístico, miristoleico, pentadecanóico, cis-10-pentadecenóico, palmítico, palmitoleico, margárico, margaroleico e esteárico apresentam uma sensibilidade de gama intermédia e para os valores mais altos tem-se os ácidos gordos oleico, EPA, araquídico e linoleico.

Concluiu-se também que o método é muito selectivo, apresentando um coeficiente de correlação elevado quer para o valor médio quer para os extremos, o que nos faz afirmar que o sinal obtido do MIX relaciona-se com cada um dos analíticos sendo a resolução instrumental dos sinais muito boa. Tendo em conta isto pode-se garantir uma boa quantificação e identificação dos analitos individuais.

Obtiveram-se os valores para os limiares analíticos tendo em conta a estimativa de erro do modelo, obtendo-se o valor de 0.0003(g/g), oscilando entre 0.0001(g/g) até 0.0065(g/g) e para a detecção de 0.0011(g/g) variando entre 0.0002(g/g) e 0.0087(g/g). Tendo em conta estes valores e os padrões utilizados pode-se concluir também que a gama analítica está entre o limite de quantificação e o ultimo padrão testado.

A nível da precisão, pela análise dos coeficientes de variação obtidos de um conjunto de réplicas efectuadas da mesma amostra, pode-se concluir que o método está validado para todos os ácidos gordos, menos para o linoleico que apresenta um coeficiente de repetibilidade maior que 0.1%. Em termos do padrão todos os ácidos gordos apresentaram um coeficiente de repetibilidade menor que 1.0%.

A exactidão do método foi avaliada segundo a recuperação de uma amostra, analisada em dois dias diferentes, de onde se concluiu que o método apresenta uma boa recuperação.

Este estudo foi concluído com um exemplo de uma amostra real, que futuramente será o procedimento utilizado pelo laboratório para poder obter as percentagens de gordura total nas amostras reais bem como as percentagens dos ácidos gordos individuais.

Este método, será muito útil para o laboratório porque com ele consegue-se reduzir o tempo de análise da amostra e reportar resultados com mais confiança que no método anterior.

Bibliografia

- [1] ISO/IEC 17025 - general requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Technical report, International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission, ISO / IEC, 2005.
- [2] Controlvet. Segurança alimentar. Technical report, ControlVet, 2009.
- [3] ISO 9001:2008 - quality management systems. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 2008.
- [4] Joseph M. Juran. *A qualidade desde o projeto: novos passos para o planejamento da qualidade em produtos e serviços*. Livraria Pioneira Editora, 1997.
- [5] A. Muller and H. Steinhardt. Food chemistry. *Food Chemistry*, 102:436–444, 2007.
- [6] Sistemas de gestão da qualidade - requisitos. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 2008.
- [7] ISO Guide 25 - general requirements for the competence of calibration and testing laboratories. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 1990.
- [8] EN 45001:1989 - general criteria for the operation of testing laboratories. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 1989.
- [9] Guia interpretativo da NP EN ISO/IEC 17025. Technical report, Instituto Português de Acreditação, IPAC, 2006.
- [10] Regulamento geral de acreditação. Technical report, Instituto Português de Acreditação, IPAC, 2012.
- [11] Lubert Stryer, Jeremy M. Berg, and John L. Tymoczko. *Biochemistry*. Freeman, 5th edition, 2002.

- [12] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger - Principles of Biochemistry*. Freeman, 6th edition, 2013.
- [13] J. S. Garrow and W. Philip T. James. *Human Nutrition and Dietetics*. Churchill Livingstone, 9th edition, 1993.
- [14] A. Vaclavik Vickie and W. Christian Elizabeth. *Essentials of food science*. Springer, 3th edition, 2008.
- [15] Instituto Nacional de Saude. As gorduras e os oleos na nutrição humana. *Relatorio de uma reunião organizada pela FAO e OMS em Roma*, 1977.
- [16] Joao B. *Fundamentos de Alimentacao Nutricao e Dietetia*. 2003.
- [17] J. Pierre, L. Martial, and S. Jean-Louis. Analytical methods for determination of trans fatty acid content in food. *European Journal of Lipid Science and technology*, 109(9):901–917, 2007.
- [18] N. Skoog Holler. *Principles of instrumental analysis*. 8th edition.
- [19] M. Rafael, L. Ilza, L.B.G. Carmen, and P. Jurandir. Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by headspace and gas chromatography/flame ionization detector. *Ciencias Exatas e Tecnologicas, Londrina*, 27(2):113–120, 2006.
- [20] J. Mendham, R.C. Denney, J. D. Barnes, and M.J.K. Thomas. *Vogel's Quantitative Chemical Analysis*. Prentice Hall, 6th edition, 2000.
- [21] Galen W. Ewing. *Metodos Instrumentais de Analise Quimica*. Sao Paulo. Edgar Blucher, 2002.
- [22] F.E. Grubbs. Sample criteria for testing outlying observations. *Ann. Math. Stat.*, 21:27, 1950.
- [23] F.E. Grubbs. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 11(1):1–21, 1969.
- [24] J. J. Faraway. *Linear models with R*. Chapman & Hall, 2005.
- [25] C. Jack. *Encyclopedia of Chromatography*. 2004.
- [26] Sadek C. Paul. *Illustrated pocket dictionary of chromatography*. Canada, 2004.
- [27] G. M. Sostenes Rosa Valentini. *Validação de Metodos Analiticos*. 2007.

- [28] Jorge L.G.F.S. Costa Pereira. *Validação de Metodos Analiticos, Departamento de Quimica da Faculdade de Ciencias e Tecnologia da Universidade de Coimbra*. 2008.
- [29] European commission. commission decision 2002/657/ec of 12 august implementing council directive 96/23/ec concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Technical report, Official Journal of European Communities, 2002.
- [30] E. S. L. R M. E. Thompsom and R. Wood. *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. 2002.
- [31] EURACHEM. Terminology in analytical measurement. introduction to vim 3 english edition. Technical report, 2011.
- [32] Flavio Leite. *Validação em Analise Quimica*. 1996.
- [33] RELACRE, editor. *Guia 13 - Validacao de Metodos Internos de Ensaio em Analise Quimica*. 2000.
- [34] I. H. T. Guideline. *Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. 2005.
- [35] ISO 8466-1:1990 - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics; part 1-statistical evaluation of the linear calibration function. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 1990.
- [36] ISO 8466-2:2001 - calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics; part 2-calibration strategy for non-linear second-order calibration functions. Technical report, International Organization for Standardization, ISO, 2001.
- [37] J. M. Andrade and M. P. Gomez-Carracedo. Notes on the use of mandel's test to check for nonlinearity in laboratory calibrations. *Anal. Methods*, 5:1145–1149, 2013.
- [38] M. B. Natilene, J. A. P. Ozelito, P. Luciana, and R. L. Maria. Validacao de metodos analiticos: Estrategia e discussao. *Pesticidas: R. Ecotoxicol e Meio Ambiente*, 13:129–146, 2013.
- [39] S. Oshioka. *hemical Stability of Drugs Substances*. 2002.

- [40] W. J. Youden and E. H. Steiner. *Statistical manual of AOAC*. AOAC - Association of Official Analytical Chemistry, 1975.
- [41] I. C. Cesar and G. A. Pianetti. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using youden's test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45:235 – 240, 06 2009.
- [42] James N. Miller and Jane C. Miller. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Prentice hall, 5th edition, 2005.
- [43] D. Brynn Hibbert and J. Justin Gooding. *Data Analysis for Chemistry: An Introductory Guide for Students and Laboratory Scientists*. Oxford University Press, 2006.
- [44] Aoac official method 996.06 fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Technical report, AOAC International, 2002.
- [45] Michael E. Swartz and Ira S. Krull. *Handbook of Analytical Validation*. CRC Press, 2012.

Apêndice A

Tabelas

Tabela A.1: Valores críticos para teste de Grubbs ($\alpha = 0.05$) [ISO 17025, ASTM E-178].

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s_x}$$

<i>n</i>	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>G</i>	1.15	1.48	1.71	1.89	2.02	2.13	2.21	2.29	2.34
<i>n</i>	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<i>G</i>	2.41	2.46	2.51	2.55	2.54	2.62	2.65	2.68	2.71
<i>n</i>	21	22	23	24	25	30	35	40	50
<i>G</i>	2.73	2.76	2.78	2.80	2.82	2.91	2.98	3.04	3.13
<i>n</i>	60	70	80	90	100	110	120	130	140
<i>G</i>	3.20	3.26	3.31	3.35	3.38	3.42	3.44	3.47	3.49

Tabela A.2: Valores críticos para o teste de Cochran referente à homogeneidade da variância ($\alpha = 0.05$).

$$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2}$$

<i>m</i> = número de réplicas da estimativa de cada variância								
<i>n</i>	2	3	4	5	6	7	10	∞
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8010	0.5000
3	0.9969	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6167	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5017	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4214	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3682	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3259	0.1429
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2439	0.1000
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1357	0.0500
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.0958	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0745	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0520	0.0167