

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Rita Daniela Carvalho Abreu

**Validação estatística de métodos analíticos  
em Química Alimentar**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Rita Daniela Carvalho Abreu

**Validação estatística de métodos analíticos  
em Química Alimentar**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob a orientação do

**Engenheiro Pedro Nuno Machado**

e da

**Professora Doutora Maria Dulce Silva Geraldo**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a todos os docentes da Escola de Ciências que acompanharam o meu percurso académico e contribuíram quer para o progresso e melhoramento do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química, quer para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Em particular, um especial obrigada à professora doutora Maria Dulce Geraldo, por ter aceite o convite para orientar a presente dissertação e, por todo o tempo disponibilizado tanto em reuniões, como e-mails, pois sem dúvida que este trabalho não teria sido possível de concretizar sem a sua ajuda incansável.

De seguida, gostaria de agradecer à empresa Silliker Portugal, S.A, por me ter acolhido durante estes meses de estágio, ter mostrado como funciona o ambiente empresarial e por me ter proporcionado o contacto com diversas técnicas analíticas com as quais não estava familiarizada, contribuindo, deste modo, de forma significativa para a minha aprendizagem. De realçar, o trabalho do orientador destacado pela empresa, o engenheiro Pedro Machado, o qual despendeu do seu tempo para que todo o trabalho fosse concluído com sucesso, e me ofereceu bons conselhos e incentivo. Deixo ainda um especial obrigada à engenheira Laura Sousa por ter supervisionado todo o trabalho laboratorial e, por me ter motivado e ajudado em tudo o que era preciso. Às colegas de estágio, Luisa, Carina, Catarina, Mariana, Joana, Beatriz, Ana, Pâmela, Albertina e, aos restantes colaboradores da empresa, em especial, à doutora Alice Santos, Andreia Martins, Eliana Santos, Ana Neto, Ana Margarida, Olga Ramos e, Liliana Silva desejo, também, muito sucesso e agradeço pelos bons momentos que me proporcionaram.

Mais acresce um especial obrigada a todas as pessoas que fizeram parte destes dois anos fantásticos e a quem desejo toda a sorte, sucesso e felicidade do mundo por terem deixado no meu coração momentos únicos e inesquecíveis que irei certamente levar comigo para a próxima etapa do meu percurso, nomeadamente a Bárbara, Patrícia, Ângela, Eduarda, Nuno, Nídia, Cláudia, Filipa, Beatriz, Paulo, Catarina, Cristiana, Mariana e Miguel.

Por fim, aos meus pais, ao meu irmão e a toda a minha família que sempre me apoiaram e incentivaram a lutar e a seguir os meus sonhos, e, também, ao João que sempre esteve a meu lado ao longo de toda esta caminhada e depositou em mim todo o seu amor, carinho e preocupação, deixo um enorme obrigada e, espero que também eles alcancem todos os seus objetivos na vida.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

Atualmente, com o aumento da diversidade de produtos alimentares em resposta ao crescimento da população mundial surgiu a necessidade de efetuar um controlo mais exigente destes produtos de modo a garantir a sua qualidade e confiança para o consumidor. Assim, através de avanços na indústria alimentar foi possível desenvolver diversos métodos analíticos capazes de analisar com o nível de exigência necessário os constituintes presentes nos produtos alimentares e, desta forma, caracterizá-los qualitativa e quantitativamente. De modo a garantir a segurança e qualidade dos produtos consumidos, criaram-se laboratórios acreditados, cujos métodos foram devidamente validados.

O presente trabalho, desenvolvido na empresa Silliker Portugal, S.A, teve como objetivo validar estatisticamente o método para quantificar o teor de teobromina em géneros alimentares à base de cacau e alimentos destinados à alimentação animal por cromatografia líquida de alta eficiência, baseado na norma AOAC 980.14. Apesar de não ser um componente prejudicial para a saúde humana, sabe-se que apresenta elevada toxicidade para os animais, nomeadamente, para os cães e, por este motivo, torna-se importante determinar este composto em produtos alimentares. Assim, os parâmetros de desempenho foram caracterizados em diversas matrizes pertencentes a sete grupos alimentares distintos.

Este trabalho também teve como objetivo a determinação de uma espécie tóxica para o ser humano em géneros alimentares, nomeadamente, o mercúrio e, pretendeu-se estender a validação do método de quantificação deste metal recorrendo ao analisador direto de mercúrio para uma nova matriz, um arroz integral. Nesta matriz, os parâmetros de desempenho foram avaliados e comparados com os definidos para as matrizes previamente validadas.

**Palavras-chave:** DMA, HPLC, mercúrio, teobromina, validação.

## Abstract

Currently, an increase in food diversity due to the world population growth led to stricter control of food products, to ensure their quality and customer confidence. Thus, through breakthroughs in the food industry, it has been possible to develop several analytical methods able to analyze, with high excellence, different food components. In this way, it is possible to characterize them in terms of quality and quantity. Therefore, to ensure the safety and quality of food products, several accredited laboratories have been set up, with properly validated methods.

For this reason, the present work, carried out at Silliker Portugal, S.A, aimed at the statistical validation of the theobromine quantification method on cocoa-based products and animal ration by high-efficiency liquid chromatography, based on the AOAC 980.14 standard. Although it is not harmful to human health, high animal toxicity has been reported, especially in dogs. For this reason, it is important to characterize this component in food products. Thus, several performance parameters were characterized in several matrices of seven different food groups.

In addition to this, the aim of this work was also to control the presence of toxic products to humans in food, namely, mercury. Therefore, it was intended to widen the validation of the mercury quantification method to a new matrix, brown rice, using the direct mercury analyzer. In this matrix, performance parameters were evaluated and compared with those of previously validated matrices.

**Keywords:** DMA, HPLC, mercury, theobromine, validation.



# Índice

|  |          |
|--|----------|
| Agradecimentos.....  | iii      |
| Resumo.....  | v        |
| Abstract.....  | vi       |
| Índice.....  | vii      |
| Lista de Abreviaturas e Siglas.....  | xv       |
| Lista de Símbolos.....   | xvii     |
| Lista de Tabelas.....  | xxi      |
| Lista de Figuras.....  | xxv      |
| Lista de Equações.....   | xxvi     |
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>1</b> |
| 1.1 Enquadramento geral.....   | 1        |
| 1.2 Empresa Silliker Portugal, S.A. ....                                     | 2        |
| 1.3 Acreditação e certificação de laboratórios de ensaios e calibração.....  | 4        |
| 1.4 Validação e verificação de métodos analíticos.....                       | 6        |
| 1.5 Ferramentas usadas na validação e verificação de métodos analíticos..... | 7        |
| 1.5.1 Testes estatísticos.....   | 8        |
| 1.5.1.1 Teste de Grubbs.....   | 10       |
| 1.5.1.2 Teste F de Snedecor-Fisher .....                                     | 11       |
| 1.5.1.3 Teste t.....   | 12       |
| 1.5.1.4 Análise de variâncias de fator único.....                            | 12       |
| 1.5.1.5 Teste de Cochran.....  | 14       |
| 1.5.1.6 Erro relativo .....  | 15       |
| 1.5.2 Materiais de referência e materiais de referência certificados.....    | 15       |
| 1.5.3 Ensaios de recuperação.....  | 17       |
| 1.5.4 Ensaios de comparação interlaboratorial .....                          | 18       |
| 1.5.5 Cartas de controlo de médias ou de indivíduos.....                     | 19       |
| 1.5.6 Amostra diária de controlo de processo.....                            | 22       |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.6     | Parâmetros de desempenho avaliados na validação e verificação de métodos analíticos .....  | 23 |
| 1.6.1   | Calibração .....   | 24 |
| 1.6.1.1 | Coeficiente de correlação .....  | 27 |
| 1.6.1.2 | Teste de significância para o r .....  | 28 |
| 1.6.1.3 | Teste de Mandel .....  | 29 |
| 1.6.2   | Sensibilidade.....   | 29 |
| 1.6.3   | Limite de quantificação .....  | 30 |
| 1.6.4   | Gama de trabalho .....   | 31 |
| 1.6.5   | Seletividade .....   | 32 |
| 1.6.6   | Precisão.....  | 32 |
| 1.6.6.1 | Precisão em condições de repetibilidade .....  | 33 |
| 1.6.6.2 | Precisão em condições de precisão intermédia.....  | 34 |
| 1.6.7   | Justeza/veracidade.....  | 36 |
| 1.6.8   | Incerteza de medição .....   | 38 |
| 1.6.8.1 | Abordagem “passo-a-passo”.....   | 38 |
| 1.6.8.2 | Abordagem baseada em dados de validação.....   | 44 |
| 1.7     | Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência ..... | 50 |
| 1.8     | Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio.....                | 54 |
| 1.8.1   | Mercúrio .....   | 54 |
| 1.8.2   | Analisador direto de mercúrio.....   | 57 |
| 2.      | Parte experimental .....   | 59 |
| 2.1     | Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência ..... | 59 |
| 2.1.1   | Resumo do processo.....  | 59 |
| 2.1.2   | Materiais.....   | 59 |
| 2.1.3   | Reagentes.....   | 60 |
| 2.1.4   | Método .....   | 60 |
| 2.1.4.1 | Matrizes.....  | 60 |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.1.4.2    | Preparação da solução mãe de calibração de teobromina 500 mg/L .....   | 61        |
| 2.1.4.3    | Preparação das soluções padrão de teobromina .....   | 61        |
| 2.1.4.4    | Preparação da amostra .....  | 62        |
| 2.1.4.5    | Extração de teobromina da amostra .....  | 63        |
| 2.1.4.6    | Preparação da fase móvel para HPLC.....  | 64        |
| 2.1.4.7    | Condições de análise para HPLC.....  | 64        |
| 2.1.4.8    | Análise e tratamento de resultados.....  | 65        |
| <b>2.2</b> | <b>Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio.....</b>         | <b>65</b> |
| 2.2.1      | Resumo do processo.....  | 65        |
| 2.2.2      | Materiais.....   | 65        |
| 2.2.3      | Reagentes.....   | 66        |
| 2.2.4      | Método .....   | 67        |
| 2.2.4.1    | Matrizes.....  | 67        |
| 2.2.4.2    | Preparação da solução de ácido nítrico, 10 % .....   | 67        |
| 2.2.4.3    | Preparação da solução mãe de calibração de mercúrio, 10 ppm.....   | 67        |
| 2.2.4.4    | Preparação da solução mãe de calibração de mercúrio, 100 ppm.....  | 68        |
| 2.2.4.5    | Preparação das soluções padrão de mercúrio.....  | 68        |
| 2.2.4.6    | Preparação da amostra .....  | 69        |
| 2.2.4.7    | Quantificação de mercúrio da amostra .....   | 69        |
| 2.2.4.8    | Condições de análise do DMA .....  | 70        |
| 2.2.4.9    | Análise e tratamento de resultados.....  | 70        |
| 2.2.4.10   | Limpeza das barquetas de quartzo .....   | 71        |
| <b>3.</b>  | <b>Apresentação e discussão de resultados .....</b>  | <b>72</b> |
| 3.1        | Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência ..... | 72        |
| 3.1.1      | Curva de calibração .....  | 72        |
| 3.1.2      | Limite de quantificação .....  | 77        |
| 3.1.3      | Gama de trabalho .....   | 80        |
| 3.1.4      | Seletividade .....   | 81        |
| 3.1.5      | Precisão.....  | 84        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.1.5.1    | Precisão em condições de repetibilidade .....  | 84         |
| 3.1.5.2    | Precisão em condições de precisão intermédia.....  | 92         |
| 3.1.6      | Justeza/veracidade .....   | 95         |
| 3.1.7      | Estimativa da incerteza do método .....  | 97         |
| 3.1.7.1    | Estimativa da incerteza para a gama de trabalho baixa .....  | 97         |
| 3.1.7.2    | Estimativa da incerteza para a gama de trabalho intermédia .....   | 99         |
| 3.1.7.3    | Estimativa da incerteza para a gama de trabalho alta.....  | 101        |
| <b>3.2</b> | <b>Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio.....</b>         | <b>103</b> |
| 3.2.1      | Curvas de calibração .....   | 103        |
| 3.2.2      | Limite de quantificação .....  | 112        |
| 3.2.3      | Gama de trabalho .....   | 114        |
| 3.2.4      | Seletividade .....   | 118        |
| 3.2.5      | Precisão.....  | 121        |
| 3.2.6      | Justeza/Veracidade.....  | 124        |
| 3.2.7      | Estimativa da incerteza do método na matriz arroz integral .....   | 125        |
| <b>4.</b>  | <b>Conclusão.....</b>  | <b>129</b> |
| 4.1        | Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência ..... | 129        |
| 4.2        | Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio.....                | 130        |
| <b>5.</b>  | <b>Bibliografia.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Anexos .....</b>  | <b>138</b> |
| 6.1        | Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência ..... | 138        |
| 6.1.1      | Ficha de segurança dos reagentes.....  | 138        |
| 6.1.2      | Soluções de calibração de teobromina.....  | 139        |

|  |     |
|--|-----|
| 6.1.2.1 Cálculo da concentração efetiva da solução mãe de calibração de teobromina e respetiva incerteza combinada associada .....     | 139 |
| 6.1.2.2 Cálculo da concentração efetiva das soluções padrão de calibração de teobromina e respetiva incerteza combinada associada..... | 142 |
| 6.1.3 Curva de calibração da teobromina .....  | 144 |
| 6.1.3.1 Cálculo das incertezas associadas aos coeficientes do modelo de regressão linear..   | 144 |
| 6.1.3.2 Modelo de regressão linear.....  | 145 |
| 6.1.3.2.1 Teste de significância para o r .....  | 145 |
| 6.1.3.2.2 Teste de Mandel.....   | 146 |
| 6.1.4 Sensibilidade.....   | 147 |
| 6.1.4.1 Teste de Grubbs.....   | 147 |
| 6.1.4.2 Carta de controlo do declive .....   | 148 |
| 6.1.4.3 Determinação do coeficiente de variação .....  | 148 |
| 6.1.5 Limite de quantificação .....  | 148 |
| 6.1.5.1 Determinação da concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação   | 148 |
| 6.1.5.2 Determinação da taxa de recuperação.....   | 149 |
| 6.1.5.3 Verificação do LDQ.....  | 150 |
| 6.1.6 Gama de trabalho .....   | 150 |
| 6.1.6.1 Teste de Grubbs.....   | 150 |
| 6.1.6.2 Teste F de Snedecor Fisher .....   | 151 |
| 6.1.7 Seletividade .....   | 152 |
| 6.1.7.1 Determinação da concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação   | 152 |
| 6.1.7.2 Determinação da taxa de recuperação.....   | 152 |
| 6.1.8 Precisão em condições de repetibilidade .....  | 153 |
| 6.1.8.1 Gama de trabalho geral.....  | 153 |
| 6.1.8.1.1 Teste de Grubbs .....  | 153 |
| 6.1.8.1.2 Teste de Cochran .....   | 154 |
| 6.1.8.2 Gama de trabalho baixa .....   | 155 |
| 6.1.8.2.1 Teste de Cochran .....   | 155 |
| 6.1.8.2.2 Determinação do $CV_r$ , do $r_r$ e, do $CV_r$ .....   | 155 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.1.8.3 Gama de trabalho intermédia .....  | 156 |
| 6.1.8.3.1 Teste de Cochran .....   | 156 |
| 6.1.8.3.2 Determinação do $CV_r$ , do $r_r$ e, do $CV_{r_r}$ .....   | 157 |
| 6.1.8.4 Gama de trabalho alta.....   | 157 |
| 6.1.8.4.1 Teste de Cochran .....   | 157 |
| 6.1.8.4.2 Determinação do $CV_r$ , do $r_r$ e, do $CV_{r_r}$ .....   | 158 |
| 6.1.9 Precisão em condições de precisão intermédia.....  | 158 |
| 6.1.9.1 Gama de trabalho baixa .....   | 158 |
| 6.1.9.1.1 Apresentação dos resultados .....  | 158 |
| 6.1.9.1.2 Determinação do $CV_{PI}$ e do $CV_{r_{PI}}$ .....   | 161 |
| 6.1.9.2 Gama de trabalho intermédia .....  | 161 |
| 6.1.9.2.1 Apresentação dos resultados .....  | 161 |
| 6.1.9.2.2 Determinação do $CV_{PI}$ e do $CV_{r_{PI}}$ .....   | 167 |
| 6.1.9.3 Gama de trabalho alta.....   | 168 |
| 6.1.9.3.1 Apresentação dos resultados .....  | 168 |
| 6.1.9.3.2 Determinação do $CV_{PI}$ e do $CV_{r_{PI}}$ .....   | 171 |
| 6.1.10 Justeza/Veracidade.....   | 172 |
| 6.1.10.1 Determinação do <i>z-score</i> .....  | 172 |
| 6.1.10.2 Determinação do <i>bias</i> absoluto e do <i>bias</i> relativo  | 172 |
| 6.1.11 Estimativa da incerteza do método .....   | 173 |
| 6.1.11.1 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho baixa .....  | 173 |
| 6.1.11.1.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão.....   | 173 |
| 6.1.11.1.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza.....  | 173 |
| 6.1.11.1.3 Estimativa das incertezas combinada e expandida .....   | 174 |
| 6.1.11.2 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho intermédia   | 174 |
| 6.1.11.2.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão.....   | 174 |
| 6.1.11.2.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR  | 174 |
| 6.1.11.2.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais ..... | 176 |

|  |            |
|--|------------|
| 6.1.11.2.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida .....   | 177        |
| 6.1.11.3 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho alta   | 178        |
| 6.1.11.3.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão.....   | 178        |
| 6.1.11.3.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR  | 178        |
| 6.1.11.3.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais ..... | 179        |
| 6.1.11.3.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida .....   | 181        |
| <b>6.2 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio.....</b> | <b>181</b> |
| 6.2.1 Ficha de segurança dos reagentes.....  | 181        |
| 6.2.2 Soluções de calibração de mercúrio .....   | 182        |
| 6.2.2.1 Concentração efetiva da solução mãe de calibração de mercúrio, 10 ppm e, respetiva incerteza combinada associada .....       | 182        |
| 6.2.3 Curva de calibração do mercúrio .....  | 184        |
| 6.2.3.1 Teste de Mandel .....  | 184        |
| 6.2.3.2 Determinação do erro relativo.....   | 186        |
| 6.2.4 Sensibilidade.....   | 187        |
| 6.2.4.1 Carta de controlo de indivíduos dos coeficientes do modelo de regressão quadrático   | 187        |
| 6.2.4.2 Determinação do coeficiente de variação .....  | 188        |
| 6.2.5 Limite de quantificação .....  | 189        |
| 6.2.5.1 Determinação da massa de mercúrio na amostra .....   | 189        |
| 6.2.5.2 Determinação da massa de mercúrio adicionada no ensaio de recuperação.....   | 189        |
| 6.2.5.3 Determinação da concentração efetiva de mercúrio nas amostras fortificadas .....   | 189        |
| 6.2.5.4 Determinação da taxa de recuperação.....   | 190        |
| 6.2.6 Gama de trabalho .....   | 190        |
| 6.2.6.1 Teste de Grubbs.....   | 190        |
| 6.2.6.2 Teste F de Snedecor Fisher .....   | 192        |
| 6.2.7 Seletividade .....   | 192        |
| 6.2.7.1 Teste de Grubbs.....   | 192        |
| 6.2.7.2 Carta de controlo de médias.....   | 193        |

|   |     |
|---|-----|
| 6.2.8 Precisão.....   | 194 |
| 6.2.8.1 Teste de Grubbs.....  | 194 |
| 6.2.8.2 Teste de Cochran.....   | 195 |
| 6.2.8.3 Determinação do $s_r$ e do $s_{PI}$ .....   | 195 |
| 6.2.8.4 Determinação do $CV_r$ e do $CV_{PI}$ .....   | 196 |
| 6.2.8.5 Determinação do $r_r$ , $CV_{r_r}$ , $r_{PI}$ e $CV_{r_{PI}}$ .....   | 196 |
| 6.2.9 Justeza/Veracidade.....   | 197 |
| 6.2.9.1 Determinação do <i>bias</i> absoluto e do <i>bias</i> relativo.....   | 197 |
| 6.2.9.2 Teste t.....  | 197 |
| 6.2.9.3 Determinação da recuperação aparente.....   | 198 |
| 6.2.10 Estimativa da incerteza do método.....   | 198 |
| 6.2.10.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão   | 198 |
| 6.2.10.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR   | 198 |
| 6.2.10.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a realização de um ensaio de recuperação..... | 199 |
| 6.2.10.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida  | 200 |



## Lista de Abreviaturas e Siglas

**AMA:** Analisador avançado de mercúrio (do inglês *Advanced Mercury Analyser*).

**ANOVA:** Análise de variâncias (do inglês *Analysis of Variance*).

**AOAC:** Associação Oficial de Químicos Analíticos (do inglês *Association of Official Analytical Chemists*).

**CQE:** Controlo de qualidade externo.

**CQI:** Controlo de qualidade interno.

**CV:** Coeficiente de variação.

**CV-AAS:** Espectroscopia de absorção atômica com vapor frio (do inglês *cold vapor atomic absorption spectroscopy*).

**CV-AFS:** Espectroscopia atômica de fluorescência com vapor frio (do inglês *cold vapor atomic fluorescence spectroscopy*).

**CV<sub>PI</sub>:** Coeficiente de variação de precisão intermédia.

**CV:** Coeficiente de variação de repetibilidade.

**CV<sub>PI</sub>:** Limite de precisão intermédia relativo.

**CV<sub>r</sub>:** Limite de repetibilidade relativo.

**DCV:** Doenças cardiovasculares.

**DMA:** Analisador direto de mercúrio (do inglês *Direct Mercury Analyze*).

**DPCS:** Amostra diária de controlo de processo (do inglês *Daily Process Control Sample*).

**EAA:** Espectroscopia de absorção atômica.

**EGI:** EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade.

**e.m.a:** Erro máximo admissível.

**EN:** Norma europeia (do inglês *European Norm*).

**E:** Erro relativo.

**F:** Fator de diluição.

**GC-MS:** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês *Gas chromatography - mass spectrometry*).

**G.L:** Graus de liberdade.

**H<sub>0</sub>:** Hipótese nula.

**H<sub>1</sub>:** Hipótese alternativa.

**HPLC:** Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High - performance liquid chromatography*).

**ICP-OES:** Espectroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*).

**IPAC:** Instituto Português de Acreditação.

**ISO:** Organização Internacional de Normalização (do inglês *International Organization for Standardization*).

**LCL:** Limite de controlo inferior (do inglês *lower control limit*).

**LDQ:** Limite de quantificação.

**LIA:** Limite inferior de aviso.

**LIC:** Limite inferior de controlo.

**LSA:** Limite superior de aviso.

**LSC:** Limite superior de controlo.

**MR:** Material de referência.

**MRC:** Material de referência certificado.

**MRI:** Material de referência interno.

**MS<sub>b</sub>:** Quadrado médio entre grupos (do inglês *mean square between groups*).

**MS residual:** Mínimos quadrados residuais (do inglês *mean square*).

**MS total:** Mínimos quadrados totais (do inglês *mean square*).

**MS<sub>w</sub>:** Quadrado médio dentro do grupo (do inglês *mean square within groups*).

**NP:** Norma portuguesa.

**r:** Coeficiente de correlação.

**R:** Taxa de recuperação.

**R<sub>a</sub>:** Recuperação aparente.

**r<sub>P</sub>:** Limite de precisão intermédia.

**r<sub>r</sub>:** Limite de repetibilidade.

**SGQ:** Sistema de Gestão da Qualidade.

**s<sub>P</sub>:** Desvio padrão de precisão intermédia.

**s:** Desvio padrão de repetibilidade.

**SS<sub>b</sub>:** Soma dos termos quadráticos entre grupos (do inglês *sum of squares between groups*).

**SS<sub>w</sub>:** Soma dos termos quadráticos dentro do grupo (do inglês *sum of squares within groups*).

**T:** Tolerância de um material volumétrico.

**TMA:** Analisador de mercúrio vestigial (do inglês *Trace Mercury Analyser*)

**t:** Tempo de retenção.

**UCL:** Limite de controlo superior (do inglês *upper control limit*).

**UV-Vis:** Ultravioleta-visível.

## Lista de Símbolos

**a:** Ordenada na origem.

**b:** Coeficiente associado ao fator de primeiro grau num polinómio de segundo grau (denominado declive num polinómio de primeiro grau).

**c:** Coeficiente associado ao fator de segundo grau num polinómio de segundo grau.

**C:** Resultado do teste de Cochran.

**C<sub>m</sub>:** Solução de calibração mãe.

**C<sub>MR</sub>:** Concentração de analito no material de referência.

**C<sub>s</sub>:** Concentração de analito na solução *stock*.

**d:** Unidade de desvio admissível.

**DS<sup>2</sup>:** Diferença de variâncias.

**G:** Resultado do teste de Grubbs.

**h:** Número de ensaios efetuados.

**[Hg]<sub>obs</sub>:** Valor médio da concentração de mercúrio determinado pelo laboratório.

**[Hg]<sub>ref</sub>:** Valor de referência da concentração de mercúrio.

**k:** Fator de expansão.

**m<sub>cm</sub>:** Massa da toma do reagente *stock*.

**n:** Número de medições efetuadas.

**n<sub>a</sub>:** Número de ensaios considerados no ensaio interlaboratorial.

**P:** Populações reportadas nos ensaios interlaboratoriais.

**P<sub>i</sub>:** População individual das populações reportadas nos ensaios interlaboratoriais.

**P̄:** Valor médio das populações reportadas nos ensaios interlaboratoriais.

**P<sub>cm</sub>:** Pureza do reagente *stock* de analito.

**PG:** Razão entre variâncias.

**Q<sub>x<sup>2</sup>y</sub>:** Valor intermediário para o cálculo do coeficiente de segundo grau do polinómio de segundo grau.

**Q<sub>x<sup>3</sup>:</sub>** Valor intermediário para o cálculo dos coeficientes do polinómio de segundo grau.

**Q<sub>x<sup>4</sup>:</sub>** Valor intermediário para o cálculo dos coeficientes do polinómio de segundo grau.

**Q<sub>xx</sub>:** Valor intermediário para o cálculo do coeficiente de segundo grau do polinómio de segundo grau.

**Q<sub>xy</sub>:** Valor intermediário para o cálculo do coeficiente de segundo grau do polinómio de segundo grau.

**RMS<sub>(bias)relativa</sub>:** Raiz quadrada média referente a todos os valores de *bias* obtidos na forma relativa.

**s:** Desvio padrão amostral.

$s_1^2$ : Variância do primeiro conjunto de medições.

$s_2^2$ : Variância do segundo conjunto de medições.

$s^2$ : Variância amostral.

$s^2$ : Variância individual da medição.

$S_{max}^2$ : Maior variância.

$s_a$ : Desvio padrão associada à ordenada na origem num polinómio do primeiro grau.

$s_{at}$ : Incerteza associada à ordenada na origem num polinómio de primeiro grau.

$s_b$ : Desvio padrão associada ao declive num polinómio do primeiro grau.

$S_{bias}$ : Desvio padrão absoluto associado à análise de um material de referência.

$S_{(bias)relativo}$ : Desvio padrão relativo associado à análise de um material de referência.

$s_{bt}$ : Incerteza associada ao declive num polinómio de primeiro grau.

$s_{ro}$ : Desvio padrão robusto.

$S_{(ro)relativo}$ : Desvio padrão robusto relativo.

$\bar{S}_{(ro)relativo}$ : Valor médio do desvio padrão robusto relativo.

$s_w$ : Desvio padrão entre grupos.

$s_{\bar{x}}$ : Desvio padrão do  $\bar{x}$ .

$s_{y^2}$ : Desvio padrão residual de um polinómio de segundo grau.

$s_{y/x}$ : Desvio padrão residual de um polinómio de primeiro grau.

$t$ : Resultado do teste *t-student*.

$[\text{Teo}]_{obs}$ : Valor médio da concentração de teobromina determinado pelo laboratório.

$[\text{Teo}]_{ref}$ : Valor de referência da concentração de teobromina.

$U$ : Incerteza expandida.

$u_{add}$ : Incerteza padrão associada à concentração de analito adicionada.

$u_{(add)relativa}$ : Incerteza relativa associada à concentração de analito adicionada.

$u_{Cref}$ : Incerteza padrão associada à concentração de um material de referência.

$u_{(Cref)relativa}$ : Incerteza relativa associada à concentração de um material de referência.

$u_{Cs}$ : Incerteza padrão associada à concentração de uma solução de calibração.

$u_c(y)$ : Incerteza combinada.

$u_{(justeza)relativa}$ : Incerteza relativa associada à justeza de um método analítico.

$u_m$ : Incerteza padrão combinada associada à massa da toma do reagente utilizado na preparação de uma solução de calibração.

$u_{Mv}$ : Incerteza padrão associada à calibração de um material volumétrico.

$u_p$ : Incerteza padrão associada à pureza do reagente utilizado na preparação de uma solução de calibração.

$u_{\text{precisão}}$ : Incerteza padrão associada à precisão de um método analítico.

$u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$ : Incerteza relativa associada à precisão de um método analítico.

$u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$ : Incerteza relativa combinada associada a ensaios de recuperação.

$u_T$ : Incerteza padrão associada ao acerto do menisco de um material volumétrico em condições de repetibilidade.

$u_T$ : Incerteza padrão associada à diferença de temperatura de um material volumétrico relativamente à temperatura a que este foi calibrado.

$u_{\text{tara}}$ : Incerteza padrão associada à zona da tara da balança analítica.

$u_{V_{cm}}$ : Incerteza combinada associada ao volume final de uma solução de calibração.

$u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$ : Incerteza relativa associada ao volume de solução de fortificação adicionado.

$u_{V_s}$ : Incerteza padrão associada ao volume retirado de uma solução *stock* para preparar uma solução de calibração.

$u_{Z_t}$ : Incerteza padrão associada à zona de trabalho da balança analítica.

$V_{cm}$ : Volume final da solução de calibração de analito.

$V_s$ : Volume retirado da solução *stock*.

$\bar{x}$ : Média aritmética ou valor médio amostral.

$\bar{x}'$ : Valor médio da concentração de analito na amostra fortificada.

$\bar{\bar{x}}$ : Valor médio de todos os valores médios calculados para cada ensaio.

$x_{\text{add}}$ : Concentração de analito adicionada num ensaio de recuperação.

$x_{\text{refativa}}$ : Concentração de analito determinada na amostra que resulta da fortificação.

$x$ : Resultado individual da medição.

$\bar{x}_j$ : Valor médio dos replicados do mesmo ensaio considerado no teste ANOVA.

$x_i$ : Resultado individual de cada replicado do mesmo ensaio considerado no teste ANOVA.

$\bar{x}_{\text{lab}}$ : Valor médio da concentração de analito determinado pelo laboratório.

$x_{\text{ref}}$ : Valor de referência.

$x_s$ : Valor suspeito no teste de Grubbs.

$\bar{y}$ : Valor médio das respostas obtidas pelo equipamento.

$y$ : Resposta obtida pelo equipamento.

$\hat{y}_i$ : Valor estimado de  $y$ .

### **Símbolos gregos**

$\alpha$ : Intervalo de confiança associado à pureza de um reagente.

$\Delta C$ : Variação da concentração de analito em solução.

$\Delta L$ : Variação da resposta experimental.

$\Delta V$ : Variação do volume de um material volumétrico.

$\mu$ : Valor médio populacional.

$\sigma$ : Desvio padrão populacional.

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Informações retiradas da análise de variâncias de fator único (ANOVA)..  | 14 |
| <b>Tabela 2:</b> Equipamentos e materiais para o método de quantificação de teobromina..  | 59 |
| <b>Tabela 3:</b> Reagentes para o método de quantificação de teobromina.....  | 60 |
| <b>Tabela 4:</b> Matrizes abrangidas pelo método de quantificação de teobromina.....  | 61 |
| <b>Tabela 5:</b> Preparação das soluções padrão de teobromina..   | 62 |
| <b>Tabela 6:</b> Massas de amostra alimentar a utilizar no método de quantificação de teobromina.....   | 63 |
| <b>Tabela 7:</b> Condições e sistemas de análise para HPLC.....   | 64 |
| <b>Tabela 8:</b> Equipamentos e materiais para o método de quantificação de mercúrio.....   | 66 |
| <b>Tabela 9:</b> Reagentes para o método de quantificação de mercúrio.....  | 66 |
| <b>Tabela 10:</b> Matrizes abrangidas pelo método de quantificação de mercúrio..  | 67 |
| <b>Tabela 11:</b> Preparação das soluções padrão de mercúrio.....   | 69 |
| <b>Tabela 12:</b> Condições de análise do DMA. ....   | 70 |
| <b>Tabela 13:</b> Valores para o traçado da curva de calibração de teobromina..   | 74 |
| <b>Tabela 14:</b> Sensibilidade do método de quantificação de teobromina.....   | 75 |
| <b>Tabela 15:</b> Análise de uma amostra de chocolate branco para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina .....  | 77 |
| <b>Tabela 16:</b> Análise de uma amostra de chocolate branco depois da fortificação para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina.....                  | 78 |
| <b>Tabela 17:</b> Concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação realizado para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina .....          | 78 |
| <b>Tabela 18:</b> Taxa de recuperação obtida no estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina .....  | 79 |
| <b>Tabela 19:</b> Gama de trabalho do método de quantificação de teobromina .....   | 80 |
| <b>Tabela 20:</b> Análise de uma amostra de ração para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina .....  | 82 |
| <b>Tabela 21:</b> Análise de uma amostra de ração depois da fortificação para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.....                    | 82 |
| <b>Tabela 22:</b> Concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação realizado para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina ..... | 83 |
| <b>Tabela 23:</b> Taxa de recuperação obtida no estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.....  | 83 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 24:</b> Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.....   | 85  |
| <b>Tabela 25:</b> Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.....                                 | 86  |
| <b>Tabela 26:</b> Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho baixa.....       | 87  |
| <b>Tabela 27:</b> Estudo da repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho baixa .....   | 88  |
| <b>Tabela 28:</b> Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho intermédia ..... | 89  |
| <b>Tabela 29:</b> Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho intermédia.. .....                         | 89  |
| <b>Tabela 30:</b> Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho alta.....        | 90  |
| <b>Tabela 31:</b> Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho alta.....                                  | 91  |
| <b>Tabela 32:</b> Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina em todas as gamas de trabalho. ....                            | 91  |
| <b>Tabela 33:</b> Informações retiradas da ANOVA de fator único para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.....      | 92  |
| <b>Tabela 34:</b> Estudo da precisão em condições de precisão intermédia do método de quantificação de teobromina.....  | 94  |
| <b>Tabela 35:</b> Comparação da precisão obtida em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia do método de quantificação de teobromina.....          | 95  |
| <b>Tabela 36:</b> Estudo da justeza do método de quantificação de teobromina através da participação em ensaios interlaboratoriais. ....                                    | 96  |
| <b>Tabela 37:</b> Estudo da justeza do método de quantificação de teobromina através da análise de DPCS .....   | 97  |
| <b>Tabela 38:</b> Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho baixa do método de quantificação de teobromina.....   | 98  |
| <b>Tabela 39:</b> Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho intermédia do método de quantificação de teobromina.....  | 100 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 40:</b> Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho alta do método de quantificação de teobromina.....   | 101 |
| <b>Tabela 41:</b> Estimativa da incerteza expandida do método de quantificação de teobromina em todas as gamas de trabalho.....  | 102 |
| <b>Tabela 42:</b> Valores para os traçados das curvas de calibração de mercúrio .....  | 104 |
| <b>Tabela 43:</b> Relação entre os coeficientes das curvas de calibração de mercúrio determinados pelo Excel e pelo DMA .....  | 106 |
| <b>Tabela 44:</b> Valores dos coeficientes do segundo e primeiro graus das curvas de calibração necessários para estabelecer os limites das cartas de controlo e estudo da sensibilidade do método de quantificação de mercúrio..... | 107 |
| <b>Tabela 45:</b> Valor alvo e limites das cartas de controlo dos coeficientes de segundo e primeiro graus da curva de calibração de gamas baixa e intermédia do método de quantificação de mercúrio. ....                           | 108 |
| <b>Tabela 46:</b> Estudo da estabilidade dos coeficientes do segundo e primeiro graus das curvas de calibração de mercúrio ao longo do tempo .....   | 108 |
| <b>Tabela 47:</b> Valor alvo e limites das cartas de controlo dos coeficientes de segundo e primeiro graus da curva de calibração de gama alta do método de quantificação de mercúrio. ....  | 110 |
| <b>Tabela 48:</b> Estudo da sensibilidade das gamas de trabalho do método de quantificação de mercúrio ao longo do tempo .....   | 111 |
| <b>Tabela 49:</b> Análise de uma amostra de açúcar para o estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio. ....   | 113 |
| <b>Tabela 50:</b> Análise de uma amostra de açúcar depois da fortificação para o estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio.....   | 113 |
| <b>Tabela 51:</b> Taxa de recuperação obtida no estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio.. ..  | 114 |
| <b>Tabela 52:</b> Estudo das gamas de trabalho baixa e intermédia do método de quantificação de mercúrio. ....   | 115 |
| <b>Tabela 53:</b> Estudo da gama de trabalho alta do método de quantificação de mercúrio.....  | 117 |
| <b>Tabela 54:</b> Valores necessários para elaborar a carta de controlo de médias para o estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio.....  | 118 |
| <b>Tabela 55:</b> Estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio .....  | 119 |
| <b>Tabela 56:</b> Estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio considerando a matriz arroz integral.....  | 121 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 57:</b> Concentração de mercúrio na amostra de arroz integral determinada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia .....                               | 122 |
| <b>Tabela 58:</b> Informações retiradas da ANOVA de fator único para o estudo da precisão do método de quantificação de mercúrio considerando a amostra de arroz integral ..... | 122 |
| <b>Tabela 59:</b> Estudo da precisão do método de quantificação de mercúrio .....   | 123 |
| <b>Tabela 60:</b> Estimativa da incerteza expandida do método de quantificação de mercúrio considerando a matriz arroz integral.....  | 127 |

## Lista de Figuras

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1:</b> Silliker Portugal, S.A.....  | 2   |
| <b>Figura 2:</b> Laboratórios Silliker, S.A a nível mundial. ....   | 4   |
| <b>Figura 3:</b> Distribuição normal vs distribuição <i>t-student</i> considerando 5 observações.....   | 9   |
| <b>Figura 4:</b> Distribuição normal vs distribuição <i>t-student</i> considerando 19 observações.....  | 10  |
| <b>Figura 5:</b> Carta de controlo de médias ou de indivíduos.....  | 21  |
| <b>Figura 6:</b> Metodologia “passo-a-passo”. ....  | 40  |
| <b>Figura 7:</b> Diagrama em espinha de peixe considerando um reagente no estado líquido.....   | 41  |
| <b>Figura 8:</b> Diagrama em espinha de peixe considerando um reagente no estado sólido.....  | 42  |
| <b>Figura 9:</b> Alcaloides da família das xantinas. ....   | 51  |
| <b>Figura 10:</b> Analisador direto de mercúrio (DMA). ....   | 57  |
| <b>Figura 11:</b> Constituintes internos do analisador direto de mercúrio (DMA).....  | 58  |
| <b>Figura 12:</b> Cromatograma de HPLC para um padrão de calibração de teobromina.. ....  | 73  |
| <b>Figura 13:</b> Representação da curva de calibração de teobromina.....   | 75  |
| <b>Figura 14:</b> Carta de controlo de indivíduos do declive da curva de calibração de teobromina.....  | 76  |
| <b>Figura 15:</b> Representação da curva de calibração de mercúrio das gamas baixa e intermédia.....  | 105 |
| <b>Figura 16:</b> Representação da curva de calibração de mercúrio da gama alta. ....   | 105 |
| <b>Figura 17:</b> Carta de controlo do coeficiente de segundo grau da curva de calibração de mercúrio para as gamas baixa e intermédia. ....  | 109 |
| <b>Figura 18:</b> Carta de controlo do coeficiente de primeiro grau da curva de calibração de mercúrio para as gamas baixa e intermédia. .... | 109 |
| <b>Figura 19:</b> Carta de controlo do coeficiente de segundo grau da curva de calibração de mercúrio para a gama alta. ....                  | 110 |
| <b>Figura 20:</b> Carta de controlo do coeficiente de primeiro grau da curva de calibração de mercúrio para a gama alta .....                 | 111 |
| <b>Figura 21:</b> Carta de controlo da taxa de recuperação média.. ....   | 120 |

## Lista de Equações

**Equação 1:** Valor médio amostral.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

**Equação 2:** Desvio padrão amostral.

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

**Equação 3:** Teste de Grubbs.

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s}$$

**Equação 4:** Variância amostral.

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

**Equação 5:** Teste F de Snedecor-Fisher.

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

**Equação 6:** Teste F de Snedecor-Fisher.

$$PG = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

**Equação 7:** Teste *t-student*.

$$|t| = |\bar{x} - x_{ref}| \times \frac{\sqrt{n}}{s}$$

**Equação 8:** Variância dentro do grupo.

$$s^2 \text{ dentro do grupo} = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / (h(n - 1))$$

**Equação 9:** Variância entre grupos.

$$s^2 \text{ entre grupos} = n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 / (h - 1)$$

**Equação 10:** Teste de Cochran.

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_i s_i^2}$$

**Equação 11:** Erro relativo.

$$E_r = \frac{|x_i - x_j|}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

**Equação 12:** Taxa de recuperação

$$R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{add}}} \times 100 (\%)$$

**Equação 13:** Taxa de recuperação.

$$R = \frac{\bar{x}'}{x_{\text{efetiva}}} \times 100 (\%)$$

**Equação 14:** *Z-score*.

$$z - score = \frac{\bar{x}_{\text{lab}} - x_{\text{ref}}}{d}$$

**Equação 15:** Limite superior de aviso da carta de controlo de indivíduos.

$$LSA = \bar{x} + 2 \times s$$

**Equação 16:** Limite inferior de aviso da carta de controlo de indivíduos.

$$LIA = \bar{x} - 2 \times s$$

**Equação 17:** Limite superior de controlo da carta de controlo de indivíduos.

$$LSC = \bar{x} + 3 \times s$$

**Equação 18:** Limite inferior de controlo da carta de controlo de indivíduos.

$$LIC = \bar{x} - 3 \times s$$

**Equação 19:** Limite superior de aviso da carta de controlo de médias.

$$LSA = \bar{\bar{x}} + \frac{2 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}$$

**Equação 20:** Limite inferior de aviso da carta de controlo de médias.

$$\text{LIA} = \bar{x} - \frac{2 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}$$

**Equação 21:** Limite superior de controlo da carta de controlo de médias.

$$\text{LSC} = \bar{x} + \frac{3 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}$$

**Equação 22:** Limite inferior de controlo da carta de controlo de médias.

$$\text{LIC} = \bar{x} - \frac{3 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}}$$

**Equação 23:** Mínimos quadrados.

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

**Equação 24:** Modelo de regressão linear.

$$y = bx + a$$

**Equação 25:** Declive do modelo de regressão linear.

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

**Equação 26:** Ordenada na origem do modelo de regressão linear.

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

**Equação 27:** Desvio padrão da ordenada na origem do modelo de regressão linear.

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

**Equação 28:** Desvio padrão do declive do modelo de regressão linear.

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

**Equação 29:** Desvio padrão residual do modelo de regressão linear.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

**Equação 30:** Modelo de regressão linear com incertezas associadas.

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

**Equação 31:** Modelo de regressão quadrático.

$$y = cx^2 + bx + a$$

**Equação 32:** Coeficiente do segundo grau do modelo de regressão quadrático.

$$c = \frac{(Q_{xy} \times Q_{x^3}) - (Q_{x^2y} \times Q_{xx})}{(Q_{x^3})^2 - (Q_{xx} \times Q_{x^4})}$$

**Equação 33:** Coeficiente do primeiro grau do modelo de regressão quadrático.

$$b = \frac{Q_{xy} - cQ_{x^3}}{Q_{xx}}$$

**Equação 34:** Ordenada na origem do modelo de regressão quadrático.

$$a = \frac{(\sum y_i - b \sum x_i - c \sum x_i^2)}{n}$$

**Equação 35:** Valor intermediário para o cálculo dos coeficientes do modelo de regressão quadrático.

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

**Equação 36:** Valor intermediário para o cálculo dos coeficientes do modelo de regressão quadrático.

$$Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - \left( \sum x_i \times \frac{\sum y_i}{n} \right)$$

**Equação 37:** Valor intermediário para o cálculo dos coeficientes do modelo de regressão quadrático.

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left( \sum x_i \times \frac{\sum x_i^2}{n} \right)$$

**Equação 38:** Valor intermediário para o cálculo do coeficiente de segundo grau do modelo de regressão quadrático.

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \frac{(\sum x_i^2)^2}{n}$$

**Equação 39:** Valor intermediário para o cálculo do coeficiente de segundo grau do modelo de regressão quadrático.

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \times y_i) - \left( \sum y_i \times \frac{\sum x_i^2}{n} \right)$$

**Equação 40:** Desvio padrão residual do modelo de regressão quadrático.

$$s_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}}$$

**Equação 41:** Coeficiente de correlação do modelo de regressão linear.

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

**Equação 42:** Coeficiente de correlação do modelo de regressão quadrático.

$$r = \sqrt{1 - \frac{\text{MS residual}}{\text{MS total}}}$$

**Equação 43:** Mínimos quadrados residuais.

$$\text{MS residual} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

**Equação 44:** Mínimos quadrados totais.

$$\text{MS total} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$$

**Equação 45:** Teste t para o r.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

**Equação 46:** Diferença de variâncias.

$$DS^2 = (n - 2) \times (s_{y/x})^2 - (n - 3) \times (s_{y^2})^2$$

**Equação 47:** Teste de Mandel.

$$PG = \frac{DS^2}{(s_{y^2})^2}$$

**Equação 48:** Sensibilidade.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

**Equação 49:** Sensibilidade do modelo de regressão quadrático.

$$\text{Sensibilidade} = (2 \times c)x + b$$



**Equação 50:** Limite de quantificação.

$$LDQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{b}$$

**Equação 51:** Coeficiente de variação.

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

**Equação 52:** Coeficiente de variação de repetibilidade.

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

**Equação 53:** Limite de repetibilidade.

$$r_r = 2,8 \times s_r$$

**Equação 54:** Limite de repetibilidade relativo.

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

**Equação 55:** Desvio padrão de precisão intermédia,  $n > 2$ .

$$s_{PI} = \sqrt{\frac{1}{t \times (n - 1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}$$

**Equação 56:** Desvio padrão de precisão intermédia,  $n = 2$ .

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

**Equação 57:** Limite de precisão intermédia relativo.

$$CV_{r_{PI}} = 2,8 \times \frac{s_{PI}}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

**Equação 58:** Coeficiente de variação de precisão intermédia.

$$CV_{PI} = \frac{s_{PI}}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

**Equação 59:** Desvio padrão de repetibilidade.

$$s_r = \sqrt{MS_w}$$

**Equação 60:** Desvio padrão de precisão intermédia.

$$s_{PI} = \sqrt{s_r^2 + s_w^2}$$

**Equação 61:** Desvio padrão entre grupos.

$$s_w = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}}$$

**Equação 62:** *Bias*.

$$bias = \bar{x} - x_{ref}$$

**Equação 63:** *Bias relativo*.

$$bias \text{ relativo} = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 (\%)$$

**Equação 64:** *Recuperação aparente*.

$$R_a = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100 (\%)$$

**Equação 65:** *Incerteza expandida*.

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

**Equação 66:** *Concentração de analito*.

$$[M]_{Cm} = \frac{C_s \times V_s}{V_{Cm}}$$

**Equação 67:** *Concentração de analito*.

$$[M]_{Cm} = \frac{m_{Cm} \times P_{Cm}}{V_{Cm}}$$

**Equação 68:** *Incerteza padrão associada à calibração do material volumétrico*.

$$u_{Mv} = \frac{T}{\sqrt{6}}$$

**Equação 69:** *Variação do volume do material volumétrico*.

$$\Delta V = \pm(4 \times V_{cm} \times 2,1 \times 10^{-4})$$

**Equação 70:** Incerteza padrão associada à diferença de temperatura de um material volumétrico relativamente à temperatura de calibração.

$$u_T = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}}$$

**Equação 71:** Incerteza padrão combinada associada ao volume final da solução de calibração.

$$u_{V_{cm}} = \sqrt{(u_{M_V})^2 + (u_r)^2 + (u_T)^2}$$

**Equação 72:** Incerteza combinada associada à concentração de analito.

$$u_c(y) = [M]_{Cm} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_s}}{C_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_s}}{V_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{cm}}}{V_{Cm}}\right)^2}$$

**Equação 73:** Incerteza padrão combinada associada à massa de reagente.

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

**Equação 74:** Incerteza padrão associada à zona tara da balança.

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

**Equação 75:** Incerteza padrão associada à zona de trabalho da balança.

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

**Equação 76:** Incerteza padrão associada à pureza de um reagente.

$$u_p = \frac{\alpha}{\sqrt{3}}$$

**Equação 77:** Incerteza combinada associada à concentração de analito.

$$u_c(y) = [M]_{Cm} \times \sqrt{\left(\frac{u_m}{m_{Cm}}\right)^2 + \left(\frac{u_p}{P_{Cm}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{cm}}}{V_{Cm}}\right)^2}$$

**Equação 78:** Incerteza combinada do método.

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

**Equação 79:** Incerteza padrão associada à componente da precisão.

$$u_{precisão} = S_{PI}$$

**Equação 80:** Incerteza relativa associada à componente da precisão.

$$u_{(\text{precisão})\text{relativa}} = CV_{PI}$$

**Equação 81:** Incerteza padrão associada à concentração de um material de referência.

$$u_{\text{Cref}} = \frac{UCL - LCL}{2k}$$

**Equação 82:** Incerteza relativa associada à concentração de um material de referência.

$$u_{(\text{Cref})\text{relativa}} = \frac{u_{\text{Cref}}}{C_{MR}} \times 100 (\%)$$

**Equação 83:** Desvio padrão relativo associado à análise de um material de referência.

$$S_{(\text{bias})\text{relativo}} = \frac{S_{\text{bias}}}{\bar{x}_{\text{lab}}} \times 100 (\%)$$

**Equação 84:** Incerteza relativa associada à componente da justeza considerando a análise de um material de referência.

$$u_{(\text{juzteza})\text{relativa}} = \sqrt{(bias \text{ relativo})^2 + \left(\frac{S_{(\text{bias})\text{relativo}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + (u_{(\text{Cref})\text{relativa}})^2}$$

**Equação 85:** Incerteza relativa associada à componente da justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais.

$$u_{(\text{juzteza})\text{relativa}} = \sqrt{(\text{RMS}_{(\text{bias})\text{relativa}})^2 + (u_{(\text{Cref})\text{relativa}})^2}$$

**Equação 86:** Raiz quadrada média de todos os valores de *bias* relativos.

$$\text{RMS}_{(\text{bias})\text{relativa}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias \text{ relativo})^2}{n_{EI}}}$$

**Equação 87:** Desvio padrão robusto relativo.

$$S_{(\text{ro})\text{relativo}} = \frac{S_{\text{ro}}}{\bar{x}_{\text{lab}}} \times 100 (\%)$$

**Equação 88:** Desvio padrão robusto relativo médio.

$$\bar{S}_{(\text{ro})\text{relativo}} = \frac{\sum_{i=1}^n S_{(\text{ro})\text{relativo}}}{n_{EI}}$$

**Equação 89:** Incerteza relativa associada à concentração de um material de referência considerado nos ensaios interlaboratoriais.

$$u_{(\text{Cref})\text{relativa}} = \frac{\bar{S}_{(\text{ro})\text{relativo}}}{\sqrt{P}} \times 1,253$$

**Equação 90:** Valor médio das populações reportadas nos ensaios interlaboratoriais.

$$\bar{P} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{n_{EI}}$$

**Equação 91:** Incerteza relativa associada à componente da justeza considerando a realização de um ensaio de recuperação.

$$= \sqrt{\frac{u_{(justeza)relativa}}{(bias\ relativo)^2 + (u_{(recuperação,c)relativa})^2}}$$

**Equação 92:** Incerteza relativa associada à concentração de analito adicionada no ensaio de recuperação.

$$u_{(add)relativa} = \frac{u_{add}}{x_{add}} \times 100 (\%)$$

**Equação 93:** Incerteza relativa associada ao volume adicionado no ensaio de recuperação.

$$u_{(Vol)relativa} = \frac{u_{Vs}}{V_s} \times 100 (\%)$$

**Equação 94:** Incerteza relativa combinada de recuperação.

$$= \sqrt{\frac{u_{(recuperação,c)relativo}}{(u_{(add)relativa})^2 + (u_{(Vol)relativa})^2}}$$

**Equação 95:** Massa de teobromina esperada na extração.

$$m_{esperada} = m_{balão+esferas} + m_{tubo+amostra} - m_{tubo\ vazio} + 100$$

**Equação 96:** Concentração de teobromina na amostra.

$$[Teo]_{amostra} = \frac{[Teo]_{int} \times V_f \times F}{m_{amostra}} \text{ (mg/Kg)}$$

**Equação 97:** Concentração de mercúrio na amostra.

$$[Mercúrio] = \frac{Massa_{Hg}}{Massa_{Toma}} \text{ ppb}$$

# 1. Introdução

## 1.1 Enquadramento geral

Até aos dias de hoje, tem-se verificado um aumento acentuado da população mundial, sendo que, de acordo com a Organização das Nações Unidas, já se contavam com 7,6 bilhões de pessoas em todo o mundo em 2017, e, estima-se um valor compreendido entre 8 e 9 bilhões de pessoas a meio do presente século<sup>1,2</sup>. Tal foi possível devido não só aos avanços das tecnologias e da medicina, como também à globalização que fez com que, atualmente, as trocas de alimentos e produtos, principalmente entre países desenvolvidos, sejam facilitadas devido à livre circulação dos mesmos<sup>1</sup>. Por este motivo, as populações têm um fácil acesso aos produtos e possuem um elevado poder de escolha relativamente às ofertas no mercado. Contudo, estas trocas comerciais nem sempre se mostraram vantajosas levando, por exemplo, à ocorrência de epidemias a nível mundial e ao aumento da obesidade, devido, em grande parte, à falta de qualidade dos produtos no mercado<sup>3</sup>. Sabe-se que, atualmente, cerca de 11 em cada 100 pessoas vivem num ambiente de insegurança alimentar, isto é, questionam-se acerca da qualidade e segurança dos produtos que ingerem diariamente, optando, geralmente, de forma repetida, por produtos de uma marca que lhes transmita confiança e vá ao encontro das suas exigências<sup>1</sup>.

Por este motivo, numa era em que a preocupação por uma alimentação consciente é crescente, é essencial que as empresas ligadas à indústria alimentar possam garantir a segurança dos produtos que comercializam. Como consequência, foram surgindo em todo o mundo inúmeros laboratórios de ensaio que permitem analisar os produtos alimentares de modo a garantir que estes são de confiança e, como tal, não prejudicam a saúde dos consumidores. De modo a avaliar a qualidade dos produtos alimentares, os laboratórios devem ter um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) que consiste no conjunto de procedimentos e responsabilidades que uma empresa ou organização implementa de modo a estabelecer os seus objetivos e recursos para efetuar medições corretas<sup>4</sup>. Quer isto dizer que, a implementação de um SGQ garante que existe uma manutenção dos equipamentos, as metodologias adotadas no laboratório são apropriadas para o objetivo da análise, os materiais e reagentes do laboratório são controlados e o pessoal técnico é competente, gerando, desta forma resultados credíveis<sup>4</sup>. Para além disso, os laboratórios também podem ser acreditados o que significa que os métodos utilizados nos laboratórios foram devidamente avaliados por entidades de acreditação e, como tal, a competência do laboratório é reconhecida mundialmente<sup>5</sup>.

Deste modo, em laboratórios acreditados, é possível determinar os diversos parâmetros que caracterizam um produto alimentar, nomeadamente, a presença de microrganismos ou a quantidade

dos diversos constituintes dos alimentos, geralmente apresentados no rótulo do produto, como o teor de ácidos gordos, de açúcares, de proteínas, de metais, entre outros. Assim, espera-se que os resultados sejam obtidos com uma maior confiança e que, desta forma seja possível diminuir a insegurança alimentar.

Desta forma, o presente trabalho, desenvolvido na empresa ligada à indústria alimentar, Silliker Portugal, S.A., tem como objetivo avaliar o desempenho de duas metodologias utilizadas no laboratório de ensaio, que permitem quantificar, com um determinado grau de confiança, os níveis de teobromina e de mercúrio em diversos produtos alimentares, recorrendo a duas técnicas de análise: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectroscopia atómica, recorrendo ao analisador direto de mercúrio (DMA).

## 1.2 Empresa Silliker Portugal, S.A.

O estágio iniciado a 16 de setembro de 2019 e finalizado a 16 de junho de 2020 foi realizado nas instalações da empresa Silliker Portugal, S.A. (**Figura 1**), pertencente ao grupo Merieux NutriSciences. Sediada no concelho de Vila Nova de Gaia, a empresa Silliker Portugal, S.A. dispõem de diversos serviços relacionados com o setor agroalimentar, que incluem o controlo analítico dos alimentos, a análise de águas e a segurança e qualidade alimentar<sup>6</sup>.



**Figura 1: Silliker Portugal, S.A.** Instalações da empresa Silliker Portugal, S.A., apresentada como Merieux NutriSciences, no concelho de Vila Nova de Gaia.

Em julho de 1992, a empresa surge com o nome EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão de Qualidade, Lda., (EGI), capaz de satisfazer as necessidades do mercado da época<sup>6</sup>. Contudo, em 1993, a EGI consegue acreditar o seu laboratório, ingressando no Sistema Português da Qualidade<sup>6</sup>.

A partir do ano 2000, a empresa passa a dispor de um laboratório de Análise Sensorial, capaz de fazer a avaliação do estado físico, da homogeneidade, do odor e da cor dos alimentos<sup>6</sup>. Como consequência, verificou-se um crescimento acentuado na empresa, quer a nível de instalações, quer a nível de valorização e reconhecimento no mercado.

Assim, em 2008 a multinacional norte-americana Silliker compra a EGI, nascendo a Silliker Portugal, S.A., que, atualmente se apresenta como Merieux NutriSciences, uma vez que o instituto Merieux, por sua vez, adquiriu o grupo Silliker<sup>6</sup>.

Aqui, são realizadas diariamente centenas de análises em produtos alimentares, sendo que em todas elas são asseguradas a qualidade, segurança e confiança nos resultados produzidos. Tudo isto é possível devido aos inúmeros serviços que a Silliker dispõem, nomeadamente, o SGQ, as análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos alimentos, a consultadoria em rotulagem, as auditorias e, o controlo de águas para consumo e águas residuais<sup>6</sup>. Por este motivo, as instalações da empresa podem ser repartidas em dois grandes grupos, o laboratorial e o administrativo.

O primeiro, é constituído por quatro laboratórios, nomeadamente, o Laboratório de Ensaios Físico-Químicos, no qual se realizam métodos de ensaio envolvendo a química analítica clássica, o Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, onde se realizam procedimentos que envolvem o recurso a técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, o Laboratório de Microbiologia, onde se realizam ensaios microbiológicos, e o Laboratório de Análise Sensorial, mencionado anteriormente e que, atualmente se encontra localizado nas imediações do edifício principal da empresa. O segundo grupo está relacionado com a boa gestão financeira da empresa, bem como a garantia da segurança e qualidade alimentar.

A cooperação entre os diferentes domínios da empresa e a qualificação dos seus colaboradores faz da Silliker uma empresa de renome a nível mundial no setor agroalimentar, sendo que, atualmente, encontra-se representada em 26 países, contando com mais de 7000 colaboradores distribuídos por mais de 100 laboratórios acreditados em todo o mundo (**Figura 2**)<sup>6</sup>. De realçar que os laboratórios Silliker são acreditados de acordo com a norma ISO 17025:2005 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Contudo, foi lançada uma nova versão deste documento normativo em 2018 (ISO 17025:2018 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração) e o laboratório encontra-se, atualmente, em fase de transição.





**Figura 2: Laboratórios Silliker, S.A a nível mundial.** Distribuição dos laboratórios Silliker, S.A, em todo o mundo. Adaptada da página [www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal](http://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal)<sup>6</sup>.

### 1.3 Acreditação e certificação de laboratórios de ensaios e calibração

Ao longo dos primeiros setenta anos do século passado, a população mundial interessava-se, principalmente, pela quantidade de alimentos que tinha disponível para o consumo e também pelo aspeto físico que estes apresentavam, todavia era pouca a importância dada à composição química e microbiológica dos mesmos<sup>7</sup>. Contudo, nas últimas cinco décadas, com o crescimento da população mundial e alteração do seu estilo de vida, surgiu a necessidade de aumentar a produtividade e diversidade dos alimentos produzidos juntamente com uma melhoria na facilidade de obtenção dos mesmos. Tal foi conseguido devido aos avanços tecnológicos e à livre circulação de alimentos e de trocas comerciais entre países<sup>8,9</sup>. Desta forma, a alimentação da população sofreu diversas alterações, tornando-se mais diversificada e consciente<sup>9</sup>. Como consequência, verificou-se um aumento da competitividade entre os diferentes produtores no mercado, especialmente devida à introdução de novos produtos semelhantes aos existentes, mas a preços mais acessíveis no mercado<sup>10</sup>.

Por este motivo, dadas as exigências do mercado e o poder de escolha do consumidor, nunca foi tão importante garantir a qualidade, segurança e confiança nos produtos confeccionados.

A Organização Internacional de Normalização (ISO), que consiste numa organização mundial de organismos de normalização que elabora os documentos que fornecem requisitos, especificações, diretrizes ou características que podem ser usadas para assegurar que os materiais, produtos, processos e serviços são adequados para o objetivo a que se destinam, define qualidade numa das suas normas (ISO 9000:2015 Sistemas de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário) como sendo “o grau de satisfação de requisitos dado por um conjunto de características intrínsecas de um objeto”<sup>4,11</sup>. Aplicando este conceito na indústria alimentar, a qualidade de um produto está dependente das características físicas do mesmo como a cor, a forma, a aparência, o sabor, o cheiro, entre outras, mas também outras

características externas do produto como a marca ou a origem, e, portanto, entende-se que um produto tem qualidade se tiver competência para responder às exigências de um cliente, garantindo, desta forma, que este volta a comprá-lo<sup>12</sup>.

Como foi referido anteriormente, atualmente, a qualidade dos produtos e confiança nos resultados produzidos é assegurada pela existência de laboratórios de análise e controlo de qualidade alimentar sendo que, só em Portugal existem sessenta e cinco laboratórios acreditados pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC)<sup>13</sup>. De acordo com a mesma instituição, a acreditação de um laboratório envolve uma avaliação dos métodos utilizados no mesmo de modo a confirmar que estes são adequados para o objetivo pretendido<sup>14</sup>. Deste modo, é possível demonstrar de uma forma eficiente a competência do laboratório a nível mundial<sup>5</sup>. A norma mais utilizada para a acreditação de laboratórios de ensaio e de calibração é a ISO 17025<sup>5</sup>. A esta norma internacional foi dado o estatuto de norma europeia (EN) e, em 2005, o estatuto de norma portuguesa (NP), sendo que a tradução foi da responsabilidade do Instituto Português da Qualidade, passando a ser designada como NP EN ISO 17025:2005<sup>15</sup>.

O grau de extensão de acreditação de um laboratório vai ao encontro das exigências do mesmo, sendo que, a estes laboratórios pode ser permitido adicionar novas práticas na sua extensão de acreditação com base nas suas próprias validações, sem a avaliação de um organismo nacional de acreditação, antes de obter resultados gerados no decorrer dessa prática<sup>16</sup>. Quando isto acontece, diz-se que o laboratório possui uma acreditação flexível global<sup>16</sup>. Assim, quando um laboratório possui este tipo de acreditação, pode fazer alterações no método relativamente a diversos aspetos, como por exemplo, estender a acreditação do método para novas matrizes ou analitos e alterar os parâmetros de desempenho do método, como a incerteza ou a gama de trabalho<sup>16</sup>. Para além disso, também lhe é permitido adotar novos métodos que possuam características semelhantes ao abrangido pela acreditação<sup>16</sup>. Contudo, é de realçar que não é permitida a introdução de novos métodos de análise que não se encontrem abrangidos no âmbito da acreditação<sup>16</sup>. Em Portugal, cabe ao IPAC fazer o reconhecimento dos laboratórios nacionais através da prestação de serviços de acreditação, nomeadamente, em laboratórios de ensaio e calibração, clínicos, organismos de inspeção, entre outros<sup>14</sup>. São inúmeras as vantagens ao adquirir uma acreditação flexível global, tanto para o organismo de acreditação, como para o laboratório<sup>16</sup>. Para o primeiro, permite reduzir o trabalho administrativo e possibilita diminuir o número de inspeções necessárias para ampliar ou modificar a extensão da acreditação de um laboratório. Para o segundo, permite que este possa adequar e aplicar os seus métodos em resposta à aquisição de novos produtos, tecnologias, entre outros, de uma forma imediata<sup>16</sup>.

Para além de acreditados, os laboratórios também podem ser certificados, isto é, a certificação de um laboratório requer a confirmação de que o SGQ em vigor no laboratório está completamente implementado e em conformidade com os requisitos de um documento normativo, geralmente a norma NP EN ISO 9001:2015 Sistemas de Gestão da Qualidade. Requisitos<sup>14,17</sup>. De acordo com esta norma, as principais vantagens para uma entidade ao implementar um SGQ são o facto de permitir um melhor desempenho na prestação de serviços de acordo com as necessidades dos clientes e, como consequência, um aumento na satisfação dos mesmos<sup>17</sup>.

Contudo, é de realçar que um laboratório acreditado de acordo com a NP EN ISO 17025:2005 funciona, igualmente, de acordo com a NP EN ISO 9001:2015, isto é, admite-se que um laboratório acreditado pela NP EN ISO 17025:2005 tem implementado um SGQ para as atividades de ensaio e calibração que cumpre com os requisitos descritos na NP EN ISO 9001:2015, não sendo necessária a certificação desse laboratório<sup>15</sup>.

Por estes motivos, num ambiente cada vez mais complexo e dinâmico, a acreditação e certificação dos laboratórios constituem um meio importante para o aumento da fiabilidade internacional do laboratório e, para uma maior garantia de qualidade dos produtos no mercado. Por este motivo, os produtores recorrem preferencialmente a laboratórios acreditados para caracterizar os seus produtos.

## **1.4 Validação e verificação de métodos analíticos**

Para além do reconhecimento internacional do laboratório, é importante que os métodos utilizados no mesmo sejam apropriados para solucionar o problema analítico proposto pelo cliente. Está descrito na NP EN ISO 17025:2005 que os métodos de ensaio usados em laboratórios acreditados devem ser normalizados, isto é, os métodos a serem utilizados pelo laboratório devem, numa fase inicial, ser devidamente validados, e, posteriormente, sujeitos a uma avaliação periódica, de modo a serem reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional<sup>15,18</sup>. A validação de um método de ensaio, de acordo com o mesmo documento normativo, consiste na obtenção de evidências objetivas que confirmam que esse método cumpre os requisitos específicos para uma determinada finalidade, isto é, a validação permite obter evidências acerca das principais capacidades e limitações do método quando este é aplicado em condições de rotina<sup>15,19</sup>.

Desta forma, a validação de métodos de ensaio é importante para caracterizar o método, bem como o seu campo de aplicação, já que, diariamente, são efetuadas inúmeras medições analíticas a nível global e os laboratórios devem ter competência para determinar o resultado correto de uma análise e serem capazes de demonstrar que este resultado é correto<sup>19</sup>.

Deste modo, os laboratórios podem adotar métodos normalizados descritos pelas entidades competentes de normalização, sem ser necessário validar os mesmos. Porém, o desempenho destes métodos deve ser verificado, isto é, devem obter-se evidências de que o método consegue reproduzir os requisitos específicos definidos aquando a sua validação<sup>19</sup>.

Em alternativa, o laboratório também pode adotar métodos não normativos descritos na literatura, desenvolver os seus próprios métodos, utilizar métodos normalizados, mas que foram utilizados fora do âmbito para o qual foram desenvolvidos ou modificar um método normalizado. Contudo, quando tal acontece, estes métodos devem ser devidamente validados, de modo a demonstrar que são apropriados para o uso pretendido<sup>15</sup>. Para além disso, estes métodos também devem ser verificados regularmente.

Em suma, métodos normalizados são métodos que já foram devidamente validados e apenas precisam de ser verificados periodicamente, enquanto métodos não normalizados precisam de ser validados para poderem ser utilizados em laboratórios acreditados, passando a ser designados por métodos acreditados.

## **1.5 Ferramentas usadas na validação e verificação de métodos analíticos**

Na validação e verificação de métodos analíticos são necessárias determinadas ferramentas de validação que se encontram inseridas nas ações de controlo de qualidade interno (CQI) e controlo de qualidade externo (CQE) de um laboratório, que por sua vez fazem parte do SGQ. O CQI depende apenas da vontade do laboratório e é referente aos procedimentos que este pode adotar de modo a monitorizar de forma contínua os resultados das medições e avaliar se estes estão corretos<sup>19,20</sup>. Este tipo de ferramentas incluem os materiais de referência internos, os brancos de reagente, as soluções padrão, os ensaios de recuperação, a análise de amostras em duplicado, a elaboração de cartas de controlo e a realização de testes estatísticos<sup>19,20</sup>. O CQE consiste nos procedimentos adotados pelo laboratório mas cuja implementação depende de um organismo externo ao laboratório que podem ser empregues para o mesmo propósito do CQI<sup>19,20</sup>. Aqui incluem-se a participação em ensaios de comparação interlaboratorial e a utilização de materiais de referência e de materiais de referência certificados<sup>20</sup>.

No seu conjunto, estas ferramentas permitem avaliar os parâmetros de desempenho de um método analítico e, garantir, com um determinado nível de confiança, que o resultado obtido é proveniente apenas do objeto de análise.

### 1.5.1 Testes estatísticos

O objetivo de uma análise química passa, numa primeira instância, por definir o propósito da análise, isto é, questionar se é suficiente avaliar se o objeto em estudo se encontra presente numa certa amostra, procedendo, deste modo a uma análise qualitativa, ou, se é necessário determinar a concentração, com um certo nível de confiança, desse mesmo objeto na amostra<sup>21</sup>. Quando isto acontece, diz-se que se procede a uma análise quantitativa<sup>21</sup>.

Contudo, é de realçar que os resultados gerados aquando a realização destas análises estão, afetados por erros, denominados por erros sistemáticos, caso influenciem a proximidade entre os resultados gerados e o resultado considerado como verdadeiro, e por erros aleatórios se afetarem a dispersão dos resultados obtidos<sup>21</sup>. Geralmente, o resultado apresentado para uma análise não deve ser um resultado individual, mas sim, um valor médio do conjunto dos resultados obtidos numa série de medições, dado na forma de média aritmética ou valor médio amostral ( $\bar{x}$ ), que se define como a razão entre o somatório de todos os resultados individuais obtidos ( $x$ ) e o número de medições ( $n$ ) efetuadas (**Equação 1**)<sup>22</sup>:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \text{(Equação 1)}$$

É de realçar que se o valor médio amostral de uma medição se aproxima do valor tido como verdadeiro, não implica, necessariamente, a ausência de erros na medição, apenas que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos. Por este motivo, a indicação exclusiva deste valor não permite inferir se os resultados se encontram dispersos, e, deste modo, concluir acerca da existência de erros aleatórios<sup>21</sup>. Assim, é necessário analisar os resultados individuais para avaliar o quão afastados se encontram do valor médio amostral determinado<sup>21</sup>.

Enquanto a influência dos erros sistemáticos pode ser calculada sob a forma do *bias* da medição, a influência dos erros aleatórios é avaliada através do cálculo do desvio padrão amostral ( $s$ ), dado por (**Equação 2**):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{(Equação 2)}$$

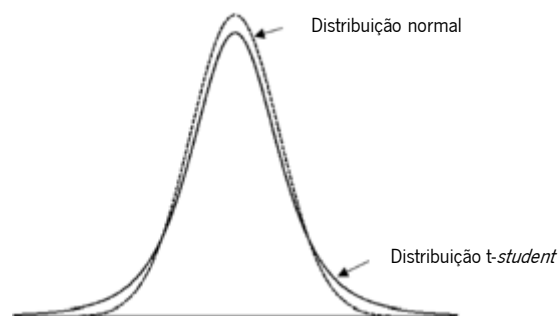
sendo que todas as grandezas foram anteriormente definidas<sup>22</sup>.

De salientar que quando se considera o  $\bar{x}$  e o  $s$ , admite-se que os resultados são referentes a uma amostra recolhida de uma dada população. Quando se pretende referir o valor médio da população da

qual foi retirada a amostra, deve representar-se este termo na forma de valor médio populacional ( $\mu$ ), sendo que, a este valor se encontra associado um desvio padrão populacional ( $\sigma$ )<sup>21</sup>. Contudo, como se admite que a amostra retirada é representativa, foram realizados  $n$  ensaios consideráveis, e, não estão evidenciados erros sistemáticos, na prática, assume-se que o valor de  $\mu$  pode ser estimado a partir do  $\bar{x}$ , assim como, o valor de  $\sigma$  pode ser estimado a partir de  $s$ <sup>21</sup>.

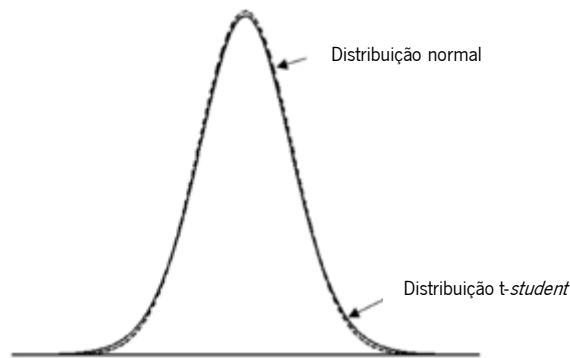
Apesar de o  $s$  avaliar a dispersão dos resultados em torno de  $\bar{x}$ , esta medida descritiva não consegue elucidar a forma da distribuição dos mesmos, sendo tal explicado por uma distribuição de probabilidades<sup>21</sup>. Embora sejam já conhecidas diversas distribuições de probabilidades da literatura, a distribuição normal é aquela que geralmente é mais observada em resultados de diversos procedimentos estatísticos.

Quando não se consegue recolher um número significativo de replicados da amostra, os resultados começam a desviar-se da distribuição normal, passando a seguir uma distribuição *t-student*. Esta distribuição distingue-se da distribuição normal dado que a cauda da curva é mais alongada, como representado na **Figura 3**<sup>23,24</sup>.



**Figura 3: Distribuição normal vs distribuição *t-student* considerando 5 observações** Comparação da forma das curvas de uma distribuição normal e de uma distribuição *t-student* para o mesmo número de observações ( $n = 5$ ). Adaptada de Whitley *et al.*.

Para além disso, sabe-se que à medida que o valor de  $n$  aumenta, a distribuição *t-student* aproxima-se da distribuição normal até que não seja possível distinguir as duas distribuições, como ilustrado na **Figura 4**<sup>22,23</sup>.



**Figura 4: Distribuição normal vs distribuição *t-student* considerando 19 observações.** Comparação da forma das curvas de uma distribuição normal e de uma distribuição *t-student* para o mesmo número de observações ( $n = 19$ ). Adaptada de Whitley *et al*.<sup>3</sup>.

Assim, admitindo a distribuição normal ou *t-student* para os resultados obtidos, é possível fazer inferências estatísticas para a população com base em amostras recorrendo a testes estatísticos. Estes testes consistem em procedimentos estatísticos, nos quais, em primeiro lugar, se devem formular duas hipóteses, denominadas hipótese nula ( $H_0$ ) e hipótese alternativa ( $H_1$ ). A primeira representa sempre uma igualdade e a segunda refuta o formulado na  $H_0$ <sup>21</sup>. De um modo geral, o objetivo destes testes passa por avaliar se a  $H_0$  deve ser rejeitada ou não rejeitada para um determinado propósito<sup>21</sup>. É de realçar que o facto de a  $H_0$  não ser rejeitada não implica que esta seja verdadeira, apenas não foram obtidas evidências de que seja falsa<sup>21</sup>.

De seguida, vários testes estatísticos relevantes ao objetivo do presente estudo serão apresentados. O primeiro destes testes é o teste de Grubbs que permite detetar se algum valor experimental deve ser rejeitado, por se encontrar mais desviado de todos os outros, o que contribui para um maior valor de  $s$ .

#### 1.5.1.1 Teste de Grubbs

Quando se termina uma análise quantitativa, é importante definir quais dos valores obtidos fornecem efetivamente informação relevante acerca do objeto em estudo e, quais podem ser desprezados. O teste estatístico mais vulgarmente empregue para eliminar um valor suspeito obtido na realização de um método de ensaio e, recomendado pela NP EN ISO 17025:2005 é o teste de Grubbs, assumindo que os resultados seguem uma distribuição normal<sup>25,26</sup>. Este teste permite determinar o quão desviado se encontra um valor suspeito ( $x_s$ ) do  $\bar{x}$  obtido na medição, tendo em consideração o  $s$  da mesma, incluindo o valor suspeito em ambos os cálculos<sup>25</sup>. Consideram-se suspeitos os valores extremos da medição, isto é, o maior e o menor valores obtidos aquando a realização da análise.

Neste teste, a  $H_0$  é definida como “não existem diferenças significativas entre o valor suspeito e os outros valores obtidos na medição”, o que por outras palavras se traduz como  $H_0: x_s = \bar{x}$  e, a partir da **Equação 3** calcula-se o valor de  $G$ <sup>25</sup>:

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s} \quad \text{(Equação 3)}$$

De seguida, compara-se o valor de G calculado com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações, incluindo o suspeito, e para a probabilidade de 95 %. Caso o valor de G calculado seja inferior ao valor de G tabelado, a  $H_0$  não é rejeitada, o que indica que o valor suspeito não difere significativamente dos restantes, e, como tal, não deve ser desprezado<sup>21</sup>.

Este teste deve ser sempre efetuado na validação ou verificação de métodos analíticos, quando se realiza uma análise em replicado, como por exemplo, para determinar a precisão do método.

### 1.5.1.2 Teste F de Snedecor-Fisher

O teste F de Snedecor-Fisher é um teste estatístico amplamente usado para determinar a componente dos erros aleatórios de um conjunto de medições obtido pelo mesmo método<sup>21</sup>. Para avaliar esta componente, neste teste utiliza-se a variância amostral ( $s^2$ ) que se define como o quadrado do s (Equação 4)<sup>21</sup>:

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad \text{(Equação 4)}$$

Neste teste, define-se como  $H_0$  que “a variância dos resultados do primeiro conjunto de medições ( $s_1^2$ ) não difere estatisticamente da variância dos resultados do segundo conjunto de medições ( $s_2^2$ )”, o que significa que,  $H_0: s_1^2 = s_2^2$  e, posteriormente, determina-se a razão entre as variâncias (PG) de modo a que o resultado seja um valor superior a 1, ou seja, a maior  $s^2$  deve ser colocada no numerador (Equações 5 e 6)<sup>21</sup>.

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \text{ se } s_1^2 > s_2^2 \quad \text{(Equação 5)}$$

$$PG = \frac{s_2^2}{s_1^2}, \text{ se } s_2^2 > s_1^2 \quad \text{(Equação 6)}$$

Por fim, compara-se este resultado com o valor indicado na tabela F *two-side tailed* para n-1 graus de liberdade (G.L) no numerador e no denominador e 95 % de confiança. Se o valor de PG for inferior ao valor de F tabelado, então não se rejeita a  $H_0$ , logo as variâncias dos dois conjuntos de medição não são estatisticamente diferentes<sup>21</sup>.



Este teste é especialmente importante para avaliar um dos parâmetros de desempenho de um método que esteja a ser validado ou verificado, como a gama de trabalho.

### 1.5.1.3 Teste t

Como referido anteriormente, é importante tentar eliminar os erros sistemáticos quando se realiza uma análise química, de modo a que o resultado obtido possa ser tido como verdadeiro quando comparado com um valor de referência ( $x_{ref}$ ), sendo que, geralmente o resultado obtido é representado na forma de  $\bar{x}$  para uma série de medições<sup>21</sup>. Contudo, por vezes estes valores nem sempre se aproximam devido à ocorrência de erros aleatórios aquando a realização da análise, pelo que é importante definir se a diferença entre estes dois valores é estatisticamente significativa ou não, ou seja, é necessário determinar, com um certo grau de confiança, se os dois resultados diferem um do outro<sup>21</sup>. Para tal, pode realizar-se um teste estatístico denominado teste *t-student* ou simplesmente teste  $t$ <sup>26</sup>. Neste teste, a  $H_0$  é definida como “o  $\bar{x}$  não difere significativamente do  $x_{ref}$ ”, por outras palavras,  $H_0: \bar{x} = x_{ref}$ . De seguida, aplica-se o teste t para comparação de um valor médio com um valor verdadeiro, dado por (Equação 7)<sup>21</sup>:

$$|t| = |\bar{x} - x_{ref}| \times \frac{\sqrt{n}}{s} \quad \text{(Equação 7)}$$

Por fim, compara-se o valor de t calculado com o valor de t obtido da tabela *t-student* para n-1 G.L e 95 % de confiança. Se o valor de t calculado for inferior ao valor de t tabelado, não se rejeita a  $H_0$  logo, os dois valores não diferem significativamente, o que implica que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos e os desvios que ocorreram no resultado são devidos à presença de erros aleatórios na medição<sup>21</sup>.

Este teste é amplamente aplicado para calcular a justeza de um método quando se procede à sua validação ou verificação, como será aprofundado posteriormente.

### 1.5.1.4 Análise de variâncias de fator único

Como foi referido anteriormente, quando se pretende determinar a homogeneidade de variâncias de dois conjuntos de resultados independentes pode realizar-se um teste F de Snedecor-Fisher. Contudo, na prática, geralmente o objetivo de uma medição analítica passa pela comparação de mais do que dois conjuntos de resultados e, neste caso, este teste já não pode ser empregue<sup>27</sup>. Quando tal acontece, o

teste estatístico mais usualmente utilizado é a análise de variâncias (ANOVA) de fator único, admitindo a normalidade dos resultados<sup>27</sup>.

Este teste permite fazer a comparação das variâncias de três ou mais conjuntos de ensaios, realizados em replicado, considerando apenas a variação de um só fator. Assim, neste caso, a  $H_0$  é dada por “não existem diferenças significativas entre as variâncias dos diversos ensaios”, o que significa que  $H_0: s_1^2 = s_2^2 = \dots = s_h^2$ , em que  $h$  corresponde ao número de ensaios realizados<sup>28</sup>. A concretização desta condição implica que não existem diferenças significativas na variância dos resultados dentro de cada ensaio e, por este motivo, quando se realiza o teste da ANOVA de fator único, realizam-se simultaneamente duas comparações, uma comparação “dentro do grupo” que, envolve a determinação da variância dos resultados obtidos dentro de cada ensaio, separadamente, e uma comparação “entre grupos” que permite avaliar a homogeneidade das variâncias entre os diferentes grupos tendo em consideração todos os valores obtidos nos diferentes ensaios<sup>21</sup>. Por este motivo, a  $H_0$  também pode ser definida como “não existem diferenças significativas entre as variâncias dentro do grupo ( $s^2$  dentro do grupo) e entre grupos ( $s^2$  entre grupos), o que por outras palavras se traduz,  $H_0: s^2$  dentro do grupo =  $s^2$  entre grupos.

Para realizar a comparação “dentro do grupo” e calcular a  $s^2$  dentro do grupo, determinam-se, numa primeira instância, as variâncias dos resultados obtidos em cada ensaio, individualmente, dada pela **Equação 4**. De seguida, o valor da  $s^2$  dentro do grupo pode ser determinado, efetuando o valor médio das variâncias calculadas anteriormente, recorrendo à **Equação 1**. Por este motivo, para calcular a  $s^2$  dentro do grupo, pode recorrer-se à fórmula generalizada (**Equação 8**), dada por<sup>21</sup>:

$$s^2 \text{ dentro do grupo} = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 / (h(n - 1)) \quad \text{(Equação 8)}$$

onde  $x_{ij}$  corresponde a cada valor dos replicados obtidos no mesmo ensaio,  $\bar{x}_i$  equivale ao valor médio dos replicados obtidos no mesmo ensaio,  $h$  é referente ao número de ensaios realizados (grupos) e  $n$  corresponde ao número de replicados efetuados por ensaio.

Esta equação é vulgarmente conhecida como quadrado médio dentro do grupo ( $MS_w$ ) uma vez que relaciona a razão entre a soma dos termos quadráticos dentro do grupo ( $SS_w$ ) e o número de G.L, sendo que este é dado o  $h(n-1)$ .

Para realizar a comparação “entre grupos” e calcular a  $s^2$  entre grupos, pode recorrer-se à seguinte expressão (**Equação 9**)<sup>21</sup>:

$$s^2 \text{ entre grupos} = n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2 / (h - 1) \quad (\text{Equação 9})$$

onde  $\bar{x}_i$ ,  $n$  e  $h$  foram anteriormente definidos e,  $\bar{\bar{x}}$  corresponde ao valor médio de todos os  $\bar{x}_i$ . Neste caso, o número de G.L equivale a  $h-1$ . Esta equação é vulgarmente conhecida como quadrado médio entre grupos ( $MS_b$ ) e tem em consideração termos quadráticos entre grupos ( $SS_b$ ) e o número de G.L<sup>21</sup>.

De seguida, calcula-se a razão entre as duas variâncias e compara-se o valor obtido com o valor tabelado na tabela *F one-tailed test* para  $h-1$  G.L no numerador e  $h(n-1)$  G.L no denominador, e 95 % de confiança. Se a  $H_0$  não for rejeitada, não existem evidências de que as variâncias dentro dos grupos e entre grupos sejam significativamente diferentes, o que implica que não existem diferenças significativas nas variâncias dos ensaios efetuados<sup>21</sup>.

Na **Tabela 1** encontram-se resumidas as informações que podem ser obtidas através da realização de um teste de ANOVA de fator único, considerando as variáveis anteriormente descritas.

Este teste estatístico pode ser empregue na validação e verificação de métodos analíticos para determinar a repetibilidade e a precisão intermédia do método, simultaneamente.

**Tabela 1: Informações retiradas da análise de variâncias de fator único (ANOVA).** Informações referentes aos parâmetros que podem ser determinados na realização de um teste de ANOVA de fator único, nomeadamente as somas dos quadrados (SS) e os quadrados médios (MS).

| Fontes de variação | SS  | Graus de Liberdade | MS                             |
|--------------------|---|--------------------|--------------------------------|
| Dentro dos grupos  | $SS_w = \sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$   | $h(n - 1)$         | $MS_w = \frac{SS_w}{h(n - 1)}$ |
| Entre grupos       | $SS_b = n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$ | $h - 1$            | $MS_b = \frac{SS_b}{h - 1}$    |
| Total              | $SS_T = SS_w + SS_b$                            | $(h \times n) - 1$ | —————                          |

#### 1.5.1.5 Teste de Cochran

Outro teste estatístico que permite avaliar a homogeneidade das variâncias de um conjunto de resultados é o teste de Cochran<sup>28</sup>. Tal como no teste da ANOVA, este teste implica a realização de mais do que um conjunto de ensaios ( $h$ ), envolvendo replicados ( $n$ ), e, a determinação da variância dos resultados para cada um dos ensaios, separadamente, de acordo com a **Equação 4**. Através da aplicação deste teste, é possível desprezar o ensaio que tem maior influência na não homogeneidade das variâncias envolvendo todos os ensaios realizados e, por este motivo, é usualmente empregue enquanto teste de rejeição de ensaios quando se realiza uma ANOVA<sup>25</sup>. Deste modo, a  $H_0$  é definida como “não existem diferenças significativas entre as variâncias entre grupos de ensaios ( $s^2$ )”, o que por outras palavras

significa,  $H_0: s_a^2 = s_b^2 = \dots = s_n^2$ . Para testar esta hipótese, calcula-se a razão entre a maior variância ( $s_{\max}^2$ ) e o somatório de todas as outras, como ilustrado na **Equação 10**<sup>28</sup>:

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_i s_i^2} \quad \text{(Equação 10)}$$

De seguida, compara-se o valor de C calculado com o valor de C definido na tabela de Cochran, para n G.L no numerador e h G.L no denominador. Se o valor de C calculado for inferior ao valor de C tabelado, a  $H_0$  não é rejeitada o que significa que não existem evidências de que as variâncias de todos os ensaios diferem significativamente, e, como tal, o ensaio com maior variância não deve ser desprezado<sup>28</sup>.

Este teste pode ser utilizado na validação de um método analítico para avaliar se alguma matriz considerada no estudo da repetibilidade deve ser rejeitada.

#### 1.5.1.6 Erro relativo

O erro relativo ( $E_r$ ) consiste numa medida estatística que permite avaliar o afastamento relativo entre dois resultados ( $x$  e  $x_j$ ) considerando a diferença entre eles e o seu valor médio, ou seja (**Equação 11**):

$$E_r = \frac{|x_i - x_j|}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 11)}$$

#### 1.5.2 Materiais de referência e materiais de referência certificados

Outras ferramentas necessárias para a validação e verificação de métodos analíticos são os materiais de referência (MRs). Estes consistem num material com uma ou mais propriedades bem definidas que, devido à sua elevada homogeneidade e estabilidade, podem ser usados enquanto ferramentas de validação para realizar a calibração de equipamentos e avaliar o desempenho de métodos de análise<sup>18,29</sup>. Quer isto dizer que, um MR deve ser suficientemente estável, representativo e homogéneo, relativamente a determinadas propriedades, com uma composição química bem definida e conhecida, podendo ser tanto um reagente do laboratório com grau de pureza conhecida, como produtos químicos obtidos industrialmente<sup>19</sup>. Por este motivo, a utilização de um MR enquanto ferramenta de análise permite ao laboratório verificar o desempenho de um equipamento, de um analista e de um procedimento, uma vez que a concordância entre o valor obtido aquando a realização da análise e o valor conhecido como verdadeiro permite inferir que o método selecionado é adequado para a análise, o equipamento e os reagentes utilizados para a preparação da amostra estão em condições adequadas e, o operador realizou

o seu trabalho de forma correta<sup>19</sup>. Se existir qualquer desvio entre o valor obtido e o valor de referência existem evidências de que ocorreram erros durante o decorrer da análise e, como consequência, deve efetuar-se um estudo pormenorizado para os detetar e eliminar.

Os materiais de referência também podem ser certificados (MRC), isto é, materiais cujos valores de uma ou mais propriedades foram certificados por um processo tecnicamente válido, sendo emitido um certificado (ou outro documento) por uma entidade de certificação<sup>18,29</sup>. Isto significa que um MRC deve, tal como um MR, manter as suas propriedades estáveis e homogêneas<sup>19,29</sup>. Contudo, este material encontra-se acompanhado de documentação emitida por uma entidade qualificada, que evidencia, não só os valores de uma ou mais propriedades, como também, a respetiva incerteza associada e uma declaração da sua rastreabilidade metrológica<sup>19,29</sup>.

A rastreabilidade metrológica de um MR, de acordo com a literatura, define-se como “a propriedade de um resultado de medição ou o valor de um padrão, através da qual este pode ser relacionado com valores de referência declarados, geralmente padrões de carácter nacional ou internacional, devido à existência de uma cadeia documentada de calibrações, cada qual contendo uma incerteza declarada”<sup>30,31</sup>. Quer isto dizer que, a utilização de um MR rastreável a um padrão primário, isto é, um padrão certificado por uma entidade internacional competente, permite fazer a comparação entre resultados obtidos em qualquer parte do mundo, tendo em consideração a hierarquia de calibrações. Esta hierarquia admite que o padrão primário é aquele que apresenta menor incerteza associada e, que os restantes MRs e MRCs possam ser rastreáveis a este<sup>29</sup>.

Em determinadas situações, a aquisição de MRCs e MRs pode não ser do interesse dos laboratórios de ensaio dado que estes são bastante dispendiosos e não conseguem representar de forma significativa todas as matrizes de interesse do laboratório. Quando tal acontece, pode ser produzido um material de referência interno (MRI), isto é, um MR que foi desenvolvido no próprio laboratório e que, para além de manter as suas condições de estabilidade e de homogeneidade, deve também ser rastreável a padrões primários ou secundários<sup>20</sup>. O laboratório deve estabelecer as propriedades destes materiais através da sua caracterização recorrendo a um método apropriado e devidamente validado para que este possa ser considerado um MRI<sup>20</sup>.

Desta forma, os MRCs, MRs e MRIs constituem uma importante ferramenta na determinação de muitas propriedades relacionadas com a qualidade de uma medição e são usados na validação e verificação de métodos, nomeadamente na determinação da estimativa da incerteza do método.

### 1.5.3 Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação consistem em ensaios nos quais o analito em estudo, ou outro possível objeto de estudo, como um interferente, foi propositadamente adicionado a um material, como uma amostra ou, uma solução padrão que já pode, ou não, conter o analito<sup>32</sup>.

A fortificação de um material pode ser realizada de duas formas distintas. A primeira consiste na adição de um pequeno volume de uma solução padrão contendo o objeto de estudo em elevada concentração e, a segunda envolve a adição de um maior volume de uma solução padrão contendo o mesmo objeto em baixa concentração. Porém, é de realçar que, uma vez que estes materiais podem já conter o analito em estudo, é necessário adotar certas medidas para garantir que a fortificação não altera a concentração de analito para valores superiores ao definido na gama de trabalho do método<sup>19</sup>.

É de destacar que quando se fortifica uma solução padrão, esta pode não representar de forma significativa a matriz natural onde o analito se encontra, pelo que a sua quantificação é mais favorável devido à ligação entre o analito e o padrão ser mais fraca e, como consequência, espera-se que o *bias* obtido para a medição seja subestimado<sup>19</sup>.

Na prática, a realização de um ensaio de recuperação envolve a medição de replicados de uma mesma amostra, seguida do cálculo do  $\bar{x}$ , de acordo com a **Equação 1**. De seguida, fortifica-se a amostra com uma solução padrão com uma determinada concentração ( $x_{add}$ ), tendo em conta as condições referidas anteriormente. Posteriormente, realiza-se novamente a medição dos replicados pelo mesmo método de análise, determinando-se o valor médio da amostra fortificada ( $\bar{x}'$ ). A taxa de recuperação (R) do ensaio pode ser calculada recorrendo à **Equação 12** dada por:

$$R = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{add}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 12)}$$

ou, em alternativa, à **Equação 13**:

$$R = \frac{\bar{x}'}{x_{efetiva}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 13)}$$

onde  $x_{efetiva}$  corresponde à concentração de analito determinada na amostra que resulta da fortificação e cuja determinação está relacionada com o procedimento analítico<sup>19</sup>.

Idealmente, a R deve ser igual a 100 %, contudo sabe-se que este valor está dependente da concentração de analito na amostra e do método de ensaio utilizado, pelo que se deve realizar um ensaio

de recuperação em três níveis de concentração da gama de trabalho, sendo da responsabilidade do laboratório definir a gama de R admissível para cada uma delas<sup>18</sup>.

Estes ensaios são de extrema importância quando se avalia, por exemplo, a seletividade de um método durante a sua validação ou verificação.

#### **1.5.4 Ensaios de comparação interlaboratorial**

Como supracitado, a certificação de um laboratório passa pelo reconhecimento de que este possui um SGQ dos resultados obtidos. Deste modo, um laboratório pode seguir dois procedimentos para garantir este controlo, designados por CQI e CQE<sup>19</sup>. Uma das formas que o laboratório tem para garantir o CQE é através da participação em ensaios interlaboratoriais, que, de acordo com a norma ISO 17043:2010 *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing* consistem na “organização, desempenho e avaliação de ensaios realizados num mesmo material, ou materiais semelhantes, por dois ou mais laboratórios de acordo com as condições pré-definidas”<sup>33</sup>. Quer isto dizer que este tipo de ensaios requer a participação de diversos laboratórios para avaliar um determinado item, de modo a que os resultados obtidos possam ser comparados.

Os ensaios de comparação interlaboratorial podem ter diversas classificações de acordo com o objetivo pretendido, sendo que, através destes ensaios é possível avaliar as características de materiais, estudar o desempenho de métodos analíticos e, estimar a competência e o desempenho do laboratório e dos seus analistas<sup>18</sup>. Assim, para responder ao primeiro objetivo, pode realizar-se um ensaio interlaboratorial de certificação, o qual permite atribuir um valor de referência de um parâmetro com a respetiva incerteza associada a uma amostra candidata a MR. Definidas as características desta amostra tendo em consideração os resultados obtidos no ensaio, esta pode ser utilizada enquanto MR. Contudo, é de realçar que só podem participar neste tipo de ensaios laboratórios de referência, e o método utilizado por estes laboratórios deve assegurar que o parâmetro em estudo é determinado com a menor incerteza possível.

De modo a avaliar as características de um método analítico através da caracterização de determinados parâmetros de desempenho, pode realizar-se um ensaio colaborativo ou de normalização<sup>18</sup>. Neste ensaio, todos os laboratórios participantes utilizam o mesmo método de análise numa série de amostras iguais ou idênticas, que apresentam a sua composição e características bem definidas, como um MR, e que mimetizam as amostras a usar em análises de rotina<sup>18</sup>. Este ensaio interlaboratorial é de extrema importância na determinação de parâmetros como a precisão e a justeza de um método de ensaio.

Por último, se o objetivo da participação num ensaio interlaboratorial passa pela avaliação do desempenho do laboratório pode recorrer-se a um ensaio interlaboratorial de aptidão, sendo que, em alguns países a participação nestes ensaios é condição obrigatória para obter a acreditação do laboratório<sup>18</sup>. Neste tipo de ensaio, os laboratórios participantes analisam um ou mais materiais idênticos, que foram fornecidos pela entidade organizadora, através de um método escolhido pelo laboratório. De seguida, é avaliada a exatidão dos resultados obtidos e, é atribuído ao laboratório um indicador numérico do seu desempenho. Geralmente, este indicador numérico é apresentado na forma de *z-score*, dado por (Equação 14):

$$z - score = \frac{\bar{x}_{lab} - x_{ref}}{d} \quad \text{(Equação 14)}$$

onde  $\bar{x}_{lab}$  corresponde ao valor obtido pelo laboratório e  $d$  a unidade de desvio admissível, isto é, a variação máxima permitida no ensaio<sup>33</sup>. Este valor tanto pode corresponder ao desvio padrão amostral obtido pelo laboratório ou à incerteza do material utilizado<sup>33</sup>.

Se o valor do *z-score* em módulo for igual ou inferior a 2, o resultado é satisfatório, se estiver compreendido entre 2 e 3, o resultado é questionável e, se for superior a 3, então o resultado é não satisfatório<sup>18</sup>.

Por este motivo, a participação nestes ensaios, em particular nos ensaios interlaboratoriais de aptidão, permite ao laboratório detetar erros sistemáticos nas suas medições e, deste modo, adotar medidas corretivas quando o nível de aceitação requerido não é atingido. Para além disso, estes ensaios contribuem para a determinação da justeza do método na validação do mesmo.

### 1.5.5 Cartas de controlo de médias ou de indivíduos

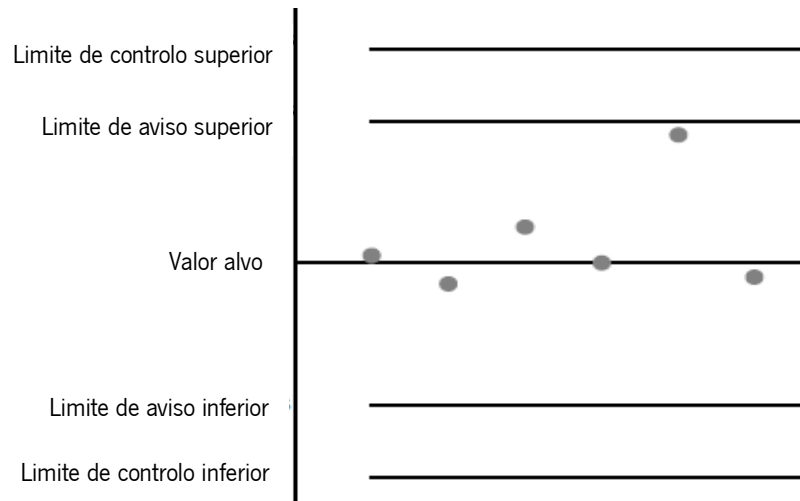
De acordo com a norma NP EN ISO 17025:2005, os resultados obtidos, independentemente do método de análise efetuado, devem ser controlados estatisticamente, isto é, tem de se garantir que os resultados em causa são válidos, admitindo que seguem uma distribuição normal e, como tal, a ocorrência de erros é aleatória<sup>15</sup>. Para tal, devem realizar-se testes estatísticos, como evidenciado anteriormente, contudo estes testes apenas avaliam os resultados no momento da realização do ensaio, pelo que não permitem fazer um controlo contínuo dos resultados gerados. Por este motivo, a monitorização dos resultados produzidos no laboratório deve ser feita de modo a que seja possível observar de uma forma prática e imediata a tendência seguida pelos mesmos.



Assim, uma das ferramentas a ser utilizada para garantir o CQI de um laboratório são as cartas de controlo, desenvolvidas em 1931 por Shewhart, e que, ainda hoje, se revelam de especial importância<sup>20</sup>. As cartas de controlo permitem visualizar graficamente os resultados produzidos pelo laboratório ao longo do tempo e, deste modo, avaliar imediatamente a ocorrência de erros<sup>20</sup>. Existem três tipos de cartas de controlo denominadas cartas de controlo de médias ou indivíduos, cartas de controlo de amplitudes e cartas de controlo de somas cumulativas. Todavia, no presente estudo, apenas será dada importância ao primeiro tipo de carta de controlo<sup>20</sup>.

Nas cartas de controlo de médias ou de indivíduos representa-se o valor médio ou um valor individual da grandeza em estudo, respetivamente, que pode variar desde a concentração de analito num MR à temperatura de um dado equipamento. Por este motivo, estas cartas podem ser empregues consoante o objetivo de estudo, como o controlo de equipamentos, o controlo da precisão e justeza de um método de ensaio ou o controlo de um determinado material. Graficamente, estas cartas são constituídas no eixo das ordenadas por um valor alvo, que representa o valor de referência da grandeza, os limites de aviso, que indicam que o processo se encontra controlado caso os valores obtidos não ultrapassem estes limites e, como tal, não é necessário adotar medidas e, os limites de controlo que indicam que um processo deve ser imediatamente interrompido caso se verifique um valor acima deste limite<sup>20</sup>. Os limites de aviso são obtidos com 95 % de confiança o que quer dizer que existe 5 % de probabilidade de um valor controlado se encontrar fora dos limites de aviso, e os limites de controlo são obtidos com 99,7 % de confiança o que indica que existe 0,3 % de probabilidade de um valor correto se encontrar fora destes limites<sup>20</sup>. No eixo das abcissas define-se a frequência temporal<sup>20</sup>.

Na **Figura 5** é possível observar um exemplo deste tipo de carta de controlo, sendo que é de realçar a simetria destas cartas, a aleatoriedade da dispersão dos resultados e, que neste caso o processo se encontra devidamente controlado.



**Figura 5: Carta de controlo de médias ou de indivíduos.** Representação gráfica de uma carta de controlo de médias ou de indivíduos, com os respetivos limites de aviso, limites de controlo e valor alvo. Adaptada de Guia RELACRE 3<sup>o</sup>.

A construção de cartas de controlo de médias ou de indivíduos requer a realização de um estudo prévio de modo a definir o valor alvo e os limites de aviso e de controlo.

Assim, admitindo que o objetivo da carta passa pelo controlo de um determinado material, na construção de uma carta de controlo de indivíduos, inicialmente, realiza-se uma única análise ao material em estudo durante um determinado número de dias, utilizando sempre o mesmo método de ensaio, preferencialmente um método validado. De seguida, determina-se o  $\bar{x}$  dos resultados obtidos na totalidade, sendo que este corresponde ao valor alvo na carta de controlo e, o respetivo  $s$  obtido em condições de precisão intermédia. Os limites superior de aviso (LSA) e inferior de aviso (LIA) são dados com 95 % de confiança pelas seguintes expressões (**Equações 15 e 16**, respetivamente)<sup>20</sup>:

$$LSA = \bar{x} + 2 \times s \quad \text{(Equação 15)}$$

$$LIA = \bar{x} - 2 \times s \quad \text{(Equação 16)}$$

Os limites superior de controlo (LSC) e inferior de controlo (LIC) são obtidos com 99,7 % de confiança recorrendo às seguintes expressões (**Equações 17 e 18**, respetivamente)<sup>20</sup>:

$$LSC = \bar{x} + 3 \times s \quad \text{(Equação 17)}$$

$$LIC = \bar{x} - 3 \times s \quad \text{(Equação 18)}$$

De seguida, todos os valores obtidos diariamente para esta grandeza devem ser introduzidos na carta de controlo, e, deste modo é possível avaliar se a composição de um analito num material se encontra estável, ou se este pode ter sofrido alguma contaminação.

Para construir uma carta de controlo de médias, admitindo o objetivo proposto acima, procede-se à análise de um número de replicados ( $n$ ) desse material pelo mesmo método de ensaio durante um determinado número de dias. De seguida, determina-se o  $\bar{x}$  dos  $n$  replicados, em condições de repetibilidade. Posteriormente, calcula-se  $\bar{\bar{x}}$  que corresponde ao valor médio dos  $\bar{x}$  obtidos nos vários dias, e o respetivo desvio padrão dos valores de  $\bar{x}$  ( $s_{\bar{x}}$ ). Nesta carta o valor alvo corresponde a  $\bar{\bar{x}}$  e os LSA, LIA, LSC e LIC são dados por (Equações 19, 20, 21 e 22, respetivamente)<sup>20</sup>:

$$LSA = \bar{\bar{x}} + \frac{2 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 19})$$

$$LIA = \bar{\bar{x}} - \frac{2 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 20})$$

$$LSC = \bar{\bar{x}} + \frac{3 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 21})$$

$$LIC = \bar{\bar{x}} - \frac{3 \times s_{\bar{x}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{Equação 22})$$

No âmbito do trabalho desenvolvido, estas cartas são de especial importância para controlar as amostras diárias de controlo de processo, como será mencionado de seguida. No primeiro caso, admite-se que uma situação se encontra fora do controlo se um valor estiver fora dos limites de controlo, se existir uma série de 7 ou mais pontos consecutivos a mover-se para cima (ou para baixo) ou se 8 ou mais pontos consecutivos se encontrarem acima (ou abaixo) do valor médio, sendo, por isso, necessário adotar medidas corretivas.

### 1.5.6 Amostra diária de controlo de processo

Uma amostra diária de controlo de processo (DPCS) consiste numa amostra que é analisada num laboratório em rotina, de modo a avaliar a fiabilidade dos resultados obtidos no ensaio e, quando se pretende realizar a validação de um método de ensaio.

No âmbito da empresa de estágio, estas amostras são preferencialmente fabricadas no laboratório *Food Science Center*, pertencente ao grupo Silliker, e distribuídas por todos os laboratórios Silliker, mundialmente. Uma característica importante nestas amostras é o facto de serem rastreáveis a um MR, pois isto significa que estas amostras têm as suas características bem definidas, nomeadamente, a sua estabilidade e a concentração de analito.

A DPCS também pode ser adquirida a uma empresa, como a BIPEA ou a FAPAS, que participam em ensaios interlaboratoriais de certificação. Isto significa que, é efetuado um ensaio para atribuir um valor de referência, sendo, neste caso, a concentração de analito com a respetiva incerteza associada a uma amostra candidata a MR. Definidas as características desta amostra tendo em consideração os resultados obtidos no ensaio, esta pode ser utilizada enquanto MR. Para além disso, a Silliker também utiliza como DPCS produtos alimentares comerciais, estáveis, quando não são fabricados materiais de referência com a matriz que contém o analito em estudo, ou quando estes são bastante dispendiosos.

Os laboratórios Silliker definem a periodicidade da análise destas amostras como diária por cada ciclo de medição, de forma a aceitar os resultados obtidos. Os resultados obtidos provenientes da análise de replicados são introduzidos numa carta de controlo de médias, cujo valor alvo e limites temporários foram definidos aquando a chegada da amostra ao laboratório, realizando-se sete medições pelo método pretendido. Os valores determinados na realização deste ensaio definem os limites temporários da carta de controlo. Posteriormente, realizam-se mais treze medições pelo mesmo método, procede-se como referido anteriormente, tendo em consideração um total de vinte medições. Desta forma, obtém-se uma carta de controlo definitiva, na qual será introduzido o valor da análise diária da DPCS. Quando o resultado de uma DPCS se encontra fora dos limites estabelecidos, todos os resultados de amostras de clientes desta série de trabalho ficam suspensos até a não conformidade ser resolvida.

As DPCS são também utilizadas no âmbito empresarial para validar e verificar equipamentos e métodos de ensaio pois, através da sua análise é possível obter informação sobre os parâmetros de desempenho, nomeadamente a justeza do método através do cálculo do *bias* da medição.

## **1.6 Parâmetros de desempenho avaliados na validação e verificação de métodos analíticos**

Conhecidas as ferramentas que podem ser utilizadas na validação e verificação de métodos analíticos, é agora importante definir quais os parâmetros de desempenho de um método analítico. Os parâmetros de desempenho permitem avaliar as características de um método analítico, nomeadamente a sensibilidade, a gama de trabalho, o limite de quantificação, a seletividade, a justeza, a precisão e a

incerteza do método<sup>19</sup>. No seu conjunto, estes parâmetros permitem inferir acerca da capacidade do método para cumprir os requisitos para o qual foi desenvolvido.

### 1.6.1 Calibração

Em química analítica, geralmente, são realizadas representações gráficas que relacionam a resposta obtida pelo instrumento de análise ( $y$ ) com a variável em estudo ( $x$ ), obtendo-se uma curva de calibração<sup>34</sup>.

Assim, o desafio antes de se proceder à determinação de qualquer parâmetro de desempenho reside na seleção do melhor modelo para ajustar os resultados obtidos<sup>34</sup>. Quer isto dizer que, apesar de existirem inúmeros modelos de regressão para um conjunto de resultados obtidos por um método analítico, de modo a obter confiança nestes resultados, deve escolher-se o modelo de regressão que apresente um menor desvio dos resultados experimentais e, deste modo, prever valores de  $x$  desconhecidos através desse modelo, recorrendo à equação da curva de calibração<sup>34</sup>.

Geralmente, o critério de escolha do modelo de regressão que melhor se ajusta aos pontos é baseado no método dos mínimos quadrados. Este método assume que a soma dos quadrados das diferenças entre os valores previstos pelo modelo ( $\hat{y}_i$ ) e os valores de  $y$  é a mínima possível, isto é **(Equação 23)**<sup>34,35</sup>:

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 = \text{mínimo} \quad \text{(Equação 23)}$$

São já conhecidos vários modelos de regressão da literatura, contudo, no presente estudo, serão apenas mencionados o modelo de regressão linear e o modelo de regressão quadrático, admitindo o método dos mínimos quadrados enquanto critério de seleção para cada um deles.

No caso do modelo de regressão linear, observa-se que existe uma relação linear entre os valores de  $y$  e de  $x$ , o que visualmente se traduz numa reta para melhor ajustar os pontos experimentais. A partir da reta de calibração deste modelo, é possível obter uma equação da reta de calibração dada por **(Equação 24)**<sup>35</sup>:

$$y = bx + a \quad \text{(Equação 24)}$$

onde  $a$  e  $b$  são referentes à ordenada na origem e ao declive, respetivamente.

Os valores de  $b$  e de  $a$  são geralmente obtidos diretamente de um programa informático aquando o traçado da curva de calibração, como por exemplo a ferramenta Excel, contudo estes valores podem ser demonstrados matematicamente recorrendo às **Equações 25 e 26**, respetivamente<sup>18</sup>.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{(Equação 25)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{(Equação 26)}$$

Os valores de a e de b devem ser acompanhados da respectiva incerteza associada, isto é,  $s_a$  e  $s_b$  respectivamente. O valor de t utilizado no cálculo destes parâmetros é obtido da tabela *t-student* para 95 % de confiança e n-2 G.L. Os valores de  $s_a$  e  $s_b$  correspondem aos desvios padrão associados à ordenada na origem e ao declive, respectivamente, e, podem ser calculados de acordo com as **Equações 27 e 28**, respectivamente<sup>18</sup>:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Equação 27)}$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{(Equação 28)}$$

onde n corresponde ao número de padrões utilizados para a construção da curva de calibração e  $s_{y/x}$  é referente ao desvio padrão residual do modelo de regressão linear e, pode ser calculado recorrendo à **Equação 29**<sup>18</sup>:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \text{(Equação 29)}$$

Assim, a equação da reta de calibração de um modelo de regressão linear deve ser apresentada como descrito na **Equação 30**.

$$y = (b \pm s_b t)x + (a \pm s_a t) \quad \text{(Equação 30)}$$

De realçar que quando se efetua o traçado da reta de calibração, devem considerar-se no mínimo seis valores experimentais equidistantes, contudo, com mais valores experimentais a incerteza associada ao declive e à ordenada diminui, uma vez que o valor de t tabelado é menor<sup>34</sup>. Porém, não se justifica obter retas de calibração com mais do que dez valores experimentais, uma vez que, a partir daqui, os

valores encontrados na tabela *t-student* apenas diminuem ligeiramente pelo que a incerteza associada aos parâmetros referidos se mantém praticamente inalterada<sup>34</sup>.

Relativamente ao modelo de regressão quadrático, a equação da curva quadrática é dada pela **Equação 31**<sup>36</sup>:

$$y = cx^2 + bx + a \quad \text{(Equação 31)}$$

onde *c* corresponde ao coeficiente associado ao fator de segundo grau, *b*, o coeficiente associado ao fator de primeiro grau e *a*, a ordenada na origem.

Tal como para o modelo de regressão linear, também para o modelo de regressão quadrático é possível demonstrar matematicamente como determinar os valores de *c*, *b* e *a*, recorrendo às **Equações 32, 33 e 34**, respetivamente, contudo, é mais simples recorrer a ferramentas informáticas para o mesmo efeito, como o Excel<sup>36</sup>.

$$c = \frac{(Q_{xy} \times Q_{x^3}) - (Q_{x^2y} \times Q_{xx})}{(Q_{x^3})^2 - (Q_{xx} \times Q_{x^4})} \quad \text{(Equação 32)}$$

$$b = \frac{Q_{xy} - cQ_{x^3}}{Q_{xx}} \quad \text{(Equação 33)}$$

$$a = \frac{(\sum y_i - b \sum x_i - c \sum x_i^2)}{n} \quad \text{(Equação 34)}$$

onde  $Q_{xx}$ ,  $Q_{xy}$ ,  $Q_{x^3}$ ,  $Q_{x^4}$  e  $Q_{x^2y}$  são obtidos recorrendo às **Equações 35, 36, 37, 38 e 39**, respetivamente<sup>36</sup>.

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \quad \text{(Equação 35)}$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - \left( \sum x_i \times \frac{\sum y_i}{n} \right) \quad \text{(Equação 36)}$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left( \sum x_i \times \frac{\sum x_i^2}{n} \right) \quad \text{(Equação 37)}$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \frac{(\sum x_i^2)^2}{n} \quad (\text{Equação 38})$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \times y_i) - \left( \sum y_i \times \frac{\sum x_i^2}{n} \right) \quad (\text{Equação 39})$$

É possível também determinar as incertezas associadas a estes três coeficientes recorrendo a modelos matemáticos, contudo torna-se vantajoso recorrer, uma vez mais, a uma ferramenta informática como o Excel. Tal como para o modelo de regressão linear, é possível determinar o desvio padrão residual do modelo de regressão quadrático ( $s_{y^2}$ ) dado por **(Equação 40)**<sup>36</sup>:

$$s_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 3}} \quad (\text{Equação 40})$$

Existem diversas formas de avaliar qual o modelo que deve ser escolhido de forma a obter um melhor ajuste para os resultados obtidos, sendo de destacar a análise do coeficiente de correlação ( $r$ ), a realização de um teste t ou a realização do teste de Mandel, como irá ser abordado de seguida.

#### 1.6.1.1 Coeficiente de correlação

O  $r$  define-se como o parâmetro estatístico que permite avaliar a relação que existe entre duas variáveis em estudo, neste caso,  $y$  e  $x$ <sup>37</sup>. Este valor é adimensional e encontra-se compreendido entre -1 e 1<sup>37</sup>. Se o valor de  $r$  for igual a 0, conclui-se que não existe uma correlação entre as duas variáveis em estudo, face ao modelo de regressão selecionado. Caso seja igual a -1 ou a 1, significa que existe uma correlação perfeita entre as duas variáveis, isto é, existe uma correlação negativa entre  $y$  e  $x$  e uma correlação positiva entre  $y$  e  $x$ , respetivamente<sup>37</sup>. O valor de  $r$ , para um modelo de regressão linear pode ser calculado a partir da **Equação 41**<sup>37</sup>:

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum (x_i - \bar{x})^2][\sum (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (\text{Equação 41})$$

sendo que todas as variáveis foram anteriormente definidas.

De acordo com o Guia RELACRE 13, pode admitir-se que um modelo de regressão linear se encontra bem ajustado se o valor de  $r$  for superior a 0,995<sup>18</sup>.



No caso do modelo de regressão quadrático, a determinação do  $r$  tem em consideração as diferenças que existem entre  $y$  e  $\bar{y}$  que são devidas não só à própria regressão (MS residual), como também a erros aleatórios sobre a regressão (MS total), isto é (Equação 42)<sup>21</sup>:

$$r = \sqrt{1 - \frac{\text{MS residual}}{\text{MS total}}} \quad (\text{Equação 42})$$

sendo que (Equações 43 e 44)<sup>21</sup>:

$$\text{MS residual} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (\text{Equação 43})$$

$$\text{MS total} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (\text{Equação 44})$$

De realçar que a determinação deste parâmetro para ambos os modelos foi facilitada pelo desenvolvimento de ferramentas informáticas capazes de fazer a sua determinação, como o Excel.

#### 1.6.1.2 Teste de significância para o $r$

Outra estratégia que pode ser adotada para avaliar se o modelo escolhido é aquele que leva a um melhor ajuste dos resultados obtidos é o teste  $t$  para o  $r$ . Neste teste, a  $H_0$  é definida como “não existe correlação linear entre  $x$  e  $y$ ” o que matematicamente significa que  $H_0: r=0$ . O valor de  $t$  pode ser calculado recorrendo à seguinte expressão (Equação 45)<sup>21</sup>.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{Equação 45})$$

onde  $n$  corresponde ao número de padrões utilizados na construção da curva de calibração. De seguida, compara-se o valor de  $t$  calculado com o valor de  $t$  indicado na tabela *t-student* para  $n-2$  G.L e, 95 % de confiança. Se o valor de  $t$  calculado for inferior ao valor de  $t$  tabelado, então aceita-se a  $H_0$  o que significa que não existe uma correlação linear entre  $x$  e  $y$ <sup>21</sup>. Caso o valor de  $t$  calculado seja superior ao valor de  $t$  tabelado, a  $H_0$  é rejeitada o que indica que existe uma correlação linear entre  $x$  e  $y$ . Como tal, o modelo selecionado é aquele que melhor se ajusta aos resultados obtidos<sup>21</sup>.

### 1.6.1.3 Teste de Mandel

Até agora, para avaliar a correlação que existe entre  $x$  e  $y$  considerou-se apenas o valor do  $r$ , contudo, existe ainda um outro teste estatístico capaz de avaliar o modelo escolhido na construção da curva de calibração, denominado teste de Mandel<sup>38</sup>. Este teste permite fazer uma comparação entre dois possíveis modelos, os modelos linear e o quadrático<sup>38</sup>. Para aplicar este teste calculam-se os valores de  $s_{y/x}$  e  $s_{y^2}$  para os modelos linear e quadrático, respetivamente, dados pelas **Equações 29 e 40**, respetivamente<sup>39</sup>.

Posteriormente, determina-se a diferença das variâncias ( $DS^2$ ), dada por (**Equação 46**)<sup>39</sup>:

$$DS^2 = (n - 2) \times (s_{y/x})^2 - (n - 3) \times (s_{y^2})^2 \quad (\text{Equação 46})$$

Por fim, realiza-se um teste F determinando-se o valor de PG, recorrendo à **Equação 47**<sup>39</sup>:

$$PG = \frac{DS^2}{(s_{y^2})^2} \quad (\text{Equação 47})$$

Desta forma, é possível comparar o valor de PG com o valor de F indicado na tabela de F de Fisher *two-side tailed* para 1 G.L no numerador e n-3 G.L no denominador e 95 % de confiança<sup>39</sup>. Se o valor de PG for inferior ao valor de F tabelado, significa que a função que melhor se ajusta aos resultados obtidos é a linear<sup>38</sup>. Caso ocorra a situação inversa, a função quadrática é aquela que melhor se ajusta aos resultados experimentais.

### 1.6.2 Sensibilidade

Definido o modelo que melhor se ajusta aos resultados experimentais, podem determinar-se os parâmetros de desempenho do método, nomeadamente a sensibilidade. Este parâmetro define-se como a capacidade que o método tem para gerar respostas diferentes quando se fazem pequenas alterações na concentração de analito em solução<sup>18</sup>. Em termos matemáticos, a sensibilidade pode ser representada como o “quociente entre a variação da resposta experimental ( $\Delta L$ ) e a variação da concentração de analito ( $\Delta C$ ) correspondente àquele acréscimo”, isto é (**Equação 48**)<sup>18</sup>:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{Equação 48})$$

Deste modo, a sensibilidade corresponde à primeira derivada da curva de calibração nessa zona de concentração. Por este motivo, se o modelo for linear, a sensibilidade do método será constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao declive da curva de calibração<sup>18</sup>.

No caso do modelo quadrático, a sensibilidade corresponde a **(Equação 49)**:

$$\text{Sensibilidade} = (2 \times c)x + b \quad \text{(Equação 49)}$$

Isto significa que, neste modelo, a sensibilidade encontra-se dependente da concentração de analito, que vai sendo diferente ao longo da curva de calibração<sup>36</sup>.

Quanto maior for a sensibilidade do método, melhor é a capacidade que este tem para distinguir soluções com concentrações de analito muito próximas.

### 1.6.3 Limite de quantificação

Quando se pretende determinar a concentração de analito numa amostra com pouco teor do mesmo, é importante escolher um método que seja capaz de quantificar este valor. Assim, outro parâmetro que deve ser estabelecido no processo de validação do método analítico é o limite de quantificação (LDQ). O LDQ define-se como o valor mínimo de concentração de analito que pode ser quantificado pelo método com uma determinada confiança<sup>40</sup>. Assim, o método apenas consegue garantir, com um determinado nível de confiança, que um resultado é correto se a concentração de analito quantificada for superior ao LDQ.

Existem diversos modos para calcular o LDQ de um método, contudo, neste estudo serão destacados apenas dois deles. O primeiro, apenas pode ser empregue no modelo de regressão linear e, permite calcular o LDQ a partir da curva de calibração<sup>32</sup>. Para tal, numa fase inicial determina-se o valor do  $s_{y/x}$  de acordo com a **Equação 29** e o LDQ pode ser calculado recorrendo à seguinte expressão **(Equação 50)**<sup>32</sup>:

$$\text{LDQ} = \frac{10 \times s_{y/x}}{b} \quad \text{(Equação 50)}$$

Geralmente, o LDQ corresponde à concentração do padrão mais baixo utilizado no traçado da curva de calibração<sup>18</sup>. Para avaliar esta hipótese, podem realizar-se ensaios de recuperação de modo a demonstrar que este padrão corresponde ao LDQ. Para tal, fortifica-se um branco de amostra ou uma amostra que, idealmente, não deve conter o analito em estudo, ou apresente uma concentração de

analito inferior ao do padrão com concentração mais baixa, de modo a que a concentração de analito após fortificação seja igual ao LDQ que se pretende definir. Este ensaio deve ser realizado efetuando dez réplicas independentes e, de seguida, calcula-se a R obtida de acordo com a **Equação 12** para cada réplica e, por fim, a  $\bar{R}$ . Se este valor estiver contido no intervalo de R indicado na legislação para o analito em estudo ou definido pelo laboratório, pode admitir-se que a concentração do primeiro padrão da curva de calibração corresponde ao LDQ.

#### 1.6.4 Gama de trabalho

Tal como referido anteriormente, quando se pretende determinar a concentração de um analito numa amostra deve, numa fase inicial, selecionar-se o método que melhor se adequa para esse propósito, uma vez que, atualmente, foram já desenvolvidos diferentes métodos capazes de analisar o mesmo analito.

Assim, outro parâmetro que vai influenciar a escolha de um método em prol de outro é a gama de trabalho. Este parâmetro define-se como o intervalo de concentração de analito para o qual o método consegue dar uma resposta com um valor de precisão e justeza aceitáveis<sup>41</sup>. O limite inferior da gama de trabalho, tanto no modelo linear como no modelo quadrático corresponde ao LDQ enquanto o limite superior equivale ao valor a partir do qual se começam a detetar anomalias na sensibilidade do método<sup>19</sup>. Quer isto dizer que, como o método não permite quantificar concentrações de analito infinitas deve estabelecer-se o limite superior da gama de trabalho. Este valor pode ser determinado visualmente na regressão linear, pois como a sensibilidade do método é constante ao longo da gama de trabalho, qualquer alteração neste parâmetro significa que a resposta dada pelo método não segue uma relação linear. No modelo quadrático, a observação da curva de calibração não permite fazer uma avaliação tão correta do limite superior da gama de trabalho, uma vez que a sensibilidade varia ao longo da mesma.

Por este motivo, uma alternativa eficaz para avaliar a gama de trabalho de um método é a realização do teste F de Snedecor-Fisher, uma vez que se pretende demonstrar que existe homogeneidade de variâncias ao longo da curva, admitindo o método dos mínimos quadrados e, que os erros seguem uma distribuição normal<sup>19,36</sup>.

Para aplicar este teste devem analisar-se pelo menos seis soluções padrão de analito distribuídas de igual modo em toda a gama de concentração. Para o primeiro e último padrões devem ser analisados dez réplicas independentes (n)<sup>19,36</sup>. Neste caso, a  $H_0$  é definida como “não existem diferenças significativas entre a variância do primeiro padrão ( $s_1^2$ ) e a variância do último padrão ( $s_2^2$ )”, o que significa que  $H_0: s_1^2 = s_2^2$ <sup>19,36</sup>. Após determinar o s e a  $s^2$  dos replicados dos dois padrões, calcula-se o valor de PG de acordo com as **Equações 5** ou **6**, consoante os resultados obtidos, pois a maior variância fica representada no

numerador<sup>19,36</sup>. Após comparação do valor de PG com o valor de F indicado na tabela F *two-side tailed* para n-1 G.L no numerador e no denominador e, 95 % de confiança rejeita-se a  $H_0$  se o valor de PG for superior ao valor de F tabelado e, como tal, a gama de trabalho não se encontra bem ajustada<sup>19,36</sup>. Se tal acontecer, deve avaliar-se a possibilidade de se reduzir a gama de trabalho até que não hajam diferenças significativas entre as variâncias do primeiro e do último padrões ou testar uma regressão ponderada.

### 1.6.5 Seletividade

Para além dos parâmetros de desempenho referidos até agora, outro que merece especial atenção é a seletividade do método de análise. Entende-se por seletividade a capacidade que um método apresenta para quantificar, com um determinado nível de confiança, o analito em estudo na presença de outros componentes de comportamento semelhante<sup>40</sup>. Quer isto dizer que um método é seletivo se for demonstrado que este consegue gerar uma resposta que é proveniente apenas a presença do analito em estudo e não, de outras substâncias que possam interferir com a resposta obtida. O estado limite de uma seletividade perfeita é designado especificidade<sup>18</sup>.

A seletividade pode ser avaliada através da realização de ensaios de recuperação. Neste ensaio, seleciona-se a amostra de interesse e determina-se o  $\bar{x}$  da concentração de analito nessa amostra. De seguida, fortificam-se as mesmas amostras com uma solução com concentração de analito conhecida ( $x_{add}$ ) e, determina-se o valor médio da concentração de analito na amostra após fortificação ( $\bar{x}'$ ). A R obtida pode ser calculada de acordo com a **Equação 17**<sup>18</sup>. Se o valor de R estiver contido no intervalo de R admitido, pode considerar-se que o método é seletivo.

### 1.6.6 Precisão

Tal como referido anteriormente, quando se realiza um método de análise os resultados obtidos por esse método encontram-se afetados por erros sistemáticos e erros aleatórios. A componente dos erros aleatórios numa medição pode ser avaliada através da determinação de um parâmetro de desempenho denominado precisão. Este parâmetro reflete a dispersão dos resultados de replicados obtidos por um dado método sob determinadas condições específicas, sendo que se assume que esta dispersão é devida à existência de erros aleatórios na medição<sup>19,30</sup>. Consoante as condições específicas selecionadas para a realização do ensaio, é possível avaliar a precisão do método em três condições distintas, nomeadamente, sob a forma de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade<sup>32</sup>. Em todas elas, os ensaios podem ser repetidos sobre uma mesma amostra, sobre amostras semelhantes, sobre soluções padrão ou sobre diferentes amostras, contudo, em todos os casos, as suas características

físicas e químicas, nomeadamente, a matriz, a concentração de analito, a homogeneidade e a estabilidade, devem manter-se inalteradas independentemente do tempo decorrido entre os ensaios<sup>19,30</sup>.

Contudo, estas podem ser distinguidas, uma vez que, a repetibilidade está relacionada com a precisão obtida em ensaios de um dado método, realizados nas mesmas condições, isto é, no mesmo local, com o mesmo operador, equipamento e reagentes, durante um intervalo curto de tempo, geralmente, no próprio dia<sup>18</sup>. A precisão intermédia, por sua vez, está relacionada com a precisão obtida em ensaios de um dado método, realizados nas mesmas condições, nomeadamente, no mesmo local, com o mesmo operador, equipamento e reagentes, durante um longo intervalo de tempo, geralmente, em dias diferentes<sup>18</sup>. Por fim, a reprodutibilidade está relacionada com a precisão obtida em ensaios de um dado método, realizados em laboratórios diferentes, isto é, local, operador, equipamento e reagentes diferentes<sup>18</sup>. Por este motivo, espera-se que a precisão obtida em condições de repetibilidade seja aquela que reflete uma menor variabilidade nos resultados, enquanto a reprodutibilidade seja aquela que expressa uma maior variabilidade nos resultados<sup>19</sup>.

É de realçar que independentemente das condições de ensaio selecionadas, a precisão, geralmente, encontra-se relacionada com a concentração de analito no objeto em estudo e, por este motivo, deve ser estudada em toda a gama de trabalho de interesse<sup>19</sup>. Este parâmetro pode ser expresso na forma de  $s$  ou de coeficiente de variação (CV), dado por **(Equação 51)**:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 51)}$$

Por vezes, torna-se útil expressar a precisão sob a forma de CV, pois, espera-se que este seja aproximadamente inalterável ao longo de toda a gama de concentração de interesse<sup>19</sup>.

#### 1.6.6.1 Precisão em condições de repetibilidade

Tal como referido anteriormente, a repetibilidade exprime a precisão obtida numa série de medições ( $n$ ), geralmente nunca inferior a seis, realizadas nas mesmas condições e num curto período de tempo<sup>32</sup>. Estas medições podem ser derivadas de participações em ensaios interlaboratoriais ou realizadas no próprio laboratório.

Sendo a repetibilidade uma forma de avaliar a precisão, esta pode ser expressa na forma de desvio padrão de repetibilidade ( $s_r$ ) associado aos resultados considerados ou na forma de coeficiente de variação de repetibilidade (CV<sub>r</sub>) para uma determinada gama de concentração, sendo estes calculados de acordo com as **Equações 2 e 52**, respetivamente.

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 52})$$

Para além da determinação dos parâmetros referidos anteriormente, também é comum quantificar-se o limite de repetibilidade ( $r_r$ ) que se define como o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados ( $x_i$  e  $x_j$ ) obtidos em condições de repetibilidade, com uma determinada probabilidade, geralmente, 95 %<sup>18</sup>. O valor do  $r_r$  é calculado da seguinte forma (**Equação 53**):

$$r_r = 2,8 \times s_r \quad (\text{Equação 53})$$

Se  $|x_i - x_j| \leq r_r$ , os resultados obtidos podem ser aceites<sup>18</sup>. Caso tal não se verifique, deve repetir-se o ensaio em questão. O  $r_r$  também pode ser expresso na forma de limite de repetibilidade relativo ( $CV_{r_r}$ ) sendo este dado por (**Equação 54**)<sup>18</sup>:

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{s_r}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 54})$$

É de realçar que, na validação de um método analítico, principalmente em âmbito empresarial, a determinação deste parâmetro para cada uma das matrizes abrangidas pelo método individualmente não é economicamente nem temporalmente viável pelo que, geralmente se apresentam os valores de  $s_r$ ,  $CV_r$ ,  $r_r$  e  $CV_{r_r}$  para o método ao invés de ser apresentado para cada matriz separadamente.

Contudo, é de destacar que antes de se proceder à determinação de cada um destes parâmetros, numa fase inicial deve avaliar-se a possibilidade de se rejeitar algum valor dos replicados obtidos para a mesma matriz através da realização de um teste de Grubbs. De seguida, deve realizar-se um teste de Cochran para avaliar se alguma das matrizes consideradas pode ser rejeitada para o cálculo destes parâmetros.

#### 1.6.6.2 Precisão em condições de precisão intermédia

A precisão intermédia expressa a precisão dos resultados obtidos numa série de ensaios ( $n$ ), geralmente nunca inferior a seis, realizadas nas mesmas condições e num longo período de tempo<sup>32</sup>. Este parâmetro é avaliado tendo em consideração o número de amostras estudadas ( $t$ ), e o número de replicados efetuados por amostra ( $n$ ), sendo que podem ser consideradas amostras pertencentes a diferentes grupos de matrizes. Assim, neste caso, o desvio padrão de precisão intermédia ( $s_{PI}$ ) é dado por (**Equação 55**)<sup>42</sup>:

$$s_{PI} = \sqrt{\frac{1}{t \times (n - 1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{(Equação 55)}$$

onde  $y_{jk}$  corresponde a um resultado individual para cada amostra e  $\bar{y}_j$  equivale ao valor médio obtido para a amostra. Caso o número de replicados efetuados seja igual a dois, a expressão anterior pode ser simplificada em **(Equação 56)**<sup>42</sup>:

$$s_{PI} = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad \text{(Equação 56)}$$

onde  $y_{j1}$  corresponde ao primeiro resultado para o duplicado da amostra e  $y_{j2}$  é referente ao segundo resultado para o mesmo duplicado amostra.

Assim, dado que o estudo da precisão intermédia é aquele que melhor permite saber acerca da variabilidade dos resultados obtida no laboratório por mimetizar as condições de rotina, é preferencial realizá-lo utilizando os resultados de n replicados obtidos para t ensaios determinados no contexto intralaboratorial<sup>18</sup>. O critério utilizado para eliminar duplicados do cálculo da precisão intermédia baseia-se no cálculo do CV<sub>r</sub>. Quer isto dizer que se a diferença entre dois resultados obtidos para a mesma amostra em condições de repetibilidade for superior ao produto entre o CV<sub>r</sub> e o valor médio do duplicado, este deve ser eliminado.

Para além do  $s_{PI}$  também é possível determinar o limite de precisão intermédia relativo (CV<sub>rPI</sub>) e o coeficiente de variação de precisão intermédia (CV<sub>PI</sub>), dados pelas **Equações 57** e **58**, respetivamente<sup>18</sup>.

$$CV_{rPI} = 2,8 \times \frac{s_{PI}}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 57)}$$

$$CV_{PI} = \frac{s_{PI}}{\bar{x}} \times 100 (\%) \quad \text{(Equação 58)}$$

Em alternativa, de modo a otimizar o tempo dispensado na validação de métodos analíticos, pode realizar-se a determinação simultânea da repetibilidade e da precisão intermédia, para uma mesma amostra recorrendo a uma ANOVA de fator único<sup>19</sup>. Neste caso em particular, efetuam-se, pelo menos, seis ensaios (grupos) em dias diferentes, isto é, em condições de precisão intermédia<sup>19</sup>. Em cada um destes ensaios efetua-se no mesmo dia, a análise de replicados de uma mesma amostra, isto é, em



condições de repetibilidade<sup>19</sup>. De realçar que a única variável entre ensaios é o dia da análise, sendo que as outras condições, nomeadamente operador, equipamento e reagentes se mantêm inalteráveis.

Assim, através da comparação dos resultados dentro do grupo, isto é a comparação dos replicados obtidos para um mesmo ensaio, é possível avaliar a repetibilidade do método, enquanto a comparação entre grupos, isto é, os valores obtidos entre os diferentes ensaios, permite avaliar a precisão intermédia do método.

Desta forma, aplicando as equações explícitas no capítulo supracitado, podem determinar-se os valores do  $s_r$  e do  $s_{PI}$ , recorrendo às **Equações 59 e 60**, respetivamente<sup>19</sup>.

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad \text{(Equação 59)}$$

$$s_{PI} = \sqrt{s_r^2 + s_w^2} \quad \text{(Equação 60)}$$

em que  $s_w$  corresponde ao desvio padrão entre grupos e, é dado por (**Equação 61**):

$$s_w = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad \text{(Equação 61)}$$

### 1.6.7 Justeza/veracidade

A componente dos erros sistemáticos numa medição pode ser avaliada através do estudo da justeza ou veracidade do método analítico. Entende-se por justeza o grau de concordância que existe entre a média de um número infinito de valores de replicados obtidos para uma mesma amostra e, um  $x_{ref}$ <sup>19</sup>. Contudo, de acordo com esta definição, este parâmetro não pode ser quantificado e, por este motivo, a justeza é quantitativamente expressa na forma de *bias* que permite fazer uma estimativa dos erros sistemáticos da medição que, tanto podem ser inerentes ao método, como provenientes do laboratório<sup>19</sup>.

Na prática o *bias* absoluto é calculado como a diferença entre o  $\bar{x}$  obtido para um elevado número de medições repetidas e o  $x_{ref}$ , isto é (**Equação 62**)<sup>19</sup>:

$$bias = \bar{x} - x_{ref} \quad \text{(Equação 62)}$$

O *bias* também pode ser calculado na forma de *bias* relativo a partir da **Equação 63**:

$$\text{bias relativo} = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 63})$$

Para avaliar o *bias* podem ser adotadas três metodologias distintas. A primeira consiste na utilização de MRs, na qual se analisam no mínimo dez réplicas independentes (n) de um ou mais destes materiais e, determina-se o  $\bar{x}$  dos resultados obtidos. Recorrendo às **Equações 62** ou **63** é possível avaliar o afastamento entre o  $\bar{x}$  obtido pelo laboratório para esse material e o  $x_{\text{ref}}$  dos mesmos<sup>19</sup>. Cada laboratório define o seu grau de exigência em termos de justeza, contudo, geralmente um *bias* relativo inferior a 10 % é aceitável.

Caso o valor de aceitação do *bias* seja desconhecido, pode realizar-se um teste t para comparação entre um  $\bar{x}$  e um  $x_{\text{ref}}$  recorrendo à **Equação 7**. Se as diferenças entre o  $\bar{x}$  e o  $x_{\text{ref}}$  não forem significativas para n-1 G.L e 95 % de confiança, pode admitir-se que o método é justo, isto é, não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos<sup>18</sup>.

Caso não estejam disponíveis MRs, outra metodologia que pode ser adotada consiste na participação em ensaios interlaboratoriais colaborativos ou de aptidão, sendo que este último é aquele em que os laboratórios participam com maior frequência, pois, para além de permitir determinar a justeza do método através do *bias* relativo, permite avaliar o desempenho do laboratório através do *z-score*, obtido de acordo com a **Equação 14**<sup>18</sup>. Através desta participação, vão ser comparados o  $\bar{x}$  obtido pelo laboratório na participação no ensaio e o  $x_{\text{ref}}$  através das **Equações 62** ou **63**.

Para além disso, de modo a avaliar a justeza do método analítico podem realizar-se ensaios de recuperação. Se a R obtida estiver contida no intervalo de R admitida para a concentração de analito em causa, pode assumir-se que o método é justo<sup>19</sup>.

Por último, a justeza do método também pode ser avaliada através do cálculo da recuperação aparente ( $R_a$ ). Para tal, considera-se a razão entre o  $\bar{x}$  obtido pelo laboratório na análise da amostra e, o  $x_{\text{ref}}$ , isto é (**Equação 64**):

$$R_a = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 64})$$

Idealmente, a  $R_a$  corresponde a 100 %, contudo, é da responsabilidade do laboratório definir o intervalo de  $R_a$  admitido.

### 1.6.8 Incerteza de medição

Todos os parâmetros de desempenho até agora referidos apresentam a sua importância para a validação e verificação de um método analítico, contudo, sempre que um resultado é obtido recorrendo a esse método, de acordo com a NP EN ISO 17025:2018, este deve ser acompanhado pela incerteza associada e, por este motivo, este parâmetro é aquele que apresenta maior peso na validação e verificação de um método de ensaio<sup>43</sup>. A incerteza é definida como o intervalo de valores, não negativos, no qual o valor tido como verdadeiro deve estar contido, com um determinado grau de confiança, isto é, a gama de valores que podem ser atribuídos ao objeto em estudo<sup>44</sup>. É de realçar que este parâmetro é diferente do *bias*, uma vez que este consiste na diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro<sup>19,44</sup>.

Existem duas metodologias principais para estimar a incerteza, denominadas abordagem “passo-a-passo” e abordagem baseada nos dados de validação<sup>45</sup>. Em ambos os casos, o objetivo principal passa pela determinação das incertezas combinada ( $u_c(y)$ ) e expandida ( $U$ ), contudo, o procedimento para atingir este objetivo é diferente, e, como tal, deve ter-se espírito crítico para avaliar quando uma ou outra metodologias deve ser empregue. A  $u_c(y)$  consiste numa incerteza padrão que pode ser estimada considerando todas as fontes de incerteza que contribuem para o resultado final, sendo calculada de acordo com a lei da propagação das incertezas<sup>44,46</sup>. Contudo, esta incerteza sozinha não consegue fornecer a confiança necessária no resultado, pelo que, geralmente, a incerteza deve ser apresentada na forma de  $U$ , que é obtida multiplicando a  $u_c(y)$  por um fator superior a um, denominado fator de expansão ( $k$ ) e que toma o valor de dois quando se assume que os resultados seguem uma distribuição normal (Equação 65)<sup>44</sup>.

$$U = u_c(y) \times k \quad \text{(Equação 65)}$$

A  $U$  calculada com o  $k = 2$  confere 95 % de confiança ao resultado obtido e, deve ser expressa nas mesmas unidades que este<sup>44</sup>.

Assim, como referido anteriormente, a  $U$  pode ser calculada de duas maneiras diferentes que serão abordadas de seguida.

#### 1.6.8.1 Abordagem “passo-a-passo”

A metodologia “passo-a-passo” é usualmente empregue quando se pretende determinar incertezas associadas a soluções preparadas no laboratório que, são utilizadas aquando a realização de um método analítico. De um modo geral, esta metodologia pode ser dividida em quatro etapas, como ilustrado na

**Figura 6**<sup>44</sup>. A etapa inicial tem como objetivo especificar a mensuranda que se pretende determinar de forma clara e objetiva, bem como as variáveis de que essa mensuranda depende, através de uma expressão matemática<sup>44,45</sup>.

Por exemplo, no caso da preparação de uma solução de calibração mãe ( $C_m$ ), a mensuranda que se pretende determinar pode ser a concentração de um determinado analito ( $M$ ) nessa solução ( $[M]_{C_m}$ ) e, como tal, deve representar-se a expressão que permite obtê-la. De realçar que neste caso, deve ter-se em consideração o modo como a solução é preparada pois, o reagente em *stock* pode encontrar-se tanto no estado líquido, como no estado sólido. Assim, para o presente estudo, admitindo a primeira situação, a mensuranda pode ser expressa na forma de **(Equação 66)**:

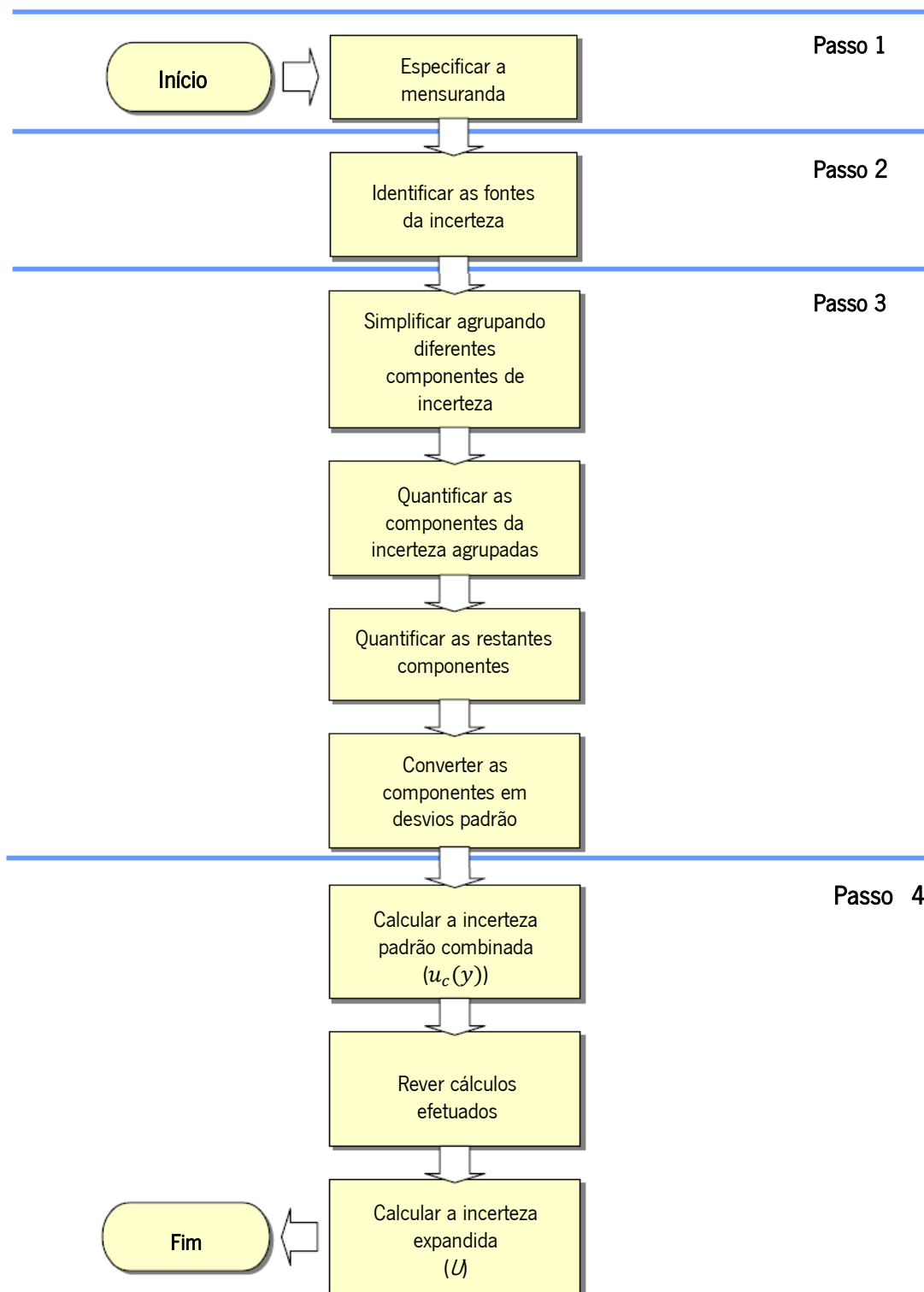
$$[M]_{C_m} = \frac{C_s \times V_s}{V_{C_m}} \quad \text{(Equação 66)}$$

onde  $C_s$  corresponde à concentração de analito na solução *stock* utilizada para preparar a  $C_m$ ,  $V_s$  equivale ao volume retirado da solução *stock* para preparar a  $C_m$  e,  $V_{C_m}$  é referente ao volume final da  $C_m$ . Caso se observe a segunda situação, para o presente estudo, tem-se que a mensuranda pode ser expressa na forma de **(Equação 67)**:

$$[M]_{C_m} = \frac{m_{C_m} \times P_{C_m}}{V_{C_m}} \quad \text{(Equação 67)}$$

onde  $m_{C_m}$  corresponde à massa da toma do reagente utilizado na preparação da  $C_m$  e  $P_{C_m}$  é relativa à pureza do mesmo reagente.

Através de cada uma destas expressões, é possível identificar as variáveis de que a mensuranda depende, o que leva ao segundo passo da metodologia. Quer isto dizer que se considera cada uma das variáveis da expressão matemática como uma fonte de incerteza para o resultado final. Todavia, é de realçar que estas variáveis, denominadas variáveis principais, podem estar a ser influenciadas por outros fatores, denominados variáveis secundárias e, de modo a facilitar a avaliação de todos os fatores que contribuem para a incerteza da medição, deve elaborar-se um diagrama em espinha de peixe<sup>44</sup>.

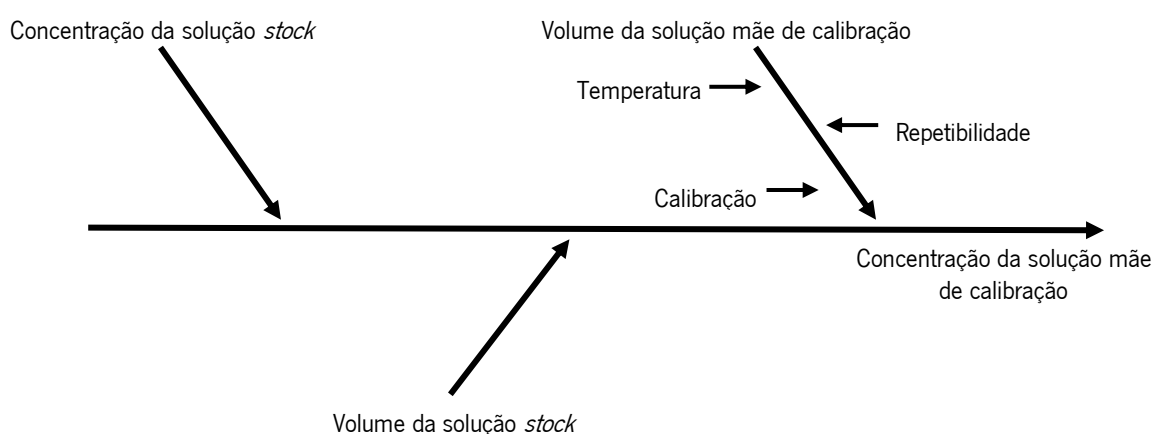


**Figura 6: Metodologia "passo-a-passo".** Estimativa da incerteza expandida ( $U$ ) recorrendo à metodologia "passo-a-passo". Adaptada de Guia Eurachem<sup>44</sup>.

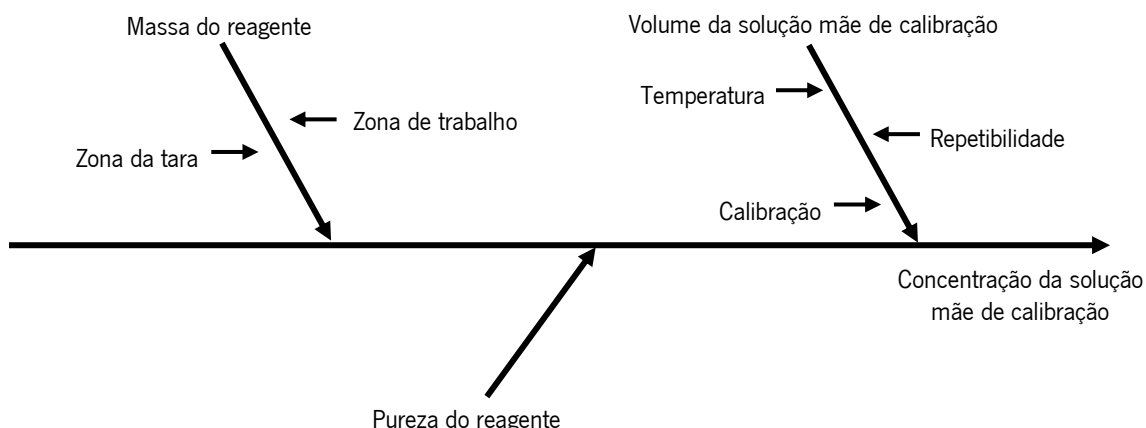
Retomando o exemplo anterior, no presente estudo, devem considerar-se na primeira situação, como variáveis principais a  $C_s$ , o  $V_s$  e o  $V_{cm}$ , e, de seguida devem avaliar-se as variáveis secundárias que influenciam cada uma delas e que contribuem para a sua incerteza. A  $C_s$ , geralmente, vem acompanhada

pela incerteza padrão ( $u_{CS}$ ) determinada pelo fabricante no certificado do reagente, pelo que este já considerou todas as outras fontes de incerteza associadas. A incerteza padrão associada ao  $V_s$  ( $u_{VS}$ ), está dependente da incerteza do material volumétrico ou da micropipeta utilizada para transferir o volume da solução *stock*. Neste caso, como se tratou sempre de uma micropipeta, a sua incerteza padrão é, geralmente, referida pelo fabricante no certificado da micropipeta. Por fim, para o cálculo da incerteza associada ao  $V_{cm}$  ( $u_{V_{cm}}$ ), como se trata de um material volumétrico, devem considerar-se três variáveis secundárias e combinar as mesmas. A primeira é a incerteza padrão associada à calibração do próprio material volumétrico que foi utilizado para preparar a solução de calibração ( $u_{MV}$ ). A segunda é a incerteza associada ao acerto do menisco desse material em condições de repetibilidade ( $u_r$ ) e por último, a incerteza associada à diferença de temperatura desse material relativamente à temperatura a que este foi calibrado ( $u_T$ )<sup>45</sup>.

Na segunda situação as variáveis principais que contribuem para a incerteza do resultado são a  $m_{cm}$ , a  $P_{cm}$  e o  $V_{cm}$ . A incerteza associada ao  $V_{cm}$  foi anteriormente descrita e determina-se de igual modo. A incerteza associada à  $m_{cm}$  ( $u_m$ ) tem em consideração a incerteza padrão do certificado de calibração da balança na zona da tara ( $u_{tara}$ ) e na zona de trabalho ( $u_{zt}$ ), sendo que, cada uma delas, por sua vez, depende do erro máximo admissível da balança (e.m.a)<sup>47</sup>. Por último, a incerteza associada à  $P_{cm}$  ( $u_p$ ) está relacionada com o intervalo de confiança ( $\alpha$ ) com que este parâmetro é apresentado<sup>47</sup>. Nas **Figuras 7 e 8** encontram-se representados os diagramas em espinha de peixe para a primeira e segunda situações, respetivamente.



**Figura 7: Diagrama em espinha de peixe considerando um reagente no estado líquido.** Representação de um diagrama em espinha de peixe admitindo que a solução mãe de calibração foi preparada a partir da diluição de uma solução *stock* pipetada com uma micropipeta para um material volumétrico.



**Figura 8: Diagrama em espinha de peixe considerando um reagente no estado sólido.** Representação de um diagrama em espinha de peixe admitindo que a solução mãe de calibração foi preparada a partir da dissolução de um reagente no estado sólido com um determinado grau de pureza associado, num material volumétrico.

Deste modo, identificadas as fontes de incerteza da mensuranda, resta determinar a contribuição de cada uma delas, que consiste no terceiro passo da metodologia “passo-a-passo”.

Numa primeira fase, devem agrupar-se as incertezas de cada variável primária, combinando as diferentes variáveis secundárias. É de realçar que as incertezas calculadas devem ser incertezas padrão, e para tal deve admitir-se uma distribuição retangular se todos os valores da grandeza apresentarem igual probabilidade de ocorrerem, ou uma distribuição triangular se não há razão para esperar obter os extremos da grandeza<sup>46</sup>.

Voltando à primeira situação do exemplo a  $u_{CS}$  é dada pelo fornecedor pelo que este valor pode ser utilizado diretamente na etapa seguinte. Como se utiliza uma micropipeta, a  $u_{VS}$  é apresentada no certificado de calibração na forma de incerteza padrão razão pela qual este valor também pode ser utilizado posteriormente. Por último, para calcular a  $u_{Vcm}$  é necessário combinar a  $u_{MV}$ , a  $u_r$  e  $u_T$  recorrendo à lei da propagação das incertezas. Assim,  $u_{MV}$  na forma de incerteza padrão, admitindo uma distribuição triangular, é dada por (Equação 68)<sup>47</sup>:

$$u_{MV} = \frac{T}{\sqrt{6}} \quad \text{(Equação 68)}$$

em que T (de tolerância) corresponde à incerteza associada à calibração do volume do material volumétrico, mas não se trata de uma incerteza padrão<sup>45</sup>. A  $u_r$  na forma de incerteza padrão pode ser calculada através da determinação do s, recorrendo à Equação 2, de uma série de dez ensaios de enchimento desse material em condições de repetibilidade. Por fim, a  $u_T$  na forma de incerteza padrão é determinada calculando, em primeiro lugar a variação do volume do material volumétrico ( $\Delta V$ ), tendo

em consideração que, normalmente, a temperatura de um laboratório oscila aproximadamente 4 °C. Assim, tem-se que **(Equação 69)**<sup>45</sup>:

$$\Delta V = \pm(4 \times V_{cm} \times 2,1 \times 10^{-4}) \quad \text{(Equação 69)}$$

onde  $2,1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$  corresponde ao coeficiente de expansão da água. A  $u_T$  na forma de incerteza padrão é obtida recorrendo à **Equação 70**, admitindo uma distribuição retangular<sup>45</sup>:

$$u_T = \frac{\Delta V}{\sqrt{3}} \quad \text{(Equação 70)}$$

Combinando estas três incertezas padrão, a  $u_{V_{cm}}$  é dada por **(Equação 71)**<sup>45</sup>:

$$u_{V_{cm}} = \sqrt{(u_{M_V})^2 + (u_r)^2 + (u_T)^2} \quad \text{(Equação 71)}$$

Calculadas as fontes de incerteza primárias, é necessário determinar a  $u_c(y)$ , passando à última etapa da metodologia passo-a-passo, obtida recorrendo à **Equação 72**<sup>45</sup>:

$$u_c(y) = [M]_{Cm} \times \sqrt{\left(\frac{u_{Cs}}{C_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{Vs}}{V_s}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{cm}}}{V_{Cm}}\right)^2} \quad \text{(Equação 72)}$$

Na segunda situação do exemplo referido anteriormente, a  $u_{V_{cm}}$  foi anteriormente descrita e determina-se de igual modo. Para determinar a  $u_m$  de modo a que esta seja uma incerteza padrão devem combinar-se as  $u_{tara}$  e  $u_{zt}$  recorrendo à lei da propagação das incertezas, de acordo com a **Equação 73**<sup>47</sup>:

$$u_m = \sqrt{(u_{tara})^2 + (u_{zt})^2} \quad \text{(Equação 73)}$$

onde, admitindo uma distribuição retangular, tem-se que **(Equações 74 e 75)**<sup>47</sup>:

$$u_{tara} = \left(\frac{\text{e. m. a}}{\sqrt{3}}\right)_{tara} \quad \text{(Equação 74)}$$



$$u_{zt} = \left( \frac{\text{e. m. a}}{\sqrt{3}} \right)_{zt} \quad (\text{Equação 75})$$

Por último, a  $u_p$  pode ser determinada de acordo com a **Equação 76**, admitindo uma distribuição retangular<sup>47</sup>:

$$u_p = \frac{\alpha}{\sqrt{3}} \quad (\text{Equação 76})$$

Neste caso, seguindo o raciocínio da **Equação 72**, a  $u_c(y)$  é dada por (**Equação 77**):

$$u_c(y) = [M]_{Cm} \times \sqrt{\left( \frac{u_m}{m_{Cm}} \right)^2 + \left( \frac{u_p}{P_{Cm}} \right)^2 + \left( \frac{u_{Vcm}}{V_{Cm}} \right)^2} \quad (\text{Equação 77})$$

Por último, em ambos os casos, a  $U$  é calculada de acordo com a **Equação 65** considerando  $k$  igual a dois<sup>47</sup>.

#### 1.6.8.2 Abordagem baseada em dados de validação

Por vezes, quando um método envolve muitos passos experimentais o cálculo das incertezas pela abordagem passo-a-passo torna-se inviável pelo que a alternativa passa pela abordagem empírica, que permite calcular a incerteza do método, considerando dados de validação. Quer isto dizer que, qualquer resultado obtido por esse método analítico apresenta esta incerteza associada.

Para o seu cálculo deve ter-se em consideração dois dos parâmetros de desempenho avaliados aquando a validação do método analítico, nomeadamente a precisão e a justeza<sup>45</sup>. Por este motivo, nesta abordagem a determinação da  $u_c(y)$  passa por agrupar a incerteza associada à precisão do método, de forma relativa ( $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$ ), como irá ser demonstrado de seguida, com a incerteza associada à justeza do método, de forma relativa ( $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ ), recorrendo à lei da propagação das incertezas como ilustrado na **Equação 78**<sup>45</sup>:

$$u_c(y) = \sqrt{\left( u_{(\text{precisão})\text{relativa}} \right)^2 + \left( u_{(\text{justeza})\text{relativa}} \right)^2} \quad (\text{Equação 78})$$

Assim, o primeiro passo desta abordagem passa pela determinação das componentes da  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  e da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  separadamente. Contudo é de realçar que estas incertezas devem estar na forma de incertezas relativas de modo a poderem ser combinadas.

Para o cálculo da  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  deve, numa primeira instância determinar-se a incerteza associada à precisão intermédia na forma absoluta ( $u_{\text{precisão}}$ ). Este valor equivale ao  $S_{PI}$  como descrito na **Equação 56**. Assim, considera-se a **Equação 79**<sup>45</sup>:

$$u_{\text{precisão}} = S_{PI} \quad (\text{Equação 79})$$

De seguida, deve considerar-se a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  que, é equivalente ao  $CV_{PI}$ , calculado de acordo com a **Equação 58**, isto é (**Equação 80**)<sup>45</sup>:

$$u_{(\text{precisão})\text{relativa}} = CV_{PI} \quad (\text{Equação 80})$$

A determinação da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  é mais complexa uma vez que, como mencionado anteriormente podem ser adotadas três metodologias para calcular a justeza do método.

A primeira metodologia consiste na análise de resultados de replicados de um ou mais MRs, sendo que o modo como se determina a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  vai depender do número de MRs considerados. No presente estudo, apenas será considerada a análise de um único MR.

Deste modo, inicialmente, deve considerar-se o *bias* relativo calculado na análise desse MR, de acordo com **Equação 63**. Para além disso, deve ainda considerar-se a incerteza padrão associada à concentração do MR ( $u_{C_{\text{ref}}}$ ). Geralmente, no certificado do MR emitido pelo fabricante vem indicado o valor limite de controlo superior (UCL), isto é, o valor máximo admitido de concentração de analito naquele material e, o valor limite de controlo inferior (LCL), que corresponde ao valor mínimo de concentração de analito admitida para esse material. A  $u_{C_{\text{ref}}}$  pode ser determinada através da **Equação 81**:

$$u_{C_{\text{ref}}} = \frac{UCL - LCL}{2k} \quad (\text{Equação 81})$$

Todavia, uma vez mais, esta incerteza deve ser apresentada na forma de incerteza relativa ( $u_{(Cref)relativa}$ ) para poder ser combinada com as restantes incertezas, sendo esta dada por (Equação 82):

$$u_{(Cref)relativa} = \frac{u_{Cref}}{C_{MR}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 82})$$

onde  $C_{MR}$  corresponde à concentração de analito no MR indicada pelo fabricante no certificado desse material.

Por último, para o cálculo da  $u_{(justeza)relativa}$  deve ainda considerar-se o desvio padrão obtido na análise do MR ( $s_{bias}$ ) pelo laboratório dado pela Equação 2. De igual modo, esta incerteza deve ser apresentada na forma de incerteza relativa ( $s_{(bias)relativo}$ ) dado por (Equação 83):

$$s_{(bias)relativo} = \frac{s_{bias}}{\bar{x}_{lab}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 83})$$

onde  $\bar{x}_{lab}$  corresponde ao valor médio de concentração de analito no MR determinado pelo laboratório.

Assim, combinando as três incertezas relativas referidas anteriormente, tem-se que (Equação 84)<sup>45</sup>:

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{(bias\ relativo)^2 + \left(\frac{s_{(bias)relativo}}{\sqrt{n}}\right)^2 + (u_{(Cref)relativa})^2} \quad (\text{Equação 84})$$

onde  $n$  corresponde ao número de leituras efetuadas para o MR.

Por fim, calcula-se a  $u_c(y)$  através da Equação 78, seguida do cálculo da  $U$ , de acordo com a Equação 65, de modo a estabelecer a incerteza do método.

Em alternativa, a  $u_{(justeza)relativa}$  pode ser calculada a partir dos resultados obtidos na participação em ensaios interlaboratoriais. Assim, este fator pode ser calculado através da Equação 85<sup>45</sup>:

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{(RMS_{(bias)relativa})^2 + (u_{(Cref)relativa})^2} \quad (\text{Equação 85})$$

onde  $RMS_{(bias)relativa}$  corresponde à raiz quadrada média referente a todos os valores de  $bias$  obtidos na forma relativa para as amostras analisadas no ensaio interlaboratorial.

Para determinar a  $RMS_{(bias)relativa}$  deve avaliar-se, inicialmente, o *bias* relativo para cada ensaio interlaboratorial de acordo com a **Equação 63**. De seguida, a  $RMS_{(bias)relativa}$  pode ser calculada recorrendo à **Equação 86**:

$$RMS_{(bias)relativa} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias \text{ relativo})^2}{n_{EI}}} \quad (\text{Equação 86})$$

em que  $n_{EI}$  corresponde ao número de ensaios interlaboratoriais considerados. Para o cálculo da  $u_{(Cref)relativa}$  deve considerar-se o desvio padrão robusto obtido pelo laboratório para cada amostra analisada no ensaio interlaboratorial ( $s_{ro}$ ), sendo que este valor é reportado pela entidade organizadora do ensaio. No entanto, é necessário convertê-lo numa incerteza relativa ( $s_{(ro)relativo}$ ) para cada amostra dada por (**Equação 87**):

$$s_{(ro)relativo} = \frac{s_{ro}}{\bar{x}_{lab}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 87})$$

onde  $\bar{x}_{lab}$  corresponde ao valor médio da concentração de analito em cada amostra determinado pelo laboratório. De seguida, determina-se o valor médio de todos os  $s_{(ro)relativo}$  ( $\bar{s}_{(ro)relativo}$ ) dado por (**Equação 88**):

$$\bar{s}_{(ro)relativo} = \frac{\sum_{i=1}^n s_{(ro)relativo}}{n_{EI}} \quad (\text{Equação 88})$$

Assim, a  $u_{(Cref)relativa}$  pode ser calculada de acordo com a **Equação 89**:

$$u_{(Cref)relativa} = \frac{\bar{s}_{(ro)relativo}}{\sqrt{\bar{P}}} \times 1,253 (\%) \quad (\text{Equação 89})$$

onde  $\bar{P}$  corresponde ao valor médio das populações reportadas pelo ensaio interlaboratorial ( $P_i$ ), isto é, o número de resultados válidos submetidos no ensaio interlaboratorial, dado por (**Equação 90**):

$$\bar{P} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{n_{EI}} \quad (\text{Equação 90})$$

Por fim, calcula-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, seguida do cálculo da  $U$ , de acordo com a **Equação 65**, com o intuito de determinar a incerteza do método.

Para finalizar, a componente da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  também pode ser calculada considerando os resultados obtidos em ensaios de recuperação. Como no presente estudo apenas será considerado um único ensaio de recuperação, esta componente é dada por **Equação 91**<sup>45</sup>:

$$u_{(\text{justeza})\text{relativa}} = \sqrt{(\text{bias relativo})^2 + (u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}})^2} \quad (\text{Equação 91})$$

onde  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$  é referente à componente da incerteza de recuperação combinada na forma relativa.

Como referido, o cálculo do *bias* relativo do ensaio de recuperação foi anteriormente descrito na **Equação 63**.

Para determinar a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$  deve, numa fase inicial determinar-se a incerteza associada à concentração de analito adicionada na fortificação ( $u_{\text{add}}$ ). A fortificação da amostra pode ser realizada através de uma solução padrão preparada no laboratório de ensaio, sendo que neste caso a  $u_{\text{add}}$  deve ser calculada de acordo com a metodologia passo-a-passo. Em alternativa, a fortificação da amostra pode ser efetuada recorrendo a uma solução *stock* de analito presente no laboratório. Neste caso, a  $u_{\text{add}}$  deve ser calculada de acordo com o indicado pelo fabricante no certificado da solução. Uma vez mais, esta incerteza deve ser convertida na forma relativa ( $u_{(\text{add})\text{relativa}}$ ), isto é (**Equação 92**):

$$u_{(\text{add})\text{relativa}} = \frac{u_{\text{add}}}{x_{\text{add}}} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 92})$$

Para além disso, quando se determina a componente da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  considerando os resultados obtidos nos ensaios de recuperação, deve ainda ter-se em conta a incerteza na forma relativa associada ao volume de solução de fortificação adicionado ( $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$ ). Para calcular este valor considera-se o volume adicionado com uma micropipeta e, a incerteza associada a esse volume, indicada pelo fabricante da micropipeta, ou seja (**Equação 93**):

$$u_{(\text{Vol})\text{relativa}} = \frac{u_{V_s}}{V_s} \times 100 (\%) \quad (\text{Equação 93})$$

Por último, devem combinar-se a  $u_{(add)relativa}$  e a  $u_{(Vol)relativa}$  para determinar a  $u_{(recuperação,c)relativa}$ , isto é (**Equação 94**):

$$u_{(recuperação,c)relativa} = \sqrt{(u_{(add)relativa})^2 + (u_{(Vol)relativa})^2} \quad (\text{Equação 94})$$

Por fim, calcula-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, seguida do cálculo da  $U$ , de acordo com a **Equação 65**, para determinar a incerteza do método.

Por vezes, o laboratório de análise pode avaliar a justeza utilizando mais do que uma metodologia e, quando tal acontece, deve calcular-se a  $u_{(justeza)relativa}$  em todas elas e, no cálculo da incerteza do método, deve considerar-se a que tiver maior valor numérico.

Assim, apresentados todos os parâmetros de desempenho que devem ser avaliados aquando a validação e verificação de um método analítico, bem como as ferramentas que podem ser utilizadas para esse efeito, no presente estudo apesar de serem apresentados os resultados da validação de dois métodos analíticos, o objetivo em cada um deles foi diferente.

O primeiro objetivo passou pela validação estatística de um método normalizado para a quantificação do teor de teobromina em amostras à base de cacau. Tratou-se de uma validação pois pretendeu-se que este método fosse aplicado noutras matrizes que não há base de cacau, como uma ração para animais. Contudo é de destacar que se trata de uma validação estatística pois todos os procedimentos necessários para a validação do método já haviam sido realizados e, por este motivo, apenas se pretendeu interpretar os resultados obtidos nesses procedimentos de modo a determinar os parâmetros de desempenho do método.

O segundo objetivo do presente estudo passou por estender a acreditação de um método que permite determinar o teor de mercúrio em amostras alimentares recorrendo ao DMA para uma nova matriz. Quer isto dizer que, o método em questão já se encontrava validado para determinadas matrizes e, pretendeu-se que a matriz arroz integral pudesse fazer parte das matrizes acreditadas pelo método. Assim, neste caso, foi necessário realizar todos os procedimentos laboratoriais requeridos para concluir o objetivo.

## 1.7 Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência

Ao longo dos últimos anos, a alimentação das populações tem sofrido diversas alterações, devido à existência de novos produtos no mercado. Contudo, principalmente nos países desenvolvidos, verificou-se que os novos hábitos alimentares passam pelo consumo excessivo de alimentos processados ricos em açúcares, sal, gorduras e de origem animal em prol de alimentos mais saudáveis como fruta, legumes e peixes<sup>48</sup>. Como consequência, verificou-se o aumento de indivíduos que padeciam de doenças cardiovasculares (DCV), originando 17,9 milhões de óbitos, tornando-se a principal causa de morte em todo o mundo em 2016, segundo a Organização Mundial de Saúde<sup>49</sup>.

O aumento do consumo destes alimentos deveu-se à sensação de prazer e bem-estar que estes sabores ofereciam em comparação com aqueles mais saudáveis. Contudo, face às alternativas existentes no mercado, já há quem pense e procure por produtos que ofereçam igual prazer mas que possam ser benéficos para a saúde, diminuindo a probabilidade de desenvolver DCV<sup>50</sup>. Nos últimos anos tem-se explorado o papel benéfico do cacau no combate destas doenças. Este produto natural pode ser extraído da planta *Theobroma cacao* e, para além de ser um produto de origem vegetal, é constituído por alcaloides, que se sabem ter um papel importante no combate às DCV<sup>50,51</sup>. Para além disso, este é o componente principal do chocolate que, oferece uma sensação de agrado à maioria da população<sup>52</sup>.

Os dois principais alcaloides presentes no cacau pertencem à família das xantinas, sendo estes a teobromina e a cafeína (**Figura 9**)<sup>52-54</sup>. A teobromina é o alcaloide responsável pelo sabor amargo encontrado em produtos que contêm cacau, sendo que o chocolate apresenta entre 0,5 a 2,7 % deste composto<sup>55</sup>. Por este motivo, espera-se que quanto maior for a quantidade de cacau num determinado género alimentício, nomeadamente, no chocolate, maior o teor em teobromina nesse alimento<sup>56</sup>.

Por outro lado, a cafeína é um composto que tem vindo a ser muito estudado, uma vez que é bastante consumida pela população mundial, tanto no café, como em refrigerantes<sup>53</sup>. Por este motivo, já é conhecido o papel da cafeína no organismo humano, nomeadamente, a sua ação no sistema nervoso central<sup>53</sup>. Ainda assim, esta metilxantina apresenta-se em quantidades vestigiais no cacau, sendo a teobromina o principal alcaloide<sup>53</sup>. Todavia, este composto ainda não se encontra bem estudado na literatura relativamente aos benefícios que apresenta para a saúde humana, sendo que apenas foi reportado que atua como um estimulante e vasodilatador e, por este motivo, contribui para o combate das DCV<sup>57</sup>.



**Figura 9: Alcaloides da família das xantinas.** Representação da estrutura química base da família das xantinas, nomeadamente a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina). Adaptada de Martínez-Pinilla *et al.*

Quanto à sua estrutura química, a teobromina apresenta o anel heterocíclico da xantina substituído com dois grupos metilo nas posições 3 e 7, originando uma dimetilxantina, com fórmula molecular  $C_7H_8N_4O_2$ <sup>58</sup>. Para além de ser encontrada em elementos biológicos, a teobromina pode ser adquirida comercialmente na forma de um pó branco, inodoro, pouco solúvel em álcoois e água à temperatura ambiente, mas cuja solubilidade aumenta com o aumento da temperatura do solvente<sup>59,60</sup>. De acordo com a literatura, a solubilidade da teobromina em água a temperatura ambiente corresponde a 0,5 g/L, enquanto em água a ferver equivale a, aproximadamente, 7 g/L<sup>61</sup>.

Apesar de serem já conhecidas as consequências do consumo excessivo de cafeína no organismo, nomeadamente, o aumento da ansiedade, ainda não foi bem explorado o efeito do consumo em excesso da teobromina para o organismo humano<sup>62</sup>. Ainda assim, um estudo mostrou que a ingestão de 700 mg diárias deste composto pode trazer efeitos nefastos para o organismo, nomeadamente, o aumento da ansiedade e a diminuição da pressão sanguínea<sup>62</sup>. Contudo, como ainda se tratam de estudos preliminares, atualmente, de acordo com a legislação portuguesa, ainda não existe nenhum valor máximo permitido para o consumo de teobromina na alimentação humana. Ainda assim, encontra-se descrito no Decreto-lei n.º 67/2010 que, para um teor de humidade de 12 %, o limite máximo de teobromina, em produtos destinados à alimentação animal, corresponde a 300 mg/Kg caso se tratem de alimentos completos<sup>62</sup>. Isto acontece, pois, apesar de os alimentos para consumo humano apresentarem um teor em teobromina que não se torna nocivo para os mesmos, sabe-se que os animais, nomeadamente os cães, metabolizam a teobromina mais lentamente e, como tal, esta pode atuar como um veneno para estes<sup>59,60</sup>.

Por este motivo, dado que a alimentação é a principal fonte de exposição de teobromina para o ser humano e para os animais, tornou-se essencial o desenvolvimento de métodos capazes de quantificar,



com um nível de confiança adequado, este composto em matrizes de origem biológica, na presença de outros de estrutura semelhante, nomeadamente a cafeína<sup>59,63</sup>.

O primeiro desafio passa por separar estes compostos da matriz onde se encontram inseridos, podendo recorrer-se a uma extração líquido-líquido, a uma extração em fase sólida ou a uma extração com recurso a micro-ondas, sendo que a escolha do método a usar depende da natureza da amostra bem como dos procedimentos internos dos laboratórios de análise<sup>63</sup>.

O segundo desafio passa por quantificar a teobromina após extração da matriz onde se encontra inserida. Um dos primeiros estudos para quantificar a teobromina em amostras à base de cacau, remonta a 1921, por Wadsworth, onde esta foi quantificada separadamente da cafeína, recorrendo a precipitações seletivas, seguida do cálculo do peso seco<sup>64</sup>. Contudo, este método apresentava várias limitações. Para além do risco biológico de alguns componentes e o facto de a extração ser lenta e difícil de realizar, a pureza da teobromina quantificada era dependente da quantidade de água que a matriz possuía antes da extração<sup>65</sup>. Por estes motivos, houve não só uma melhoria deste método ao longo dos anos, como também a formulação de novos métodos para a quantificação deste alcaloide, de forma mais eficiente, numa maior diversidade de matrizes. Relativamente às matrizes alimentares, sabe-se que a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é uma técnica utilizada para quantificar cafeína em bebidas e chocolates. Porém, mais recentemente foi utilizada para determinar o teor de teobromina na matriz casca da vagem do cacau<sup>66,67</sup>. Este estudo mostrou ser promissor, contudo como envolve um processo de purificação da amostra numa coluna cromatográfica torna-se temporalmente desvantajoso face a outros métodos já existentes. Como se trata de um método desenvolvido recentemente, ainda deve ser explorado em diferentes matrizes. Existem outras técnicas analíticas em desenvolvimento para quantificar a teobromina em amostras alimentares como a espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-Vis) e a espectroscopia de fluorescência<sup>68,69</sup>. Todavia, a banda de absorção da teobromina num espectro UV-Vis surge sobreposta às bandas de outros componentes de natureza semelhante como a cafeína, o que inviabiliza a sua quantificação diretamente<sup>68</sup>. Para ultrapassar esta adversidade, *Aktas* e *Pekan* aplicando métodos quimiométricos, como o método dos quadrados mínimos parciais e a rede neural artificial, desenvolveram uma estratégia com sucesso para quantificar as diversas xantinas na amostra, separadamente<sup>68</sup>. Um outro estudo teve como objetivo quantificar o teor destas xantinas recorrendo à espectroscopia de fluorescência, contudo verificou-se a mesma sobreposição das bandas de emissão de fluorescência<sup>69</sup>. Por este motivo, concluíram que utilizando esta técnica analítica não foi possível quantificar a teobromina e, até à data ainda não foi reportado o uso de métodos quimiométricos para solucionar este problema.

Por estes motivos, o método mais descrito na literatura e largamente empregue para quantificar a teobromina em amostras alimentares é a HPLC devido ao facto de ser mais sensível, específica e rápida<sup>59,70</sup>. Esta técnica permite a separação física dos componentes de uma determinada amostra numa coluna cromatográfica de acordo com a afinidade que estes apresentam para duas fases distintas, denominadas fase estacionária e fase móvel<sup>71</sup>. Contudo, diferentes autores utilizam diferentes condições cromatográficas para quantificar este analito, nomeadamente, as características da coluna cromatográfica, a composição e o fluxo da fase móvel, o volume de amostra injetado, o tipo de eluição utilizado, o tempo de análise, o comprimento de onda de absorção e o detetor. Uma revisão das diferentes condições cromatográficas utilizadas para quantificar teobromina em alimentos, bebidas, fluidos biológicos e plantas entre 1992 e 2011 foi realizado por *Sena* e colaboradores<sup>59</sup>. Neste estudo, os autores concluíram que a eluição isocrática era a mais empregue devido ao seu fácil uso<sup>59</sup>. Para além disso, a fase móvel mais comum era uma mistura de água/metanol/acetoneitrilo tratadas com ácido acético, fosfórico ou fórmico<sup>59</sup>. Por último, relativamente à análise em alimentos e bebidas, o detetor mais comum era o detetor UV-Vis<sup>59</sup>. Ainda assim, um método desenvolvido por *Chen* e colaboradores recorrendo à HPLC de troca iónica com detetor UV-Vis mostrou ser eficaz na quantificação de teobromina em bebidas e cacau, apesar de indicar outras alternativas para detetores, nomeadamente o detetor amperométrico<sup>72</sup>. Na realidade, estudos conduzidos por *Thomas* e colaboradores permitiram quantificar o teor de teobromina numa amostra de preparado para bolo de chocolate utilizando a HPLC de fase reversa com um detetor amperométrico<sup>61</sup>.

De facto, de acordo com a literatura, o teor de metilxantinas em amostras líquidas à base de água como o café, o chá e os refrigerantes pode ser determinado facilmente recorrendo à HPLC, pois a extração destes compostos revelou-se bastante simples dada a natureza da amostra<sup>73</sup>. Contudo, quando se pretende determinar o teor destes compostos em amostras sólidas à base de cacau, como o chocolate negro ou o cacau em pó e bebidas achocolatadas, como o chocolate quente, é necessário adotar um procedimento mais complexo, como descrito pela Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC)<sup>73</sup>. O método oficial AOAC 980.14 de 1998 indica o procedimento a ser adotado para se proceder à quantificação de metilxantinas em produtos à base de cacau que, utiliza como técnica analítica a HPLC de partição com eluição isocrática de fase reversa, com recurso a uma coluna C18, detetor UV-Vis e, uma mistura de água:metanol (70:30) enquanto fase móvel<sup>74</sup>.

Assim, o presente estudo teve como objetivo a implementação da norma AOAC 980.14 no laboratório de métodos instrumentais de análise. Contudo, pretendeu-se que este procedimento também pudesse ser empregue em produtos destinados à alimentação animal, e, por este motivo, foi necessário proceder-

se à validação interna dos parâmetros de desempenho do método, nomeadamente, o LDQ, a precisão, a justeza e a incerteza do método. Para além disso, ainda foi definida a gama de trabalho e avaliada a sensibilidade e a seletividade do método.

## 1.8 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio

### 1.8.1 Mercúrio

A alimentação dos seres vivos é a principal fonte de aquisição de determinados compostos essenciais à sua sobrevivência, nomeadamente, proteínas, açúcares e, elementos metálicos sendo, por este motivo, necessário um controlo nutricional de tudo que é ingerido. Quando consumidos em excesso, estes compostos podem apresentar efeitos nefastos no organismo, contribuindo para o desenvolvimento de determinadas doenças, potencialmente fatais. Os elementos metálicos, em particular, revelam-se de especial interesse uma vez que nem todos apresentam benefícios para o organismo. Metais como o sódio, o potássio, o ferro, o zinco e o cálcio, são considerados elementos essenciais, pois contribuem para a homeostasia do organismo por participarem em inúmeros eventos celulares, podendo ser adquiridos em quantidades vestigiais na alimentação<sup>75</sup>. Contudo, outros metais, nomeadamente, o chumbo, o cádmio e o mercúrio e semimetais como o arsénio, também podem ser ingeridos na alimentação, embora não sejam elementos essenciais. Pelo contrário, sabe-se que estes elementos, em quantidades vestigiais, apresentam elevada toxicidade para o organismo, nomeadamente, para os rins<sup>76</sup>.

Por este motivo, nos últimos anos, observou-se uma crescente preocupação relativamente ao modo como estes metais são introduzidos no meio ambiente e, como consequência, nas cadeias alimentares<sup>75</sup>. Estudos recentes mostraram que, para além da alimentação, os seres vivos também se encontram expostos a estes elementos por outras vias. De facto, apesar destes elementos existirem naturalmente na crosta terrestre, observou-se um aumento das suas concentrações no ambiente devido às ações antropogénicas ao nível da indústria e da agricultura<sup>75</sup>.

Em particular, o mercúrio (Hg) revelou-se um metal de especial importância dado que, ao longo dos anos, apesar de apresentar elevada toxicidade para as populações, foi introduzido no seu quotidiano através de, por exemplo, lâmpadas, instrumentos de medição ou amálgamas dentárias<sup>75,77</sup>.

O Hg pode ser encontrado na natureza em três formas químicas distintas e, em três estados de oxidação (0, 1+ e 2+), o que aumenta a exposição dos seres vivos a este elemento<sup>76</sup>. A primeira é a forma elementar ( $\text{Hg}^0$ ), a segunda é a forma inorgânica (ião mercurioso ( $\text{Hg}^+$ ) e ião mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ )) e, por último

a forma orgânica, sendo que o ião metilmercúrio ( $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ ), é o mais tóxico e abundante na natureza e resulta da metilação do ião  $\text{Hg}^{2+}$  por parte de microrganismos presentes no solo e na água<sup>59,78,79</sup>.

Estas três formas químicas de mercúrio podem ser facilmente absorvidas pelos seres vivos<sup>79</sup>. A forma  $\text{Hg}^0$  é absorvida através da inalação de vapores ou aerossóis<sup>79</sup>. A forma inorgânica e a forma orgânica são absorvidas via oral através da ingestão de sais de mercúrio e de seres vivos que acumulam no seu organismo este metal, respetivamente<sup>79</sup>. Como consequência, independentemente do modo de absorção do mercúrio, a toxicidade deste elemento origina, para além de danos nos rins e nos pulmões, outras lesões, nomeadamente, nos sistemas nervoso central e periférico, digestivo e imune, que podem, porventura, ser fatais<sup>80</sup>. Uma propriedade única deste elemento é o facto de se encontrar no estado líquido à temperatura ambiente devido ao seu baixo ponto de fusão e, como tal, pode formar amálgamas com outros metais<sup>77</sup>.

A presença destas três formas de Hg no meio ambiente é devida não só a fenómenos naturais, tais como a libertação de minerais das rochas ou da atividade vulcânica, como também pode ser proveniente das atividades humanas, contribuindo para a poluição do meio ambiente<sup>78</sup>. Ainda assim, as principais fontes de contaminação deste elemento para os seres humanos são as amálgamas dentárias, a água para consumo e, os alimentos, em particular os peixes e outros seres marinhos<sup>75,81</sup>. Para além disso, o Hg também surge como contaminante, juntamente com outros metais, em diversos produtos agrícolas como nos fertilizantes, o que contamina as plantas que podem vir a ser consumidas, como é o caso da planta do arroz<sup>80</sup>. Ao longo da história foram já reportados vários incidentes relacionados com intoxicação por mercúrio, sendo que o maior deles ocorreu no Japão quando, após anos de descargas industriais na baía de Minata, 2252 pessoas foram envenenadas por ingestão de mercúrio em espécies marinhas dessa baía, resultando em 1043 mortes<sup>82</sup>.

Para evitar situações como a descrita, é requerido um controlo dos níveis deste elemento em espécies marinhas, sendo que, de acordo com Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, o valor máximo de Hg admitido em produtos de pesca é de 0,5 mg/Kg de peso fresco, com exceção de alguns peixes como o peixe-espada, o atum ou o tamboril que é de 1,0 mg/Kg de peso fresco<sup>83</sup>.

Por estes motivos, foi necessário desenvolver técnicas analíticas capazes de quantificar valores vestigiais de mercúrio em amostras alimentares, de modo a que o resultado produzido possa ser transmitido com confiança. A espectroscopia de absorção atómica com vapor frio (CV-AAS) é a técnica analítica mais vulgarmente utilizada para quantificar o teor de mercúrio em produtos alimentares, nomeadamente em espécies marinhas, sendo que já foram descritos vários métodos recorrendo a esta

técnica<sup>84,85</sup>. Para além disso, também a espectroscopia atómica de fluorescência com vapor frio (CV-AFS) foi utilizada em estudos conduzidos por *Martínez* e colaboradores para quantificar o teor de mercúrio em algas marinhas, pois os autores defendem que se trata de uma técnica mais sensível, simples e menos dispendiosa<sup>86</sup>. A espectroscopia de emissão atómica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) também é uma técnica analítica que permite quantificar o teor de mercúrio em peixes, tendo sido utilizada por *Morgano* e colaboradores<sup>87,88</sup>. Contudo, estas três técnicas apresentam uma desvantagem em comum relacionada com o facto de necessitarem de uma preparação prévia da amostra que consiste num conjunto de procedimentos que levam à sua digestão<sup>77</sup>. São conhecidos diversos procedimentos para digerir a amostra sendo que, num estudo foram comparados quatro para o efeito, três dos quais em vasos de polipropileno fechados e, um deles em vasos de polipropileno abertos<sup>86</sup>. Os autores concluíram que a digestão por refluxo em vasos de polipropileno abertos com recurso a um sistema de aquecimento de grafite a temperatura controlada é o mais promissor<sup>86</sup>. Para além disso, a digestão da amostra geralmente requer o uso de soluções ácidas concentradas, como a solução de ácido nítrico ou de ácido sulfúrico e também, a solução de peróxido de hidrogénio<sup>89</sup>. Por este motivo, para além destas técnicas serem demoradas, existe a possibilidade de ocorrerem perdas da amostra através da volatilização ou, a digestão pode ser incompleta, o que leva a uma quantificação errónea do teor de mercúrio na amostra<sup>89</sup>.

Por este motivo, foi necessário desenvolver um método que pudesse colmatar estas desvantagens e, que simultaneamente, fosse sensível o suficiente para substituir as técnicas já existentes em condições de rotina num laboratório.

Assim, em 1986, foi reportado o primeiro equipamento capaz de quantificar exclusivamente o teor de Hg em diversos tipos de amostras alimentares que, tanto se podem encontrar no estado sólido como no estado líquido, denominado analisador de mercúrio vestigial (TMA)<sup>90</sup>. Contudo, este equipamento apresentava alguns problemas como uma decomposição incompleta da amostra e, por este motivo, ao longo dos anos outras empresas foram desenvolvendo equipamentos baseados no mesmo princípio mas que não apresentassem essa falha<sup>90</sup>. A segunda geração deste equipamento surgiu em 1992 com o analisador de mercúrio avançado (AMA) que apresentava um melhoramento mecânico, ótico e químico face ao primeiro<sup>90</sup>. Ainda assim, mais recentemente, a empresa *Milestone®* desenvolveu o chamado analisador direto de mercúrio (DMA) que se apresenta como a versão mais moderna do equipamento que, mantém por base a espectroscopia de absorção atómica (EAA).

## 1.8.2 Analisador direto de mercúrio

A EAA consiste numa técnica analítica que possibilita a quantificação de determinados elementos químicos, maioritariamente metais, quando estes se encontram no estado fundamental e sob a forma de vapor<sup>91</sup>. Por estes motivos, a EAA pode ser dividida em três etapas fundamentais. A primeira consiste na formação de um aerossol, ou seja, ocorre a conversão de toda a amostra numa nuvem gasosa<sup>91</sup>. A segunda tem como objetivo a atomização da amostra, através da qual todo o analito de interesse presente na nuvem gasosa passa ao estado fundamental<sup>91</sup>. A última etapa permite que haja absorção de radiação pelo elemento de interesse para que este possa ser quantificado pois, o sinal obtido pelo equipamento encontra-se relacionado com a concentração de analito na amostra<sup>92</sup>.

No DMA (**Figura 10**), todas estas etapas são consideradas, tal como num equipamento de absorção atômica convencional. Contudo, este equipamento apresenta como principais vantagens o facto de não ser necessário qualquer pré-tratamento da amostra, o que possibilita a análise de amostras que se encontrem tanto no estado sólido, como no estado líquido e, o facto de reduzir o tempo necessário para efetuar a mesma (cerca de 6 minutos)<sup>90</sup>. Ainda assim, é de realçar que o resultado obtido na análise é influenciado pela homogeneidade da amostra e, como tal, esta deve ser garantida através de uma eficiente preparação<sup>90</sup>.

Desta forma, o DMA permite quantificar o teor de Hg em diferentes amostras alimentares, cujo princípio geral da técnica consiste na decomposição térmica da amostra, amalgamação e quantificação por EAA<sup>93</sup>.

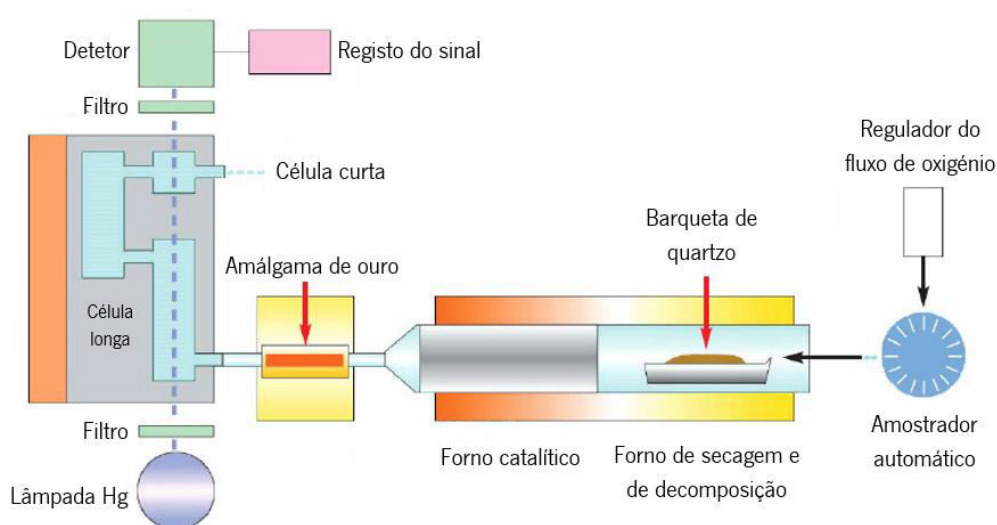


Figura 10: Analisador direto de mercúrio (DMA).

Por este motivo, este equipamento é constituído por quatro componentes principais, que incluem um amostrador automático, fornos de processos térmicos, espectrofotómetro de absorção atômica e um sistema de controlo<sup>93</sup>.

De forma resumida, como ilustrado na **Figura 11**, nesta técnica a amostra é pesada diretamente para uma barqueta de quartzo que é colocada no amostrador automático do equipamento. De seguida, esta é introduzida no forno de secagem e de decomposição, no qual ocorre o processo de secagem da

amostra e a formação de uma nuvem gasosa, completando-se a primeira fase da EAA. Posteriormente, os produtos da decomposição são transportados por um fluxo de oxigénio para o forno catalisador onde ocorre a redução de todas as formas de Hg a Hg<sup>0</sup> dando-se, por concluída, a atomização da amostra. Os restantes produtos da decomposição e o Hg<sup>0</sup> são transportados para a amálgama de ouro, na qual o Hg<sup>0</sup> fica retido seletivamente e, as impurezas remanescentes são eliminadas. Posteriormente, a amálgama de ouro é aquecida e o Hg<sup>0</sup> é libertado, seguindo em direção a um bloco composto por duas células posicionadas ao longo do percurso ótico do espectrofotómetro. A quantificação de Hg<sup>0</sup> é realizada a 253,65 nm com recurso a uma lâmpada de mercúrio<sup>93</sup>.



**Figura 11: Constituintes internos do analisador direto de mercúrio (DMA).** Representação esquemática do interior do DMA na qual se observa o caminho percorrido pela amostra desde que entra no equipamento (à direita) até atravessar o detetor (à esquerda). Adaptada do manual de operação do DMA<sup>93</sup>.

De realçar que o equipamento apresenta no seu percurso ótico duas células espectrofotométricas sendo que uma é designada por célula longa e outra por célula curta. Quando se efetua uma análise com este equipamento, dependendo da concentração de analito na amostra, a leitura é efetuada numa das células definida automaticamente pelo equipamento.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo estender a validação o método que permite quantificar o teor de Hg em amostras alimentares para uma nova matriz recorrendo ao DMA. Quer isto dizer que, o método em questão já se encontrava validado para ser aplicado em nove matrizes distintas, contudo, dado que o laboratório possui uma acreditação flexível, pretendeu-se, com este trabalho, validar a matriz arroz integral para que pudesse entrar nas matrizes acreditadas pelo método.

## 2. Parte experimental

### 2.1 Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência

#### 2.1.1 Resumo do processo

De modo a quantificar o teor de teobromina em amostras alimentares à base de cacau e em produtos destinados à alimentação animal recorrendo à técnica de HPCL, a amostra foi, inicialmente, desengordurada com éter de petróleo e, após evaporação do solvente, levada a um banho de água quente durante 30 minutos. Após filtração, a teobromina foi separada dos restantes componentes da amostra por HPLC numa coluna de fase reversa C18 sendo detetada ao comprimento de onda de 280 nm.

#### 2.1.2 Materiais

Para que todo o procedimento analítico fosse realizado com sucesso, foram utilizados determinados equipamentos controlados diariamente através da elaboração de cartas de controlo e, materiais devidamente calibrados, como indicado na **Tabela 2**.

**Tabela 2: Equipamentos e materiais para o método de quantificação de teobromina.** Equipamentos e materiais volumétricos e de laboratório necessários para a quantificação de teobromina em amostras alimentares.

| Equipamentos   |                 |                |
|--|-----------------|----------------|
| Centrífuga (Hettich, Rotina 380) ( $\pm 175$ rpm)  |                 |                |
| Balança de precisão (Mettler Toledo, XS603S) ( $\pm 1$ mg)                                   |                 |                |
| Cromatógrafo líquido de alta eficiência ( <i>Agilent Technologies 1200 Infinity Series</i> ) |                 |                |
| Banho de água (Julabo, SW22) ( $\pm 2,0$ °C)   |                 |                |
| Estufa (MMM Group) ( $\pm 0,1$ °C)   |                 |                |
| Material volumétrico   | Capacidade (mL) | Incerteza (mL) |
| Micropipetas (Eppendorf)   | 5,0000          | $\pm 0,0041$   |
|  | 10,0000         | $\pm 0,0064$   |
| Balões volumétricos (Normax)   | 25,00           | $\pm 0,04$     |
|  | 50,00           | $\pm 0,06$     |
|  | 100,0           | $\pm 0,1$      |
|  | 250,00          | $\pm 0,15$     |



| Material geral de laboratório  | Capacidade (mL) |
|--|-----------------|
| Tubos de centrifuga (VWR)  | 50,0            |
| Proveta  | 1000            |
| Balões de fundo plano (Schott Duran)   | 250,0           |
| Frasco <i>schott</i>   | 1000            |
| Papel de alumínio  | —               |
| Esferas de ebulição  | —               |
| Seringa  | —               |
| Filtros de seringa de PVDF com 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de porosidade (VWR) | —               |
| <i>Vial</i> (Phenomenex)   | 2               |
| Exsicador  | —               |
| Purificador de água (ATS)  | —               |

### 2.1.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no procedimento foram de qualidade analítica (**Tabela 3**) e a água ultrapura.

**Tabela 3: Reagentes para o método de quantificação de teobromina.** Reagentes de laboratório necessários para a quantificação de teobromina em amostras alimentares.

| Reagentes*       | Fórmula química   | Estado Físico | Grau de pureza (%) | Massa molar (g/mol) | Marca |
|------------------|---|---------------|--------------------|---------------------|-------|
| Teobromina       | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> | Sólido        | > 98,0             | 180,16              | Sigma |
| Metanol          | CH <sub>4</sub> O   | Líquido       | ≥ 99,8             | 32,04               | VWR   |
| Éter de petróleo | —   | Líquido       | —                  | —                   | VWR   |

\*Ver informação detalhada em “Anexo 6.1.1”.

### 2.1.4 Método

#### 2.1.4.1 Matrizes

Para se proceder à validação do método que permite determinar o teor de teobromina em amostras alimentares por HPLC, baseado na norma AOAC 980.14, foram utilizadas diversas matrizes pertencentes a sete grupos alimentares distintos, tal como ilustrado na **Tabela 4**.

**Tabela 4: Matrizes abrangidas pelo método de quantificação de teobromina.** Matrizes utilizadas na validação do método de determinação de teobromina em amostras alimentares, por HPLC, bem como o grupo alimentar em que se encontram inseridas.

| Grupo alimentar   | Matriz   |
|---|--|
| Açúcar, produtos açucarados e derivados   | Chocolate preto, chocolate de leite e chocolate branco                           |
| Alimentos para animais  | Ração  |
| Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial | Bebida de soja com chocolate e suplemento em pó de chocolate                     |
| Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados                                | Bolacha, mistura para bolo de chocolate, cereais e barra de cereais de chocolate |
| Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados                                  | Amendoins com chocolate e cacau em pó  |
| Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados                               | Creme para barrar de chocolate   |
| Leite, produtos láteos e derivados  | Leite com chocolate  |

#### 2.1.4.2 Preparação da solução mãe de calibração de teobromina 500 mg/L

Para a quantificação de teobromina em amostras alimentares, procedeu-se, numa primeira instância, à preparação de uma solução mãe de calibração de teobromina com concentração de, aproximadamente, 500 mg/L. Para tal, pesaram-se cerca de 125 mg de um reagente *stock* de teobromina para uma folha de alumínio previamente tarada e, posteriormente, transferiu-se a toma para um balão de fundo plano de 250 mL, tendo o cuidado de lavar o papel de alumínio com água ultrapura. De seguida, adicionaram-se três esferas de ebulição e 100 mL de água ultrapura ao respetivo balão e, colocou-se o mesmo num banho de água quente, com agitação, a 100 °C durante 30 minutos, de modo a dissolver toda a teobromina presente em solução. Por fim, quando a solução se encontrava arrefecida, transferiu-se a mesma para um balão volumétrico de 250 mL, efetuando lavagens sucessivas ao balão de fundo plano, e, de seguida, perfez-se o volume do mesmo com água ultrapura e homogeneizou-se a solução.

Esta solução foi preparada sempre que se procedeu à análise.

#### 2.1.4.3 Preparação das soluções padrão de teobromina

Para elaborar a curva de calibração prepararam-se nove soluções padrão de teobromina. Para tal, transferiram-se volumes da solução mãe de calibração de teobromina com concentração de 500 mg/L para balões volumétricos de volume variado, de modo a preparar cinco soluções padrão de teobromina com concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 mg/L, respetivamente, como ilustrado na **Tabela 5**. A partir da solução padrão com concentração de teobromina de 10 mg/L prepararam-se as restantes soluções padrão de teobromina, por transferência de volumes conhecidos desta solução para balões volumétricos

de volume variado, de modo a que as concentrações de teobromina nessas soluções correspondessem a 2, 4, 6 e 8 mg/L, respetivamente, como mencionado na **Tabela 5**.

Estas soluções foram preparadas sempre que se procedeu à análise.

**Tabela 5: Preparação das soluções padrão de teobromina.** Volumes transferidos das soluções mãe de calibração (Volume solução mãe), com concentrações de teobromina variáveis ([Teo] solução mãe), para balões volumétricos de volume variado (Volume final), de modo a obter nove soluções padrão de teobromina com diferentes concentrações ([Teo] solução padrão).

| [Teo] solução padrão (mg/L) | [Teo] solução mãe (mg/L) | Volume solução mãe (mL) | Volume final (mL) |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------|
| 2,0                         | 10,0                     | 10,0                    | 50,0              |
| 4,0                         |                          | 20,0                    | 50,0              |
| 6,0                         |                          | 15,0                    | 25,0              |
| 8,0                         |                          | 20,0                    | 25,0              |
| 10,0                        | 500,0                    | 2,0                     | 100,0             |
| 25,0                        |                          | 2,5                     | 50,0              |
| 50,0                        |                          | 5,0                     | 50,0              |
| 75,0                        |                          | 15,0                    | 100,0             |
| 100,0                       |                          | 10,0                    | 50,0              |

#### 2.1.4.4 Preparação da amostra

As amostras foram preparadas de acordo com o definido no procedimento interno PAFQ.044 – Métodos de preparação de amostras para análise, sendo que, esta preparação é independente do método de ensaio a realizar.

Em suma, as amostras foram homogeneizadas numa trituradora, como o Ultra-turrax® ou a Bimby® e, de seguida, transferidas e armazenadas num copo de plástico estéril de 50 mL. No caso de amostras no estado líquido, estas foram agitadas frequentemente e transferidas diretamente para os copos, sem qualquer outro tipo de preparação. De realçar que todos os copos se encontravam devidamente identificados com o número da amostra e a matriz em questão, bem como a data de preparação, contudo, é confidencial qualquer informação referente ao cliente que forneceu a amostra, de modo a que toda a análise possa ser realizada de forma imparcial, como requerido na NP EN ISO 17025:2018<sup>43</sup>.

De seguida, as amostras foram guardadas em caixas num armário, ou caso se tratem de amostras que requerem refrigeração, num frigorífico, cuja temperatura se encontra monitorizada com ajuda de uma carta de controlo.

#### 2.1.4.5 Extração de teobromina da amostra

Para quantificar o teor de teobromina em amostras alimentares, pesaram-se entre 0,5 a 10,0 g de amostra ( $m_{amostra}$ ), como indicado na **Tabela 6**, para tubos de centrífuga, previamente pesados sem rolha e, cuja massa foi registada ( $m_{tubo\ vazio}$ ). De seguida, adicionaram-se 30 mL de éter de petróleo a cada um dos tubos contendo as amostras de modo a remover a gordura presente nas mesmas e, agitou-se o tubo manualmente. Posteriormente, colocaram-se os tubos numa centrífuga onde permaneceram durante 10 minutos a 3500 rpm. De seguida, rejeitou-se o sobrenadante e, colocaram-se os tubos numa estufa a 50 °C durante a noite, para evaporação do solvente.

No dia seguinte, os tubos foram armazenados durante 60 minutos no exsiccador para arrefecerem e, de seguida pesaram-se os mesmos ( $m_{tubo+amostra}$ ). Os resíduos foram transferidos para balões de fundo redondo contendo três esferas de ebulição, previamente pesados ( $m_{balão+esferas}$ ), através de lavagens do tudo com 100 mL de água ultrapura. De seguida, colocaram-se os balões num banho de água quente a 100 °C durante 30 minutos e, após arrefecerem, pesaram-se os mesmos ( $m_{balão+esferas+amostra}$ ). A partir das massas registadas e da massa de água adicionada (cerca de 100 g), foi possível determinar a massa esperada ( $m_{esperada}$ ) para a  $m_{balão+esferas+amostra}$ , sendo esta dada por (**Equação 95**):

$$m_{esperada} = m_{balão+esferas} + m_{tubo+amostra} - m_{tubo\ vazio} + 100 \quad (\text{Equação 95})$$

Como o valor da  $m_{balão+esferas+amostra}$  determinada experimentalmente foi inferior ao valor da  $m_{esperada}$ , adicionou-se água ultrapura nos balões contendo a amostra e as esferas de ebulição até se atingir o valor da  $m_{esperada}$  pois, considera-se que a diferença observada foi devida à perda de água que ocorreu no banho a 100 °C. De seguida, registaram-se os novos valores da  $m_{balão+esferas+amostra}$  e, filtraram-se as soluções com o auxílio de seringa e filtro, para cada solução. Por fim, transferiram-se cerca de 2 mL dos filtrados para *vials* para posterior injeção no cromatógrafo líquido.

**Tabela 6: Massas de amostra alimentar a utilizar no método de quantificação de teobromina.** Massas da toma de amostra alimentar a pesar para quantificar a teobromina nas mesmas.

| Matriz  | Massa (g) |
|---|-----------|
| Cacau em pó   | 0,5       |
| Chocolate preto, suplemento alimentar e bolacha                 | 1,0       |
| Amendoins com chocolate   | 1,5       |
| Mistura para bolo de chocolate e creme para barrar de chocolate | 2,0       |

|   |      |
|---|------|
| Chocolate de leite, cereais e barra de cereais                              | 3,0  |
| Bebida de soja com chocolate, leite com chocolate, chocolate branco e ração | 10,0 |

#### 2.1.4.6 Preparação da fase móvel para HPLC

A fase móvel utilizada na separação cromatográfica consistiu numa mistura de metanol e água (30:70 V/V). Para preparar esta solução, transferiram-se 700 mL de água ultrapura com o auxílio de uma proveta de vidro para um frasco *Schott* e, de seguida, adicionaram-se 300 mL de metanol. Homogeneizou-se a solução e, por fim, filtrou-se a mesma num sistema a vácuo para desgaseificar.

Esta solução foi preparada sempre que se procedeu à análise.

#### 2.1.4.7 Condições de análise para HPLC

De modo a responder ao objetivo proposto, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência que possuía um conjunto de sistemas essenciais, e, definiram-se as condições ótimas de operação do mesmo, como ilustrado na **Tabela 7**.

**Tabela 7: Condições e sistemas de análise para HPLC.**

| Condições                       | Características                                   |
|---------------------------------|---|
| Volume de amostra injetado      | 20 µL   |
| Bomba de eluição                | Isocrática  |
| Mecanismo de separação          | Partição  |
| Tempo de análise                | 10 minutos  |
| Fase móvel                      | Água:metanol (70:30 (V/V))                        |
| Fluxo da fase móvel             | 1 mL/min  |
| Coluna (Waters Spherisorb ODS2) | Fase reserva, C18 com poro de 5 µm e 250 × 4,6 mm |
| Temperatura                     | Ambiente  |
| Detetor                         | UV-Vis  |
| Comprimento de onda de absorção | 280 nm  |
| Programa informático            | <i>Chromeleon</i>                                 |

#### 2.1.4.8 Análise e tratamento de resultados

Após a obtenção do cromatograma, a teobromina foi quantificada selecionando o pico que apresentava um tempo de retenção ( $t_r$ ) de, aproximadamente, 5 minutos. De acordo com a literatura, espera-se que esta seja a primeira xantina a ser eluída na coluna cromatográfica, seguida da cafeína<sup>94</sup>. Para tal, a área do pico selecionada, em mUA.s, obtida para a amostra deve ser interpolada na curva de calibração traçada, de modo a obter a concentração de teobromina na amostra em mg/L ( $[Teo]_{int}$ ). Contudo, o resultado da concentração de teobromina na amostra indicado para um cliente ( $[Teo]_{amostra}$ ) vem expresso em mg/Kg e, por este motivo, devem considerar-se, para além da  $[Teo]_{int}$ , o fator de diluição (F) utilizado, o volume final da solução ( $V_f$ ), em mL, e a  $m_{amostra}$ , em g, isto é (Equação 96):

$$[Teo]_{amostra} = \frac{[Teo]_{int} \times V_f \times F}{m_{amostra}} \text{ (mg/Kg)} \quad \text{(Equação 96)}$$

Muitas vezes, o resultado do teor de teobromina numa amostra vem apresentado em g/100 g, como é o caso de alguns resultados provenientes da participação em ensaios interlaboratoriais.

## 2.2 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio

### 2.2.1 Resumo do processo

Com o objetivo de quantificar o teor de Hg num arroz integral recorrendo ao DMA, um MR foi pesado diretamente para uma barqueta de quartzo e, de seguida, submetido a um programa de aquecimento que levou à sua decomposição térmica, seguida da redução de todas as formas de Hg ao seu estado fundamental e, formação de uma amálgama de ouro. A quantificação do Hg, após eliminação dos restantes componentes da amostra, foi efetuada por EAA a 253,65 nm.

### 2.2.2 Materiais

Para que o procedimento analítico fosse realizado com sucesso, foram utilizados determinados equipamentos, controlados diariamente através da elaboração de cartas de controlo, apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8: Equipamentos e materiais para o método de quantificação de mercúrio.** Equipamentos e materiais volumétricos e de laboratório necessários para a quantificação de mercúrio numa amostra alimentar.

| Equipamentos   |                 |                |
|--|-----------------|----------------|
| Analisador direto de mercúrio ( <i>Milestone</i> )                   |                 |                |
| Balança analítica ( <i>Mettler Toledo</i> , AB265-S) ( $\pm 0,1$ mg) |                 |                |
| Material volumétrico   | Capacidade (mL) | Incerteza (mL) |
| Balões volumétricos  | 10,000          | 0,025          |
|  | 50,00           | 0,06           |
|  | 100,0           | 0,1            |
| Micropipeta  | 200,00000       | 0,00013        |
|  | 1000,00000      | 0,00051        |
|  | 5000,0000       | 0,0041         |
| Material geral de laboratório  | Capacidade (mL) |                |
| Proveta  | 100             |                |
| Barquetas de quartzo   | 0,5             |                |
| Copo   | 500             |                |
| Purificador de água (ATS)  | —               |                |

### 2.2.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no procedimento eram de qualidade analítica (Tabela 9) e a água ultrapura.

**Tabela 9: Reagentes para o método de quantificação de mercúrio.** Reagentes de laboratório necessários para a quantificação de mercúrio numa amostra alimentar.

| Reagentes*            | Fórmula química                   | Estado Físico | Grau de pureza (%) | Massa molar (g/mol) | Marca |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------|---------------------|-------|
| Mercúrio              | Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | Líquido       | > 98,0             | 180,16              | Merck |
| Ácido nítrico 68 %    | HNO <sub>3</sub>                  | Líquido       | ≥ 99,8             | 63,01               | VWR   |
| Ácido clorídrico 37 % | HCl                               | Líquido       | ≥ 99,9             | 36,46               | Merck |

\*Ver informação detalhada em “Anexo 6.2.1”.

## 2.2.4 Método

### 2.2.4.1 Matrizes

O método que permite quantificar o teor de mercúrio em amostras alimentares encontrava-se validado para três grupos alimentares, com um total de nove matrizes distintas, como ilustrado na **Tabela 10**.

**Tabela 10: Matrizes abrangidas pelo método de quantificação de mercúrio.** Matrizes utilizadas na validação do método de determinação de mercúrio em amostras alimentares, recorrendo ao DMA, bem como o grupo alimentar em que se encontram inseridas.

| Grupo alimentar                               | Matriz  |
|---|---|
| Açúcar, produtos açucarados e derivados       | Açúcar e chocolate  |
| Alimentos confeccionados e pré-confeccionados | Batata frita e salada de atum   |
| Produtos de pesca e derivados                 | Espadim, carne de caranguejo em conserva, pescado em conserva, lula e tintureira. |

Contudo, pretendeu-se estender a validação deste método para uma nova matriz, um arroz integral e, por este motivo, esta foi a única matriz considerada para o presente estudo, exceto quando são apresentados parâmetros de desempenho estudados na validação do método.

### 2.2.4.2 Preparação da solução de ácido nítrico, 10 %

Para preparar uma solução de ácido nítrico 10 % transferiram-se 15 mL de ácido nítrico 68 % para um balão volumétrico de 100 mL que já continha, aproximadamente, 50 mL de água. De seguida, completou-se o volume do balão com água e homogeneizou-se a solução.

Esta solução foi preparada sempre que se efetuou uma análise.

### 2.2.4.3 Preparação da solução mãe de calibração de mercúrio, 10 ppm

Para a quantificação de Hg num arroz integral, procedeu-se, inicialmente, à preparação de uma solução mãe de calibração com concentração de Hg de, aproximadamente, 10 ppm. Para tal, transferiram-se 100 µL de uma solução de Hg em ácido nítrico ( $947 \pm 7$  mg/L Hg) para um balão volumétrico de 10 mL. De seguida, diluiu-se este volume em, aproximadamente, 5 mL de água ultrapura e, adicionaram-se 100 µL de ácido clorídrico (37 % m/m, máx. 0,001 ppm de Hg). Por fim, perpez-se o volume do balão com água ultrapura e homogeneizou-se a solução.

Esta solução foi preparada sempre que se realizou o traçado da curva de calibração.



#### 2.2.4.4 Preparação da solução mãe de calibração de mercúrio, 100 ppm

Para além da solução de calibração anterior, preparou-se outra solução mãe de calibração com concentração de Hg de, aproximadamente, 100 ppm. Neste caso, a solução foi preparada por diluição de 5 mL da solução de mercúrio em ácido nítrico ( $947 \pm 7$  mg/L Hg) num balão volumétrico de 50 mL com, aproximadamente, 25 mL de água ultrapura. De seguida, adicionaram-se 500  $\mu$ L de ácido clorídrico (37 % m/m, máx. 0,001 ppm de Hg), fez-se o volume do balão com água ultrapura e, homogeneizou-se a solução.

Esta solução foi preparada sempre que se realizou o traçado da curva de calibração.

#### 2.2.4.5 Preparação das soluções padrão de mercúrio

Para elaborar o traçado da curva de calibração, procedeu-se à preparação de cinco soluções padrão com concentrações de Hg de 5; 10; 20; 30 e 50 ppb, a partir de uma solução mãe de calibração de Hg com concentração deste analito de 10 ppm. Prepararam-se, ainda, mais sete soluções padrão a partir da solução mãe de calibração de Hg 100 ppm, com concentrações iguais a 200; 500; 1000; 2000; 5000; 7000 e 10000 ppb. Para tal, inicialmente, pipetaram-se os volumes das soluções mãe de calibração de Hg como ilustrado na **Tabela 11** para balões volumétricos de 100 mL. De seguida, diluiu-se cada solução em, aproximadamente, 50 mL de água ultrapura e adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico (37 % m/m, máx. 0,001 ppm de Hg). Por fim, fez-se o volume dos balões com água ultrapura e, homogeneizaram-se as soluções. Para o traçado da curva de calibração, também se inclui o branco do processo que corresponde a uma barqueta de quartzo vazia.

Estas soluções foram preparadas sempre que se realizou a curva de calibração.

**Tabela 11: Preparação das soluções padrão de mercúrio.** Volumes transferidos de soluções mãe de calibração (Volume solução mãe) com concentrações de Hg variáveis ([Hg] solução mãe) para balões volumétricos de 100 mL, de modo a obter treze soluções padrão de Hg com diferentes concentrações ([Hg] solução padrão).

| [Hg] solução padrão (ppb) | [Hg] solução mãe (ppm) | Volume solução mãe (mL) |
|---------------------------|------------------------|-------------------------|
| 5                         | 10                     | 0,05                    |
| 10                        |                        | 0,10                    |
| 20                        |                        | 0,20                    |
| 30                        |                        | 0,30                    |
| 50                        |                        | 0,50                    |
| 100                       |                        | 0,10                    |
| 200                       | 100                    | 0,20                    |
| 500                       |                        | 0,50                    |
| 1000                      |                        | 1,00                    |
| 2000                      |                        | 2,00                    |
| 5000                      |                        | 5,00                    |
| 7000                      |                        | 7,50                    |
| 10000                     |                        | 10,00                   |

#### 2.2.4.6 Preparação da amostra

As amostras foram preparadas de acordo com o definido no procedimento interno PAFQ.044 – Métodos de preparação de amostras para análise, sendo que, esta preparação é independente do método de ensaio a realizar, como descrito anteriormente, para o método que permite quantificar o teor de teobromina em amostras alimentares.

#### 2.2.4.7 Quantificação de mercúrio da amostra

Para quantificar o teor de mercúrio no arroz integral, inicialmente, pesaram-se 0,25 g de amostra para barquetas de quartzo. A amostra foi distribuída uniformemente na barqueta tendo-se evitado deixar vestígios da amostra nas paredes da mesma. De seguida, introduziram-se as barquetas no amostrador automático do equipamento e iniciou-se a medição do teor de Hg, como descrito no procedimento interno PAFQ.155.0 - Determinação de mercúrio. Método de decomposição térmica, amalgamação e espectrofotometria de absorção atômica.

#### 2.2.4.8 Condições de análise do DMA

O DMA foi programado com um conjunto de definições ótimas para o seu funcionamento, como ilustrado na Tabela 12.

Tabela 12: Condições de análise do DMA.

| Condições                              | Características  |
|--|------------------|
| Massa de amostra                       | 0,25 g           |
| Temperatura inicial                    | 250 °C           |
| Temperatura máxima de aquecimento      | 1000 °C          |
| Tempo máximo de aquecimento            | 720 s            |
| Temperatura de catálise                | 565 °C           |
| Tempo de purga                         | 60 s             |
| Temperatura de aquecimento da amálgama | 850 °C           |
| Tempo de amálgama                      | 12 s             |
| Tempo de geração do sinal              | 30 s             |
| Detetor                                | UV com fotodíodo |
| Comprimento de onda de absorção        | 253,65 nm        |
| Lâmpada                                | Hg               |

#### 2.2.4.9 Análise e tratamento de resultados

Em condições de rotina, a concentração de Hg presente na amostra foi determinada diretamente pelo equipamento, tendo em consideração a massa de Hg obtida por interpolação da absorvância na curva de calibração ( $Massa_{Hg}$ ), em ng, e a massa da toma da amostra ( $Massa_{Toma}$ ), em g, pois (Equação 97):

$$[\text{Mercúrio}] = \frac{Massa_{Hg}}{Massa_{Toma}} \text{ ppb} \quad (\text{Equação 97})$$

Quando se analisou a amostra de arroz integral, todos os resultados apresentados para a concentração de Hg nessa amostra, em ppb, foram obtidos por interpolação da resposta dada pelo DMA, isto é, a absorvância, na curva de calibração obtida.

#### **2.2.4.10 Limpeza das barquetas de quartzo**

Após utilização, removeu-se a cinza das barquetas de quartzo com o auxílio de uma escova. De seguida, enxaguaram-se as barquetas com água e escovaram-se as mesmas. Posteriormente, colocaram-se as barquetas num copo contendo a solução de ácido nítrico 10 % durante uma hora. Por fim, enxaguaram-se novamente as barquetas com água e, de seguida deixaram-se as mesmas à temperatura ambiente até secarem completamente.

## 3. Apresentação e discussão de resultados

### 3.1 Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência

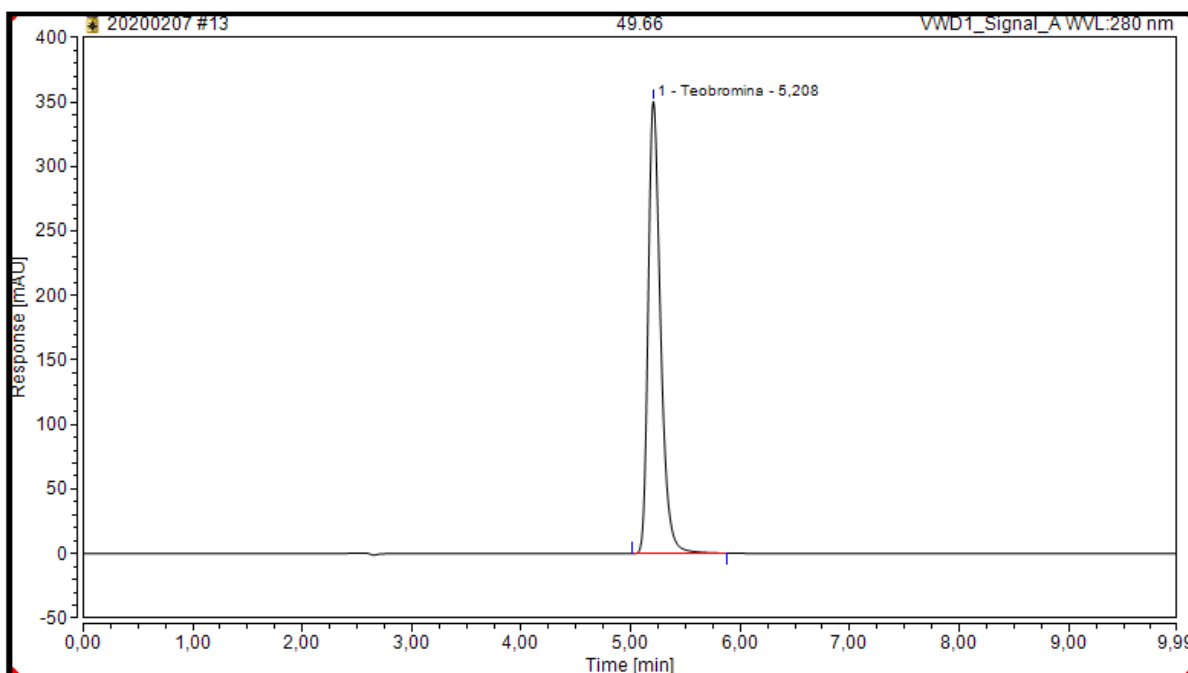
De modo a quantificar o teor de teobromina em géneros alimentícios à base de cacau e em produtos destinados à alimentação animal, procedeu-se à validação interna do método analítico baseado na norma AOAC 980.14. Neste caso, trata-se de uma validação uma vez que a norma AOAC 980.14 apenas é aplicável a géneros alimentícios à base de cacau, e, ao implementar esta norma no laboratório de análise pretendeu-se que esta também fosse aplicada a outra matriz que não pertence a esta família de alimentos, isto é, uma ração animal. Quer isto dizer que, como se procedeu à implementação de um documento normativo para ser utilizado fora do âmbito da normalização, este método teve de ser devidamente validado.

Deste modo, através da realização de um conjunto de procedimentos, pretendeu-se avaliar os parâmetros de desempenho do método, nomeadamente, a sensibilidade, o LDQ, a gama de trabalho, a seletividade, a repetibilidade, a precisão intermédia e, a justeza. Para além disso, determinou-se a incerteza do método baseada em dados de validação e controlo de qualidade do método.

Para responder ao objetivo proposto, foi necessário, numa fase inicial, proceder-se ao traçado de uma curva de calibração.

#### 3.1.1 Curva de calibração

A validação interna do método analítico para a quantificação do teor de teobromina em amostras alimentares iniciou-se com o traçado de uma curva de calibração. Para tal, cada um dos padrões de teobromina preparados a partir de uma solução mãe de calibração de teobromina com concentração efetiva de  $493,5 \pm 6,0$  mg/L (**Anexo 6.1.2.1**) e de um padrão de calibração com concentração de  $9,87 \pm 0,12$  mg/L (**Anexo 6.1.2.2**) foram analisados por HPLC obtendo-se um cromatograma para cada um deles, como apresentado na **Figura 12**.



**Figura 12: Cromatograma de HPLC para um padrão de calibração de teobromina.** Representação de um cromatograma obtido por HPLC para um padrão de calibração de teobromina com concentração de 49,66 mg/L, no qual foi possível observar um pico único correspondente à teobromina, a um tempo de retenção de 5,21 minutos. Fase móvel uma mistura de metanol-água (30:70 (V/V)) a um fluxo de 1 mL/min e volume injetado de 20  $\mu$ L.

Na **Figura 12** é possível observar no cromatograma um único pico a um  $t_r$  de, aproximadamente, 5,21 minutos. Como se trata de um padrão de calibração, concluiu-se que o pico é proveniente da presença de teobromina na solução e, cuja área depende da concentração desse analito.

Na literatura, o  $t_r$  da teobromina encontra-se compreendido entre 2,46 e 4,05 minutos, devido às alterações das condições experimentais como o comprimento da coluna cromatográfica, a composição da fase móvel utilizada, bem como o fluxo<sup>94</sup>.

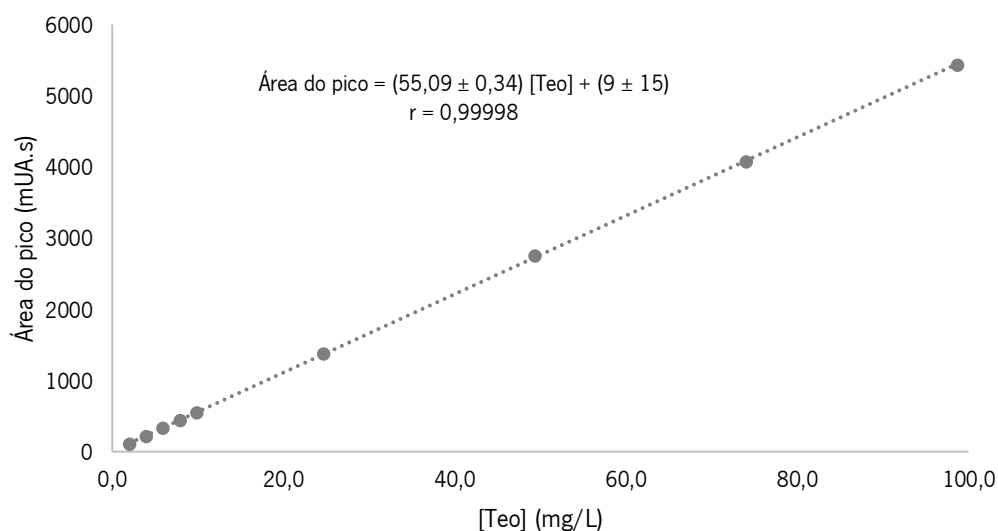
De realçar que, como se trata de um padrão de calibração, não seriam expectáveis outros picos ao comprimento de onda selecionado, contudo, quando se analisam amostras alimentares, podem surgir novos picos no cromatograma referentes a outras xantinas presentes na amostra, que absorvem a esse comprimento de onda, como é o caso da cafeína. Ainda assim, dado que a cafeína apresenta maior afinidade para a fase estacionária pois, é mais apolar do que a teobromina por possuir um grupo metilo adicional, os  $t_r$  destes compostos encontram-se distanciados. O  $t_r$  da cafeína encontra-se compreendido entre 6,85 e 8,47 minutos, embora seja dependente das condições de análise<sup>94</sup>. Assim, mesmo que a cafeína estivesse presente na amostra, as condições selecionadas permitiriam que os seus picos se encontrassem bem resolvidos.

Assim, na **Tabela 13** registaram-se os valores das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas para cada um dos padrões de calibração, em mUA.s, bem como as suas concentrações em teobromina com a respetiva incerteza combinada associada, em mg/L (**Anexo 6.1.2.2**).

**Tabela 13: Valores para o traçado da curva de calibração de teobromina.** Valores das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas de HPLC para cada padrão de calibração de teobromina (Teo) apresentado com a concentração e a incerteza combinada associada ( $u$ ).

| [Teo] $\pm u$<br>(mg/L) | Área do pico<br>(mUA.s) |
|-------------------------|-------------------------|
| 1,974 $\pm$ 0,025       | 109,879                 |
| 3,948 $\pm$ 0,049       | 217,445                 |
| 5,922 $\pm$ 0,074       | 332,149                 |
| 7,896 $\pm$ 0,099       | 440,894                 |
| 9,87 $\pm$ 0,12         | 552,495                 |
| 24,67 $\pm$ 0,31        | 1378,109                |
| 49,35 $\pm$ 0,61        | 2759,036                |
| 74,02 $\pm$ 0,91        | 4075,174                |
| 98,7 $\pm$ 1,2          | 5437,203                |

Na **Figura 13**, representaram-se graficamente os valores das áreas dos picos obtidos nos cromatogramas para os padrões de calibração de teobromina em função das concentrações de teobromina nos mesmos padrões. Assim, obteve-se uma curva de calibração do primeiro grau que apresenta uma equação da reta dada por Área do pico (mUA.s) = (55,09  $\pm$  0,34) [Teo] (mg/L) + (9  $\pm$  15) (mUA.s) (**Anexo 6.1.3.1**), cujo declive e ordenada na origem foram determinados de acordo com as **Equações 25** e **26**, respetivamente. Verificou-se que esta curva de calibração apresentava um  $r$  de 0,99998, determinado de acordo com a **Equação 41**.



**Figura 13: Representação da curva de calibração de teobromina.** Representação gráfica dos valores da área do pico obtidos para os padrões de calibração de teobromina, em função da concentração de teobromina (Teo) nos mesmos padrões.

Considerando que a linearidade da curva de calibração pode ser admitida se o valor do  $r$  for superior a 0,995 verificou-se a existência de uma correlação linear entre os valores das áreas dos picos e a concentração de teobromina nas soluções padrão de calibração<sup>18</sup>. Esta evidência foi corroborada pela realização do teste  $t$  para  $r$  (**Anexo 6.1.3.2.1**) e do teste de Mandel (**Anexo 6.1.3.2.2**).

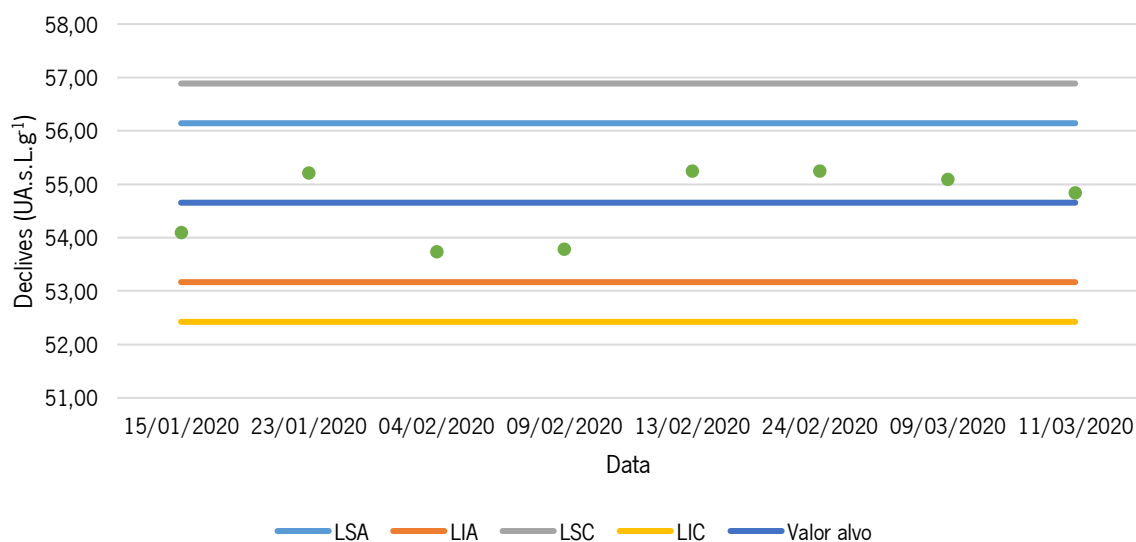
A curva de calibração para a teobromina foi traçada diariamente aquando a análise de amostras analíticas, sendo que, de modo a avaliar a estabilidade destas curvas, e, como consequência a sensibilidade do método, realizou-se o controlo dos declives das curvas de calibração traçadas ao longo do tempo. Deste modo, registaram-se os declives das curvas de calibração de teobromina obtidos de 15/01/2020 a 11/03/2020, como ilustrado na **Tabela 14**.

**Tabela 14: Sensibilidade do método de quantificação de teobromina.** Valores dos declives das curvas de calibração de teobromina realizadas de 15/01/2020 a 11/03/2020.

| Data       | Declive<br>(UA.s.L.g <sup>-1</sup> ) |
|------------|--------------------------------------|
| 15/01/2020 | 54,10                                |
| 23/01/2020 | 55,21                                |
| 04/02/2020 | 55,40                                |
| 09/02/2020 | 53,74                                |
| 13/02/2020 | 53,79                                |
| 24/02/2020 | 55,25                                |
| 09/03/2020 | 55,09                                |



A partir dos primeiros sete valores dos declives obtidos, elaborou-se uma carta de controlo de indivíduos provisória (**Figura 14**). Após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.1.4.1**), constatou-se que não era necessário rejeitar quaisquer valores dos declives para traçar os limites e o valor alvo da carta de controlo e, deste modo, determinou-se o valor médio dos declives e o respetivo desvio padrão, que corresponderam a 54,66 e 0,74 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, respetivamente. A partir destes valores, determinaram-se o LSA e o LIA que equivaleram a 56,14 e 53,17 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, respetivamente e, o LSC e o LIC foram de 56,89 e 52,42 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, respetivamente (**Anexo 6.1.4.2**).



**Figura 14: Carta de controlo de indivíduos do declive da curva de calibração de teobromina.** Carta de controlo de indivíduos provisória dos declives das curvas de calibração de teobromina traçadas ao longo do tempo para avaliar a estabilidade das curvas de calibração, na qual se representam os limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA, respetivamente), os limites superior e inferior de controlo (LSC e LIC, respetivamente) e, o valor alvo.

Como os declives se encontravam dentro dos limites estabelecidos na carta de controlo e, obedecem aos outros critérios de aceitação de processo controlado, concluiu-se que a curva de calibração se manteve estável ao longo do tempo. Para além disso, considerando os oito declives das curvas de calibração, determinou-se o valor médio dos declives e o respetivo desvio padrão, que corresponderam a 54,68 e 0,69 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, respetivamente. A partir destes dois valores obteve-se o coeficiente de variação (**Equação 51**) de 1,3 % (**Anexo 6.1.4.3**). De acordo com o definido internamente pelo laboratório, os resultados são considerados satisfatórios se o CV for inferior a 10 %. Como tal foi verificado, concluiu-se que a sensibilidade do método não sofre alterações significativas ao longo do tempo, o que corrobora a evidência anterior.

### 3.1.2 Limite de quantificação

De acordo com o procedimento interno da empresa, quando se procede à validação de qualquer método analítico, no que diz respeito aos limiares analíticos, apenas se mostrou relevante a determinação do LDQ, pelo que o limite de deteção não foi determinado na validação estatística do método em estudo.

Assim, dada a natureza das amostras em estudo pretendeu-se definir como LDQ do método a concentração de teobromina equivalente ao padrão de menor concentração, isto é, 2 mg/L. Para tal, efetuaram-se ensaios de recuperação de modo a demonstrar que o método em causa permitia quantificar esta concentração de teobromina e, como tal, este poderia ser o valor mínimo de concentração de teobromina que poderia ser quantificada por este método de análise.

Deste modo, utilizando como amostra o chocolate branco, extraiu-se a teobromina de, aproximadamente, 10 g desta amostra, em duplicado e, de seguida, determinou-se a sua concentração, recorrendo à curva de calibração, correspondendo a 1,43 mg/L. De seguida, como se encontra representado na **Tabela 15**, determinou-se a concentração média de teobromina na mesma amostra, sendo esta igual a 14,35 mg/Kg, de acordo com a **Equação 96**.

**Tabela 15: Análise de uma amostra de chocolate branco para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina.** Determinação da concentração de teobromina ([Teo]amostra) numa amostra de chocolate branco, recorrendo à curva de calibração, juntamente com a massa da toma da amostra (Massa da toma) e, o volume de solução final obtido após extração da teobromina da amostra (Volume final).

| Ensaio | Massa da toma (g) | Volume final (mL) | [Teo]amostra (mg/L) | [Teo]amostra (mg/Kg) |
|--------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| 1      | 10,1060           | 102,247           | 1,33                | 13,50                |
| 2      | 10,0438           | 100,711           | 1,52                | 15,20                |
| Média  | 10,0749           | 101,479           | 1,43                | 14,35                |

Posteriormente, extraiu-se, uma vez mais, a teobromina de cerca de 10 g de amostra de chocolate branco, tendo sido efetuados oito replicados. Contudo, procedeu-se à fortificação dos oito replicados antes de se analisar no cromatógrafo. Para tal, adicionaram-se a cada replicado, 0,5 mL do padrão com concentração de teobromina de  $496,7 \pm 6,0$  mg/L. Analisaram-se as amostras fortificadas por HPLC para determinar a sua concentração em teobromina, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 16**.

**Tabela 16: Análise de uma amostra de chocolate branco depois da fortificação para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina.** Determinação da concentração de teobromina ([Teo]fortificada) em oito replicados de uma amostra de chocolate branco fortificados, juntamente com a massa da toma da amostra (Massa da toma) e, o volume de solução final obtido após extração da teobromina da amostra (Volume final).

| Ensaio | Massa da toma (g) | Volume final (mL) | [Teo]fortificada (mg/L) | [Teo]fortificada (mg/Kg) |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1      | 10,1268           | 101,165           | 3,77                    | 37,70                    |
| 2      | 10,0881           | 99,953            | 3,43                    | 34,00                    |
| 3      | 10,1467           | 100,689           | 3,61                    | 35,80                    |
| 4      | 10,1403           | 100,261           | 3,61                    | 35,70                    |
| 5      | 10,3009           | 100,220           | 3,58                    | 34,80                    |
| 6      | 10,0514           | 100,078           | 3,74                    | 37,20                    |
| 7      | 10,0307           | 100,884           | 4,13                    | 41,50                    |
| 8      | 10,1082           | 100,193           | 3,92                    | 38,90                    |

De seguida, determinou-se a concentração de teobromina adicionada em cada um dos ensaios (**Anexo 6.1.5.1**) sendo que os resultados obtidos se encontram apresentados na **Tabela 17**.

**Tabela 17: Concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação realizado para o estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina.** Valores da concentração de teobromina ([Teo]adicionada) adicionados na fortificação da amostra de chocolate branco no ensaio de recuperação.

| Ensaio | [Teo]adicionada (mg/L) | [Teo]adicionada (mg/Kg) |
|--------|------------------------|-------------------------|
| 1      | 2,45                   | 24,52                   |
| 2      | 2,48                   | 24,62                   |
| 3      | 2,47                   | 24,48                   |
| 4      | 2,48                   | 24,49                   |
| 5      | 2,48                   | 24,11                   |
| 6      | 2,48                   | 24,71                   |
| 7      | 2,46                   | 24,76                   |
| 8      | 2,48                   | 24,57                   |

Determinou-se a taxa de recuperação, R, de cada ensaio efetuado (**Anexo 6.1.5.2**), de acordo com a **Equação 12**, considerando a concentração de teobromina adicionada em cada ensaio, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 18**. Por fim, calculou-se a  $\bar{R}$  do ensaio de recuperação, após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.1.5.2**), que correspondeu a 93,0 %.

**Tabela 18: Taxa de recuperação obtida no estudo do LDQ do método de quantificação de teobromina.** Determinação da taxa de recuperação (R), obtida em cada ensaio efetuado, determinada a partir dos valores da concentração de teobromina presente na amostra ([Teo]amostra), dos valores da concentração de teobromina nas amostras fortificadas, ([Teo]fortificada) e, dos valores da concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação ([Teo]adicionada).

| Ensaio | [Teo]amostra (mg/L) | [Teo]adicionada (mg/L) | [Teo]fortificada (mg/L) | R (%) |
|--------|---------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| 1      | 1,43                | 2,45                   | 3,77                    | 95,7  |
| 2      | 1,43                | 2,48                   | 3,43                    | 80,8  |
| 3      | 1,43                | 2,47                   | 3,61                    | 88,5  |
| 4      | 1,43                | 2,48                   | 3,61                    | 88,2  |
| 5      | 1,43                | 2,48                   | 3,58                    | 86,8  |
| 6      | 1,43                | 2,48                   | 3,74                    | 93,1  |
| 7      | 1,43                | 2,46                   | 4,13                    | 109,7 |
| 8      | 1,43                | 2,48                   | 3,92                    | 100,8 |

O documento normativo AOAC 980.14 não faz referência acerca do intervalo de R admitido recorrendo a este método analítico<sup>74</sup>. Por este motivo, o laboratório definiu internamente que métodos que permitam a análise de analitos em solução aquosa por HPLC apresentam um intervalo de R admitida entre 80 e 120 %. Uma vez que a  $\bar{R}$  obtida ( $93,0 \pm 9,1$  %) se encontra inserida no intervalo de R admitida para o método, concluiu-se que o LDQ equivale à concentração de teobromina do primeiro padrão de calibração, isto é, 2,0 mg/L. Ainda assim, internamente, o LDQ vem expresso em mg/Kg, uma vez que são nestas unidades que os resultados são apresentados nos relatórios para os clientes. Isto significa que o LDQ do método, tendo em consideração a concentração de teobromina determinada na amostra, em mg/L, o volume final da solução e a massa da toma da amostra, equivaleu a 20 mg/Kg.

Após validação interna do método analítico, no futuro, pretende-se realizar um controlo da estabilidade do LDQ ao longo do tempo. Para tal, poder-se-á calcular este valor, periodicamente, no traçado da curva de calibração de teobromina recorrendo à **Equação 50**. Numa perspetiva futura, o laboratório tem como objetivo elaborar uma carta de controlo de indivíduos na qual registe os valores obtidos para avaliar a estabilidade do valor do LDQ ao longo do tempo. Assim, tomando como exemplo a curva de calibração elaborada a 09/03/2020, verificou-se que o LDQ calculado recorrendo a esta equação foi de 2,67 mg/L (**Anexo 6.1.5.3**).

### 3.1.3 Gama de trabalho

Um dos parâmetros mais importantes a definir na validação de um método analítico é a gama de trabalho, uma vez que esta define o intervalo de concentração de teobromina que pode ser quantificado recorrendo a este método de análise. Assim, uma das formas para avaliar este parâmetro considera que existe homogeneidade de variâncias ao longo de toda a gama de trabalho e, deste modo, para demonstrar que a gama de trabalho selecionada se encontra bem ajustada, deve mostrar-se que este critério é cumprido.

Para tal, pode realizar-se um teste F de Snedecor-Fisher para avaliar se as variâncias das respostas obtidas na análise do primeiro e do último padrões da curva de calibração diferem significativamente. Deste modo, prepararam-se dez réplicas do padrão com concentração de teobromina de  $1,974 \pm 0,025$  mg/L e dez réplicas do padrão com concentração de teobromina de  $98,7 \pm 1,2$  mg/L. De seguida, analisaram-se os replicados por HPLC, encontrando-se os valores das áreas dos picos apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19: Gama de trabalho do método de quantificação de teobromina.** Valores das áreas dos picos obtidos para os dez replicados do padrão com concentração de teobromina de  $1,974 \pm 0,025$  mg/L (P1) e para os dez replicados do padrão com concentração de teobromina de  $98,7 \pm 1,2$  mg/L (P9).

| Área do pico P1<br>(mUA.s) | Área do pico P9<br>(mUA.s) |
|----------------------------|----------------------------|
| 108,948                    | 5404,505                   |
| 109,196                    | 5402,167                   |
| 109,144                    | 5405,505                   |
| 109,091                    | 5414,223                   |
| 109,265                    | 5414,768                   |
| 109,190                    | 5406,648                   |
| 108,736                    | 5404,274                   |
| 107,568                    | 5419,386                   |
| 109,098                    | 5401,552                   |
| 109,951                    | 5404,062                   |
| 108,358                    | 5411,738                   |
| 109,724                    | 5351,820                   |

Ao aplicar o teste de Grubbs, verificou-se que os valores mínimos das áreas dos picos obtidos para ambos os padrões deveriam ser rejeitados, uma vez que os valores de G calculados foram superiores ao valor de G indicado na tabela de Grubbs para  $n = 10$  e, 95 % de confiança (**Anexo 6.1.6.1**).

Deste modo, não foram considerados estes valores para o cálculo da variância das respostas obtidas para cada um dos padrões, de acordo com a **Equação 4**. Assim, verificou-se que os resultados do padrão com maior concentração apresentavam uma variância de  $35,3 \text{ (mUA.s)}^2$ , enquanto os do padrão com menor concentração apresentavam uma variância igual a  $0,18 \text{ (mUA.s)}^2$ . Calculou-se o valor de F, como descrito na **Equação 6**, sendo este igual a 192,72 (**Anexo 6.1.6.2**). Este valor foi comparado com o valor de F de 4,433 indicado na tabela *two-side tailed* ( $n = 9$ ) para 95 % de confiança. Como o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado concluiu-se que a gama de trabalho do método não se encontra bem ajustada.

Por este motivo, dever-se-ia reduzir a gama de trabalho até que as variâncias das respostas obtidas para o primeiro e último padrões não fossem estatisticamente diferentes, ou, em alternativa, testar o modelo de regressão ponderada. Contudo, devido a contingências de tempo, não foi possível avaliar a primeira situação. Relativamente à segunda possibilidade, em contexto empresarial não é temporalmente vantajosa pois, para além de ser mais complexa, teria de ser aplicada sempre que fosse realizada a curva de calibração, o que implica um maior tempo de espera por parte do cliente.

Por este motivo, pode assumir-se que não existe homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho. Contudo, de acordo com os procedimentos internos da empresa, como a linearidade da reta de calibração foi demonstrada na gama de trabalho selecionada, esta pode ser considerada válida.

Ainda assim, como referido anteriormente, internamente, a gama de trabalho encontra-se expressa em mg/Kg. Assim, definiu-se que o valor mínimo de concentração de teobromina que pode ser quantificado pelo método corresponde ao LDQ, isto é, 20 mg/Kg e o valor máximo de concentração de teobromina equivale a 20000 mg/Kg uma vez que foi este o valor máximo de concentração de teobromina registado no processo de validação do método.

### 3.1.4 Seletividade

A seletividade permite concluir acerca da capacidade que o método apresenta para quantificar com a confiança necessária o analito de interesse na presença de outras espécies que poderão influenciar a sua quantificação. Este parâmetro de desempenho foi avaliado através da realização de ensaios de recuperação para demonstrar que a fortificação de uma amostra com uma concentração de teobromina

conhecida conduz a um aumento proporcional à adição efetuada. Para realizar este estudo, utilizou-se a matriz ração, dado que esta não se encontra abrangida pelo documento normativo AOAC 980.14.

Para tal, prepararam-se dois replicados com cerca de 10 g de uma amostra de ração e determinou-se a concentração de teobromina nesta amostra, sendo esta igual a 0,00 mg/L, encontrando-se os valores obtidos na **Tabela 20**.

**Tabela 20: Análise de uma amostra de ração para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.** Determinação da concentração de teobromina ([Teo]amostra) numa amostra de ração recorrendo à curva de calibração, juntamente com a massa da toma da amostra (Massa da toma) e, o volume de solução final obtido após extração da teobromina da amostra (Volume final).

| Ensaio | Massa da toma (g) | Volume final (mL) | [Teo]amostra (mg/L) | [Teo]amostra (mg/Kg) |
|--------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| 1      | 10,064            | 100,680           | 0,00                | 0,00                 |
| 2      | 10,050            | 101,020           | 0,00                | 0,00                 |

Prepararam-se, novamente, oito replicados da mesma amostra e, fortificaram-se os mesmos com 15 mL de uma solução padrão com concentração de teobromina de  $493,5 \pm 6,0$  mg/L. Estas amostras foram analisadas por HPLC para determinar a sua concentração em teobromina, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 21**.

**Tabela 21: Análise de uma amostra de ração depois da fortificação para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.** Determinação da concentração de teobromina ([Teo]fortificada) em oito replicados de uma amostra de ração, juntamente com a massa da toma da amostra (Massa da toma) e, o volume de solução final obtido após extração da teobromina da amostra (Volume final), em cada um dos ensaios efetuados.

| Ensaio | Massa da toma (g) | Volume final (mL) | [Teo]fortificada (mg/L) | [Teo]fortificada (mg/Kg) |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1      | 10,0536           | 100,068           | 64,20                   | 639,0                    |
| 2      | 10,0128           | 100,029           | 63,39                   | 633,3                    |
| 3      | 10,0754           | 100,030           | 63,82                   | 633,6                    |
| 4      | 10,0591           | 100,023           | 62,67                   | 623,2                    |
| 5      | 10,0611           | 99,887            | 61,78                   | 613,4                    |
| 6      | 10,1984           | 100,048           | 66,62                   | 653,5                    |
| 7      | 10,0325           | 100,093           | 65,54                   | 653,9                    |
| 8      | 10,0293           | 100,108           | 62,26                   | 621,5                    |

Determinou-se a concentração de teobromina adicionada em cada um dos ensaios (**Anexo 6.1.7.1**) sendo que os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 22**.

**Tabela 22: Concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação realizado para o estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.** Valores da concentração de teobromina ([Teo]adicionada) adicionados na fortificação de uma amostra de ração quando realizado o ensaio de recuperação.

| Ensaio | [Teo]adicionada (mg/L) | [Teo]adicionada (mg/Kg) |
|--------|------------------------|-------------------------|
| 1      | 73,97                  | 736,3                   |
| 2      | 74,00                  | 739,3                   |
| 3      | 74,00                  | 734,7                   |
| 4      | 74,01                  | 735,9                   |
| 5      | 74,11                  | 735,7                   |
| 6      | 73,99                  | 725,8                   |
| 7      | 73,95                  | 737,8                   |
| 8      | 73,94                  | 738,1                   |

Posteriormente, determinou-se a R obtida em cada ensaio (Anexo 6.1.7.2), de acordo com a Equação 12. Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 23. Realizou-se o teste de Grubbs e, constatou-se que nenhum dos valores de R calculados deveria ser rejeitado para o estudo da seletividade (Anexo 6.1.7.2). Deste modo, obteve-se uma  $\bar{R}$  de 86,2 %.

**Tabela 23: Taxa de recuperação obtida no estudo da seletividade do método de quantificação de teobromina.** Determinação da taxa de recuperação (R), obtida em cada ensaio de recuperação efetuado, determinada a partir dos valores da concentração de teobromina na amostra de ração ([Teo]amostra), da concentração de teobromina adicionada na fortificação ([Teo]adicionada) e, a concentração de teobromina na amostra fortificada ([Teo]fortificada).

| Ensaio | [Teo]amostra (mg/L) | [Teo]adicionada (mg/L) | [Teo]fortificada (mg/L) | R (%) |
|--------|---------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| 1      | 0                   | 73,97                  | 64,20                   | 86,8  |
| 2      | 0                   | 74,00                  | 63,39                   | 85,7  |
| 3      | 0                   | 74,00                  | 63,82                   | 86,2  |
| 4      | 0                   | 74,01                  | 62,67                   | 84,7  |
| 5      | 0                   | 74,11                  | 61,78                   | 83,4  |
| 6      | 0                   | 73,99                  | 66,62                   | 90,0  |
| 7      | 0                   | 73,95                  | 65,54                   | 88,6  |
| 8      | 0                   | 73,94                  | 62,26                   | 84,2  |



Considerando que a  $\bar{R}$  admitida para o método ( $86,2 \pm 2,3 \%$ ) se encontra compreendida entre 80 e 120 %, concluiu-se que o método é seletivo e, como tal, a resposta obtida pelo método encontra-se diretamente relacionada com a concentração de teobromina na amostra.

De salientar que a amostra de ração analisada não continha teobromina o que respeita o definido no Decreto-lei n.º 67/2010, logo este alimento pode ser ingerido com segurança pelos animais.

### 3.1.5 Precisão

Ao longo do trabalho experimental, procedeu-se à avaliação da precisão do método, uma vez que a determinação deste parâmetro é essencial para fazer a validação interna do mesmo. Assim, este parâmetro de desempenho foi avaliado em duas condições distintas, nomeadamente em condições de repetibilidade e de precisão intermédia.

#### 3.1.5.1 Precisão em condições de repetibilidade

Como referido anteriormente, a repetibilidade do método expressa a precisão obtida em análises realizadas nas mesmas condições experimentais, isto é, no mesmo dia, com mesmo o analista e equipamento, entre outros.

Assim, para avaliar a repetibilidade do método foram analisadas 8 réplicas (n) de 15 matrizes (k) pertencentes a 7 grupos alimentares, como ilustrado na **Tabela 4**, sendo que duas delas (chocolate de leite e mistura para bolo de chocolate) eram DPCS. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 24** e, para cada matriz, foi realizado o teste de Grubbs (**Anexo 6.1.8.1.1**) para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor da concentração de teobromina determinada para os replicados. Como o valor de G tabelado para  $n = 8$  e, 95 % de confiança é de 2,13 e, o valor máximo de G calculado foi de 2,09, para a matriz chocolate preto, concluiu-se que nenhum dos valores considerados suspeitos devia ser rejeitado para o cálculo da repetibilidade do método.

**Tabela 24: Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.** Valores da concentração da teobromina (Teo) obtidos na realização de 8 ensaios para 15 matrizes pertencentes a 7 grupos alimentares distintos.

|  |                                    | [Teo] (mg/Kg) |         |         |         |         |         |         |         |
|--|------------------------------------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Grupo  | Matriz                             | 1             | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8       |
| Açúcar, produtos açucarados e derivados          | Chocolate de leite                 | 1622,7        | 1694,7  | 1706,6  | 1704,6  | 1701,4  | 1634,7  | 1641,7  | 1672,6  |
|  | Chocolate preto                    | 7566,4        | 7397,7  | 7497,3  | 7498,9  | 7529,2  | 7491,4  | 7540,4  | 7560,9  |
|  | Chocolate branco                   | 37,7          | 34,0    | 35,8    | 35,7    | 34,8    | 37,2    | 41,5    | 38,9    |
|  | Chocolate de leite (DPCS)          | 1200,5        | 1200,7  | 1219,6  | 1272,6  | 1227,9  | 1239,1  | 1226,9  | 1212,0  |
| Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados | Mistura para bolo chocolate (DPCS) | 2127,7        | 2153,4  | 2166,8  | 2082,9  | 1981,4  | 2044,2  | 2066,5  | 2188,9  |
|  | Bolacha                            | 1158,5        | 1174,8  | 1163,0  | 1152,5  | 1165,5  | 1179,2  | 1176,6  | 1174,3  |
|  | Barras de cereais                  | 695,3         | 732,9   | 677,8   | 693,5   | 749,1   | 794,1   | 765,1   | 794,8   |
|  | Cereais                            | 286,3         | 288,9   | 291,9   | 289,7   | 294,7   | 293,7   | 297,4   | 297,1   |
| Alimentos dietéticos, suplementos.               | Suplemento em pó                   | 1635,4        | 1686,0  | 1765,9  | 1646,5  | 1721,4  | 1724,8  | 1725,8  | 1726,8  |
|  | Bebida de soja com chocolate       | 349,0         | 337,9   | 338,3   | 327,2   | 318,6   | 310,1   | 309,9   | 289,6   |
| Frutos, algas, produtos hortícolas               | Amendoim com chocolate             | 1685,1        | 1782,7  | 1696,9  | 1741,7  | 1715,0  | 1724,0  | 1759,2  | 1724,8  |
|  | Cacau em pó                        | 18547,1       | 18598,3 | 18576,0 | 18556,0 | 18737,6 | 18457,8 | 18368,4 | 18446,8 |
| Leite, produtos láteos...                        | Leite com chocolate                | 309,4         | 301,9   | 301,6   | 302,4   | 301,7   | 297,2   | 303,8   | 301,4   |
| Gorduras, óleos, sementes...                     | Creme para barrar                  | 1510,7        | 1489,7  | 1510,0  | 1529,7  | 1493,4  | 1475,9  | 1475,9  | 1544,4  |

|                           |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Alimentos<br>para animais | Ração | 639,0 | 633,3 | 633,6 | 623,2 | 613,4 | 665,2 | 653,9 | 621,5 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

Determinaram-se os valores médios da concentração de teobromina, o desvio padrão da repetibilidade e, a variância de repetibilidade para cada uma das matrizes, considerando os 8 ensaios realizados para cada uma delas e, registaram-se os resultados na **Tabela 25**.

**Tabela 25: Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.** Valores auxiliares necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método, nomeadamente o valor médio da concentração de teobromina ( $[\text{Teo}]$ ) nas matrizes consideradas, o desvio padrão de repetibilidade ( $s$ ) e, a variância ( $s^2$ ) de cada uma delas.

| Matriz                                | $[\text{Teo}]$<br>(mg/Kg) | $s$<br>(mg/Kg) | $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------|
| Chocolate de leite                    | 1672                      | 35             | 1197                          |
| Chocolate preto                       | 7510                      | 54             | 2901                          |
| Chocolate branco                      | 36,9                      | 2,4            | 5,9                           |
| Chocolate de leite (DPCS)             | 1225                      | 24             | 552                           |
| Mistura para bolo de chocolate (DPCS) | 2101                      | 70             | 4937                          |
| Suplemento em pó                      | 1704                      | 45             | 1985                          |
| Bebida de soja com chocolate          | 323                       | 19             | 374                           |
| Bolacha                               | 1168,0                    | 9,6            | 92                            |
| Barras de cereais                     | 738                       | 46             | 2098                          |
| Cereais                               | 292,5                     | 4,0            | 16                            |
| Amendoins com chocolate               | 1729                      | 32             | 1022                          |
| Cacau em pó                           | 18536                     | 113            | 12687                         |
| Leite com chocolate                   | 302,4                     | 3,4            | 11                            |
| Creme para barrar                     | 1504                      | 25             | 610                           |
| Ração                                 | 635                       | 17             | 297                           |

Com o intuito de avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método, a partir dos valores da variância de repetibilidade determinados anteriormente, realizou-se um teste de Cochran, como indicado na **Equação 10 (Anexo 6.1.8.1.2)**. Através da análise dos resultados verificou-se que o valor de C tabelado é igual a 0,191 ( $n = 8$ ,  $k = 15$ ) para 95 % de confiança e, o valor

de C calculado da matriz com maior variância nos resultados foi de 0,441. Deste modo, concluiu-se que a matriz cacau em pó devia ser rejeitada no estudo da repetibilidade. O mesmo cálculo foi sucessivamente realizado até que não fosse necessário eliminar mais nenhuma matriz. Assim, verificou-se que as matrizes mistura para bolo de chocolate, chocolate preto, barras de cereais, suplemento em pó, chocolate de leite e amendoins com chocolate teriam de ser rejeitadas, pela ordem indicada, de acordo com o critério referido anteriormente, tendo em consideração que o valor de k se alterava em cada teste (**Anexo 6.1.8.1.2**). Por este motivo, ao invés de se eliminarem as matrizes referidas e se determinar a repetibilidade do método para a gama de trabalho compreendida entre 20 e 20000 mg/Kg, dividiu-se a mesma em três gamas com intervalos de concentração inferiores, e, para cada uma delas, determinou-se não só a repetibilidade como também a precisão intermédia e a incerteza do método.

A primeira gama, gama baixa, consistiu no intervalo compreendido entre  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$  mg/Kg, a seguinte, gama intermédia, de  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$  mg/Kg e por último, a gama alta, de  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg. O critério de separação da gama de trabalho principal nestas gamas menores foi aquele que permitiu uma menor rejeição de matrizes para o estudo da repetibilidade e, considerou no mínimo, três matrizes por cada gama de trabalho.

Assim, para a gama de trabalho compreendida entre 20 e 500 mg/Kg, foram consideradas 4 matrizes, como ilustrado na **Tabela 26**, sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de teobromina, o desvio padrão de repetibilidade e, a variância de repetibilidade.

**Tabela 26: Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho baixa.** Valores auxiliares necessários para o estudo da repetibilidade do método na gama de trabalho baixa, compreendida entre  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$  mg/Kg, nomeadamente o valor médio da concentração de teobromina ( $[\overline{\text{Teo}}]$ ) nas matrizes consideradas nesta gama, bem como o desvio padrão da repetibilidade (s) e a variância de repetibilidade ( $s^2$ ) de cada uma delas.

| Matriz                       | $[\overline{\text{Teo}}]$<br>(mg/Kg) | s<br>(mg/Kg) | $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------------------|
| Chocolate branco             | 36,9                                 | 2,4          | 5,9                           |
| Cereal                       | 292,5                                | 4,0          | 16                            |
| Leite com chocolate          | 302,4                                | 3,4          | 11                            |
| Bebida de soja com chocolate | 323                                  | 19           | 374                           |

Após realização do teste de Cochran (**Anexo 6.1.8.2.1**), verificou-se que o valor de C calculado foi de 0,918 considerando a matriz que apresentava maior variância dos resultados, isto é, a bebida de soja com chocolate. Sabendo que o valor de C tabelado ( $n = 8, k = 4$ ) para 95 % de confiança é de 0,537, esta matriz foi rejeitada para o estudo da repetibilidade nesta gama de trabalho. Por este motivo, dado

que não foram efetuados outros ensaios recorrendo a esta matriz, concluiu-se que esta não poderia ser incluída nas matrizes acreditadas para o método.

Assim, para as restantes matrizes, através dos valores auxiliares apresentados na **Tabela 26**, determinou-se o  $\bar{s}_r$ , sendo este igual a 3,3 mg/Kg, bem como os valores do CV<sub>r</sub>, do r<sub>r</sub> e do CV<sub>r</sub> (**Anexo 6.1.8.2.2**), juntamente como os respetivos valores médios, como apresentado na **Tabela 27**.

**Tabela 27: Estudo da repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho baixa.** Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV), do limite de repetibilidade (r) e, do limite de repetibilidade relativo (CV<sub>r</sub>) obtidos para cada matriz considerada no estudo da repetibilidade na gama de trabalho baixa, de 20 ≤ [Teobromina] < 500 mg/Kg, bem como os valores médios destes três parâmetros.

| Matriz              | CV <sub>r</sub><br>(%) | r <sub>r</sub><br>(mg/Kg) | CV <sub>r</sub><br>(%) |
|---------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| Chocolate branco    | 6,6                    | 6,8                       | 18                     |
| Cereal              | 1,4                    | 11                        | 3,8                    |
| Leite com chocolate | 1,1                    | 9,5                       | 3,1                    |
| Média               | 3,0                    | 9,2                       | 8,5                    |

Deste modo concluiu-se que o método, na gama de trabalho compreendida entre 20 ≤ [Teobromina] < 500 mg/Kg apresenta, um  $\overline{CV}_r$  de 3,0 %, um  $\bar{r}_r$  de 9,2 mg/Kg e um  $\overline{CV}_r$  igual a 8,5 %. De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade pode ser considerada satisfatória se o  $\overline{CV}_r$  for inferior a 10 %. Assim, concluiu-se que a repetibilidade do método nesta gama de trabalho foi satisfatória e, os erros aleatórios observados em ensaios efetuados em condições de repetibilidade nesta gama não influenciam a confiança nos resultados obtidos. Para além disso, ainda se concluiu que valores obtidos em duplicado, em condições de repetibilidade podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 9,2 mg/Kg. Contudo, dado que a gama de trabalho ainda é extensa e o valor absoluto pode induzir em erro a eliminação de duplicados, ao invés de se considerar o  $\bar{r}_r$  como critério de aceitação de diferença entre replicados obtidos em condições de repetibilidade considerou-se o  $\overline{CV}_r$ , isto é, aceitam-se duplicados se a diferença entre eles não for superior a 8,5 % do seu valor médio.

Para a gama de trabalho compreendida entre 500 e 2000 mg/Kg, foram consideradas 8 matrizes, como ilustrado na **Tabela 28**, sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de teobromina, o desvio padrão de repetibilidade e, a variância de repetibilidade.

**Tabela 28: Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho intermédia.** Valores auxiliares necessários para o estudo da repetibilidade do método na gama intermédia, compreendida entre  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000 \text{ mg/Kg}$ , nomeadamente o valor médio da concentração de teobromina ( $\overline{[\text{Teo}]}$ ) nas matrizes consideradas nesta gama, bem como o desvio padrão de repetibilidade ( $s_r$ ) e, a variância de repetibilidade ( $s_r^2$ ) de cada uma delas.

| Matriz                    | $\overline{[\text{Teo}]}$<br>(mg/Kg) | $s_r$<br>(mg/Kg) | $s_r^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------------|
| Chocolate de Leite        | 1672                                 | 35               | 1197                            |
| Chocolate de Leite (DPCS) | 1225                                 | 24               | 552                             |
| Suplemento em pó          | 1704                                 | 45               | 1985                            |
| Bolacha                   | 1168,0                               | 9,6              | 92                              |
| Barras cereais            | 738                                  | 46               | 2098                            |
| Amendoins com chocolate   | 1729                                 | 32               | 1022                            |
| Creme para barrar         | 1504                                 | 25               | 610                             |
| Ração                     | 635                                  | 17               | 297                             |

Após realização do teste de Cochran (**Anexo 6.1.8.3.1**), verificou-se que para a matriz que apresentava maior variância, isto é, as barras de cereais, o valor de C calculado foi de 0,267. Como o valor de C tabelado ( $n = 8, k = 8$ ) para 95 % de confiança é de 0,319, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as 8 matrizes mencionadas.

Deste modo, tal como procedido anteriormente, através dos valores auxiliares apresentados na **Tabela 28** determinou-se o  $\overline{s}_r$ , sendo este igual a 29 mg/Kg, bem como os valores do CV<sub>r</sub>, do  $r_r$  e do CV<sub>r</sub> (**Anexo 6.1.8.3.2**), bem como os respetivos valores médios, como apresentado na **Tabela 29**, para esta gama de trabalho.

**Tabela 29: Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho intermédia.** Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV<sub>r</sub>), do limite de repetibilidade ( $r_r$ ) e, do limite de repetibilidade relativo (CV<sub>r</sub>) obtidos para cada matriz considerada no estudo da precisão em condições de repetibilidade na gama de trabalho intermédia, de  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000 \text{ mg/Kg}$ , bem como os valores médios destes três parâmetros.

| Matriz                    | CV <sub>r</sub><br>(%) | $r_r$<br>(mg/Kg) | CV <sub>r</sub><br>(%) |
|---------------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Chocolate de Leite        | 2,1                    | 97               | 5,8                    |
| Chocolate de Leite (DPCS) | 1,9                    | 66               | 5,4                    |
| Suplemento em pó          | 2,6                    | 125              | 7,3                    |
| Bolacha                   | 0,82                   | 27               | 2,3                    |
| Barras cereais            | 6,2                    | 128              | 17                     |
| Amendoins com chocolate   | 1,8                    | 90               | 5,2                    |

|                   |     |    |     |
|-------------------|-----|----|-----|
| Creme para barrar | 1,6 | 69 | 4,6 |
| Ração             | 2,7 | 48 | 7,6 |
| Média             | 2,5 | 81 | 6,9 |

Deste modo concluiu-se que o método, na gama de trabalho compreendida entre  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$  mg/Kg apresentava um  $\overline{CV}_r$  de 2,5 %, um  $\bar{r}_r$  de 81 mg/Kg e um  $\overline{CVr}_r$  igual a 6,9 %. Pelos motivos referidos anteriormente, concluiu-se que a repetibilidade do método nesta gama de trabalho também é satisfatória e, como critério de aceitação de diferença entre replicados considerou-se o  $\overline{CVr}_r$ , isto é, aceitam-se duplicados obtidos em condições de repetibilidade se a diferença entre eles não for superior a 6,9 % do seu valor médio.

Por último, realizou-se o mesmo estudo para a gama de trabalho compreendida entre  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg e, para tal, foram consideradas 3 matrizes, como ilustrado na **Tabela 30**, sendo que para cada uma delas foi determinado o valor médio da concentração de teobromina, o desvio padrão de repetibilidade e, a variância de repetibilidade.

**Tabela 30: Valores auxiliares para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho alta.** Valores auxiliares necessários para o estudo da repetibilidade do método na gama de trabalho alta, compreendida entre  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg, nomeadamente o valor médio da concentração de teobromina ( $[\overline{\text{Teo}}]$ ) nas matrizes consideradas nesta gama, bem como o desvio padrão de repetibilidade (s) e, a variância de repetibilidade ( $s^2$ ) de cada uma delas.

| Matriz                                | $[\overline{\text{Teo}}]$<br>(mg/Kg) | s<br>(mg/Kg) | $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------------------|
| Chocolate preto                       | 7510                                 | 54           | 2901                          |
| Mistura para bolo de chocolate (DPCS) | 2101                                 | 70           | 4937                          |
| Cacau em pó                           | 18536                                | 113          | 12687                         |

Tal como realizado para as gamas anteriores, aplicou-se o teste de Cochran (**Anexo 6.1.8.4.1**) para a matriz que apresentava maior variância, isto é, o cacau em pó, tendo-se verificado que o valor de C calculado foi de 0,618. Como o valor de C tabelado ( $n = 8$ ,  $k = 3$ ) para 95 % de confiança é de 0,653, concluiu-se que esta matriz não devia ser rejeitada para o estudo da repetibilidade e, como tal, foram consideradas as matrizes cacau em pó, chocolate preto e mistura para bolo de chocolate para o estudo desta gama de trabalho.

De seguida, com base nos valores apresentados na **Tabela 30** determinou-se o  $\bar{s}_r$ , sendo este igual a 79 mg/Kg, bem como os valores do  $CV_r$ , do  $r_r$  e do  $CVr_r$  (**Anexo 6.1.8.4.2**), e, os respetivos valores médios, como apresentado na **Tabela 31**, considerando esta gama de trabalho.

**Tabela 31: Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina na gama de trabalho alta.** Valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV), do limite de repetibilidade ( $r_r$ ) e, do limite de repetibilidade relativo (CVR) obtidos para cada matriz considerada no estudo da precisão em condições de repetibilidade na gama de trabalho alta, de  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg, bem como os valores médios destes três parâmetros.

| Matriz                                | CV.<br>(%) | $r_r$<br>(mg/Kg) | CVR.<br>(%) |
|---------------------------------------|------------|------------------|-------------|
| Chocolate preto                       | 0,72       | 151              | 2,0         |
| Mistura para bolo de chocolate (DPCS) | 3,3        | 197              | 9,4         |
| Cacau em pó                           | 0,61       | 315              | 1,7         |
| Média                                 | 1,6        | 221              | 4,4         |

Desta forma concluiu-se que o método, na gama de trabalho compreendida entre  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg apresentava um  $\overline{CV}_r$  de 1,6 %, um  $\bar{r}_r$  de 221 mg/Kg e um  $\overline{CVR}_r$  igual a 4,4 %. Pelos motivos referidos anteriormente, constatou-se que a repetibilidade do método nesta gama de trabalho também é satisfatória e, como critério de aceitação de diferença entre replicados obtidos em condições de repetibilidade considerou-se o  $\overline{CVR}_r$ , ou seja, aceitam-se duplicados obtidos em condições de repetibilidade nesta gama de concentração se a diferença entre eles não for superior a 4,4 % do seu valor médio.

Em suma, os valores médios do  $\bar{s}_r$ , do  $\overline{CV}_r$ , do  $\bar{r}_r$  e, do  $\overline{CVR}_r$  obtidos para as três gamas de trabalho consideradas encontram-se resumidos na **Tabela 32**.

**Tabela 32: Estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina em todas as gamas de trabalho.** Valores médios do desvio padrão de repetibilidade ( $\bar{s}_r$ ), do coeficiente de variação de repetibilidade ( $\overline{CV}_r$ ), do limite de repetibilidade ( $\bar{r}_r$ ) e, do limite de repetibilidade relativo ( $\overline{CVR}_r$ ), obtidos para cada gama de trabalho considerada no estudo da precisão em condições de repetibilidade.

| Gama de trabalho<br>(mg/Kg)             | $\bar{s}_r$<br>(mg/Kg) | $\overline{CV}_r$<br>(%) | $\bar{r}_r$<br>(mg/Kg) | $\overline{CVR}_r$<br>(%) |
|---|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|
| $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$     | 3,3                    | 3,0                      | 9,2                    | 8,5                       |
| $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$   | 29                     | 2,5                      | 81                     | 6,9                       |
| $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$ | 79                     | 1,6                      | 221                    | 4,4                       |

Através dos resultados apresentados **Tabela 32**, é possível constatar que à medida que a gama de concentração de teobromina aumenta, o  $\overline{CV}_r$  e o  $\overline{CVR}_r$  diminuem, enquanto o  $\bar{s}_r$  e o  $\bar{r}_r$  aumentam. Contudo é importante avaliar se a diminuição dos  $\overline{CV}_r$  é estatisticamente significativa e, para tal, realizou-se o teste ANOVA de fator único. Neste teste, a  $H_0$  considera que não existem diferenças significativas



entre os  $\overline{CV}_r$  determinados para cada gama de trabalho, isto é, que  $H_0: \overline{CV}_r1 = \overline{CV}_r2 = \overline{CV}_r3$ . Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 33**.

**Tabela 33: Informações retiradas da ANOVA de fator único para o estudo da precisão em condições de repetibilidade do método de quantificação de teobromina.** Resultados obtidos através da realização de uma ANOVA de fator único para comparação dos coeficientes de variação de repetibilidade obtidos para cada uma das gamas de trabalho.

| Fontes de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Dentro dos grupos  | 42                 | 11                 | 3,8            |
| Entre grupos       | 3,3                | 2                  | 1,7            |
| Total              | 45                 | 13                 | —————          |

Assim, considerando os resultados apresentados, verificou-se que o valor de F calculado foi de 0,44 e o valor de F indicado na tabela F para h-1 G.L no numerador e h(n-1) G.L no denominador e, 95 % de confiança é de 3,98. Como o valor de F calculado foi inferior ao valor de F tabelado, concluiu-se que a  $H_0$  não deve ser rejeitada. Por este motivo, os  $\overline{CV}_r$  determinados para cada uma das gamas de trabalho não diferem significativamente entre si. Isto significa que, apesar de haver uma diminuição nos  $\overline{CV}_r$  à medida que a gama de concentração de teobromina aumenta, esta diminuição não é estatisticamente significativa, o que indica que todas as gamas de trabalho sofrem a mesma influência de erros aleatórios. Ainda assim, como estes valores são inferiores a 10 %, concluiu-se que os desvios observados em análise efetuadas em condições de repetibilidade não afetam a confiança nos resultados produzidos.

Para além disso, é de realçar que o valor do  $\overline{CV}_r$  não deve ser superior a 20 % uma vez que se trata de um coeficiente de variação do limite de repetibilidade. Esta condição foi verificada em todas as gamas de trabalho, logo os valores do  $\overline{CV}_r$  são satisfatórios.

### 3.1.5.2 Precisão em condições de precisão intermédia

Como referido anteriormente, a precisão do método também pode ser expressa em condições de precisão intermédia, isto é, obtida em análises realizadas nas mesmas condições experimentais, nomeadamente, com mesmo o analista e equipamento, contudo em dias diferentes.

Para avaliar este parâmetro de desempenho, foram recolhidos um total de 299 resultados da análise de amostras pertencentes aos 7 grupos de famílias, em duplicado. Como referido anteriormente, a gama de trabalho foi dividida em três gamas com intervalos de concentração menores e, como tal, a precisão intermédia foi calculada para cada uma destas gamas de trabalho, tal como foi efetuado para o estudo em condições de repetibilidade.

Após rejeição de duplicados atendendo ao critério do  $\overline{CV}_{R_r}$ , consideraram-se para o estudo da precisão intermédia na gama de trabalho baixa, compreendida entre 20 e 500 mg/Kg, os resultados obtidos para 50 amostras em duplicado (**Anexo 6.1.9.1.1**). A partir dos mesmos, determinou-se o valor médio para cada um dos duplicados, bem como o quadrado da diferença entre eles. Deste modo, foi possível determinar o valor do  $s_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sendo este igual a 5,2 mg/Kg. Recorrendo ao valor médio das médias dos duplicados, que equivale a 256,8 mg/Kg, e ao  $s_{PI}$  determinou-se o valor do  $CV_{PI}$ , de acordo com a **Equação 58**, sendo este igual a 2,0 % (**Anexo 6.1.9.1.2**). A partir deste, calculou-se o valor do  $CV_{R_{PI}}$ , como indicado na **Equação 57**, que equivaleu a 5,7 % (**Anexo 6.1.9.1.2**). De acordo com o definido pelo laboratório, a precisão intermédia é considerada satisfatória se o  $CV_{PI}$  for inferior a 10 %. Assim, concluiu-se que a precisão intermédia do método nesta gama de trabalho é satisfatória. Concluiu-se ainda que valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 5,7 % do seu valor médio.

Para a gama de trabalho intermédia, compreendida entre 500 e 2000 mg/Kg, após rejeição de duplicados atendendo ao critério do  $\overline{CV}_{R_r}$  neste intervalo, consideraram-se para o estudo da precisão intermédia 159 amostras em duplicado (**Anexo 6.1.9.2.1**). Tal como referido para a gama de trabalho baixa, determinou-se o valor médio dos valores da concentração de teobromina nestas amostras, juntamente, com o quadrado da diferença entre duplicados. De seguida, determinou-se o valor do  $s_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sendo este igual a 23 mg/Kg. A partir deste valor, bem como do valor médio das médias dos duplicados, que correspondeu a 1283 mg/Kg, determinou-se o  $CV_{PI}$ , de acordo com a **Equação 58**, sendo este igual a 1,8 % (**Anexo 6.1.9.2.2**). Por fim, calculou-se o valor do  $CV_{R_{PI}}$ , como indicado na **Equação 57**, que equivaleu a 5,0 % (**Anexo 6.1.9.2.2**). Uma vez mais, de acordo com o critério definido pelo laboratório, referido anteriormente, a precisão intermédia é considerada satisfatória. Concluiu-se que os valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra nesta gama de trabalho podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 5,0 % do seu valor médio.

Por último, para a gama de trabalho alta,  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg, rejeitaram-se as amostras em duplicado atendendo ao critério do  $\overline{CV}_{R_r}$  neste intervalo, e, deste modo, foram consideradas para o estudo da precisão intermédia neste intervalo 90 amostras em duplicado (**Anexo 6.1.9.3.1**). A partir destes valores, determinou-se o valor médio da concentração de teobromina nestas amostras, bem como, o quadrado da diferença entre duplicados. De seguida, determinou-se o valor do  $s_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sendo este igual a 90 mg/Kg. A partir deste valor, bem como do valor médio das médias dos duplicados, que equivale a 5738 mg/Kg, determinou-se o  $CV_{PI}$ , de acordo com a **Equação 58**, sendo este igual a 1,6 % (**Anexo 6.1.9.3.2**). Por fim, calculou-se o valor do  $CV_{R_{PI}}$ , como

ilustrado na **Equação 57**, que equivale a 4,4 % (**Anexo 6.1.9.3.2**). Assim, de acordo com o estipulado pelo laboratório, a precisão intermédia é considerada satisfatória se o  $CV_{PI}$  for inferior a 10 %, e, como tal se verificou, concluiu-se que o resultado obtido foi satisfatório. Constatou-se ainda que valores obtidos em condições de precisão intermédia para a mesma amostra nesta gama de trabalho podem ser aceites se a diferença entre eles não exceder os 4,4 % do seu valor médio.

Na **Tabela 34** encontram-se sumarizados os valores do  $s_{PI}$ , do  $CV_{PI}$  e do  $CV_{rPI}$  obtidos para as três gamas de trabalho consideradas.

**Tabela 34: Estudo da precisão em condições de precisão intermédia do método de quantificação de teobromina.** Valores do desvio padrão da precisão intermédia ( $s_{PI}$ ), do coeficiente de variação de precisão intermédia ( $CV_{PI}$ ) e, do limite de precisão intermédia relativo ( $CV_{rPI}$ ) obtidos para cada gama de trabalho considerada no estudo da precisão em condições de precisão intermédia.

| Gama de trabalho<br>(mg/Kg)             | $s_{PI}$<br>(mg/Kg) | $CV_{PI}$<br>(%) | $CV_{rPI}$<br>(%) |
|---|---------------------|------------------|-------------------|
| $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$     | 5,2                 | 2,0              | 5,7               |
| $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$   | 23                  | 1,8              | 5,0               |
| $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$ | 90                  | 1,6              | 4,4               |

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 34**, foi possível constatar que à medida que a gama de concentração de teobromina aumenta, o  $CV_{PI}$  e o  $CV_{rPI}$  diminuem, enquanto o  $s_{PI}$  aumenta. Esta evidência foi igualmente observada no estudo da repetibilidade. Como os  $CV_{PI}$  são inferiores a 10 %, foi possível concluir que os erros aleatórios observados em análises efetuadas em condições de precisão intermédia não afetam a confiança nos resultados produzidos.

Para além disso, é de realçar que o valor do  $CV_{rPI}$  não deve exceder os 20 % uma vez que se trata de um coeficiente de variação do limite de precisão intermédia. Esta condição foi verificada em todas as gamas de trabalho, logo os valores do  $CV_{rPI}$  podem ser aceites.

Por último, encontram-se resumidos na **Tabela 35**, os valores dos  $\overline{CV}_r$  e  $CV_{PI}$  determinados para cada uma das gamas de trabalho consideradas.

**Tabela 35: Comparação da precisão obtida em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia do método de quantificação de teobromina.** Valores do coeficiente de variação de precisão intermédia ( $CV_{PI}$ ) e, do coeficiente de variação de repetibilidade médio ( $\overline{CV}_{R_r}$ ) obtidos para cada uma das gamas de trabalho.

| Gama de trabalho<br>(mg/Kg)             | $\overline{CV}_{R_r}$<br>(%) | $CV_{PI}$<br>(%) |
|---|------------------------------|------------------|
| $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$     | 3,0                          | 2,0              |
| $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$   | 2,5                          | 1,8              |
| $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$ | 1,6                          | 1,6              |

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 35**, foi possível observar que, de um modo geral, os coeficientes de variação calculados para todas as gamas de trabalho, quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia encontram-se muito próximos e, situam-se aproximadamente em 2 %. Isto significa que apesar de as análises terem sido efetuadas em diferentes dias, observou-se a ocorrência de erros aleatórios que afetaram de igual modo os resultados produzidos, embora não tenham comprometido a confiança nos mesmos.

Genericamente, estes resultados mostram que não existe uma grande variação entre o  $\overline{CV}_{R_r}$  e o  $CV_{PI}$  dentro da mesma gama de trabalho. Isto poder-se-á ter devido ao facto de se terem considerado menor número de matrizes no estudo da repetibilidade comparativamente às estudadas na precisão intermédia. Deste modo, futuramente, seria interessante analisar mais matrizes em condições de repetibilidade de modo a verificar se esta tendência se mantém.

### 3.1.6 Justeza/veracidade

Para avaliar a justeza do método em estudo, foram recolhidos os resultados da concentração de teobromina, em mg/Kg e g/100 g, obtidos para amostras provenientes da participação em ensaios interlaboratoriais. Os resultados em questão, na forma de valor médio, encontram-se apresentados na **Tabela 36**, juntamente com os valores de concentração de teobromina de referência para cada amostra, a partir dos quais foi possível determinar os valores do desvio padrão, do *z-score* (**Anexo 6.1.10.1**) e do *bias* relativo (**Anexo 6.1.10.2**), em percentagem, recorrendo às **Equações 2, 14 e 63**, respetivamente.

**Tabela 36: Estudo da justeza do método de quantificação de teobromina através da participação em ensaios interlaboratoriais.** Valores médios obtidos pelo laboratório ( $[\text{Teo}]_{\text{obs}}$ ) para a concentração de teobromina em amostras analisadas em ensaios interlaboratoriais, juntamente com o valor de referência da concentração de teobromina nessas amostras ( $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$ ). A partir destes, determinaram-se os valores do desvio padrão ( $s$ ), do  $z$ -score e do *bias* relativo. O  $n$  corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio interlaboratorial.

| Matriz                                 | $[\text{Teo}]_{\text{obs}}$ | $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$ | $n$ | $s$   | $z$ -score | <i>bias</i> relativo (%) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----|-------|------------|--------------------------|
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 1910                        | 1775                        | 38  | 92    | 1,47       | 8                        |
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 1920                        | 1775                        | 38  | 92    | 1,57       | 8                        |
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 1270                        | 1203                        | 38  | 66    | 1,01       | 6                        |
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 1230                        | 1203                        | 38  | 66    | 0,41       | 2                        |
| Chocolate de leite (g/100 g)           | 0,18                        | 0,16                        | 9   | 0,017 | 1,18       | 13                       |
| Chocolate de leite (g/100 g)           | 0,17                        | 0,16                        | 9   | 0,017 | 0,58       | 6                        |
| Cacau em pó (g/100 g)                  | 1,73                        | 1,83                        | 9   | 0,20  | -0,50      | 5                        |
| Cacau em pó (g/100 g)                  | 1,75                        | 1,83                        | 9   | 0,20  | -0,40      | 4                        |
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 2050                        | 2154                        | 37  | 109   | -0,96      | 5                        |
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 2010                        | 2154                        | 37  | 109   | -1,33      | 7                        |
| Chocolate de leite (g/100 g)           | 0,12                        | 0,12                        | 10  | 0,10  | 0,00       | 0                        |
| Chocolate de leite (g/100 g)           | 0,11                        | 0,12                        | 10  | 0,01  | -1,00      | 8                        |

A partir da análise da **Tabela 36** verificou-se que o valor mínimo de  $z$ -score, em módulo, foi 0,00 e o valor máximo calculado foi 1,57. Considerando que o desempenho do laboratório é satisfatório quando o valor de  $|z\text{-score}|$  for inferior a 2, foi possível concluir que o laboratório produziu resultados aceitáveis.

Como tal, o método a ser avaliado é considerado justo, o que indica que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos. Esta observação foi reforçada com o valor de *bias* relativo médio, que correspondeu a 6 %, uma vez que, de acordo com o critério definido internamente pelo laboratório, o método é considerado justo se o valor do *bias* relativo não for superior a 10 %.

Para além dos resultados apresentados, foram ainda considerados outros resultantes da análise de dois DPCS no próprio laboratório, como ilustrado na **Tabela 37**.

**Tabela 37: Estudo da justeza do método de quantificação de teobromina através da análise de DPCS.** Valores médios obtidos pelo laboratório ( $[\overline{\text{Teo}}]_{\text{obs}}$ ) para a concentração de teobromina em DPCS, juntamente com o valor de referência da concentração de teobromina nesses materiais ( $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$ ), os limites inferior e superior de concentração de teobromina admitida pelo fabricante e, o *bias* relativo.

| Matriz                                 | $[\overline{\text{Teo}}]_{\text{obs}}$ | $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$ | Limite inferior | Limite superior | <i>Bias</i> relativo (%) |
|--|--|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|
| Mistura para bolo de chocolate (mg/Kg) | 2101                                   | 2154                        | 1937            | 2371            | 2                        |
| Chocolate de Leite (g/100 g)           | 0,12                                   | 0,12                        | 0,10            | 0,14            | 0                        |

A partir da observação da **Tabela 37** foi possível constatar que os resultados obtidos pelo laboratório, em ambos os casos, encontram-se compreendidos entre os limites inferior e superior de concentração de teobromina referidos pelo fornecedor. Quer isto dizer que, estes DPCS apresentam no seu certificado um intervalo de valores de concentração de teobromina que podem ser quantificados pelo laboratório de modo a aceitar os resultados por ele produzidos. Assim, concluiu-se que o método é justo, o que corrobora o valor de 1 % de *bias* relativo médio.

Por último, como a justeza do método também pode ser avaliada através dos resultados obtidos na realização de ensaios de recuperação, também foi considerado o resultado do ensaio de recuperação utilizando a matriz ração. Neste ensaio determinou-se que a  $\bar{R}$  do ensaio foi de 86,2 % e, como este valor se encontrava inserido no intervalo de R admitido (80 - 120 %), o método é considerado justo.

### 3.1.7 Estimativa da incerteza do método

De modo a que todos os resultados obtidos pelo método analítico possam ter a mesma incerteza relativa associada, esta foi estimada recorrendo a dados de validação e de controlo de qualidade. Assim, pretendeu-se estimar a incerteza do método combinando os dados obtidos no estudo da precisão e da justeza, como ilustrado pela **Equação 78**. Contudo, é de destacar que este parâmetro de desempenho foi calculado separadamente para cada uma das gamas de trabalho consideradas.

#### 3.1.7.1 Estimativa da incerteza para a gama de trabalho baixa

Para a gama de trabalho baixa,  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$  mg/Kg, determinou-se a componente da incerteza associada à precisão do método, considerando os dados do estudo da precisão intermédia, uma vez que mimetizam as condições de rotina no laboratório. Assim, para esta gama, considerou-se o  $CV_{\text{PI}}$  de 2,0 %, sendo portanto a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  igual a 2,0 %, de acordo com a **Equação 80 (Anexo 6.1.11.1.1)**.

Para o cálculo da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , (Anexo 6.1.11.1.2) considerou-se o resultado obtido na realização de um ensaio de recuperação utilizando a matriz chocolate de leite e, aplicou-se a **Equação 91**. Na realização do ensaio de recuperação, verificou-se que o valor médio da concentração de teobromina determinado pelo laboratório ( $\overline{[\text{Teo}]_{\text{obs}}}$ ) foi de 22,6 mg/Kg. Para além disso, sabe-se que o valor de referência da concentração de teobromina ( $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$ ) correspondeu a 24,6 mg/Kg. A partir destes dois valores, determinou-se o *bias* relativo, como descrito na **Equação 63**, sendo este igual a 8,1 %. Determinou-se a  $u_{\text{add}}$  de 6,0 mg/Kg de acordo com a metodologia passo-a-passo. A fortificação da amostra foi efetuada através da adição de  $0,5000 \pm 0,0005$  mL de uma solução padrão de teobromina com concentração de  $496,7 \pm 6,0$  mg/Kg e, determinou-se a  $u_{(\text{add})\text{relativa}}$ , de acordo com a **Equação 92**, sendo esta igual a 1,2 %. Foi considerada a  $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$ , de acordo com a **Equação 93**, sendo esta igual a 0,10 %. De seguida, calculou-se a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativo}}$ , como indicado na **Equação 94**, sendo que este correspondeu a 1,2 %. Por fim, calculou-se a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  sendo esta igual a 8,2 %.

Deste modo, calculou-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, que correspondeu a 8,5 % (Anexo 6.1.11.1.3). Como tal, a  $U$  de acordo com a **Equação 65** desta gama de trabalho foi de 17 % (Anexo 6.1.11.1.3). No âmbito laboratorial, a incerteza do método pode ser considerada aceitável se não exceder os 20 %. Por este motivo, a metodologia aplicada pode ser aceite para estimar a incerteza do método nesta gama de trabalho.

Na **Tabela 38** encontram-se resumidas as variáveis intermédias calculadas para estimar a incerteza expandida na gama de trabalho baixa, bem como, os valores necessários para o seu cálculo.

**Tabela 38: Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho baixa do método de quantificação de teobromina.** Valores auxiliares necessários para determinar a incerteza expandida na gama de trabalho baixa, nomeadamente as componentes da precisão e da justeza.

| Componente | Variável                               | Valor  | Unidades |
|------------|--|--------|----------|
| Precisão   | $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$ | 2,0    | %        |
|            | $\overline{[\text{Teo}]_{\text{obs}}}$ | 22,6   | mg/Kg    |
|            | $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$            | 24,6   | mg/Kg    |
|            | <i>bias</i> relativo                   | 8,1    | %        |
| Justeza    | $u_{\text{add}}$                       | 6,0    | mg/Kg    |
|            | $C_{\text{add}}$                       | 496,7  | mg/Kg    |
|            | $u_{(\text{add})\text{relativa}}$      | 1,2    | %        |
|            | $u_{V\text{add}}$                      | 0,0005 | mL       |

|                     |   |        |    |
|---------------------|---|--------|----|
|                     | $V_{\text{add}}$                            | 0,5000 | mL |
|                     | $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$           | 0,10   | %  |
|                     | $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativo}}$ | 1,2    | %  |
|                     | $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$       | 8,2    | %  |
| Incerteza combinada | $u_c(y)$                                    | 8,5    | %  |
| Incerteza expandida | $U$   | 17     | %  |

### 3.1.7.2 Estimativa da incerteza para a gama de trabalho intermédia

Para estimar a incerteza da gama de trabalho intermédia,  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$  mg/Kg, procedeu-se de igual modo e determinou-se a componente da incerteza associada à precisão intermédia do método. Deste modo, para esta gama, verificou-se que o  $CV_{\text{PI}}$  foi de 1,8 %, o que significa que, de acordo com a **Equação 80**, que a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  equivaleu a 1,8 % (**Anexo 6.1.11.2.1**).

Para o cálculo da  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , consideraram-se os resultados obtidos na análise de um MR e os resultados obtidos na participação em ensaios interlaboratoriais.

Considerando a análise de um MR, a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  foi calculada de acordo com a **Equação 84** (**Anexo 6.1.11.2.2**). Para tal, inicialmente, analisaram-se oito replicados de uma amostra de chocolate de leite que continha uma  $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$  de 1200 mg/Kg e, determinou-se a sua  $[\overline{\text{Teo}}]_{\text{obs}}$  que equivaleu a 1225 mg/Kg. A partir destes valores, determinou-se o *bias* relativo como indicado na **Equação 63**, sendo este igual a 2,1 %. Para além disso, sabe-se que o UCL e o LCL deste MR equivalem a 1400 mg/Kg e 1100 mg/Kg, respetivamente e, deste modo, calculou-se a  $u_{C_{\text{ref}}}$  como indicado na **Equação 81**, sendo esta igual a 75 mg/Kg. Contudo, este valor deve ser apresentado na forma relativa para poder ser combinado e, por este motivo, determinou-se a  $u_{(C_{\text{ref}})\text{relativa}}$  como ilustrado na **Equação 82**, sendo esta de 6,3 %. Por último, foi ainda considerado o  $s_{\text{bias}}$  dado pela **Equação 2**, que foi de 24 mg/Kg. Este valor também deve ser apresentado na forma relativa, isto é,  $s_{(\text{bias})\text{relativo}}$  dado pela **Equação 83**, que foi de 1,9 %. Assim, dado que todas as variáveis se encontram na forma relativa, foram combinadas como indicado na **Equação 84** e, concluiu-se que a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  foi de 6,6 %.

Considerando os resultados obtidos na participação em oito ensaios interlaboratoriais, a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  foi calculada de acordo com a **Equação 85** (**Anexo 6.1.11.2.3**). Assim, para calcular o  $\text{RMS}_{(\text{bias})\text{relativa}}$  como descrito na **Equação 86**, calculou-se, para cada ensaio realizado o *bias* relativo como indicado na **Equação 63** e, sabendo que se considerou a participação em oito ensaios interlaboratoriais, a  $\text{RMS}_{(\text{bias})\text{relativa}}$  foi de 7,3 %. Para o cálculo da  $u_{(C_{\text{ref}})\text{relativa}}$ , como indicado na



**Equação 89**, considerou-se  $s_{r0}$  sendo que este valor foi reportado pela entidade organizadora do ensaio. No entanto, foi necessário converter estes valores para a forma relativa, isto é,  $s_{(ro)relativo}$  como indicado na **Equação 87** e, determinou-se o seu valor médio, como indicado na **Equação 88**, sendo este de 5,4 %. Sabe-se que  $\bar{P}$  correspondeu a 24 participantes e, por este motivo, a  $u_{(Cref)relativa}$  foi de 1,4 %. Assim, calculou-se a  $u_{(justeza)relativa}$  que foi de 7,4 %.

Dado que a incerteza associada à precisão foi a mesma, a incerteza desta gama de trabalho encontra-se dependente da incerteza associada à justeza. Como esta componente foi maior para os resultados obtidos na participação em ensaios interlaboratoriais, para o cálculo das incertezas combinada e expandida desta gama de trabalho foi considerada a componente da justeza calculada na participação dos ensaios interlaboratoriais. Assim, calculou-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, que correspondeu a 7,6 % (**Anexo 6.1.11.2.4**). Como tal, a  $U$  desta gama de trabalho foi de 15 % (**Anexo 6.1.11.2.4**). É ainda de realçar que a componente associada à justeza foi aquela que apresentou maior contribuição para a estimativa da incerteza nesta gama de trabalho.

Na **Tabela 39** encontram-se resumidas as variáveis intermédias calculadas para estimar a incerteza expandida na gama de trabalho intermédia.

**Tabela 39: Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho intermédia do método de quantificação de teobromina.** Valores auxiliares necessários para determinar a incerteza expandida na gama de trabalho intermédia, nomeadamente a componente da precisão e a componente da justeza considerando a análise de um material de referência (MR) e a participação em ensaios interlaboratoriais.

| Componente                              | Variável                 | Valor | Unidades |
|---|--------------------------|-------|----------|
| Precisão                                | $u_{(precisão)relativa}$ | 1,8   | %        |
|   | $[\overline{Teo}]_{obs}$ | 1225  | mg/Kg    |
|   | $[Teo]_{ref}$            | 1200  | mg/Kg    |
|   | <i>bias</i> relativo     | 2,1   | %        |
| Justeza considerando a análise de um MR | UCL                      | 1400  | mg/Kg    |
|   | LCL                      | 1100  | mg/Kg    |
|   | $u_{Cref}$               | 75    | mg/Kg    |
|   | $u_{(Cref)relativa}$     | 6,3   | %        |
|   | $S_{bias}$               | 24    | mg/Kg    |
|   | $S(bias)relativo$        | 1,9   | %        |
|   | $u_{(justeza)relativa}$  | 6,6   | %        |
|   | $n_{EI}$                 | 8     | —        |

|   |                                   |     |   |
|---|-----------------------------------|-----|---|
| Justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais | $\sum_{i=1}^n (bias\ relativo)^2$ | 425 | % |
|   | $RMS_{(bias)relativa}$            | 7,3 | % |
|   | $\sum_{i=1}^n s_{(ro)relativo}$   | 43  | % |
|   | $\bar{s}_{(ro)relativo}$          | 5,4 | % |
|   | $\bar{P}$                         | 24  | — |
|   | $u_{(Cref)relativa}$              | 1,4 | % |
|   | $u_{(justeza)relativa}$           | 7,4 | % |
| Incerteza combinada   | $u_c(y)$                          | 7,6 | % |
| Incerteza expandida   | $U$                               | 15  | % |

### 3.1.7.3 Estimativa da incerteza para a gama de trabalho alta

Para estimar a incerteza da gama de trabalho alta, de  $2000 \leq [Teobromina] < 20000$  mg/Kg determinou-se a componente da incerteza associada à precisão intermédia do método. Deste modo, para esta gama, verificou-se que o  $CV_{R1}$  foi de 1,6 %, o que significa que, de acordo com a **Equação 80**, a  $u_{(precisão)relativa}$  equivale a 1,6 % (**Anexo 6.1.11.3.1**).

Para o cálculo da  $u_{(justeza)relativa}$ , consideraram-se os resultados obtidos na análise de um MR e os resultados obtidos na participação de quatro ensaios interlaboratoriais. Como ambas as situações foram já supracitadas, apresentaram-se os resultados obtidos na **Tabela 40 (Anexos 6.1.11.3.2 e 6.1.11.3.3, respetivamente)**.

Neste caso, a incerteza foi apresentada como sendo 12 % para majorar a incerteza calculada. Este valor teve como principal contribuição a componente da incerteza associada à justeza, calculada a partir dos resultados obtidos na participação de ensaios interlaboratoriais

**Tabela 40: Estimativa da incerteza expandida da gama de trabalho alta do método de quantificação de teobromina.** Valores auxiliares necessários para determinar a incerteza expandida da gama de trabalho alta, nomeadamente a componente da precisão e a componente da justeza considerando a análise de um material de referência (MR) e a participação em ensaios interlaboratoriais.

| Componente                              | Variável                 | Valor | Unidades |
|---|--------------------------|-------|----------|
| Precisão                                | $u_{(precisão)relativa}$ | 1,6   | %        |
| Justeza considerando a análise de um MR | $\overline{[Teo]}_{obs}$ | 2189  | mg/Kg    |
|   | $[Teo]_{ref}$            | 2154  | mg/Kg    |
|   | $bias\ relativo$         | 1,6   | %        |

|   |                                   |      |       |
|---|-----------------------------------|------|-------|
|   | UCL                               | 2371 | mg/Kg |
|   | LCL                               | 1937 | mg/Kg |
|   | $u_{Cref}$                        | 109  | mg/Kg |
|   | $u_{(Cref)relativa}$              | 5,0  | %     |
|   | $S_{bias}$                        | 70   | mg/Kg |
|   | $S_{(bias)relativo}$              | 3,2  | %     |
|   | $u_{(justeza)relativa}$           | 5,4  | %     |
|   | $n_{EI}$                          | 4    | —     |
|   | $\sum_{i=1}^n (bias\ relativo)^2$ | 117  | %     |
|   | $RMS_{(bias)relativa}$            | 5,4  | %     |
| Justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais | $\sum_{i=1}^n S_{(ro)relativo}$   | 35   | %     |
|   | $\bar{S}_{(ro)relativo}$          | 8,6  | %     |
|   | $\bar{P}$                         | 23   | —     |
|   | $u_{(Cref)relativa}$              | 2,3  | %     |
|   | $u_{(justeza)relativa}$           | 5,9  | %     |
| Incerteza combinada   | $u_c(y)$                          | 6,1  | %     |
| Incerteza expandida   | $U$                               | 12   | %     |

Na **Tabela 41** encontram-se resumidos os valores das  $U$  determinadas para cada uma das gamas de trabalho.

**Tabela 41: Estimativa da incerteza expandida do método de quantificação de teobromina em todas as gamas de trabalho.** Valores estimados para a incerteza do método em cada uma das gamas de trabalho estudadas.

| Gama de trabalho (mg/Kg)         | Incerteza (%) |
|----------------------------------|---------------|
| $20 \leq [Teobromina] < 500$     | 17            |
| $500 \leq [Teobromina] < 2000$   | 15            |
| $2000 \leq [Teobromina] < 20000$ | 12            |

A partir dos resultados apresentados, foi possível verificar que à medida que a concentração de teobromina aumenta, a incerteza do método diminuiu. Estes resultados vão ao encontro da tendência

dos valores de  $CV_{PI}$  determinados no estudo da precisão intermédia do método para cada gama de trabalho pois, como referido, espera-se que concentrações menores de teobromina suscitem maior variabilidade e, como tal, apresentam uma maior incerteza associada. De realçar que em todas as gamas de trabalho consideradas, a incerteza foi inferior a 20 %, o que, pelos critérios estabelecidos internamente, a metodologia aplicada é válida para estimar a incerteza do método ao longo de todas as gamas.

## 3.2 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio

A quantificação do teor de mercúrio num arroz integral foi realizada com o método validado no laboratório tendo-se que proceder, para o efeito, à extensão da validação desse método analítico para que possa abranger esta nova matriz. Para tal, pretende-se com este trabalho aferir se os parâmetros de desempenho do método, nomeadamente, a seletividade, a repetibilidade, a precisão intermédia, a justeza e a incerteza do método determinados para esta matriz, vão ao encontro do definido na validação do método. Para além disso, também serão apresentados alguns parâmetros determinados na validação do método analítico recorrendo a diversas matrizes, como o LDQ, a gama de trabalho, a sensibilidade e a seletividade.

Assim, foi necessário, numa fase inicial, proceder-se ao traçado das curvas de calibração.

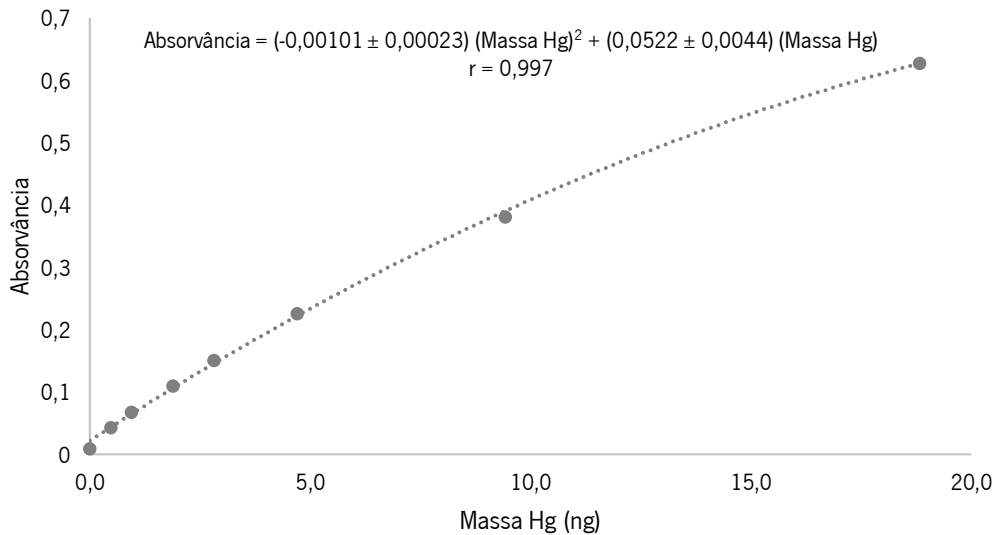
### 3.2.1 Curvas de calibração

De modo a estender a acreditação do método analítico que permite determinar o teor de Hg em amostras alimentares, para que possa ser empregue na análise da matriz arroz integral, procedeu-se à elaboração de duas curvas de calibração. Para tal, cada um dos padrões de calibração de Hg preparados a partir de duas soluções mãe de calibração com concentrações de Hg de  $9,470 \pm 0,078$  e  $94,70 \pm 0,71$  ppm (**Anexo 6.2.2.1**) foram analisados recorrendo ao DMA, obtendo-se uma resposta individual como apresentado na **Tabela 42**.

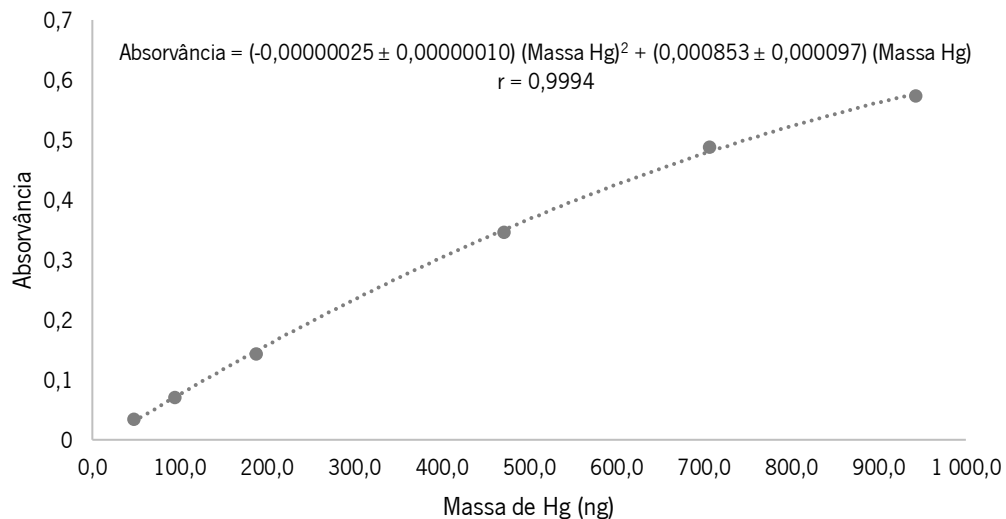
**Tabela 42: Valores para os traçados das curvas de calibração de mercúrio.** Valores das absorvâncias obtidos pelo DMA, para cada um dos padrões de calibração com uma determinada concentração de Hg ([Hg]) e, a respetiva incerteza combinada associada ( $\mu$ ). Valores das massas da toma de solução padrão (Massa da toma), bem como a massa de Hg presente em cada solução padrão de Hg (Massa de Hg). Os valores estão apresentados em três gamas de concentração de acordo com a utilização da célula de percurso ótico maior (gama baixa e intermédia) ou menor (gama alta).

| Gama               | Massa da toma (g) | [Hg] $\pm \mu$ (ppb) | Massa de Hg (ng) | Absorvância |
|--------------------|-------------------|----------------------|------------------|-------------|
| Baixa e intermédia | 0,0100            | 0 $\pm$ 0            | 0,00             | 0,0095      |
|                    | 0,0996            | 4,735 $\pm$ 0,041    | 0,47             | 0,0440      |
|                    | 0,0992            | 9,470 $\pm$ 0,079    | 0,94             | 0,0687      |
|                    | 0,0994            | 18,94 $\pm$ 0,16     | 1,9              | 0,1104      |
|                    | 0,0991            | 28,41 $\pm$ 0,24     | 2,8              | 0,1511      |
|                    | 0,0993            | 47,35 $\pm$ 0,39     | 4,7              | 0,2263      |
|                    | 0,0995            | 94,70 $\pm$ 0,72     | 9,4              | 0,3815      |
|                    | 0,0994            | 189,4 $\pm$ 1,4      | 19               | 0,6284      |
| Alta               | 0,1003            | 473,5 $\pm$ 3,6      | 47               | 0,0344      |
|                    | 0,0996            | 947,0 $\pm$ 7,1      | 94               | 0,0707      |
|                    | 0,0991            | 1894 $\pm$ 15        | 188              | 0,1431      |
|                    | 0,0995            | 4735 $\pm$ 36        | 471              | 0,3464      |
|                    | 0,0995            | 7103 $\pm$ 54        | 707              | 0,4884      |
|                    | 0,0995            | 9470 $\pm$ 72        | 942              | 0,5737      |

Considerando a massa da Hg presente em cada toma da solução padrão, bem como o sinal obtido na análise de cada uma dessas tomas, efetuou-se o traçado de duas curvas de calibração, onde se representaram no eixo das abcissas as massas de Hg presentes nas soluções padrão de Hg e na análise de uma barqueta de quartzo vazia, e, no eixo das ordenadas as absorvâncias correspondentes. Como o equipamento dispõe de dois percursos óticos, foram traçadas duas curvas de calibração (**Figuras 15 e 16**). Assim, quando a primeira célula se apresenta saturada, e o equipamento não permite quantificar corretamente da massa de Hg na amostra nesta célula, a nuvem gasosa gerada passa automaticamente para a segunda célula a qual permite quantificar valores maiores de massa de Hg. Geralmente, a primeira célula não quantifica valores de absorvância superiores a 0,8 e, quando tal ocorre, a nuvem gasosa é automaticamente transferida para a segunda célula. Deste modo, o próprio equipamento define se o resultado é obtido recorrendo à curva de calibração de gamas baixa e intermédia ou de gama alta.



**Figura 15: Representação da curva de calibração de mercúrio das gamas baixa e intermédia.** Representação gráfica dos valores das absorvâncias obtidos para a barqueta de quartzo vazia e primeiros sete padrões de calibração de Hg, em função das massas de Hg.



**Figura 16: Representação da curva de calibração de mercúrio da gama alta.** Representação gráfica dos valores das absorvâncias obtidos com os últimos seis padrões de calibração de Hg, em função das massas de Hg nos mesmos padrões.

Através da representação gráfica das curvas de calibração é possível visualizar que em ambos os casos, existe uma curvatura, sugerindo que o modelo de regressão linear não é o mais adequado. Para avaliar esta hipótese, determinou-se o  $r$  para cada regressão linear (a partir da **Equação 41**), obtendo-se os valores de 0,98 e 0,991 para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia e curva de calibração de gama alta, respetivamente. De acordo com a literatura, a linearidade da curva de calibração pode ser admitida se o valor de  $r$  calculado for superior a 0,995<sup>18</sup>. Como os valores de  $r$  calculados foram inferiores a 0,995, foi possível inferir que o modelo de regressão linear não é aquele que melhor se adequa para ajustar os resultados experimentais. Esta evidência foi reforçada pelo valor de  $r$  calculado admitindo um

modelo de regressão quadrático, como indicado na **Equação 42** sendo este igual a 0,997 e 0,9994 para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia e curva de calibração de gama alta, respetivamente.

Para além disso, após realização do teste de Mandel (**Anexo 6.2.3.1**) confirmou-se que o modelo de regressão de segundo grau era o mais adequado.

Assim, para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia obteve-se como equação do modelo de regressão quadrático  $\text{Absorv\ancia} = (-0,00101 \pm 0,00023) (\text{Massa Hg})^2 (\text{ng})^2 + (0,0522 \pm 0,0044) (\text{Massa Hg}) (\text{ng})$  e, para a curva de calibração de gama alta obteve-se uma equação do modelo de regressão quadrático dada por  $\text{Absorv\ancia} = (-0,00000025 \pm 0,00000010) (\text{Massa Hg})^2 (\text{ng})^2 + (0,000853 \pm 0,000097) (\text{Massa Hg}) (\text{ng})$ . Os valores dos parâmetros do segundo e primeiro graus foram determinados como indicado nas **Equações 32 e 33**, respetivamente.

De realçar que o DMA apresenta a curva de calibração, mas não apresenta as incertezas associadas aos parâmetros da regressão quadrática. Assim, na **Tabela 43** encontram-se apresentados os valores dos coeficientes obtidos pelo equipamento para ambas as curvas de calibração, bem como os coeficientes obtidos com o Excel, juntamente com as respetivas incertezas associadas.

**Tabela 43: Relação entre os coeficientes das curvas de calibração de mercúrio determinados pelo Excel e pelo DMA.** Valores dos coeficientes de segundo grau (c) e de primeiro grau (b) do modelo de regressão quadrático, obtidos para ambas as gamas de trabalho recorrendo ao DMA e à ferramenta informática Excel, juntamente com as incertezas associadas, bem como o erro relativo entre eles.

| Gama               | Coefficientes | DMA         | Excel                    | Erro relativo (%) |
|--------------------|---------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Baixa e intermédia | c             | -0,00100    | -0,00101 ± 0,00023       | 0,52              |
|                    | b             | 0,0520      | 0,0522 ± 0,0044          | 0,22              |
| Alta               | c             | -0,00000025 | -0,00000025 ± 0,00000010 | 0,014             |
|                    | b             | 0,000853    | 0,000853 ± 0,000097      | 0,000048          |

Deste modo, para ambas as gamas de trabalho verificou-se que os desvios observados foram extremamente baixos o que indica que os resultados não diferem estatisticamente entre si (**Anexo 6.2.3.2**). Para além disso, esta evidência também é reforçada pelo facto de os valores dos coeficientes determinados pelo DMA se encontrarem inseridos na incerteza dos coeficientes determinados pelo Excel.

Quando se procedeu à validação do método em causa, pretendeu-se avaliar se as curvas de calibração se mantinham estáveis durante mais do que um mês uma vez que o traçado das mesmas consiste num processo bastante demorado que não se revela temporalmente vantajoso em âmbito empresarial. Este estudo também permite aferir acerca da sensibilidade do método.

Assim, quando foram traçadas sete curvas de calibração, de 25/09/2019 a 14/11/2019, elaboraram-se quatro cartas de controlo de indivíduos provisórias para os coeficientes de segundo e primeiro grau de ambas as curvas de calibração. Os valores dos coeficientes de segundo e primeiro grau das sete curvas de calibração necessários para estabelecer os limites das cartas de controlo, após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.2.4.1**) encontram-se apresentados na **Tabela 44**.

**Tabela 44: Valores dos coeficientes do segundo e primeiro grau das curvas de calibração necessários para estabelecer os limites das cartas de controlo e estudo da sensibilidade do método de quantificação de mercúrio.** Valores dos coeficientes do segundo (c) e primeiro grau (b) obtidos nos traçados das curvas de calibração realizadas de 25/09/2019 a 14/11/2019, para as gamas de concentração baixa e intermédia e gama alta, necessários para estabelecer os limites das cartas de controlo de indivíduos e para estudar a sensibilidade ao longo do tempo.

| Gama               | Data       | c<br>(ng <sup>2</sup> ) | b<br>(ng <sup>1</sup> ) |
|--------------------|------------|-------------------------|-------------------------|
| Baixa e intermédia | 25/09/2019 | -0,00106                | 0,0603                  |
|                    | 26/09/2019 | -0,00116                | 0,0630                  |
|                    | 30/09/2019 | -0,00104                | 0,0607                  |
|                    | 02/10/2019 | -0,00105                | 0,0589                  |
|                    | 03/10/2019 | -0,00109                | 0,0636                  |
|                    | 14/10/2019 | -0,00125                | 0,0582                  |
|                    | 14/11/2019 | -0,00134                | 0,0640                  |
| Alta               | 25/09/2019 | -0,00000027             | 0,000951                |
|                    | 26/09/2019 | -0,00000038             | 0,001012                |
|                    | 30/09/2019 | -0,00000020             | 0,000882                |
|                    | 02/10/2019 | -0,00000042             | 0,000838                |
|                    | 03/10/2019 | -0,00000032             | 0,000961                |
|                    | 14/10/2019 | -0,00000029             | 0,000936                |
|                    | 14/11/2019 | -0,00000025             | 0,000893                |

Assim, através dos valores apresentados na **Tabela 44**, estabeleceram-se os limites e o valor alvo das cartas de controlo de indivíduos dos coeficientes da curva de calibração de gamas baixa e intermédia, sendo que estes encontram-se apresentados na **Tabela 45 (Anexo 6.2.4.1)**. Nas **Figuras 17 e 18**, encontram-se as cartas de controlo de indivíduos para o coeficiente de segundo e primeiro grau da curva de calibração de gamas baixa e intermédia, respetivamente.



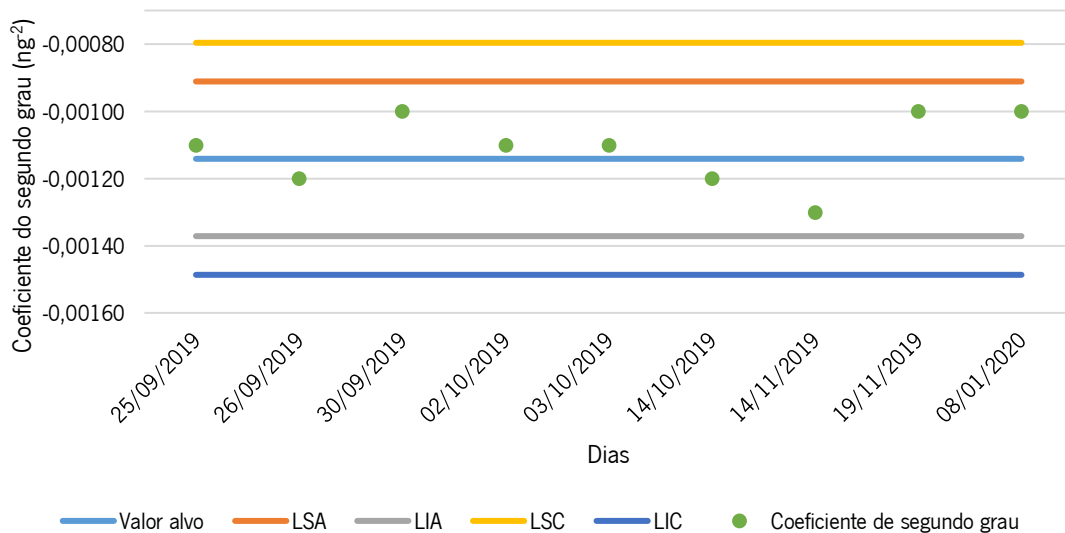
**Tabela 45: Valor alvo e limites das cartas de controlo dos coeficientes de segundo e primeiro graus da curva de calibração de gamas baixa e intermédia do método de quantificação de mercúrio.** Valor alvo, limite superior de aviso (LSA), limite inferior de aviso (LIA), limite superior de controlo (LSC) e limite inferior de controlo (LIC) das cartas de controlo de indivíduos provisórias dos coeficientes de segundo (c) e primeiro (b) da curva de calibração de gamas baixa e intermédia.

| Gama               | Coefficiente         | Valor alvo | LSA      | LIA      | LSC      | LIC      |
|--------------------|----------------------|------------|----------|----------|----------|----------|
| Baixa e intermédia | c (ng <sup>2</sup> ) | -0,00114   | -0,00091 | -0,00137 | -0,00080 | -0,00149 |
|                    | b (ng <sup>1</sup> ) | 0,0612     | 0,0659   | 0,0566   | 0,0682   | 0,0543   |

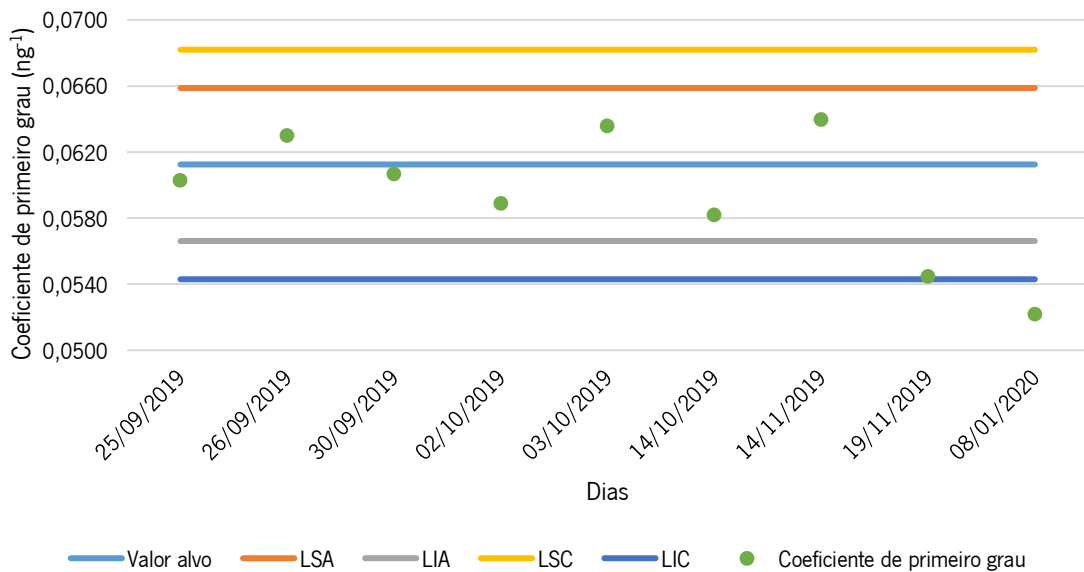
De realçar que, para além das sete curvas de calibração apresentadas, foram traçadas mais duas nos dias 19/11/2019 e 08/01/2020 e, por este motivo, estas também foram consideradas para o estudo da estabilidade dos coeficientes da curva de calibração de ambas as gamas de trabalho ao longo do tempo. Os valores dos coeficientes de segundo e primeiro graus das duas curvas de calibração encontram-se apresentados na **Tabela 46**.

**Tabela 46: Estudo da estabilidade dos coeficientes do segundo e primeiro graus das curvas de calibração de mercúrio ao longo do tempo.** Valores dos coeficientes do segundo (c) e primeiro graus (b) obtidos nos traçados das curvas de calibração realizadas a 19/11/2019 e a 08/01/2020, para as gamas de concentração baixa e intermédia e, gama alta.

| Gama               | Data       | c (ng <sup>2</sup> ) | b (ng <sup>1</sup> ) |
|--------------------|------------|----------------------|----------------------|
| Baixa e intermédia | 19/11/2019 | -0,00100             | 0,0545               |
|                    | 08/01/2020 | -0,00101             | 0,0522               |
| Alta               | 19/11/2019 | -0,00000026          | 0,000907             |
|                    | 08/01/2020 | -0,00000025          | 0,000853             |



**Figura 17: Carta de controle do coeficiente de segundo grau da curva de calibração de mercúrio para as gamas baixa e intermédia.** Carta de controle de indivíduos provisória para o controle do coeficiente de segundo grau da curva de calibração das gamas baixa e intermédia, na qual se encontram apresentados o valor alvo, os limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA, respetivamente) e, os limites superior e inferior de controle (LSC e LIC, respetivamente).



**Figura 18: Carta de controle do coeficiente de primeiro grau da curva de calibração de mercúrio para as gamas baixa e intermédia.** Carta de controle provisória de indivíduos para o controle do coeficiente de primeiro grau da curva de calibração das gamas baixa e intermédia, na qual se encontram apresentados o valor alvo, os limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA, respetivamente) e, os limites superior e inferior de controle (LSC e LIC, respetivamente).

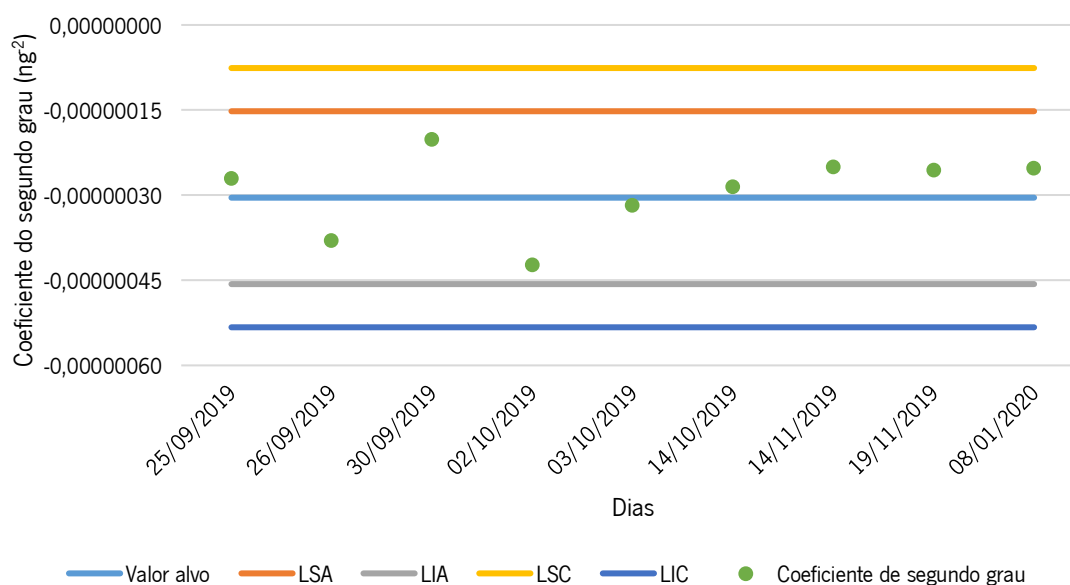
Através da observação da carta de controle de indivíduos para o coeficiente do segundo grau da curva de calibração de gamas baixa e intermédia, verificou-se que durante cerca de três meses, este parâmetro manteve-se estável uma vez que os critérios de aceitação de processo controlado foram cumpridos. Contudo, o mesmo não se verificou para o coeficiente do primeiro grau da mesma curva de calibração. Neste caso, observou-se que a curva de calibração de gamas baixa e intermédia traçada a 08/01/2020

apresentou um coeficiente de primeiro grau que se encontrava fora do LIC. Como tal aconteceu, apesar de a curva de calibração ter sido aceite, não se efetuaram mais análises. Assim, foi necessária uma intervenção técnica externa do equipamento que evidenciou que a amálgama de ouro se encontrava saturada e, por este motivo foi substituída. Para além disso, é de realçar que os limites desta carta de controlo são provisórios e podem vir a ser alterados no futuro quando se tiverem efetuado as vinte curvas de calibração.

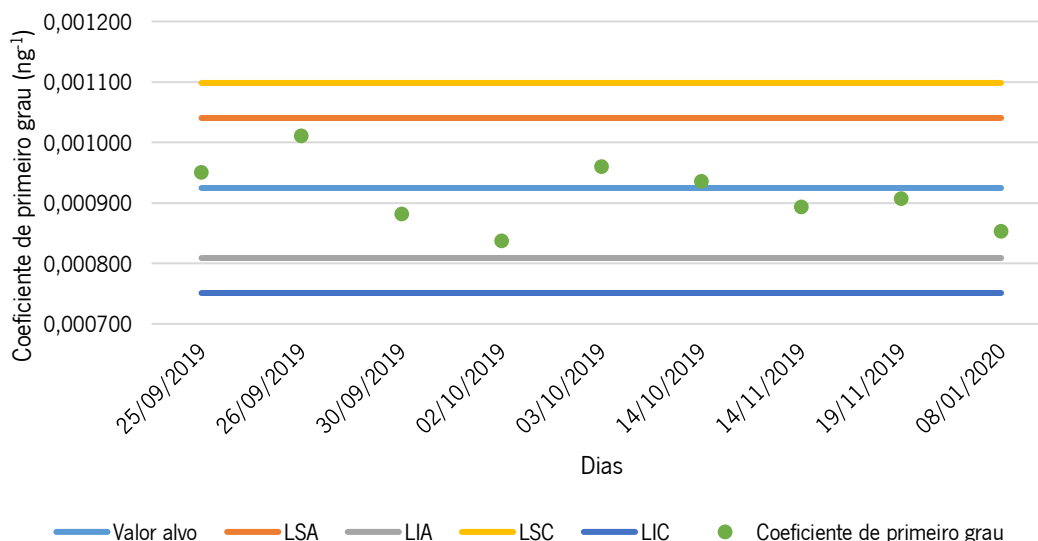
Relativamente à curva de calibração de gama alta, através dos valores apresentados na **Tabela 44**, estabeleceram-se os limites e o valor alvo das cartas de controlo de indivíduos dos coeficientes desta curva de calibração, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 47 (Anexo 6.2.4.1)**. Nas **Figuras 19 e 20**, encontram-se as cartas de controlo de indivíduos para o coeficiente de segundo e primeiro graus da curva de calibração de gama alta, respetivamente.

**Tabela 47: Valor alvo e limites das cartas de controlo dos coeficientes de segundo e primeiro graus da curva de calibração de gama alta do método de quantificação de mercúrio.** Valor alvo, limite superior de aviso (LSA), limite inferior de aviso (LIA), limite superior de controlo (LSC) e limite inferior de controlo (LIC) das cartas de controlo de indivíduos provisórias dos coeficientes de segundo (c) e primeiro (b) da curva de calibração de gama alta.

| Gama | Coefficiente         | Valor alvo  | LSA         | LIA         | LSC          | LIC         |
|------|----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| Alta | c (ng <sup>2</sup> ) | -0,00000030 | -0,00000015 | -0,00000046 | -0,000000076 | -0,00000053 |
|      | b (ng <sup>1</sup> ) | 0,000925    | 0,001040    | 0,000809    | 0,001098     | 0,000751    |



**Figura 19: Carta de controlo do coeficiente de segundo grau da curva de calibração de mercúrio para a gama alta.** Carta de controlo provisória de indivíduos para o controlo do coeficiente de segundo grau da curva de calibração da gama alta, na qual se encontram apresentados o valor alvo, os limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA, respetivamente) e, os limites superior e inferior de controlo (LSC e LIC, respetivamente).



**Figura 20: Carta de controle do coeficiente de primeiro grau da curva de calibração de mercúrio para a gama alta.** Carta de controle provisória de indivíduos para o controle do coeficiente de primeiro grau da segunda curva de calibração, na qual se encontram apresentados o valor alvo, os limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA, respetivamente) e, os limites superior e inferior de controlo (LSC e LIC, respetivamente).

Relativamente aos coeficientes da curva de calibração de gama alta, verificou-se que tanto o coeficiente de segundo grau, como o coeficiente de primeiro grau mantiveram-se estáveis ao longo de cerca de três meses, uma vez que os critérios de aceitação de processo controlado foram cumpridos. Por estes motivos, internamente decidiu-se que as curvas de calibração do Hg poderiam ser utilizadas durante três meses, caso não se observasse nenhuma anomalia no controlo do processo.

Para além disso, determinou-se o valor médio de cada coeficiente obtido para cada uma das curvas de calibração e o respetivo desvio padrão, considerando as nove curvas de calibração efetuadas, como ilustrado na **Tabela 48**.

**Tabela 48: Estudo da sensibilidade das gamas de trabalho do método de quantificação de mercúrio ao longo do tempo.** Valores médios dos coeficientes do segundo ( $\bar{c}$ ) e primeiro graus ( $\bar{b}$ ), com o desvio padrão associado ( $s$ ) obtidos nos traçados das curvas de calibração realizadas a 19/11/2019 e a 08/01/2020, para as gamas de concentração baixa e intermédia e, gama alta, bem como os valores dos coeficientes de variação (CV).

| Gama               | $\bar{c} \pm s$<br>(ng <sup>2</sup> ) | $\bar{b} \pm s$<br>(ng <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---------------------------------------|--|
| Baixa e intermédia | -0,00111 ± 0,00012                    | 0,0595 ± 0,0041                        |
| CV (%)             | 10                                    | 6,8                                    |
| Alta               | -0,000000293 ± 0,000000069            | 0,000915 ± 0,000056                    |
| CV (%)             | 24                                    | 6,1                                    |

Deste modo constatou-se para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia que o  $\bar{c}$  foi  $-0,00111 \text{ ng}^2$  e o desvio padrão foi  $0,00012 \text{ ng}^2$  e, o  $\bar{b}$  foi  $0,0595 \text{ ng}^1$  e o desvio padrão foi  $0,0041 \text{ ng}^1$ . Deste modo, como apresentado na **Tabela 48**, através destes dois valores determinou-se o CV dos coeficientes obtidos para esta curva de calibração, de acordo com a **Equação 51**, que equivaleram a 10 e, 6,8 %, para o  $\bar{c}$  e para o  $\bar{b}$ , respetivamente (**Anexo 6.2.4.2**). De acordo com o definido no laboratório de análise, os resultados são satisfatórios se o CV calculado for inferior a 10 %. Como este critério foi observado, concluiu-se que a sensibilidade da curva de calibração de gamas baixa e intermédia não sofreu alterações significativas ao longo do tempo.

Relativamente à curva de calibração de gama alta, o  $\bar{c}$  foi  $-0,000000293 \text{ ng}^2$  e o desvio padrão foi  $0,000000069 \text{ ng}^2$  e o  $\bar{b}$  foi  $0,000915 \text{ ng}^1$  e o  $s$  foi  $0,000055 \text{ ng}^1$ . Deste modo, como apresentado na **Tabela 48**, recorrendo a estes dois valores determinou-se o CV dos coeficientes obtidos para a segunda curva de calibração, de acordo com a **Equação 51**, que equivaleram a 24 e, 6,1 %, para o  $\bar{c}$  e para o  $\bar{b}$ , respetivamente (**Anexo 6.2.4.2**). De acordo com o critério referido anteriormente, concluiu-se que o coeficiente de segundo grau da curva de calibração de gama alta sofreu alterações significativas ao longo do tempo. Contudo, esta evidência vai ao encontro do esperado uma vez que à medida que o valor médio tende para zero, o CV é sensível a pequenas variações deste valor.

Deste modo, recorrendo aos valores médios dos coeficientes calculados para cada uma das curvas de calibração constatou-se que a sensibilidade da primeira curva de calibração foi dada por  $(-0,0022) (\text{Massa de Hg}) + 0,0595$  e, da segunda curva de calibração foi  $(0,00000058) (\text{Massa Hg}) + 0,000915$ . Assim, verificou-se que, a primeira curva de calibração é mais sensível do que a segunda curva de calibração. Esta evidência vai ao encontro do esperado uma vez que a primeira célula é aquela que apresenta maior percurso ótico e, como tal, deve ser mais sensível.

### 3.2.2 Limite de quantificação

Tal como referido anteriormente, o LDQ do método em causa foi determinado durante o processo de validação do mesmo. Para tal, foram realizados seis ensaios de recuperação de modo a demonstrar que o padrão de calibração com concentração de Hg igual a 10 ppb correspondia ao LDQ. Assim, selecionou-se uma matriz que se esperava que contivesse níveis baixos de Hg, como o açúcar e, efetuaram-se seis replicados da amostra. Pesaram-se, aproximadamente, 0,400 g desta amostra e, de seguida, analisaram-se os replicados recorrendo ao DMA. Posteriormente, determinou-se a concentração média de Hg nesta amostra, sendo que esta equivaleu a 1,66 ppb e, conhecida a toma de amostra em cada ensaio,

determinou-se a massa de Hg na mesma, sendo que os resultados encontram-se apresentados na **Tabela 49 (Anexo 6.2.5.1)**.

**Tabela 49: Análise de uma amostra de açúcar para o estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio.** Valores das massas da toma de amostra de açúcar (Massa da toma), do valor médio da concentração de Hg ( $\overline{[Hg]}$  amostra) determinado para a amostra e, a massa de Hg presente na amostra (Massa de Hg amostra) em cada ensaio realizado.

| Ensaio | Massa da toma (g) | $\overline{[Hg]}$ amostra (ppb) | Massa de Hg amostra (ng) |
|--------|-------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 1      | 0,3944            | 1,66                            | 0,655                    |
| 2      | 0,3930            | 1,66                            | 0,652                    |
| 3      | 0,3967            | 1,66                            | 0,659                    |
| 4      | 0,3926            | 1,66                            | 0,652                    |
| 5      | 0,3931            | 1,66                            | 0,653                    |
| 6      | 0,3946            | 1,66                            | 0,655                    |

Dado que a análise é destrutiva, isto é, a amostra é degradada durante a análise, prepararam-se seis novas barquetas contendo cerca de 0,400 g de amostra em estudo e, de seguida, fortificaram-se as mesmas com, aproximadamente, 100  $\mu$ L de uma solução de Hg com concentração de  $47,35 \pm 0,39$  ppb (**Anexo 6.2.5.2**). Os resultados da concentração de Hg em cada uma das amostras fortificadas obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 50**.

**Tabela 50: Análise de uma amostra de açúcar depois da fortificação para o estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio.** Concentração de Hg ( $[Hg]$ fortificada) em seis replicados de uma amostra de açúcar fortificada, juntamente com a massa do padrão de Hg adicionada na fortificação (Massa de padrão), a massa de Hg presente no padrão adicionado (Massa de Hg padrão) e, a massa de Hg determinada na amostra após fortificação (Massa de Hg fortificada).

| Ensaio | Massa de padrão (g) | Massa de Hg padrão (ng) | Massa de Hg fortificada (ng) | $[Hg]$ fortificada (ppb) |
|--------|---------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1      | 0,0994              | 4,71                    | 5,36                         | 11,23                    |
| 2      | 0,0989              | 4,68                    | 5,34                         | 10,25                    |
| 3      | 0,0993              | 4,70                    | 5,36                         | 10,70                    |
| 4      | 0,0988              | 4,68                    | 5,33                         | 9,91                     |
| 5      | 0,0986              | 4,67                    | 5,32                         | 10,14                    |
| 6      | 0,0989              | 4,68                    | 5,34                         | 10,04                    |

De seguida, determinou-se a concentração de Hg efetiva em cada uma das amostras fortificadas, sendo que os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 51 (Anexo 6.2.5.3)**. A partir deste

valor e, da concentração de Hg determinada nas amostras fortificadas, calculou-se a R obtida em cada um dos ensaios efetuados (Anexo 6.2.5.4), de acordo com a Equação 13, encontrando-se apresentados na Tabela 51. Por fim, calculou-se a  $\bar{R}$  do ensaio de recuperação e o respetivo desvio padrão, após realização do teste de Grubbs, sem rejeitar qualquer valor (Anexo 6.2.5.4), que equivaleu a  $95,8 \pm 4,5$  %.

**Tabela 51: Taxa de recuperação obtida no estudo do LDQ do método de quantificação de mercúrio.** Valores auxiliares necessários para a determinação da taxa de recuperação (R) obtida nos ensaios de recuperação, nomeadamente, a concentração de Hg presente na amostra após a fortificação, ([Hg]fortificada) e, a concentração efetiva de Hg calculada na amostra fortificada ([Hg]efetiva fortificada).

| Ensaio | [Hg]fortificada (ppb) | [Hg]efetiva fortificada (ppb) | R (%) |
|--------|-----------------------|-------------------------------|-------|
| 1      | 11,23                 | 10,86                         | 103,4 |
| 2      | 10,25                 | 10,85                         | 94,5  |
| 3      | 10,70                 | 10,81                         | 99,0  |
| 4      | 9,91                  | 10,85                         | 91,4  |
| 5      | 10,14                 | 10,82                         | 93,7  |
| 6      | 10,04                 | 10,82                         | 92,8  |

De acordo com a Diretiva 2001/22/CE da Comissão de 8 de março de 2001, o intervalo de R admitido para métodos que permitem quantificar o teor de Hg em géneros alimentícios é de 80 a 120 %<sup>95</sup>. Assim, como a  $\bar{R}$  calculada se encontra dentro do intervalo de R admitido, foi possível concluir que o LDQ do método corresponde à concentração de Hg de 10 ppb.

De realçar que, até aos dias de hoje ainda não foi implementado qualquer procedimento de verificação do LDQ ao longo do tempo no laboratório, contudo pretende-se cumprir este objetivo no futuro.

### 3.2.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho do método em estudo foi previamente definida pelo fabricante do equipamento. De acordo com o manual do equipamento, a gama de trabalho principal do método pode ser dividida em três gamas<sup>93</sup>. A primeira, denominada gama de trabalho baixa, permite quantificar o teor de Hg compreendido entre 0 e 100 ppb. A segunda, designada gama de trabalho intermédia, possibilita a quantificação do teor de Hg compreendido entre 100 e 200 ppb e, a última denominada gama de trabalho alta, quantifica o teor de Hg compreendido entre 200 e 10000 ppb. Assim, estas indicações sugerem que a gama de trabalho deste método vai de 0 a 10000 ppb<sup>93</sup>. Contudo, sabe-se que o valor mínimo da gama de trabalho corresponde ao LDQ, isto é, 10 ppb.

Apesar de o fabricante sugerir a divisão da gama de trabalho em três gamas foi possível definir apenas duas curvas de calibração. Por este motivo, a primeira curva de calibração permitiu estudar, simultaneamente, as gamas de trabalho baixa e intermédia, enquanto a segunda curva de calibração possibilitou o estudo da gama de trabalho alta.

Deste modo, pretendeu-se avaliar se as gamas de trabalho definidas em cada uma das curvas de calibração se encontram bem ajustadas. Considera-se que a gama de trabalho se encontra bem ajustada, caso não se observem diferenças significativas entre as variâncias das respostas obtidas para o primeiro e último padrões da respetiva gama de trabalho, uma vez que se admite que existe homogeneidade de variâncias ao longo da mesma. Para avaliar esta hipótese, realizou-se um teste F de Snedecor-Fisher.

Assim, para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia, a concentração de Hg quantificada nesta curva encontrava-se compreendida entre os 10 e os 200 ppb. Desta forma, prepararam-se dez soluções padrão de Hg com concentração de 10 ppb e dez soluções padrão de Hg com concentração de 200 ppb. De seguida, pipetaram-se 100 µL de cada uma das soluções preparadas para barquetas de quartzo, separadamente, e, de seguida, analisaram-se as mesmas, apresentando-se as respostas obtidas para cada uma das soluções, na **Tabela 52**. Contudo é de destacar que a análise efetuada para as amostras da solução com concentração de Hg de 10 ppb foi realizada em condições de repetibilidade, enquanto a análise efetuada para as soluções com concentração de Hg de 200 pb foi realizada em condições de precisão intermédia, uma vez que não foi possível efetuar as leituras no mesmo dia.

**Tabela 52: Estudo das gamas de trabalho baixa e intermédia do método de quantificação de mercúrio.** Valores auxiliares necessários para avaliar as gamas de trabalho baixa e intermédia, nomeadamente, a massa de padrão pesado para a análise (Massa da toma) bem como as absorvâncias obtidas na análise dos dez replicados do padrão de 10 ppb (Absorvância 10 ppb) e, as absorvâncias obtidas na análise dos dez replicados do padrão de 200 ppb (Absorvância 200 ppb).

| Ensaio | Massa da toma (g) | Absorvância 10 ppb | Massa da toma (g) | Absorvância 200 ppb |
|--------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| 1      | 0,0980            | 0,0734             | 0,1003            | 0,7752              |
| 2      | 0,0988            | 0,0656             | 0,1008            | 0,7436              |
| 3      | 0,0992            | 0,0711             | 0,0999            | 0,7709              |
| 4      | 0,0991            | 0,0733             | 0,1001            | 0,7439              |
| 5      | 0,1005            | 0,0642             | 0,1006            | 0,7586              |
| 6      | 0,1013            | 0,0681             | 0,1002            | 0,7819              |
| 7      | 0,1000            | 0,0713             | 0,1006            | 0,7444              |
| 8      | 0,1008            | 0,0713             | 0,1011            | 0,7588              |
| 9      | 0,1000            | 0,0647             | 0,1001            | 0,7744              |



|    |        |        |        |        |
|----|--------|--------|--------|--------|
| 10 | 0,0988 | 0,0751 | 0,1006 | 0,7659 |
|----|--------|--------|--------|--------|

Após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.2.6.1**) e, não se tendo rejeitado qualquer valor apresentado, determinou-se a variância das absorvâncias para cada uma das concentrações de Hg, de acordo com a **Equação 4**. Assim, a variância da resposta obtida para a concentração de Hg de 10 ppb equivaleu a 0,000015, enquanto para a concentração de 200 ppb correspondeu a 0,00020. Deste modo, aplicando a **Equação 6** determinou-se o valor de F sendo este igual a 13,215 (**Anexo 6.2.6.2**). Sabendo que o valor de F tabelado para n-1 G.L no numerador e no denominador (n = 10) e, 95 % de confiança é de 4,026, foi possível concluir que a  $H_0$  deste teste estatístico deve ser rejeitada e, como tal, a gama de trabalho encontra-se mal ajustada. Assim, para este caso poderia avaliar-se a possibilidade de se reduzir a gama de trabalho. Para além disso, é de realçar que como a análise da solução com concentração de Hg de 200 ppb não foi realizada em condições de repetibilidade, poderia repetir-se o procedimento nestas condições, uma vez que se espera que a variância calculada em condições de repetibilidade seja inferior à variância calculada em condições de precisão intermédia e, como tal, o valor de F calculado também poderia ser menor.

Ainda assim, face aos resultados apresentados, é possível que não exista homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho. Para testar esta hipótese, a gama de trabalho teria de ser sucessivamente reduzida de modo a demonstrar-se que a variância obtida para as respostas do primeiro e seguintes padrões da curva de calibração diferem significativamente.

No caso da curva de calibração de gama alta, a concentração de Hg quantificada nesta gama encontra-se compreendida entre 500 e 10000 ppb, pois o padrão de 500 ppb é aquele que apresenta a menor concentração de Hg para ser quantificada nesta gama. Desta forma, prepararam-se seis soluções padrão de Hg com concentração de 500 ppb e seis soluções padrão de Hg com concentração de 10000 ppb. De seguida, pipetaram-se 100  $\mu$ L de cada uma das soluções preparadas para barquetas de quartzo, separadamente, e, de seguida, analisaram-se as mesmas, apresentando-se as respostas obtidas para cada uma das soluções na **Tabela 53**. Neste caso, as análises efetuadas para ambas as soluções foram realizadas em condições de precisão intermédia. Isto sucedeu-se, pois, quando se tratam de análises na gama alta, como a concentração de Hg é elevada, a célula fica saturada e, entre análises o equipamento efetua auto-brancos para limpar a mesma, consumindo bastante tempo neste processo. No caso do padrão com concentração de Hg de 500 ppb, foram realizadas três análises por dia, enquanto no padrão de 10000 ppb só foi possível efetuar uma análise por dia. Neste último caso, quando se tentou efetuar

mais do que uma leitura, o equipamento interrompeu a análise e emitiu um aviso que indicava que não era possível continuar a mesma.

**Tabela 53: Estudo da gama de trabalho alta do método de quantificação de mercúrio.** Valores auxiliares necessários para avaliar a gama de trabalho alta do método em estudo, nomeadamente, a massa de padrão pesado para a análise (Massa da toma), bem como as absorvâncias obtidas na análise dos seis replicados do padrão de 500 ppb (Absorvância 500 ppb) e, as absorvâncias obtidas na análise dos seis replicados do padrão de 10000 ppb (Absorvância 10000 ppb).

| Ensaio | Massa da toma (g) | Absorvância 500 ppb | Massa da toma (g) | Absorvância 10000 ppb |
|--------|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 1      | 0,0982            | 0,0348              | 0,0993            | 0,6300                |
| 2      | 0,1007            | 0,0376              | 0,0994            | 0,6007                |
| 3      | 0,1008            | 0,0425              | 0,0981            | 0,5238                |
| 4      | 0,0993            | 0,0408              | 0,1011            | 0,5942                |
| 5      | 0,0999            | 0,0400              | 0,1014            | 0,6478                |
| 6      | 0,1004            | 0,0452              | 0,1004            | 0,5810                |

Após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.2.6.1**) e, aceitação de todos os valores apresentados, determinou-se a variância das respostas obtidas para cada uma das concentrações de Hg, de acordo com a **Equação 4**. Assim, a variância da resposta obtida para a concentração de Hg de 500 ppb correspondeu a 0,000013, enquanto para a concentração de 10000 ppb correspondeu a 0,0019. Deste modo, aplicando a **Equação 6** determinou-se o valor de F sendo este igual a 139,68 (**Anexo 6.2.6.2**). Como o valor de F tabelado para n-1 G.L no numerador e no denominador (n = 6) e, 95 % de confiança é de 5,82, foi possível concluir que a  $H_0$  deste teste estatístico deve ser rejeitada e, como tal, a gama de trabalho encontra-se mal ajustada. Uma vez mais, poderia avaliar-se a possibilidade de se reduzir a gama de trabalho. Para além disso, as análises efetuadas para ambas as soluções não foram realizadas em condições de repetibilidade, o que pode ter contribuído para o elevado valor das variâncias mas, neste caso, o modo de funcionamento do equipamento não possibilita que sejam efetuadas as análises nesta condição.

Assim, tal como sucedido para a primeira curva de calibração, existe a possibilidade da gama de trabalho alta não apresentar homogeneidade das variâncias. Para verificar esta suspeita, a gama de trabalho teria de ser sucessivamente diminuída de modo a demonstrar-se que a variância obtida para as respostas do primeiro e seguintes padrões da curva de calibração diferem significativamente.

### 3.2.4 Seletividade

Para estudar a seletividade do método analítico, uma vez que não foram referidos pelo fabricante do equipamento quaisquer possíveis interferentes da análise, recorreram-se aos resultados obtidos na realização de ensaios de recuperação utilizando a matriz em estudo.

Assim, de acordo com o procedimento interno do laboratório, pode determinar-se o intervalo da taxa de recuperação deste método através da elaboração de uma carta de controlo de médias. Como referido anteriormente, para a elaboração desta carta, devem considerar-se os primeiros sete resultados da  $\bar{R}$  calculados através da realização de ensaios de recuperação com diversas matrizes e, de seguida determinar o seu valor médio ( $\bar{\bar{R}}$ ), que equivale ao valor alvo e o desvio padrão, necessário para estabelecer os limites da carta. Deste modo, consideraram-se os ensaios de recuperação efetuados nas matrizes chocolate, açúcar, pescado e batata frita sendo que a  $\bar{R}$  obtida em cada um deles encontra-se apresentada na **Tabela 54**.

**Tabela 54: Valores necessários para elaborar a carta de controlo de médias para o estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio.** Valores auxiliares necessários para elaborar a carta de controlo de médias para o estudo da seletividade do método analítico, nomeadamente, as matrizes utilizadas no estudo e a taxa de recuperação média ( $\bar{R}$ ) obtida nos ensaios de recuperação efetuados com cada matriz.

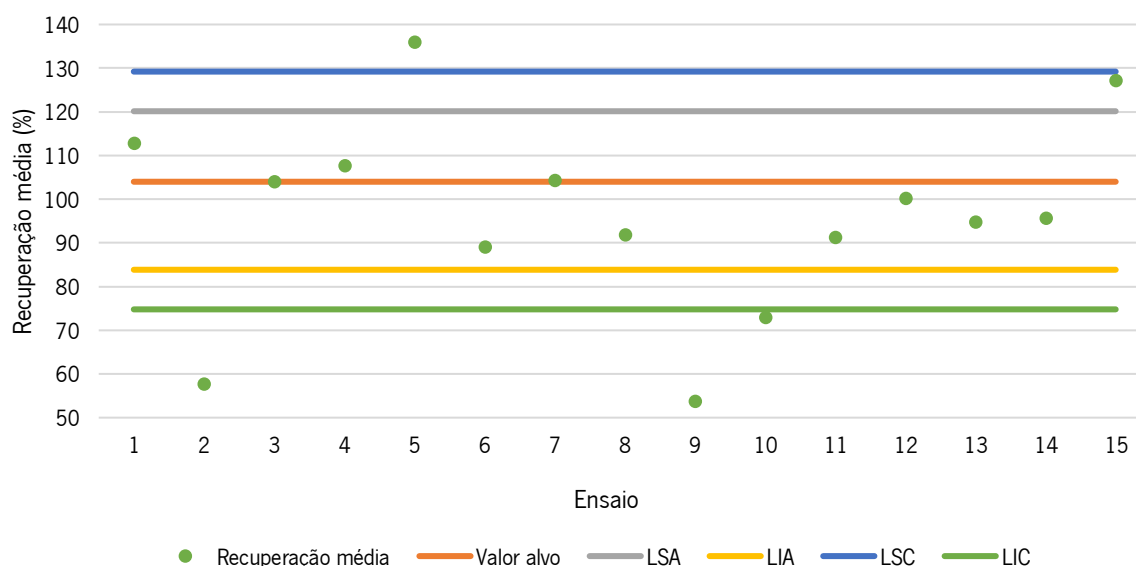
| Ensaio | Matriz       | $\bar{R}$<br>(%) |
|--------|--------------|------------------|
| 1      | Pescado      | 113,0            |
| 2      | Chocolate    | 57,8             |
| 3      | Pescado      | 104,1            |
| 4      | Açúcar       | 107,8            |
| 5      | Açúcar       | 136,1            |
| 6      | Batata frita | 89,1             |
| 7      | Pescado      | 104,358          |

Após realização do teste de Grubbs (**Anexo 6.2.7.1**), verificou-se que nenhum dos valores da  $\bar{R}$  calculados devia ser rejeitado. Ainda assim, de destacar que as  $\bar{R}$  calculadas para a matriz chocolate e para um dos ensaios utilizando a matriz açúcar encontram-se desviados das restantes  $\bar{R}$  calculadas. Relativamente à matriz chocolate, o facto de a  $\bar{R}$  obtida ter sido inferior ao valor ideal poderá ter-se devido a uma ineficiente fortificação da amostra, ou seja, é possível que tenha ficado padrão adicionado nas paredes da barqueta ou a matriz da amostra não permitiu uma eficiente fortificação da mesma. Relativamente à matriz açúcar, como a  $\bar{R}$  calculada foi superior ao valor ideal, poder ter ocorrido alguma

contaminação na barqueta ou, uma ineficiente limpeza do equipamento. Esta evidência é reforçada pelo facto de os restantes ensaios realizados com a mesma matriz apresentarem uma  $\bar{R}$  próxima do ideal. Ainda assim, como estes valores não foram rejeitados, constatou-se que a  $\bar{R}$  obtida foi de 102 % e o desvio padrão correspondeu a 24 %. Através destas duas medidas, elaborou-se a carta de controlo de médias das taxas de recuperação provisória (**Figura 21**), sendo que o valor alvo equivaleu a 102 % e, os valores dos LSA e de LSC corresponderam a 120 e 129 %, respetivamente. Por sua vez, os valores dos LIA e de LIC equivaleram a 84 e 75 %, respetivamente (**Anexo 6.2.7.2**). Nesta carta apresentaram-se todos os resultados dos ensaios de recuperação realizados até ao momento, como indicado nas **Tabelas 54 e 55**.

**Tabela 55: Estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio.** Valores auxiliares necessários para avaliar seletividade do método analítico, nomeadamente, as matrizes utilizadas no estudo e a taxa de recuperação média ( $\bar{R}$ ) obtida nos ensaios de recuperação efetuados com cada matriz.

| Ensaio | Matriz         | $\bar{R}$<br>(%) |
|--------|----------------|------------------|
| 8      | Açúcar         | 92,0             |
| 9      | Chocolate      | 53,9             |
| 10     | Batata frita   | 73,2             |
| 11     | Açúcar         | 91,4             |
| 12     | Pescado        | 100,3            |
| 13     | Chocolate      | 94,9             |
| 14     | Açúcar         | 95,8             |
| 15     | Arroz integral | 127,47           |



**Figura 21: Carta de controle da taxa de recuperação média.** Carta de controle provisória da taxa de recuperação média obtida através da realização de sete ensaios de recuperação, na qual se apresentam o limite superior de aviso (LSA), o limite inferior de aviso (LIA), o limite superior de controle (LSC) e o limite inferior de controle (LIC).

Através da observação da carta de controle verificou-se que quatro dos ensaios realizados encontram-se fora dos limites de controle. Isto indica que o processo encontrou-se fora do controle e, como tal, todo o equipamento foi revisto e limpo. Para além disso, parece haver uma maior tendência para os resultados se encontrarem abaixo do valor alvo e, inclusive, próximos do valor de recuperação ideal. Isto indica que os limites da carta de controle provisória apresentada necessitam de ser revistos pois, parece haver uma menor dispersão nos resultados. De acordo com o regulamento interno do laboratório, pode assumir-se que o processo se encontra fora do controle se algum valor se encontrar fora dos limites de controle, se existir uma série de 7 ou mais pontos consecutivos a mover-se para cima (ou para baixo) ou se 8 ou mais pontos consecutivos se encontrarem acima (ou abaixo) do valor médio. Assim, como as anomalias observadas nos resultados foram corrigidas nos ensaios seguintes e, os restantes resultados dos ensaios de recuperação foram satisfatórios, concluiu-se que o processo encontra-se sob controle e portanto que o método pode ser considerado seletivo.

De realçar que, o último ensaio de recuperação foi realizado com a matriz pretendida para obter a acreditação, para a qual se prepararam três réplicas, e, os resultados da taxa de recuperação obtidos em cada ensaio encontram-se apresentados na **Tabela 56**.

**Tabela 56: Estudo da seletividade do método de quantificação de mercúrio considerando a matriz arroz integral.** Valores auxiliares necessários para avaliar seletividade do método analítico considerando a matriz arroz integral, nomeadamente, a taxa de recuperação (R) obtida nos ensaios de recuperação efetuados com essa matriz.

| Ensaio | Matriz         | R (%)  |
|--------|----------------|--------|
| 1      | Arroz integral | 128,01 |
| 2      | Arroz integral | 127,92 |
| 3      | Arroz integral | 126,49 |

Através dos resultados apresentados, determinou-se a  $\bar{R}$  e o respetivo desvio padrão obtidos considerando a matriz arroz integral que equivaleram a  $127,47 \pm 0,85$  %. Este valor encontra-se próximo, mas abaixo do LSC pelo que se admite que a  $\bar{R}$  obtida foi satisfatória. Assim, pode-se afirmar que o método analítico permanece seletivo na matriz arroz integral. Ainda assim, destaca-se que a  $\bar{R}$  obtida encontra-se fora do indicado na Diretiva 2001/22/EC da comissão de 8 de março de 2001. Contudo, como se encontra dentro dos limites definidos internamente, a seletividade pode ser aceite.

### 3.2.5 Precisão

Para o estudo da precisão, optou-se por realizar um ensaio que permitisse avaliar simultaneamente a repetibilidade e a precisão intermédia utilizando a matriz arroz integral. Assim, avaliou-se a precisão recorrendo à ANOVA de fator único para avaliar estes dois parâmetros, no qual o fator de variação foi o intervalo de tempo da realização dos ensaios.

Para tal, no mesmo dia, pesaram-se cerca de 0,25 g de amostra de arroz integral para oito barquetas de quartzo e, analisaram-se os oito replicados de amostra para determinar a concentração de Hg. Este procedimento foi efetuado em oito dias distintos. A partir das respostas obtidas pelo DMA, por interpolação das mesmas na curva de calibração de gamas baixa e intermédia determinou-se a concentração de Hg presente nesta amostra, em ppb, encontrando-se esta apresentada na **Tabela 57** sendo que cada linha corresponde aos resultados obtidos no mesmo dia.

**Tabela 57: Concentração de mercúrio na amostra de arroz integral determinada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia.** Valores auxiliares necessários para realização do teste estatístico ANOVA de fator único, nomeadamente os valores da concentração de Hg ([Hg]) numa amostra de arroz integral determinados em condições de repetibilidade (linhas) e precisão intermédia (colunas).

| [Hg] (ppb) |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ensaio     |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Dia        | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |
| 13/01/2020 | 26,93 | 25,93 | 27,47 | 25,54 | 26,61 | 27,18 | 27,96 | 26,91 |
| 22/01/2020 | 26,92 | 26,42 | 26,56 | 26,07 | 26,26 | 26,24 | 25,33 | 25,65 |
| 11/02/2020 | 26,80 | 26,56 | 26,49 | 26,88 | 26,45 | 27,29 | 25,91 | 25,43 |
| 14/02/2020 | 25,71 | 25,91 | 25,78 | 25,39 | 25,71 | 25,51 | 25,92 | 25,46 |
| 17/02/2020 | 26,12 | 25,67 | 25,92 | 26,10 | 25,67 | 25,58 | 25,86 | 25,05 |
| 18/02/2020 | 27,15 | 26,83 | 26,42 | 26,49 | 25,77 | 25,11 | 25,84 | 25,60 |
| 21/02/2020 | 26,90 | 27,79 | 26,35 | 25,91 | 25,88 | 26,04 | 26,33 | 25,32 |
| 27/02/2020 | 25,96 | 25,92 | 25,02 | 25,49 | 25,58 | 25,82 | 25,87 | 25,85 |

Para avaliar se algum dos valores obtidos em condições de repetibilidade deveria ser rejeitado, efetuou-se o teste de Grubbs (**Anexo 6.2.8.1**), sendo que nenhum dos valores suspeitos foi rejeitado.

Para avaliar se algum dia deveria ser rejeitado para o estudo realizou-se o teste de Cochran (**Anexo 6.2.8.2**). Neste caso, verificou-se que a maior variância, obtida no dia 13/01/2020, correspondeu a 0,62. Assim, o valor de C calculado para este dia foi de 0,248. Considerando que o valor de C indicado na tabela de Cochran para  $n = 8$ ,  $k = 8$  e 95 % de confiança é de 0,319, concluiu-se que nenhum dos dias deveria ser rejeitado para o estudo.

Deste modo, realizou-se uma ANOVA de fator único, encontrando-se os resultados obtidos na **Tabela 58**.

**Tabela 58: Informações retiradas da ANOVA de fator único para o estudo da precisão do método de quantificação de mercúrio considerando a amostra de arroz integral.** Informações referentes aos parâmetros que podem ser determinados na realização de um teste de ANOVA de fator único.

| Fontes de variação | Soma dos quadrados | Graus de Liberdade | Quadrado médio |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Dentro dos grupos  | 17,54              | 56                 | 0,31           |
| Entre grupos       | 9,46               | 7                  | 1,35           |
| Total              | 27,0               | 63                 | ————           |

A partir dos valores calculados, determinou-se o  $s_r$  de acordo com a **Equação 59**, sendo este igual a 0,56 ppb e o  $s_{PI}$  como descrito na **Equação 60**, que equivaleu a 0,67 ppb (**Anexo 6.2.8.3**). Tal como esperado, observou-se uma maior variabilidade nos resultados obtidos em condições de precisão intermédia, comparativamente com os obtidos em condições de repetibilidade, dado o desvio padrão calculado. De seguida, foi possível determinar os valores do  $CV_r$  e do  $CV_{PI}$  de acordo com as **Equações 52 e 58**, respetivamente, sendo que estes correspondem a 2,1 e 2,5 %, respetivamente (**Anexo 6.2.8.4**). De acordo com o critério de aceitação interna, o CV pode ser considerado satisfatório se for inferior a 10 %. Como tal foi observado nos dois casos, concluiu-se que os erros aleatórios observados não influenciaram significativamente os resultados produzidos em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédia.

Para além disso, também se determinaram os valores do  $r_r$  e do  $CV_{r_r}$ , que equivaleram a 1,6 ppb e 6,0 %, respetivamente e os valores do limite de precisão intermédia ( $r_{PI}$ ) e  $CV_{r_{PI}}$ , sendo estes iguais a 1,9 ppb e 7,1 %, respetivamente (**Anexo 6.2.8.5**). De acordo com o definido internamente, o  $CV_{r_r}$  e o  $CV_{r_{PI}}$  não devem ser superiores a 20 %. Como tal foi observado, concluiu-se que se aceitam replicados desta matriz em condições de repetibilidade se a diferença entre eles não exceder 6,0 % do seu valor médio e, aceitam-se replicados desta matriz em condições de precisão intermédia se a diferença entre eles não exceder 7,1 % do seu valor médio

Na **Tabela 59** encontram-se agrupados os parâmetros relativos referidos anteriormente obtidos com a matriz arroz integral, bem como os mesmos parâmetros calculados na validação do método analítico.

**Tabela 59: Estudo da precisão do método de quantificação de mercúrio.** Valores necessários para o estudo da precisão em condições de repetibilidade, nomeadamente, o limite de repetibilidade relativo ( $CV_r$ ) e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV$ ) obtidos na análise da matriz arroz integral e obtidos aquando a validação do método analítico. Valores necessários para o estudo da precisão em condições de precisão intermédia, inclusive, o limite de precisão intermédia relativo ( $CV_{r_{PI}}$ ) e o coeficiente de variação de precisão intermédia ( $CV_{PI}$ ) obtidos na análise da matriz arroz integral e obtidos aquando a validação do método analítico.

| Matrizes       | $CV_r$<br>(%) | $CV$<br>(%) | $CV_{r_{PI}}$<br>(%) | $CV_{PI}$<br>(%) |
|----------------|---------------|-------------|----------------------|------------------|
| Arroz integral | 6,0           | 2,1         | 7,1                  | 2,5              |
| Validadas      | 12            | 4,5         | 11                   | 4,0              |

Relativamente aos valores obtidos para a matriz integral, verificou-se que os parâmetros referentes à precisão intermédia foram ligeiramente superiores aos parâmetros relativos à repetibilidade, contudo, esta diferença pode ser considerada não significativa dada a proximidade entre eles. Por este motivo, concluiu-se que o facto de as análises se realizarem em dias diferentes não afeta significativamente os resultados. Esta evidência vai ao encontro do observado aquando a validação do método analítico, pois,



também neste caso, os parâmetros referentes à precisão intermédia não diferem significativamente dos parâmetros relativos à repetibilidade. Por último, de destacar que os parâmetros determinados para a matriz arroz integral são significativamente inferiores aos determinados nas diversas matrizes consideradas na validação do método. Esta evidência vai ao encontro do esperado uma vez que, na validação o número de matrizes analisadas foi muito superior, o que aumentou a variabilidade dos resultados.

### 3.2.6 Justeza/Veracidade

A justeza do método foi avaliada através da realização de dois procedimentos utilizando a matriz em estudo.

O primeiro consistiu na determinação da concentração de Hg nessa matriz, enquanto MR (26,2 ppb) e determinação do *bias* relativo. Foi determinado o valor médio da concentração de Hg no arroz integral, considerando os 64 ensaios efetuados no estudo da precisão correspondendo a 26,13 ppb. A partir da concentração efetiva do MR, determinou-se o *bias* da medição, de acordo com a **Equação 62** que correspondeu a 0,070 ppb e o *bias* relativo, como descrito na **Equação 63** que equivaleu a 0,27 % (**Anexo 6.2.9.1**). Segundo o critério de aceitação interno do laboratório, considera-se que o método é justo se o *bias* relativo for inferior a 10 %. Dado que isto foi verificado, o método é justo e, por este motivo, concluiu-se que não foram encontradas evidências da ocorrência de erros sistemáticos.

Para corroborar este resultado, apesar de não ser um procedimento habitualmente seguido no laboratório, realizou-se um teste t para comparação entre o valor de referência e, o valor obtido experimentalmente. Neste caso, pretendeu-se avaliar se o valor da concentração de Hg presente na amostra de arroz integral indicado pelo fornecedor difere estatisticamente do valor da concentração de Hg determinado experimentalmente recorrendo ao DMA, na mesma amostra. Assim, aplicando a **Equação 7**, determinou-se o valor de t experimental que correspondeu a 0,85 (**Anexo 6.2.9.2**). Sabendo que o valor de t indicado na tabela *t-student* para n-1 G.L (n = 64) e 95 % de confiança é de 1,96, concluiu-se que a  $H_0$  deste teste não deveria ser rejeitada, o que indica que o valor da concentração de Hg presente na amostra de arroz integral determinado experimentalmente recorrendo ao DMA não difere significativamente do valor da concentração de Hg indicado pelo fornecedor e, como tal, o método é justo.

O mesmo resultado foi obtido pelo cálculo da  $R_s$  de 99,7 % (**Anexo 6.2.9.3**), uma vez que este valor corresponde ao ideal, reforçando uma vez mais a justeza do método nesta matriz.

A justeza do método foi também avaliada através de um ensaio de recuperação com a matriz em estudo. Como referido anteriormente, a  $\bar{R}$ , obtida na realização deste ensaio foi de 127,47 %. Verificou-se que este valor se encontra compreendido dentro dos limites de controlo da carta de controlo de médias da R do método (75 e 129 %), o que reforça, uma vez mais, que o método é justo.

Para além disso, sabe-se que, de acordo com o relatório de validação do método, a justeza do mesmo foi demonstrada quando se procedeu à sua validação através da participação em ensaios interlaboratoriais, cujo critério de aceitação consistiu na análise do *z-score* e, da análise de MRs, cujos valores mínimo e máximo de concentração de Hg admissíveis foram anteriormente definidos.

Em suma, todos os procedimentos adotados para verificar a justeza do método indicaram que este método é justo.

### 3.2.7 Estimativa da incerteza do método na matriz arroz integral

De modo a incluir a matriz arroz integral na acreditação do método que permite determinar o teor de Hg em amostras alimentares recorrendo ao DMA, estimou-se a incerteza do método considerando a análise dessa matriz. Para além disso, pretendeu-se avaliar se o valor determinado vai ao encontro do definido quando se procedeu à validação do método analítico considerando a análise de outras matrizes. Assim, para estimar a incerteza consideraram-se dois parâmetros avaliados utilizando esta matriz, nomeadamente, a precisão e a justeza, que serão posteriormente combinados na forma relativa, como ilustrado na **Equação 78**.

A primeira componente, isto é, a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  foi determinada considerando o  $CV_{PI}$  calculado aquando a realização da ANOVA de fator único com matriz arroz integral, pois este valor já se encontra na forma relativa sendo equivalente a 2,5 % (**Anexo 6.2.10.1**). Quando se procedeu à estimativa da incerteza do método, verificou-se que a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  correspondeu a 4,5 %. Isto indica que na análise da matriz arroz integral não foram evidenciados erros aleatórios, o que vai ao encontro do esperado.

A segunda componente, isto é, a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , foi avaliada considerando dois procedimentos realizados, nomeadamente, a análise da amostra de arroz integral enquanto MR e os resultados obtidos no ensaio de recuperação com a mesma amostra.

A partir da análise da amostra, a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  foi calculada de acordo com a **Equação 84 (Anexo 6.2.10.2)**. Para tal, considerou-se a análise de 64 replicados desta amostra que continha um valor de referência da concentração de mercúrio ( $[\text{Hg}]_{\text{ref}}$ ) de 26,2 ppb e, determinou-se o valor médio de concentração de mercúrio pelo laboratório ( $[\overline{\text{Hg}}]_{\text{obs}}$ ) que equivaleu a 26,13 ppb. Através destes valores,

determinou-se o *bias* relativo como indicado na **Equação 63**, sendo este igual a 0,27 %. Para além disso, sabe-se que o UCL e o LCL deste MR mencionados pelo fornecedor equivalem a 37,8 ppb e 14,7 ppb, respetivamente. No laboratório, a justeza do método apresenta *bias* relativos inferiores a 10 %, logo assume-se que o intervalo indicado pelo fornecedor foi sobrestimado pois, na prática não se esperam observar valores tão distantes do valor de referência. Por este motivo, reduziu-se o intervalo de aceitação referido pelo fornecedor e, consideraram-se como UCL e LCL os valores 31,5 e 21,7 ppb, respetivamente.

Deste modo, calculou-se a  $u_{C_{ref}}$  como indicado na **Equação 81**, sendo esta igual a 2,5 ppb. Contudo, este valor deve ser apresentado na forma relativa para poder ser combinado e, por este motivo, determinou-se a  $u_{(C_{ref})relativa}$  como apresentado na **Equação 82**, sendo esta de 9,4 %. Por último, foi ainda considerado o  $s_{bias}$  dado pela **Equação 2**, de 0,65 ppb. Este valor também foi convertido na forma relativa, isto é,  $s_{(bias)relativo}$  dado pela **Equação 83**, e foi de 2,5 %. Assim, dado que todas as variáveis se encontram na forma relativa, foram combinadas como indicado na **Equação 84** e, concluiu-se que a  $u_{(justeza)relativa}$  foi de 9,4 %.

Relativamente ao cálculo da  $u_{(justeza)relativa}$  (**Anexo 6.2.10.3**) considerando o resultado obtido na realização de um ensaio de recuperação utilizando esta amostra, aplicou-se a **Equação 91**. Aquando a realização do ensaio de recuperação, verificou-se que a  $[\overline{Hg}]_{obs}$  após fortificação foi de 58 ppb. Para além disso, sabe-se que a  $[\overline{Hg}]_{efetiva}$  correspondeu a 45 ppb. Através destes dois valores, determinou-se o *bias* relativo, como descrito na **Equação 63**, sendo este igual a 27 %. De seguida, determinou-se a  $u_{add}$ , sendo que esta foi calculada de acordo com a metodologia passo-a-passo e equivaleu a 0,72 ppb. Sabendo que a fortificação da amostra foi efetuada através da adição de  $0,10000 \pm 0,00013$  mL de uma solução padrão de Hg com concentração de  $94,70 \pm 0,72$  ppb, determinou-se a  $u_{(add)relativa}$ , de acordo com a **Equação 92**, sendo esta igual a 0,76 %. Para além disso, também foi considerada a  $u_{(Vol)relativa}$ , de acordo com a **Equação 93**, sendo esta igual a 0,13 %. De seguida, calculou-se a  $u_{(recuperação,c)relativa}$ , como indicado na **Equação 94**, sendo que este correspondeu a 0,77 %. Por fim, calculou-se a  $u_{(justeza)relativa}$  sendo esta igual a 27 %.

Como a incerteza associada à componente da precisão não sofreu alterações, a incerteza associada à componente da veracidade determina a incerteza do método através da análise desta matriz. Assim, como esta componente determinada através da realização do ensaio de recuperação apresentou evidências da ocorrência de erros sistemáticos, foi considerado este valor para o cálculo da incerteza do método. Deste modo, calculou-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, que correspondeu a 28 % (**Anexo 6.2.10.4**). Como tal, a  $U$  foi de 55 % (**Anexo 6.2.10.4**).

Na **Tabela 60** encontram-se resumidas as variáveis intermédias calculadas para estimar a incerteza expandida considerando para o cálculo da componente associada à justeza, a análise da amostra de arroz integral enquanto MR e a realização de um ensaio de recuperação.

**Tabela 60: Estimativa da incerteza expandida do método de quantificação de mercúrio considerando a matriz arroz integral.** Valores auxiliares necessários para determinar a incerteza expandida, nomeadamente a componente associada à precisão e a componente associada à justeza determinada através da análise da amostra de arroz integral e a realização de um ensaio de recuperação com a mesma.

| Componente                                       | Variável   | Valor                                     | Unidades |     |
|--|--|---|----------|-----|
| Precisão   | $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$   | 2,5                                       | %        |     |
|  | $\overline{[\text{Hg}]_{\text{obs}}}$  | 26,13                                     | ppb      |     |
| Justeza considerando a análise do arroz integral | $[\text{Hg}]_{\text{ref}}$   | 26,20                                     | ppb      |     |
|  | <i>bias</i> relativo   | 0,27                                      | %        |     |
|  | UCL  | 31,5                                      | ppb      |     |
|  | LCL  | 21,7                                      | ppb      |     |
|  | $u_{\text{Cref}}$  | 2,5                                       | ppb      |     |
|  | $u_{(\text{Cref})\text{relativa}}$   | 9,4                                       | %        |     |
|  | $S_{\text{bias}}$  | 0,65                                      | ppb      |     |
|  | $S(\text{bias})\text{relativo}$  | 2,5                                       | %        |     |
|  | $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  | 9,4                                       | %        |     |
|  | Justeza considerando a realização de um ensaio de recuperação com o arroz integral | $\overline{[\text{Hg}]_{\text{obs}}}$     | 58       | ppb |
|  |  | $\overline{[\text{Hg}]_{\text{efetiva}}}$ | 45       | ppb |
| <i>bias</i> relativo                             |  | 27  | %        |     |
| $u_{\text{add}}$                                 |  | 0,72                                      | ppb      |     |
| $[\text{Hg}]_{\text{add}}$                       |  | 94,70                                     | ppb      |     |
| $u_{(\text{add})\text{relativa}}$                |  | 0,76                                      | %        |     |
| $u_{\text{Vadd}}$                                |  | 0,00013                                   | mL       |     |
| $V_{\text{add}}$                                 |  | 0,10000                                   | mL       |     |
| $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$                |  | 0,13                                      | %        |     |
| $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$      |  | 0,77                                      | %        |     |
| $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$            |  | 27  | %        |     |
| Incerteza combinada                              | $u_c(y)$   | 28  | %        |     |
| Incerteza expandida                              | $U$  | 55  | %        |     |

No âmbito laboratorial, a incerteza do método pode ser considerada aceitável se não exceder os 20 %. Por este motivo, a metodologia aplicada não pode ser aceite para estimar a incerteza do método recorrendo à matriz arroz integral. A elevada incerteza calculada encontra-se relacionada com o valor da  $\bar{R}$  obtida no ensaio de recuperação efetuado. Isto indica que, durante a realização do ensaio ocorreram erros sistemáticos que, apesar de não terem influenciado a justeza do método, contribuíram para o aumento da incerteza calculada. Por este motivo, numa perspetiva futura, seria interessante repetir o ensaio de recuperação para avaliar se os erros observados foram pontuais ou se persistem. De realçar que quando se efetuou a validação do método, a incerteza estimada foi de 18 % o que sugere que poderá ter-se tratado de um erro pontual, como por exemplo, uma contaminação nas barquetas ou na amálgama do equipamento.

Um valor semelhante de 19 % foi obtido na estimativa da incerteza calculada considerando a análise do MR o que está em concordância com a incerteza calculada para o método considerando as restantes matrizes validadas. Este facto veio reforçar a necessidade de repetir o ensaio de recuperação, para confirmar a eventual contaminação, que por limitações de tempo, não pôde ser realizado.

## 4. Conclusão

### 4.1 Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência

Com este trabalho, foi possível validar internamente o método descrito na norma AOAC 980.14 para quantificar o teor de teobromina por HPLC em géneros alimentícios à base de cacau e alimentos destinados à alimentação animal. Para tal, realizou-se um conjunto de procedimentos que levou à determinação dos parâmetros de desempenho do método, nomeadamente a linearidade, a sensibilidade, o LDQ, a gama de trabalho, a seletividade, a repetibilidade, a precisão intermédia, a justeza e a incerteza do método.

Assim, neste trabalho mostrou-se que o método analítico apresenta uma correlação linear entre a resposta obtida por HPLC e a concentração de analito presente na amostra dado o elevado valor do coeficiente de correlação obtido. Verificou-se que a sensibilidade do método se mantém inalterada ao longo do tempo dado que não ocorrem variações significativas nos declives das curvas de calibração traçadas ao longo de vários meses.

Relativamente ao LDQ observou-se que, após realização de um ensaio de recuperação, o método é capaz de quantificar a concentração de teobromina no padrão de calibração com menor concentração deste analito e, por este motivo, este valor é estipulado como o LDQ. Quanto à gama de trabalho selecionada, constatou-se que esta se encontra mal ajustada. Apesar disto, dado que a linearidade do método foi demonstrada, decidiu-se internamente que não seria necessário reduzir a gama selecionada, tendo-se definido três gamas de trabalho.

Quanto à precisão do método, tanto o estudo da repetibilidade, como o estudo da precisão intermédia mostraram que nas gamas de trabalho estudadas os valores dos CV são aceitáveis e, portanto, os erros aleatórios observados não afetam a confiança nos resultados produzidos.

Constatou-se, ainda, que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos uma vez que o método mostrou ser justo dados os resultados obtidos na análise de MRs e na participação de ensaios interlaboratoriais.

Por último, concluiu-se que a incerteza estimada para o método analítico transmite confiança nos resultados produzidos dado que os valores deste parâmetro determinados para a gama de trabalho são inferiores à incerteza máxima admitida internamente.

Por todos estes motivos, é possível afirmar que o método baseado na norma AOAC 980.14 foi devidamente validado para a quantificação de teobromina nos géneros alimentícios pretendidos.

## 4.2 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio

Com a realização do trabalho foi possível caracterizar o método analítico para a quantificação de mercúrio numa nova matriz, o arroz integral, e adicioná-la ao conjunto de matrizes acreditadas.

Como o equipamento dispõe de duas células espectrofotométricas que são utilizadas de acordo com o valor da concentração de Hg presente na amostra, verificou-se que são obtidas duas correlações quadráticas entre a absorvância lida pelo equipamento e a massa de Hg presente na amostra. Para além disso, constatou-se que os coeficientes do modelo de regressão quadrático determinados pelo equipamento mantêm-se estáveis durante três meses. Por este motivo, concluiu-se que a sensibilidade do método não sofreu alterações significativas neste intervalo de tempo e, portanto, que se devem efetuar novas curvas de calibração de três em três meses.

Constatou-se ainda que a curva de calibração definida para as gamas baixa e intermédia de concentração é mais sensível do que a da gama alta dados os coeficientes de segundo e primeiro grau calculados. Para além disso, verificou-se que a gama de trabalho indicada pelo fabricante se encontra mal ajustada em ambas as curvas de calibração e, por este motivo dever-se-ia estudar, no futuro, a possibilidade de se reduzir a mesma.

Quanto ao LDQ estabeleceu-se que este corresponde à concentração de Hg no segundo padrão de calibração dada a taxa de recuperação obtida aquando a realização de um ensaio de recuperação.

Relativamente aos parâmetros avaliados recorrendo à amostra de arroz integral, mostrou-se que o método é seletivo pois a taxa de recuperação calculada no ensaio de recuperação efetuado encontra-se dentro dos limites da carta de controlo elaborada pelo laboratório.

Quanto à precisão do método, um estudo simultâneo da repetibilidade e da precisão intermédia usando esta amostra mostrou que, em ambas as condições, os erros aleatórios observados não influenciam a confiança nos resultados produzidos dados os CV calculados. Mais acresce que o método mostra ser justo pois não existem evidências de erros sistemáticos aquando a análise desta amostra dado o valor de *bias* relativo determinado.

Por último, apesar de a incerteza determinada recorrendo a esta amostra ser superior ao valor máximo admitido pelo laboratório, pensa-se que tal poderá ser devido à ocorrência de um erro sistemático pontual aquando a realização do ensaio de recuperação usando esta matriz. Por este motivo, no futuro seria interessante repetir o ensaio e averiguar se o valor obtido persiste. Para além disso, verificou que a incerteza estimada recorrendo à análise da matriz arroz integral baseada na análise do material de referência seria aceite de acordo com o critério definido internamente pelo laboratório.

## 5. Bibliografia

- (1) Nayak, R.; Waterson, P. Global Food Safety as a Complex Adaptive System: Key Concepts and Future Prospects. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *91*, 409-425.
- (2) Guevane, E. Onu News. <https://news.un.org/pt/story/2017/06/1589091-populacao-mundial-atingiu-76-bilhoes-de-habitantes> (consultado em Fev 12,2020).
- (3) Pozo, H.; Barcelos, A. F.; Akabane, G. K. Critical Factors of Success for Quality and Food Safety Management: Classification and Priorization. *Univers. J. Ind. Bus. Manag.* **2018**, *6*, 30-41.
- (4) NP EN ISO/IEC 9000:2015 Sistemas de gestão da qualidade. Fundamentos e vocabulário. **2015**.
- (5) Zima, T. Accreditation of Medical Laboratories-System, Process, Benefits for Labs. *J. Med. Biochem.* **2017**, *36*, 231-237.
- (6) Website da Merieux NutriSciences Portugal. <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> (consultado em Jan 15, 2020).
- (7) Petrović, Z.; Milićević, D.; Nastasijević, I.; Dordević, V.; Trbović, D.; Velebit, B. The Role of Food Quality Assurance and Product Certification Systems on Marketing Aspects. *Earth Environ. Sci.* **2017**, *85*, 1-5.
- (8) Kearney, J. Food Consumption Trends and Drivers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2010**, *365*, 2793-2807.
- (9) Pot, G. K.; Prynne, C. J.; Almoosawi, S.; Kuh, D.; Stephen, A. M. Trends in Food Consumption over 30 Years: Evidence from a British Birth Cohort. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2015**, *69*, 817-823.
- (10) Davies, G.; Brito, E. Price and Quality Competition between Brands and Own Brands. *Eur. J. Mark.* **2004**, *38*, 30-55.
- (11) Website da International Organization for Standardization. <https://www.iso.org/standards.html> (consultado em Dez 30, 2019).
- (12) Scollan, N.; Hocquette, J. F.; Nuernberg, K.; Dannenberger, D.; Richardson, I.; Moloney, A. Innovations in Beef Production Systems That Enhance the Nutritional and Health Value of Beef Lipids and Their Relationship with Meat Quality. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 17-33.
- (13) Website do Instituto Português da acreditação, diretório de entidades acreditadas. <http://www.ipac.pt/pesquisa/acredita.asp> (consultado em Mar 1, 2020).
- (14) Website do Instituto Português da acreditação. <http://www.ipac.pt> (consultado em Dez 30, 2019).
- (15) NP EN ISO/IEC 17025:2005 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. **2005**.



- (16) ILAC-G18:04/2010 Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories. **2010**.
- (17) NP EN ISO 9001:2015 Sistemas de Gestão Da Qualidade. Requisitos. **2015**.
- (18) *Validação de Métodos Internos de Ensaio Em Análise Química*. Guia RELACRE 13, edição 1; RELACRE: 2000.
- (19) Magnusson, B.; Ornemark, U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2ª edição; 2014.
- (20) *Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. Guia RELACRE 3, edição 1; RELACRE: 1996.
- (21) Miller, J. N.; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5ª edição. Pearson Education Limited: 2005.
- (22) Belouafa, S.; Habti, F.; Benhar, S.; Belafkih, B.; Tayane, S.; Hamdouch, S.; Bennamara, A.; Abourriche, A. Statistical Tools and Approaches to Validate Analytical Methods: Methodology and Practical Examples. *Int. J. Metrol. Qual. Eng.* **2017**, *8*, 1-10.
- (23) Whitley, E.; Ball, J. Statistics Review 2: Samples and Populations. *Crit. Care* **2002**, *7*, 1-8.
- (24) Kao, L. S.; Green, C. E. Analysis of Variance: Is There a Difference in Means and What Does It Mean? *J. Surg. Res.* **2008**, *144*, 158-170.
- (25) Miller, J. N. Using the Grubbs and Cochran Tests to Identify Outliers. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 7948-7950.
- (26) Adikaram, K. K. L. B.; Hussein, M. A.; Effenberger, M.; Becker, T. Data Transformation Technique to Improve the Outlier Detection Power of Grubbs' Test for Data Expected to Follow Linear Relation. *J. Appl. Math.* **2015**, *2015*, 1-9.
- (27) Kim, T. K. Understanding One-Way Anova Using Conceptual Figures. *Korean J. Anesthesiol.* **2017**, *70*, 22-26.
- (28) Wang, Y.; Gil, P. R. de; Chen, Y. H.; Kromrey, J. D.; Kim, E. S.; Pham, T.; Nguyen, D.; Romano, J. L. Comparing the Performance of Approaches for Testing the Homogeneity of Variance Assumption in One-Factor ANOVA Models. *Educ. Psychol. Meas.* **2017**, *77*, 305-329.
- (29) ISO/REMCO Guide 30:2015 Reference materials - Selected terms and definitions. **2015**.
- (30) Barwick, V.; Prichard, E. *Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3*, 1ª edição; 2011.
- (31) Koumantakis, G. Traceability of Measurement Results. *Clin. Biochem. Rev.* **2008**, *29*, 61-66.
- (32) Ravisankar, P.; Naga Navya, C.; Pravallika, D.; Sri, D. N. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *J. Pharm.* **2015**, *5*, 2250-3013.

- (33) ISO/IEC 17043:2010 Conformity Assessment - General Requirements for Proficiency Testing. **2010**.
- (34) Rawski, R. I.; Sanecki, P. T.; Kijowska, K. M.; Skitał, P. M.; Saletnik, D. E. Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies. *South African J. Chem.* **2016**, *69*, 166-173.
- (35) Alexopoulos E. C. Introduction to Multivariate Regression Analysis. *Hippokratia* **2010**, *14*, 23-28.
- (36) ISO/TC 147/SC 2 8466-2:2001 Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 2: Calibration strategy for Non-Linear Second-Order Calibration Functions. **2001**.
- (37) Mukaka, M. M. Statistics Corner: A Guide to Appropriate Use of Correlation Coefficient in Medical Research. *Malawi Med. J.* **2012**, *24*, 69-71.
- (38) Raposo, F. Evaluation of Analytical Calibration Based on Least-Squares Linear Regression for Instrumental Techniques: A Tutorial Review. *Trends Anal. Chem.* **2016**, *77*, 167-185.
- (39) Andrade, J. M.; Gómez-Carracedo, M. P. Notes on the Use of Mandel's Test to Check for Nonlinearity in Laboratory Calibrations. *R. Soc. Chem.* **2013**, *5*, 1145-1149.
- (40) Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Londres, 1995.
- (41) Patel, M.; Patel, D. A.; Gajra, B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. *Int. J. Pharm. Innov.* **2011**, *1*, 41-50.
- (42) ISO/TC 69/SC 6 5725-3:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method. **1994**.
- (43) NP EN ISO/IEC 17025:2018 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. **2018**.
- (44) Ellison, S L R.; Williams, A.; *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3ª edição; 2012.
- (45) *Quantificação de Incerteza de Medição Em Ensaio Químicos e Físico-Químicos*. Guia RELACRE 31, edição 1; RELACRE: 2018.
- (46) JCGM 100:2008 Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. **2008**.
- (47) *Exemplo de Cálculo de Incertezas*. Guia Eurachem/RELACRE, edição 1; RELACRE: 2002.
- (48) Anand, S. S.; Hawkes, C.; Souza, R. J. De; Mente, A.; Dehghan, M.; Nugent, R.; Zulyniak, M. A.; Weis, T.; Bernstein, A. M.; Krauss, R.; et al. Food Consumption and Its Impact on CVD: Importance of Solutions Focused on the Globalized Food System. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *66*, 1590-1614.

- (49) Website da World Health Organization, cardiovascular diseases fact sheets. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (consultado em Mar 8, 2020).
- (50) Cooper, K. A.; Donovan, J. L.; Waterhouse, A. I.; Williamson, G. Cocoa and Health: A Decade of Research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 1-11.
- (51) Katz, D. L.; Doughty, K.; Ali, A. Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2011**, *15*, 2779-2811.
- (52) Baggott, M. J.; Childs, E.; Hart, A. B.; De Bruin, E.; Palmer, A. A.; Wilkinson, J. E.; De Wit, H. Psychopharmacology of Theobromine in Healthy Volunteers. *Psychopharmacology (Berl)*. **2013**, *228*, 109-118.
- (53) Martínez-Pinilla, E.; Oñatibia-Astibia, A.; Franco, R. The Relevance of Theobromine for the Beneficial Effects of Cocoa Consumption. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 1-5.
- (54) Aprotosoiaie, A. C.; Luca, S. V.; Miron, A. Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products - An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2016**, *15*, 73-91.
- (55) Izawa, K.; Amino, Y.; Kohmura, M.; Ueda, Y.; Kuroda, M. Human-Environment Interactions - Taste. *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* **2010**, *4*, 631-671.
- (56) Sanchez, J. Methylxanthine Content in Commonly Consumed Foods in Spain and Determination of Its Intake during Consumption. *Foods* **2017**, *6*, 1-13.
- (57) Patten, A. M.; Vassão, D. G.; Wolcott, M. P.; Davin, L. B.; Lewis, N. G. Trees: A Remarkable Biochemical Bounty. *Compr. Nat. Prod. II Chem. Biol.* **2010**, *3*, 1173-1296.
- (58) Website da PubChem, Theobromine compound summary. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine> (consultado em Mar 11, 2020).
- (59) Sena, A. R.; Assis, S. A.; Branco, A. Analysis of Theobromine and Related Compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992-2011). *Food Technol. Biotechnol.* **2011**, *49*, 413-423.
- (60) Zhong, J.; Tang, N.; Asadzadeh, B.; Yan, W. Measurement and Correlation of Solubility of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in Water and Organic Solvents at Various Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* **2017**, *62*, 2570-2577.
- (61) Thomas, J. B.; Yen, J. H.; Schantz, M. M.; Porter, B. J.; Sharpless, K. E. Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Standard Reference Material 2384, Baking Chocolate, Using Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3259-3263.
- (62) Diário da República, 1º Série - N.º 113 - Decreto-lei nº 193/2007 de 14 de Junho de **2010**.

- (63) Xia, Z.; Ni, Y.; Kokot, S. Simultaneous Determination of Caffeine, Theophylline and Theobromine in Food Samples by a Kinetic Spectrophotometric Method. *Food Chem.* **2013**, *141*, 4087-4093.
- (64) Wadsworth, R. V. Proceedings of the Society of Public Analysts and Other Analytical Chemists. *Analyst* **1919**, *44*, 32-37.
- (65) Gerritsma, K. W.; Koers, J. Determination of Theobromine in Cocoa Products. *Analyst.* **1953**, *78*, 201-205.
- (66) Shrivastava, K.; Wu, H.-F. Rapid Determination of Caffeine in One Drop of Beverages and Foods Using Drop-to-Drop Solvent Microextraction with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1170*, 9-14.
- (67) González, J.; Monan, M.; Perez, J.; Gómez, E.; Salgado, D. D. L. C.; Pérez, D. Determination of Theobromine and Caffeine in Theobroma Cacao Husk from Ethanolic Extract by GC-MS after CC Separation. *Open Access Libr. J.* **2019**, *06*, 1-9.
- (68) Aktas, A. H.; Pekcan, H. Chemometric Methods for the Simultaneous Spectrophotometric Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Tea. *Asian J. Chem.* **2013**, *25*, 8333-8338.
- (69) Yisak, H.; Redi-Abshiro, M.; Chandravanshi, B. S. New Fluorescence Spectroscopic Method for the Simultaneous Determination of Alkaloids in Aqueous Extract of Green Coffee Beans. *Chem. Cent. J.* **2018**, *12*, 1-59.
- (70) Pura Naik, J. Improved High-Performance Liquid Chromatography Method to Determine Theobromine and Caffeine in Cocoa and Cocoa Products. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3579-3583.
- (71) Meyer, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4<sup>a</sup> edição; John Wiley & Sons, Ltd: 2004.
- (72) Chen, Q.-C.; Mou, S.; Hou, X.; Ni, Z. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline in Foods and Pharmaceutical Preparations by Using Ion Chromatography. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, *371*, 287-296.
- (73) Caudle, A. G.; Gu, Y.; Bell, L. N. Improved Analysis of Theobromine and Caffeine in Chocolate Food Products Formulated with Cocoa Powder. *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 599-603.
- (74) AOAC 980.14 Theobromine and Caffeine in Cacao Products. **1998**.
- (75) Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology.* **2012**, *101*, 133-164.
- (76) Rana, M. N.; Tangpong, J.; Rahman, M. M. Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- Induced Kidney Toxicity and Treatment Strategy: A Mini Review. *Toxicol. Reports* **2018**, *5*,

704-713.

(77) Martín-Yerga, D.; González-García, M. B.; Costa-García, A. Electrochemical Determination of Mercury: A Review. *Talanta*. **2013**, *116*, 1091-1104.

(78) Suvarapu, L. N.; Baek, S. O. Recent Developments in the Speciation and Determination of Mercury Using Various Analytical Techniques. *J. Anal. Methods Chem.* **2015**, *2015*, 1-18.

(79) Kimáková, T.; Kuzmová, L.; Nevolná, Z.; Bencko, V. Fish and Fish Products as Risk Factors of Mercuroexposure. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2018**, *25*, 488-493.

(80) Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; Silva, L. O. B.; Queiroz, A. F. S.; Souza, A. S.; da Silva, E. G. P.; dos Santos, W. N. L.; das Virgens, C. F. Analytical Strategies of Sample Preparation for the Determination of Mercury in Food Matrices - A Review. *Microchem. J.* **2015**, *121*, 227-236.

(81) Liang, P.; Yu, J.; Yang, E.; Mo, Y. Determination of Mercury in Food and Water Samples by Displacement-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 236-242.

(82) Harada, M.; Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol.* **1995**, *25*, 1-24.

(83) Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de **2006**.

(84) Noël, L.; Testu, C.; Chafey, C.; Velge, P.; Guérin, T. Contamination Levels for Lead, Cadmium and Mercury in Marine Gastropods, Echinoderms and Tunicates. *Food Control* **2011**, *22*, 433-437.

(85) Fernández, Z. H.; Valcárcel Rojas, L. A.; Álvarez, A. M.; Estevez Álvarez, J. R.; Araújo dos Santos, J.; González, I. P.; González, M. R.; Macias, N. A.; Sánchez, D. L.; Torres, D. H. Application of Cold Vapor-Atomic Absorption (CVAAS) Spectrophotometry and Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry Methods for Cadmium, Mercury and Lead Analyses of Fish Samples. Validation of the Method of CVAAS. *Food Control* **2015**, *48*, 37-42.

(86) Fernández-Martínez, R.; Rucandio, I.; Gómez-Pinilla, I.; Borlaf, F.; García, F.; Larrea, M. T. Evaluation of Different Digestion Systems for Determination of Trace Mercury in Seaweeds by Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *38*, 7-12.

(87) Morgano, M. A.; Rabonato, L. C.; Milani, R. F.; Miyagusku, L.; Balian, S. C. Assessment of Trace Elements in Fishes of Japanese Foods Marketed in São Paulo (Brazil). *Food Control* **2011**, *22*, 778-785.

(88) Morgano, M. A.; Rabonato, L. C.; Milani, R. F.; Miyagusku, L.; Quintaes, K. D. As, Cd, Cr, Pb and Hg in Seafood Species Used for Sashimi and Evaluation of Dietary Exposure. *Food Control* **2014**, *36*, 24-29.

- (89) Panichev, N. A.; Panicheva, S. E. Determination of Total Mercury in Fish and Sea Products by Direct Thermal Decomposition Atomic Absorption Spectrometry. *Food Chem.* **2015**, *166*, 432-441.
- (90) Száková, J.; Koliňová, D.; Miholová, D.; Mader, P. Single-Purpose Atomic Absorption Spectrometer AMA-254 for Mercury Determination and Its Performance in Analysis of Agricultural and Environmental Materials. *Chem. Pap.* **2004**, *58*, 311-315.
- (91) Fernández, B.; Lobo, L.; Pereiro, R. Atomic Absorption Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Capabilities. 3<sup>rd</sup> Edition. **2019**.
- (92) Atomic Absorption, Methods and Instrumentation. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 3<sup>a</sup> edição; Elsevier: 2016.
- (93) Manual do equipamento DMA-80 *evo*. Milestone.
- (94) Srdjenovic, B.; Djordjevic-Milic, V.; Grujic, N.; Injac, R.; Lepojevic, Z. Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *J. Chromatogr. Sci.* **2008**, *46*, 144-149.
- (95) Diretiva 2001/22/CE da Comissão Europeia de 8 de março de 2001.

## 6. Anexos

### 6.1 Validação estatística do método para quantificar a teobromina em géneros alimentícios por cromatografia líquida de alta eficiência

#### 6.1.1 Ficha de segurança dos reagentes

Ao longo da realização do procedimento experimental foram adotados determinados cuidados de acordo com a ficha de segurança dos reagentes utilizados, como ilustrado na **Tabela 1A**.

**Tabela 1A: Ficha de segurança dos reagentes para o método de quantificação de teobromina.** Ficha de segurança dos reagentes necessários para quantificar o teor de teobromina em géneros alimentícios.

| Reagente         | Ficha de segurança  |
|------------------|---|
| Teobromina       | H302  |
| Metanol          | H225; H301+H311+H331; H370<br>P210; P243; P280; P302+P352; P304+P340; P308+P310 |
| Éter de petróleo | H225; H304; H315; H336; H411<br>P210; P280; P312; P301+P330+P331; P302+P352     |

| Reagente         | Pictograma | Perigo   |
|------------------|------------|--|
| Teobromina       |            | Nocivo ou irritante  |
| Metanol          |            | Inflamável; tóxico e carcinogénico   |
| Éter de petróleo |            | Inflamável; carcinogénico; nocivo ou irritante e prejudicial para o ambiente |

| Ficha de segurança | Declaração de perigo                                       |
|--------------------|--|
| H225               | Altamente inflamável no estado líquido e gasoso            |
| H302               | Nocivo por ingestão  |
| H304               | Pode ser fatal se ingerido e entrar nas vias respiratórias |
| H315               | Causa irritação na pele                                    |
| H336               | Pode causar sonolência ou tonturas                         |
| H411               | Tóxico para organismos aquáticos com efeito duradouro      |
| H370               | Causa danos no organismo                                   |
| H301+H311+H331     | Tóxico se ingerido, se inalado ou em contacto com a pele   |

| Ficha de segurança | Declaração de precaução   |
|--------------------|---|
| P210               | Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar |
| P243               | Tomar medidas preventivas contra descargas elétricas  |
| P280               | Usar luvas, vestuário, óculos e máscara de proteção   |
| P312               | Em caso de mau estar, chamar os serviços de urgência  |
| P301+P330+P331     | Se ingerido, enxaguar a boca e nunca provocar o vômito  |
| P302+P352          | Se em contacto com a pele, enxaguar abundantemente com água   |
| P304+P340          | Se inalado, remover o indivíduo para o ar livre e manter numa posição que facilite a respiração           |
| P308+P310          | Em caso de exposição, chamar de imediato os serviços de urgência  |
| P312+P352          | Se em contacto com a pele, enxaguar com água e sabão  |

## 6.1.2 Soluções de calibração de teobromina

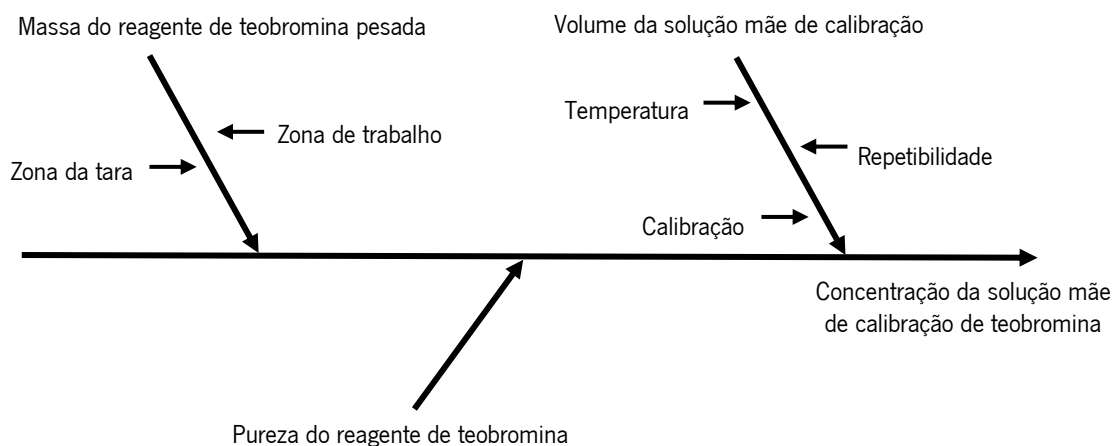
### 6.1.2.1 Cálculo da concentração efetiva da solução mãe de calibração de teobromina e respetiva incerteza combinada associada

Como a teobromina encontrava-se no estado sólido, a  $[\text{Teo}]_{\text{cm}}$  foi calculada como indicado na **Equação 67**, considerando que se pesaram 125,89 mg de teobromina com pureza  $0,98 \pm 0,02$ , para um volume final de 0,25 L, isto é (**Equação 1A**):

$$[\text{Teo}]_{\text{cm}} = \frac{125,89 \times 0,98}{0,25} = 493,49 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 1A})$$

A  $u_c([\text{Teo}]_{\text{cm}})$  foi determinada considerando todas as etapas descritas na metodologia passo-a-passo, como indicado na **Equação 77**. Por este motivo, em primeiro lugar, determinaram-se as fontes de incerteza e, representou-se o diagrama em espinha de peixe para este caso em particular, como representado na **Figura 1A**.





**Figura 1A: Diagrama em espinha de peixe.** Ilustração do diagrama em espinha de peixe para determinar a incerteza combinada associada à concentração da solução mãe de calibração de teobromina.

Deste modo, identificadas as fontes de incerteza, determinou-se, em primeiro lugar,  $u_m$  como indicado na **Equação 73**, sabendo que o e.m.a da balança na zona da tara e na zona de trabalho é igual a 0,5 mg (**Equação 2A**):

$$u_m = \sqrt{\left(\frac{0,5}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,5}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0,41 \text{ mg} \quad (\text{Equação 2A})$$

De seguida, calculou-se a  $u_p$ , como descrito na **Equação 76**, sabendo que  $\alpha$  corresponde a 0,02 (**Equação 3A**):

$$u_p = \frac{0,02}{\sqrt{3}} = 0,012 \quad (\text{Equação 3A})$$

Por fim, determinou-se a  $u_{V_{cm}}$ , como indicado na **Equação 71**. Para tal, inicialmente, determinou-se a  $u_{Mv}$ , como referido na **Equação 68**, sabendo que a T do balão volumétrico de 250 mL equivale a 0,15 mL (**Equação 4A**):

$$u_{Mv} = \frac{0,15}{\sqrt{6}} = 0,061 \text{ mL} \quad (\text{Equação 4A})$$

Posteriormente, de modo a calcular a  $u_r$ , efetuaram-se dez enchimentos de um balão volumétrico de 10 mL e registaram-se as massas do balão, após aferição do menisco, como indicado na **Tabela 2A**:

Tabela 2A: Valores auxiliares para determinação da incerteza padrão associada ao ajuste do menisco de um balão volumétrico.

| Leitura | Massa (g) |
|---------|-----------|
| 1       | 9,9255    |
| 2       | 9,9147    |
| 3       | 9,9592    |
| 4       | 9,9372    |
| 5       | 9,9323    |
| 6       | 9,9128    |
| 7       | 9,9834    |
| 8       | 9,9897    |
| 9       | 9,9902    |
| 10      | 9,9186    |

A partir dos resultados apresentados, determinou-se o desvio padrão, como indicado na **Equação 2**, que foi de 0,032 g e corresponde à  $u_r$ .

Por fim, para calcular a  $u_T$  como indicado na **Equação 70**, determinou-se a  $\Delta V$  dada pela **Equação 69**, isto é (**Equação 5A**):

$$\Delta V = \pm(4 \times 250 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,21 \text{ mL} \quad (\text{Equação 5A})$$

Assim,  $u_T$  correspondeu a (**Equação 6A**):

$$u_T = \frac{0,21}{\sqrt{3}} = 0,12 \text{ mL} \quad (\text{Equação 6A})$$

Deste modo, a  $u_{V_{cm}}$  foi dada por (**Equação 7A**):

$$u_{V_{cm}} = \sqrt{(0,061)^2 + (0,032)^2 + (0,12)^2} = 0,14 \text{ mL} \quad (\text{Equação 7A})$$

Assim, a  $u_c([Teo]_{cm})$  correspondeu a (**Equação 8A**):

$$u_c([\text{Teo}]_{\text{cm}}) = 493,49 \times \sqrt{\left(\frac{0,41}{125,89}\right)^2 + \left(\frac{0,012}{0,980}\right)^2 + \left(\frac{0,14}{250,00}\right)^2} = 6,0 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 8A})$$

Assim, a  $[\text{Teo}]_{\text{cm}}$  foi apresentada na forma (Equação 9A):

$$[\text{Teo}]_{\text{cm}} = 493,5 \pm 6,0 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 9A})$$

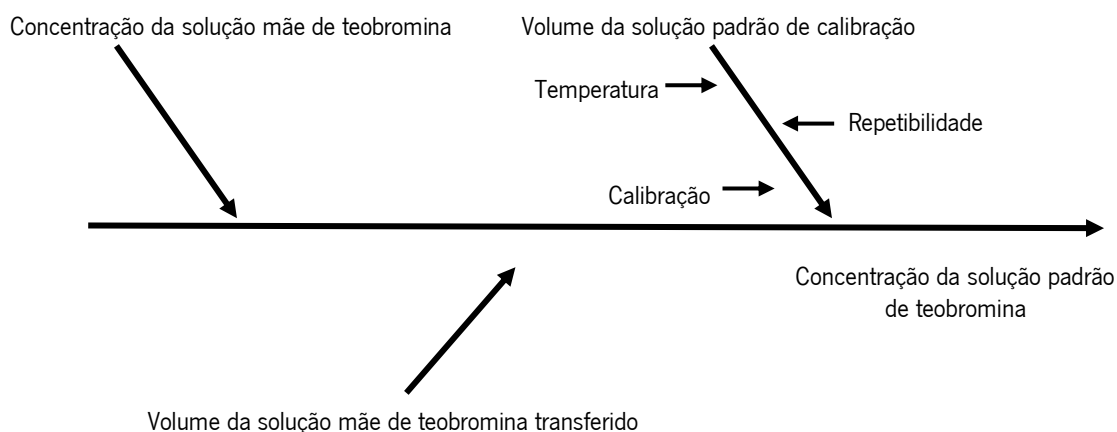
#### 6.1.2.2 Cálculo da concentração efetiva das soluções padrão de calibração de teobromina e respetiva incerteza combinada associada

Como as soluções padrão de calibração de teobromina foram preparadas por diluição ou da solução mãe de calibração de teobromina, ou da solução padrão de teobromina com concentração de, aproximadamente, 10 mg/L, a concentração efetiva de cada um destes padrões ( $[\text{Teo}]_{\text{pc}}$ ) foi calculada de acordo com a Equação 66.

Tomando como exemplo o padrão de maior concentração, sabendo que foi preparado a partir da transferência de 10 mL da solução mãe de calibração de teobromina com concentração de  $493,5 \pm 6,0$  mg/L, para um balão volumétrico de 50 mL teve-se que (Equação 10A):

$$[\text{Teo}]_{\text{pc}} = \frac{493,5 \times 10}{50} = 98,70 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 10A})$$

A incerteza combinada desta solução padrão ( $u_c([\text{Teo}]_{\text{pc}})$ ) foi determinada considerando, uma vez mais, todas as etapas descritas na metodologia passo-a-passo, como indicado na Equação 72. Assim, determinaram-se as fontes de incerteza e, representou-se o diagrama em espinha de peixe para este caso, como representado na Figura 2A.



**Figura 2A: Diagrama em espinha de peixe.** Ilustração do diagrama em espinha de peixe para determinar a incerteza combinada associada à concentração de um padrão de calibração de teobromina.

Desta forma, identificadas as fontes de incerteza, sabe-se que a  $u_c([\text{Teo}]_{\text{cm}})$  correspondeu a 6,0 mg/L.

Para além disso, sabe-se que a incerteza padrão associada ao volume da solução mãe de calibração de teobromina transferido para preparar esta solução padrão equivale à incerteza indicada no certificado da micropipeta utilizada, que corresponde a 0,0064 mL.

Por fim, para calcular a  $u_{\text{Vcm}}$  procedeu-se como descrito anteriormente, e teve-se que (**Equação 11A**):

$$u_{\text{Vcm}} = \sqrt{(0,024)^2 + (0,032)^2 + (0,024)^2} = 0,047 \text{ mL} \quad (\text{Equação 11A})$$

Assim, a  $u_c([\text{Teo}]_{\text{pc}})$  correspondeu a (**Equação 12A**):

$$u_c([\text{Teo}]_{\text{pc}}) = 98,70 \times \sqrt{\left(\frac{6,0}{493,5}\right)^2 + \left(\frac{0,0064}{10,0000}\right)^2 + \left(\frac{0,047}{50,000}\right)^2} = 1,2 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 12A})$$

Assim, a  $[\text{Teo}]_{\text{pc}}$  foi apresentada na forma de (**Equação 13A**):

$$[\text{Teo}]_{\text{pc}} = 98,7 \pm 1,2 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 13A})$$

### 6.1.3 Curva de calibração da teobromina

#### 6.1.3.1 Cálculo das incertezas associadas aos coeficientes do modelo de regressão linear

Para calcular a  $s_a$  e a  $s_b$  do modelo de regressão linear, sendo que  $s_a$  e  $s_b$  foram obtidos recorrendo às **Equações 27** e **28**, respetivamente, foi necessário realizar alguns cálculos auxiliares, os quais necessitaram dos dados apresentados na **Tabela 3A**.

**Tabela 3A:** Valores auxiliares para o cálculo das incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem do modelo de regressão linear. Valores das áreas dos picos da teobromina ( $y_i$ ) obtidos experimentalmente para cada um dos padrões de calibração de teobromina, bem como os valores das áreas dos picos da teobromina estimados a partir do modelo de regressão linear ( $\hat{y}_i$ ), os valores das concentrações de teobromina ( $[\text{Teo}]$ ) em cada uma das soluções padrão de teobromina, juntamente com o valor médio das concentrações de teobromina nas soluções padrão de calibração ( $\overline{[\text{Teo}]}$ ).

|           | $[\text{Teo}]$<br>(mg/L) | $[\text{Teo}]^2$<br>(mg/L) <sup>2</sup> | $y_i$<br>(mUA.s) | $\hat{y}_i$<br>(mUA.s) | $(y_i - \hat{y}_i)^2$<br>(mUA.s) <sup>2</sup> | $([\text{Teo}] - \overline{[\text{Teo}]})^2$<br>(mg/L) <sup>2</sup> |
|-----------|--------------------------|---|------------------|------------------------|---|---|
|           | 1,97                     | 3,897                                   | 109,879          | 109,586                | 55,922  | 825,529   |
|           | 3,95                     | 15,587                                  | 217,445          | 220,431                | 75,064  | 715,992   |
|           | 5,92                     | 35,070                                  | 332,149          | 331,182                | 7,354   | 614,248   |
|           | 7,90                     | 62,347                                  | 440,894          | 441,839                | 7,391   | 520,297   |
|           | 9,87                     | 97,412                                  | 552,495          | 552,390                | 0,020   | 434,149   |
|           | 24,67                    | 608,828                                 | 1378,109         | 1378,592               | 102,751                                       | 36,380  |
|           | 49,35                    | 2435,312                                | 2759,036         | 2743,829               | 1004,666                                      | 347,556   |
|           | 74,02                    | 5479,452                                | 4075,174         | 4094,357               | 133,002                                       | 1876,389  |
|           | 98,70                    | 9741,248                                | 5437,203         | 5430,178               | 78,691  | 4622,877  |
| Média     | 30,71                    | ——                                      | ——               | ——                     | ——  | ——  |
| Somatório | ——                       | 18479,152                               | ——               | ——                     | 1464,861                                      | 9993,416  |

Através dos dados apresentados acima, determinou-se o valor do  $s_{y/x}$ , como descrito na **Equação 29**, isto é (**Equação 14A**):

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{1464,861}{9 - 2}} = 14 \text{ mUA. s} \quad (\text{Equação 14A})$$

Deste modo, calcularam-se os valores de  $s_a$  e  $s_b$ , como descrito nas **Equações 15A** e **16A**, respetivamente:

$$s_a = 14 \times \sqrt{\frac{18479,152}{9 \times 9993,416}} = 6,6 \text{ mUA. s} \quad (\text{Equação 15A})$$

$$s_b = \frac{14}{\sqrt{9993,416}} = 0,15 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 16A})$$

Os valores de  $s_a t$  e  $s_b t$  foram calculados multiplicando os valores de  $s_a$  e  $s_b$  pelo valor de  $t$  indicado na tabela *t-student* para  $n-2$  G.L e 95 % de confiança, que corresponde a 2,36 (Equações 17A e 18A):

$$s_a t = 6,6 \times 2,36 = 15 \text{ mUA. s} \quad (\text{Equação 17A})$$

$$s_b t = 0,15 \times 2,36 = 0,34 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 18A})$$

### 6.1.3.2 Modelo de regressão linear

De modo a demonstrar que o modelo de regressão linear era aquele que apresentava um melhor ajuste dos dados obtidos realizaram-se dois testes estatísticos.

#### 6.1.3.2.1 Teste de significância para o $r$

Realizou-se o teste  $t$  para o  $r$  do modelo de regressão linear para avaliar se este modelo era o mais indicado face aos resultados apresentados. Assim, na **Tabela 4A** encontram-se resumidos os dados necessários e o valor de  $t$  calculado de acordo com a **Equação 45**, isto é, (Equação 19A):

$$t = \frac{|0,99998| \times \sqrt{9 - 2}}{\sqrt{1 - 0,99995}} = 380,71 \quad (\text{Equação 19A})$$

**Tabela 4A: Teste de significância para o  $r$ .** Valores do número de soluções padrão utilizadas para o traçado da curva de calibração de teobromina ( $n$ ), bem como o coeficiente de correlação obtido no modelo de regressão linear ( $r$ ), o valor de  $t$  calculado no teste estatístico e o valor de  $t$  indicado na tabela *t-student* para  $n-2$  graus de liberdade e 95 % de confiança.

| $n$ | $r$     | $r^2$   | $t$ calculado | $t$ tabelado |
|-----|---------|---------|---------------|--------------|
| 9   | 0,99998 | 0,99995 | 380,71        | 2,36         |

Verificou-se que o valor de  $t$  calculado foi superior ao valor de  $t$  indicado na tabela *t-student* para  $n-2$  G.L e 95 % de confiança, que corresponde a 2,36, o que indica que existe uma correlação linear entre as áreas dos picos dos padrões de calibração de teobromina e a concentração deste analito nos mesmos padrões.

### 6.1.3.2.2 Teste de Mandel

Para realizar o teste de Mandel, em primeiro lugar obtiveram-se as equações das retas do modelo de regressão linear e do modelo de regressão quadrático que correspondem a Área do pico (mUA.s) = (55,09 ± 0,34) [Teo] (mg/L) + (9 ± 15) (mUA.s) e Área do pico (mUA.s) = (-0,012 ± 0,011) [Teo]<sup>2</sup> (mg/L)<sup>2</sup> + (56,2 ± 1,0) [Teo] (mg/L) - (1 ± 14) (mUA.s), respetivamente. De seguida, foi necessário determinar os valores do  $s_{y/x}$  e do  $s_{y^2}$  de acordo com as **Equações 29** e **40**, respetivamente. O valor do  $s_{y/x}$  foi determinado anteriormente, como ilustrado na **Equação 14A**. Para determinar o valor de  $s_{y^2}$  foi necessário efetuar alguns cálculos auxiliares, como indicado na **Tabela 5A**.

**Tabela 5A: Valores auxiliares para o cálculo do desvio padrão residual do modelo de regressão quadrático.** Valores das áreas dos picos da teobromina ( $y_i$ ) obtidos experimentalmente para cada um dos padrões de calibração de teobromina, bem como os valores das áreas dos picos da teobromina estimados a partir do modelo de regressão quadrático ( $\hat{y}_i$ ) e, a concentração de teobromina em cada um dos padrões de calibração ([Teo]).

|           | [Teo]<br>(mg/L) | $y_i$<br>(mUA.s) | $\hat{y}_i$<br>(mUA.s) | $(y_i - \hat{y}_i)^2$<br>(mUA.s) <sup>2</sup> |
|-----------|-----------------|------------------|------------------------|---|
|           | 1,97            | 109,879          | 109,586                | 0,086   |
|           | 3,95            | 217,445          | 220,431                | 8,918   |
|           | 5,92            | 332,149          | 331,182                | 0,934   |
|           | 7,90            | 440,894          | 441,839                | 0,894   |
|           | 9,87            | 552,495          | 552,390                | 0,011   |
|           | 24,67           | 1378,109         | 1378,592               | 0,233   |
|           | 49,35           | 2759,036         | 2743,829               | 231,265                                       |
|           | 74,02           | 4075,174         | 4094,357               | 368,006                                       |
|           | 98,70           | 5437,203         | 5430,178               | 49,346  |
| Somatório | 30,71           | —                | —                      | 659,693                                       |

Assim, teve-se (**Equação 20A**):

$$s_{y^2} = \sqrt{\frac{659,693}{9 - 3}} = 10 \text{ mUA. s} \quad (\text{Equação 20A})$$

Deste modo, calculou-se o  $DS^2$  recorrendo à **Equação 46**, isto é (**Equação 21A**):

$$DS^2 = (9 - 2) \times (14)^2 - (9 - 3) \times (10)^2 = 805,17 \text{ (mUA. s)}^2 \quad (\text{Equação 21A})$$

Por fim, de acordo com a **Equação 47**, calculou-se o valor PG, ou seja (**Equação 22A**):

$$PG = \frac{805,17}{(10)^2} = 7,323 \quad (\text{Equação 22A})$$

Verificou-se que o valor de PG foi inferior ao valor de F indicado na tabela F de Fisher para 1 G.L no numerador, n-3 G.L no denominador e 95 % de confiança, que corresponde a 8,813, corroborando a conclusão da existência de uma correlação linear entre as áreas dos picos e a concentração de teobromina nas soluções padrão.

## 6.1.4 Sensibilidade

### 6.1.4.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para se avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor dos declives obtidos para determinar os limites e o valor alvo da carta de controlo provisória do declive da curva de calibração de teobromina.

Deste modo, consideraram-se como suspeitos os declives mínimo e máximo registados quando se efetuaram as curvas de calibração, que corresponderam a 53,74 e 55,40 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, respetivamente. O valor médio dos declives, como indicado pela **Equação 1**, foi de 54,66 UA.s.L.g<sup>-1</sup> e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,74 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, considerando estes dois valores para o seu cálculo. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 6A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n = 7 e, 95 % de confiança.

**Tabela 6A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar algum declive considerado para elaborar a carta de controlo do declive da curva de calibração de teobromina, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 7) para 95 % de confiança.

| Declive<br>(UA.s.L.g <sup>-1</sup> ) | G calculado | G tabelado |
|--------------------------------------|-------------|------------|
| 53,74                                | 1,23        | 2,02       |
| 55,40                                | 1,01        |            |

Tomando como exemplo o menor declive, o valor de G foi calculado como indicado na **Equação 3**, isto é (**Equação 23A**):



$$G = \frac{|53,74 - 54,66|}{0,74} = 1,23 \quad (\text{Equação 23A})$$

Como os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado concluiu-se que nenhum dos valores suspeitos deveria ser rejeitado para elaborar a carta de controlo.

#### 6.1.4.2 Carta de controlo do declive

Sabendo que o valor alvo da carta de controlo correspondeu ao valor médio dos declives, isto é, 54,66 UA.s.L.g<sup>-1</sup> e, o desvio padrão calculado foi de 0,74 UA.s.L.g<sup>-1</sup>, determinaram-se os LSA, LIA, LSC e, LIC (Equações 24A, 25A, 26A e, 27A, respetivamente):

$$\text{LSA} = 54,66 + 2 \times 0,74 = 56,14 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 24A})$$

$$\text{LIA} = 54,66 - 2 \times 0,74 = 53,17 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 25A})$$

$$\text{LSC} = 54,66 + 3 \times 0,74 = 56,89 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 26A})$$

$$\text{LIC} = 54,66 - 3 \times 0,74 = 52,42 \text{ UA. s. L. g}^{-1} \quad (\text{Equação 27A})$$

#### 6.1.4.3 Determinação do coeficiente de variação

A sensibilidade do método analítico foi avaliada através da determinação do CV, como descrito na Equação 51, ou seja (Equação 28A):

$$\text{CV} = \frac{0,69}{54,68} \times 100 = 1,3 \% \quad (\text{Equação 28A})$$

De acordo com o procedimento interno do laboratório, os resultados são satisfatórios se o CV for inferior a 10 %. Como tal se verificou, concluiu-se que a sensibilidade do método não sofreu alterações significativas ao longo do tempo.

### 6.1.5 Limite de quantificação

#### 6.1.5.1 Determinação da concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação

A concentração de teobromina adicionada ([Teo]adicionada), em mg/L, em cada um dos ensaios de recuperação realizados foi determinada considerando a concentração de teobromina da solução mãe, que equivale a 496,7 ± 6,0 mg/L, o volume de solução mãe de teobromina adicionado, que foi de 0,5

mL e, o volume final de solução em cada ensaio, que foi variando de ensaio para ensaio. Considerando como exemplo o Ensaio 1, teve-se que (Equação 29A):

$$[\text{Teo}]_{\text{adicionada}} = \frac{496,7 \times 0,5}{101,165} = 2,45 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 29A})$$

A  $[\text{Teo}]_{\text{adicionada}}$ , em mg/Kg, foi determinada considerando a  $[\text{Teo}]_{\text{adicionada}}$  em mg/L, a massa de amostra pesada, em g e, o volume final de solução em cada ensaio, como descrito na Equação 96. Considerando como exemplo o Ensaio 1, teve-se que (Equação 30A):

$$[\text{Teo}]_{\text{adicionada}} = \frac{2,45 \times 101,165}{10,1268} = 24,52 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 30A})$$

#### 6.1.5.2 Determinação da taxa de recuperação

A taxa de recuperação, R, obtida em cada ensaio de recuperação foi calculada como descrito na Equação 12. Tomando como exemplo o Ensaio 1, teve-se que (Equação 31A):

$$R = \frac{3,77 - 1,43}{2,45} \times 100 = 95,7 \% \quad (\text{Equação 31A})$$

De seguida, efetuou-se o teste de Grubbs para avaliar se algum dos valores da R calculados deveria ser rejeitado. Para tal, em primeiro lugar determinou-se a  $\bar{R}$  considerando os valores suspeitos, que foi de 93,0 % e, o respetivo desvio padrão que correspondeu a 9,1 %, sendo que se consideraram como suspeitos os extremos da R obtidos, isto é, 80,8 e 109,7 %. Os valores de G calculados para cada um dos suspeitos encontram-se apresentados na Tabela 7A, bem como o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n = 8 e, 95 % de confiança.

**Tabela 7A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma taxa de recuperação (R) calculada nos ensaios de recuperação efetuados, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 8) para 95 % de confiança.

| R (%) | G calculado | G tabelado |
|-------|-------------|------------|
| 80,8  | 1,34        | 2,13       |
| 109,7 | 1,84        |            |

Como os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado concluiu-se que nenhum dos valores suspeitos deveria ser rejeitado para a determinação do LDQ do método.

### 6.1.5.3 Verificação do LDQ

De modo a verificar a estabilidade do LDQ ao longo do tempo, este parâmetro deve ser calculado sempre que se realizar o traçado de uma curva de calibração, como descrito pela **Equação 50**. Assim, tomando como exemplo a curva de calibração efetuada a 09/03/2020, verificou-se que o declive desta curva correspondeu a 55,09 UA.s.L.g<sup>-1</sup> e o  $s_{y/x}$  foi de 14 mUA.s. Assim, teve-se que (**Equação 32A**):

$$LDQ = \frac{14 \times 10}{55,09} = 2,63 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 32A})$$

## 6.1.6 Gama de trabalho

### 6.1.6.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor da área do pico determinada para cada um dos padrões de calibração de teobromina quando se procedeu ao estudo da gama de trabalho.

Considerando o padrão de calibração com menor concentração de teobromina, assumiram-se como suspeitos as áreas dos picos máxima e mínima registadas quando se analisou este padrão por HPLC, que correspondem a 109,951 e 107,568 mUA.s, respetivamente. O valor médio das áreas dos picos, determinado como indicado pela **Equação 1**, foi de 109,02 mUA.s e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,61 mUA.s, considerando estes dois suspeitos. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 8A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 10) para 95 % de confiança.

**Tabela 8A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma área do pico obtida na análise do padrão com menor concentração de teobromina, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 10) para 95 % de confiança.

| Área do pico (mUA.s) | G calculado | G tabelado |
|----------------------|-------------|------------|
| 109,951              | 1,51        | 2,29       |
| 107,568              | 2,37        |            |

Como o valor de G calculado para o menor valor suspeito foi superior ao valor de G tabelado concluiu-se que este valor deveria ser rejeitado para o estudo da gama de trabalho.

Tendo em conta o padrão de calibração com maior concentração de teobromina, consideraram-se como suspeitos, novamente, as áreas dos picos máxima e mínima registadas quando se analisou este padrão por HPLC, que equivaleram a 5419,386 e 5351,820 mUA.s, respetivamente. O valor médio da área do pico, calculado de acordo com a **Equação 1**, foi de 5403 mUA.s e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 17 mUA.s, considerando estes dois valores. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 9A**, bem como o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 10) para 95 % de confiança.

**Tabela 9A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma área do pico obtida na análise do padrão com maior concentração de teobromina, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 10) para 95 % de confiança.

| Área do pico (mUA.s) | G calculado | G tabelado |
|----------------------|-------------|------------|
| 5419,386             | 0,93        | 2,29       |
| 5351,820             | 3,00        |            |

Também neste caso, como o valor de G calculado para o menor valor suspeito foi superior ao valor de G tabelado concluiu-se que este valor deveria ser rejeitado para o estudo da gama de trabalho.

Para além disso, verificou-se que não era necessário eliminar mais nenhum suspeito para ambos os padrões de calibração.

#### 6.1.6.2 Teste F de Snedecor Fisher

Para avaliar se a gama de trabalho se encontrava bem ajustada, avaliou-se a homogeneidade das variâncias ao longo da mesma e, para tal, aplicou-se o teste F de Snedecor-Fisher. Neste caso, o valor de F foi calculado, tendo em consideração a **Equação 6**, isto é (**Equação 33A**):

$$F = \frac{35,3}{0,18} = 192,72 \quad (\text{Equação 33A})$$

Como o valor de F calculado foi superior ao valor de F indicado na tabela de Fisher (n = 9) para 95 % de confiança concluiu-se que a gama de trabalho encontra-se mal ajustada.

## 6.1.7 Seletividade

### 6.1.7.1 Determinação da concentração de teobromina adicionada no ensaio de recuperação

A [Teo]adicionada, em mg/L, em cada um dos ensaios de recuperação realizados com a matriz ração, foi determinada considerando a concentração de teobromina da solução mãe, que equivale a  $493,5 \pm 6,0$  mg/L, o volume de solução mãe de teobromina adicionado, que foi de 15 mL e, o volume final de solução em cada ensaio, que variou de ensaio para ensaio. Considerando como exemplo o Ensaio 1, teve-se que (Equação 34A):

$$[\text{Teo}]_{\text{adicionada}} = \frac{493,5 \times 15}{100,068} = 73,97 \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 34A})$$

A [Teo]adicionada, em mg/Kg, foi determinada considerando a [Teo]adicionada em mg/L, a massa de amostra pesada, em g e, o volume final de solução em cada ensaio. Considerando como exemplo o Ensaio 1, teve-se que (Equação 35A):

$$[\text{Teo}]_{\text{adicionada}} = \frac{73,97 \times 100,068}{10,0536} = 736,3 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 35A})$$

### 6.1.7.2 Determinação da taxa de recuperação

A R obtida em cada ensaio de recuperação foi calculada como descrito na Equação 12. Tomando como exemplo o Ensaio 1, vem (Equação 36A):

$$R = \frac{64,20 - 0}{73,97} = 86,8 \% \quad (\text{Equação 36A})$$

De seguida, efetuou-se o teste de Grubbs para avaliar se algum dos valores da R calculados deveria ser rejeitado, sendo que se consideraram como suspeitos os extremos da R obtidos, ou seja, 83,4 e 90,0 %. Para tal, inicialmente calculou-se o  $\bar{R}$  considerando os valores suspeitos, que foi de 86,2 % e, o respetivo desvio padrão que correspondeu a 2,3 %. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 10A.

**Tabela 10A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma taxa de recuperação (R) calculada nos ensaios de recuperação efetuados, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 8) para 95 % de confiança.

| R (%) | G calculado | G tabelado |
|-------|-------------|------------|
| 83,4  | 1,26        | 2,13       |
| 90,0  | 1,70        |            |

Como os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado concluiu-se que nenhum dos valores suspeitos deveria ser rejeitado para o estudo da seletividade.

## 6.1.8 Precisão em condições de repetibilidade

### 6.1.8.1 Gama de trabalho geral

#### 6.1.8.1.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para avaliar se algum dos valores da concentração de teobromina determinados para os replicados estudados na repetibilidade do método deveria ser rejeitado. Foram considerados como suspeitos o maior e o menor valores de concentração de teobromina determinados para cada matriz, sendo que os resultados obtidos encontram-se referidos na **Tabela 11A**, juntamente com o valor de G tabelado (n = 8) para 95 % de confiança.

**Tabela 11A: Teste de Grubbs.** Valores de G calculados na realização do teste de Grubbs, considerando como suspeitos as concentrações mínima e máxima de teobromina ([Teo]) obtidas para cada matriz considerada no estudo da precisão em condições de repetibilidade, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs (n = 8) para 95 % de confiança.

| Matriz                                | [Teo]mínima (mg/Kg) | G calculado | [Teo]máxima (mg/Kg) | G calculado | G tabelado |
|---------------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|------------|
| Chocolate de leite                    | 1622,7              | 1,44        | 1706,6              | 0,99        | 2,13       |
| Chocolate preto                       | 7397,7              | 2,09        | 7566,4              | 1,04        |            |
| Chocolate branco                      | 34,0                | 1,21        | 41,5                | 1,87        |            |
| Chocolate de leite (DPCS)             | 1200,5              | 1,04        | 1272,6              | 2,03        |            |
| Mistura para bolo de chocolate (DPCS) | 1981,4              | 1,71        | 2188,9              | 1,24        |            |
| Suplemento em pó                      | 1635,4              | 1,54        | 1765,9              | 1,39        |            |
| Bebida de soja com chocolate          | 289,6               | 1,70        | 349,0               | 1,37        |            |
| Bolacha                               | 1152,5              | 1,62        | 1179,2              | 1,16        |            |
| Barras de cereais                     | 677,8               | 1,31        | 794,8               | 1,24        |            |

|                         |     |         |      |         |      |
|-------------------------|-----|---------|------|---------|------|
| Cereais                 |     | 286,3   | 1,55 | 297,4   | 1,24 |
| Amendoins com chocolate | com | 1685,1  | 1,36 | 1782,7  | 1,69 |
| Cacau em pó             |     | 18368,4 | 1,49 | 18737,6 | 1,79 |
| Leite com chocolate     | com | 297,2   | 1,54 | 309,4   | 2,06 |
| Creme para barrar       |     | 1475,9  | 1,13 | 1544,4  | 1,65 |
| Ração                   |     | 613,4   | 1,28 | 665,2   | 1,73 |

Como os valores de G calculados para todas as matrizes analisadas foram inferiores ao valor de G tabelado concluiu-se que nenhum dos valores apresentados deveria ser rejeitado para o estudo da repetibilidade.

#### 6.1.8.1.2 Teste de Cochran

De modo a avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o cálculo da repetibilidade do método, realizou-se um teste de Cochran, que tem por base a análise das variâncias calculadas para cada matriz utilizada no estudo da repetibilidade. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 12A**, juntamente com o valor de C indicado na tabela de Cochran para  $n = 8$ ,  $k$  variável e, 95 % de confiança.

**Tabela 12A: Teste de Cochran.** Valores de C calculados para as matrizes com a maior variância dos resultados ( $s^2$ ) consideradas no estudo da repetibilidade, bem como o valor do somatório de todas as  $s^2$  calculadas. Para além disso, encontram-se apresentados os valores de C tabelados para um número de ensaios ( $n$ ) igual a 8 e número de matrizes consideradas ( $k$ ) variável e 95 % de confiança.

| Matriz                                | Maior $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $\sum s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | C calculado | C tabelado | k  |
|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|------------|----|
| Cacau em pó                           | 12687                               | 28786                              | 0,441       | 0,191      | 15 |
| Mistura para bolo de chocolate (DPCS) | 4937                                | 16099                              | 0,307       | 0,230      | 14 |
| Chocolate preto                       | 2901                                | 11162                              | 0,260       | 0,230      | 13 |
| Barras de cereais                     | 2098                                | 8261                               | 0,254       | 0,230      | 12 |
| Suplemento em pó                      | 1985                                | 6163                               | 0,322       | 0,267      | 11 |
| Chocolate de leite                    | 1197                                | 4178                               | 0,287       | 0,267      | 10 |
| Amendoins com chocolate               | 1022                                | 2981                               | 0,343       | 0,290      | 9  |
| Creme para barrar                     | 610                                 | 1959                               | 0,311       | 0,319      | 8  |

Tomando como exemplo a matriz cacau em pó, o valor de C foi calculado como descrito na **Equação 16**, isto é (**Equação 37A**):

$$C = \frac{12687}{28786} = 0,441 \quad (\text{Equação 37A})$$

Como os valores de C calculados para todas as matrizes analisadas, com exceção da última, foram superiores aos valores de C tabelados, concluiu-se que estas matrizes deveriam ser rejeitadas para o estudo da repetibilidade, caso a gama de trabalho não fosse dividida em gamas menores.

### 6.1.8.2 Gama de trabalho baixa

#### 6.1.8.2.1 Teste de Cochran

Para a gama baixa de concentração de teobromina,  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500 \text{ mg/Kg}$ , realizou-se um teste de Cochran, como descrito na **Equação 10**, para verificar se alguma das matrizes consideradas nesta gama deveria ser rejeitada. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na **Tabela 13A**.

**Tabela 13A: Teste de Cochran para a gama de trabalho baixa.** Valores de C calculados para as matrizes com a maior variância dos resultados ( $s^2$ ) consideradas no estudo da precisão em condições de repetibilidade na menor gama de trabalho, bem como o valor do somatório de todas as  $s^2$  calculadas. Valores de C tabelados para  $n = 8$ ,  $k$  variável e, 95 % de confiança, sendo  $n$  o número de ensaios efetuados e,  $k$  o número de matrizes consideradas para o estudo.

| Matriz                       | Maior $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $\sum s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | C calculado | C tabelado | k |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|------------|---|
| Bebida de soja com chocolate | 374                                 | 408                                | 0,918       | 0,537      | 4 |
| Cereal                       | 16                                  | 33                                 | 0,477       | 0,653      | 3 |

Como o valor de C calculado para a matriz bebida de soja com chocolate foi superior ao valor de C tabelado, concluiu-se que esta matriz não deveria ser considerada para o estudo da repetibilidade na gama de trabalho baixa e, como tal, não foi incluída nas matrizes acreditadas pelo método.

#### 6.1.8.2.2 Determinação do CV<sub>r</sub>, do r<sub>e</sub> e, do CV<sub>r</sub>

Tomando como exemplo a matriz chocolate branco, o CV<sub>r</sub> foi determinado de acordo com a **Equação 52**, sabendo que o  $s_r$  corresponde a 2,4 mg/Kg e o valor médio a 36,9 mg/Kg, isto é (**Equação 38A**):

$$CV_r = \frac{2,4}{36,9} \times 100 = 6,6 \% \quad (\text{Equação 38A})$$



Admitindo a mesma matriz, o  $r_r$  foi calculado como indicado na **Equação 53**, ou seja (**Equação 39A**):

$$r_r = 2,8 \times 2,4 = 6,8 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 39A})$$

Por último, o  $CVr_r$  foi calculado como descrito na **Equação 54**, isto é (**Equação 40A**):

$$CVr_r = 2,8 \times \frac{2,4}{36,9} \times 100 = 18 \% \quad (\text{Equação 40A})$$

De acordo com o procedimento interno do laboratório, os resultados são satisfatórios se o  $CV_r$  for inferior a 10 %. Como tal se verificou, concluiu-se que os erros aleatórios observados em ensaios efetuados em condições de repetibilidade não influenciam a confiança nos resultados obtidos pelo método na gama de trabalho baixa.

### 6.1.8.3 Gama de trabalho intermédia

#### 6.1.8.3.1 Teste de Cochran

Para a gama de concentração de teobromina intermédia, compreendida entre 500 e 2000 mg/Kg, realizou-se um teste de Cochran, de acordo com a **Equação 10**, para verificar se alguma das matrizes consideradas nesta gama deveria ser rejeitada. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 14A**, juntamente com o valor de C indicado na tabela de Cochran para  $n = 8$ ,  $k = 8$  e, 95 % de confiança.

**Tabela 14A: Teste de Cochran para a gama de trabalho intermédia.** Valor de C calculado para a matriz com a maior variância dos resultados ( $s^2$ ) considerada no estudo da repetibilidade da gama de trabalho intermédia, bem como o valor do somatório de todas as  $s^2$  calculadas. Valor de C tabelado para  $n = 8$ ,  $k = 8$  e, 95 % de confiança, sendo n o número de ensaios efetuados e, k o número de matrizes consideradas para o estudo.

| Matriz            | Maior $s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $\sum s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | C calculado | C tabelado | k |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------|------------|---|
| Barras de cereais | 2098                                | 7853                               | 0,267       | 0,319      | 8 |

Como o valor de C calculado para esta matriz foi inferior ao valor de C tabelado, concluiu-se que a matriz barras de cereais não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade na gama de trabalho intermédia.

### 6.1.8.3.2 Determinação do CV<sub>r</sub>, do r<sub>r</sub> e, do CV<sub>r</sub><sub>r</sub>

Tomando como exemplo a matriz chocolate de leite, o CV<sub>r</sub> foi determinado de acordo com a **Equação 52**, sabendo que o s<sub>r</sub> corresponde a 35 mg/Kg e o valor médio a 1672 mg/Kg, isto é (**Equação 41A**):

$$CV_r = \frac{35}{1672} \times 100 = 2,1 \% \quad (\text{Equação 41A})$$

Admitindo a mesma matriz, o r<sub>r</sub> foi calculado como indicado na **Equação 53**, ou seja (**Equação 42A**):

$$r_r = 2,8 \times 35 = 97 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 42A})$$

Por último, o CV<sub>r</sub><sub>r</sub> foi calculado como descrito na **Equação 54**, isto é (**Equação 43A**):

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{35}{1672} \times 100 = 5,8 \% \quad (\text{Equação 43A})$$

Como o valor do CV<sub>r</sub> calculado foi inferior ao valor máximo admitido internamente pelo laboratório (10 %), concluiu-se que, também na gama de trabalho intermédia, os erros aleatórios observados em análises realizadas em condições de repetibilidade não influenciam a confiança nos resultados obtidos.

### 6.1.8.4 Gama de trabalho alta

#### 6.1.8.4.1 Teste de Cochran

Para a gama de concentração de teobromina alta, compreendida entre 2000 e 20000 mg/Kg, realizou-se um teste de Cochran, de acordo com a **Equação 10**, para verificar se alguma das matrizes consideradas nesta gama deveria ser rejeitada. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 15A**, juntamente com o valor de C indicado na tabela de Cochran para n = 8, k = 3 e, 95 % de confiança.

**Tabela 15A: Teste de Cochran para a gama de trabalho alta.** Valor de C calculado para a matriz com a maior variância dos resultados (s<sup>2</sup>) considerada no estudo da repetibilidade da gama de trabalho alta, bem como o valor do somatório de todas as s<sup>2</sup> calculadas. Valor de C tabelado para n = 8, k = 3 e, 95 % de confiança, sendo n o número de ensaios efetuados e, k o número de matrizes consideradas para o estudo.

| Matriz      | Maior s <sup>2</sup><br>((mg/Kg) <sup>2</sup> ) | $\sum s^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | C calculado | C tabelado | k |
|-------------|---|------------------------------------|-------------|------------|---|
| Cacau em pó | 12687   | 20525                              | 0,618       | 0,653      | 3 |

Também nesta gama de trabalho, como o valor de C calculado para a matriz cacau em pó foi inferior ao valor de C tabelado, concluiu-se que esta matriz não deveria ser rejeitada para o estudo da repetibilidade na gama de trabalho alta.

#### 6.1.8.4.2 Determinação do $CV_r$ , do $r_r$ e, do $CV_{r_r}$

Tomando como exemplo a matriz chocolate preto, o  $CV_r$  foi determinado de acordo com a **Equação 52**, sabendo que o  $s_r$  corresponde a 54 mg/Kg e o valor médio a 7510 mg/Kg, isto é (**Equação 44A**):

$$CV_r = \frac{54}{7510} \times 100 = 0,72 \% \quad (\text{Equação 44A})$$

Admitindo a mesma matriz, o  $r_r$  foi calculado como indicado na **Equação 53**, ou seja (**Equação 45A**):

$$r_r = 2,8 \times 54 = 151 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 45A})$$

Por último, o  $CV_{r_r}$  foi calculado como descrito na **Equação 54**, isto é (**Equação 46A**):

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{54}{7510} \times 100 = 2,0 \% \quad (\text{Equação 46A})$$

De acordo com o procedimento interno do laboratório, os resultados são satisfatórios se o  $CV_r$  for inferior a 10 %. Como tal se verificou, concluiu-se que os erros aleatórios observados em análises efetuadas em condições de repetibilidade não influenciam a confiança nos resultados obtidos pelo método na gama de trabalho alta.

### 6.1.9 Precisão em condições de precisão intermédia

#### 6.1.9.1 Gama de trabalho baixa

##### 6.1.9.1.1 Apresentação dos resultados

A precisão intermédia foi estudada considerando três gamas de trabalho de teobromina. Para a gama baixa, compreendida entre 20 e 500 mg/Kg, foram considerados os resultados da concentração de teobromina de 50 amostras, obtidos em duplicado, cujos valores se encontram apresentados na **Tabela 16A**.

**Tabela 16A: Determinação da precisão intermédia na gama de trabalho baixa.** Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão em condições de precisão intermédia na gama de trabalho baixa, compreendida entre  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$  mg/Kg, nomeadamente, a concentração de teobromina em dois ensaios ( $[\text{Teo}]_1$ ), bem como o valor médio ( $[\overline{\text{Teo}}]$ ) obtido.

| Matriz              | $[\text{Teo}]_1$<br>(mg/Kg) | $[\text{Teo}]_2$<br>(mg/Kg) | $([\text{Teo}]_1 - [\text{Teo}]_2)^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $[\overline{\text{Teo}}]$<br>(mg/Kg) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| Não registada       | 324,0                       | 321,6                       | 5,76  | 322,8                                |
| Não registada       | 380,5                       | 366,1                       | 207,36  | 373,3                                |
| Não registada       | 85,3                        | 84,8                        | 0,25  | 85,1                                 |
| Não registada       | 88,2                        | 87,7                        | 0,25  | 88,0                                 |
| Não registada       | 263,1                       | 270,1                       | 49,00   | 266,6                                |
| Não registada       | 382,3                       | 383,4                       | 1,21  | 382,9                                |
| Não registada       | 322,1                       | 305,9                       | 262,94  | 314,0                                |
| Não registada       | 172,1                       | 175,2                       | 9,61  | 173,7                                |
| Não registada       | 173,6                       | 176,7                       | 9,61  | 175,2                                |
| Não registada       | 172,6                       | 173,5                       | 0,81  | 173,1                                |
| Não registada       | 267,1                       | 259,9                       | 51,84   | 263,5                                |
| Não registada       | 172,8                       | 174,0                       | 1,44  | 173,4                                |
| Não registada       | 154,7                       | 143,8                       | 118,81  | 149,3                                |
| Não registada       | 176,6                       | 168,5                       | 65,61   | 172,6                                |
| Não registada       | 125,4                       | 134,6                       | 84,64   | 130,0                                |
| Não registada       | 199,7                       | 206,3                       | 43,56   | 203,0                                |
| Não registada       | 396,0                       | 410,1                       | 198,81  | 403,1                                |
| Não registada       | 460,6                       | 466,9                       | 39,69   | 463,8                                |
| Não registada       | 156,4                       | 153,6                       | 7,84  | 155,0                                |
| Não registada       | 477,9                       | 492,4                       | 210,25  | 485,2                                |
| Leite com chocolate | 225,7                       | 225,2                       | 0,25  | 225,5                                |
| Chocolate           | 30,8                        | 30,1                        | 0,49  | 30,5                                 |
| Gelado              | 202,8                       | 215,8                       | 169,00  | 209,3                                |
| Bolacha             | 187,9                       | 181,2                       | 44,89   | 184,6                                |
| Gelado              | 239,9                       | 239,8                       | 0,01  | 239,9                                |
| Bolacha             | 356,8                       | 369,0                       | 148,84  | 362,9                                |
| Cereais             | 327,6                       | 331,0                       | 11,56   | 329,3                                |

|                     |       |       |         |       |
|---------------------|-------|-------|---------|-------|
| Leite com chocolate | 165,2 | 153,9 | 127,69  | 159,6 |
| Pastelaria          | 487,1 | 477,3 | 96,04   | 482,2 |
| Leite com Chocolate | 304,7 | 298,8 | 34,81   | 301,8 |
| Leite com Chocolate | 186,1 | 189,1 | 9,00    | 187,6 |
| Bolacha             | 265,1 | 245,5 | 384,16  | 255,3 |
| Leite com Chocolate | 260,0 | 259,8 | 0,04    | 259,9 |
| Leite com Chocolate | 330,3 | 328,7 | 2,56    | 329,5 |
| Leite com Chocolate | 328,1 | 331,4 | 10,89   | 329,8 |
| Leite com Chocolate | 334,2 | 328,0 | 38,44   | 331,1 |
| Leite com Chocolate | 334,6 | 333,5 | 1,21    | 334,1 |
| Leite com Chocolate | 333,6 | 327,0 | 43,56   | 330,3 |
| Bolacha             | 204,5 | 202,0 | 6,25    | 203,3 |
| Leite com Chocolate | 216,6 | 216,6 | 0,00    | 216,6 |
| Leite com Chocolate | 280,2 | 278,4 | 3,24    | 279,3 |
| Leite com Chocolate | 318,3 | 312,1 | 38,44   | 315,2 |
| Bolacha             | 218,5 | 225,9 | 54,76   | 222,2 |
| Leite com Chocolate | 244,4 | 247,0 | 6,76    | 245,7 |
| Leite com Chocolate | 206,0 | 203,6 | 5,76    | 204,8 |
| Bebida de soja      | 171,1 | 172,6 | 2,25    | 171,9 |
| Leite com Chocolate | 176,3 | 168,2 | 65,61   | 172,3 |
| Bebida soja         | 345,0 | 344,3 | 0,49    | 344,7 |
| Bebida soja         | 345,0 | 344,3 | 0,49    | 344,7 |
| Leite               | 284,5 | 277,9 | 43,56   | 281,2 |
| Soma                | —     | —     | 2719,84 | —     |

A partir dos resultados apresentados acima, determinou-se o  $S_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sabendo que  $t$  é igual a 50, isto é (**Equação 47A**):

$$S_{PI} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 50}} \times 2719,84 = 5,2 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 47A})$$

### 6.1.9.1.2 Determinação do CV<sub>PI</sub> e do CV<sub>rPI</sub>

O CV<sub>PI</sub> foi determinado de acordo com a **Equação 58**, sabendo que o s<sub>PI</sub> corresponde a 5,2 mg/Kg e o valor médio a 256,8 mg/Kg, isto é (**Equação 48A**):

$$CV_{PI} = \frac{5,2}{256,8} \times 100 = 2,0 \% \quad (\text{Equação 48A})$$

O CV<sub>rPI</sub> foi calculado como descrito na **Equação 57**, isto é (**Equação 49A**):

$$CV_{rPI} = 2,8 \times \frac{5,2}{256,8} \times 100 = 5,7 \% \quad (\text{Equação 49A})$$

De acordo com o procedimento interno do laboratório, os resultados são satisfatórios se o CV<sub>PI</sub> for inferior a 10 %. Como tal se verificou, concluiu-se que os erros aleatórios observados em ensaios efetuados em condições de precisão intermédia não influenciam a confiança nos resultados obtidos pelo método na gama de trabalho baixa.

## 6.1.9.2 Gama de trabalho intermédia

### 6.1.9.2.1 Apresentação dos resultados

Para a gama intermédia, entre  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$  mg/Kg, foram considerados os resultados da concentração de teobromina de 159 amostras, obtidos em duplicado, cujos valores se encontram apresentados na **Tabela 17A**.

**Tabela 17A: Determinação da precisão intermédia na gama de trabalho intermédia.** Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia na gama de trabalho intermédia, compreendida entre  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000$  mg/Kg, nomeadamente, a concentração de teobromina em dois ensaios ( $[\text{Teo}]_1$ ), bem como o valor médio ( $\overline{[\text{Teo}]}$ ) obtido.

| Matriz        | $[\text{Teo}]_1$<br>(mg/Kg) | $[\text{Teo}]_2$<br>(mg/Kg) | $([\text{Teo}]_1 - [\text{Teo}]_2)^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $\overline{[\text{Teo}]}$<br>(mg/Kg) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| Não registada | 1560,2                      | 1524,3                      | 1288,81   | 1542,3                               |
| Não registada | 1960,4                      | 1965,9                      | 30,25   | 1963,2                               |
| Não registada | 743,8                       | 731,0                       | 163,84  | 737,4                                |
| Não registada | 1821,6                      | 1806,5                      | 228,01  | 1814,1                               |
| Não registada | 1940,5                      | 1983,7                      | 1866,24   | 1962,1                               |
| Não registada | 632,3                       | 599,9                       | 1049,76   | 616,1                                |
| Não registada | 669,5                       | 656,8                       | 161,29  | 663,2                                |

|               |        |        |         |        |
|---------------|--------|--------|---------|--------|
| Não registada | 1755,3 | 1769,4 | 198,81  | 1762,4 |
| Não registada | 781,3  | 742,0  | 1544,49 | 761,7  |
| Não registada | 578,5  | 607,6  | 846,81  | 593,1  |
| Não registada | 1707,6 | 1705,4 | 4,84    | 1706,5 |
| Não registada | 1902,7 | 1928,3 | 655,36  | 1915,5 |
| Não registada | 1216,5 | 1196,0 | 420,25  | 1206,3 |
| Não registada | 1646,1 | 1667,6 | 462,25  | 1656,9 |
| Não registada | 1945,3 | 1941,1 | 17,64   | 1943,2 |
| Não registada | 707,3  | 699,0  | 68,89   | 703,2  |
| Não registada | 716,7  | 727,5  | 116,64  | 722,1  |
| Não registada | 624,2  | 595,2  | 841,00  | 609,7  |
| Não registada | 1266,6 | 1288,2 | 466,56  | 1277,4 |
| Não registada | 1034,4 | 1041,5 | 50,41   | 1038,0 |
| Não registada | 1085,0 | 1075,6 | 88,36   | 1080,3 |
| Não registada | 1816,5 | 1854,1 | 1413,76 | 1835,3 |
| Não registada | 683,1  | 669,5  | 184,96  | 676,3  |
| Não registada | 1160,4 | 1146,3 | 198,81  | 1153,4 |
| Não registada | 1724,7 | 1706,6 | 327,61  | 1715,7 |
| Não registada | 1325,7 | 1298,1 | 761,76  | 1311,9 |
| Não registada | 1471,9 | 1468,7 | 10,24   | 1470,3 |
| Não registada | 1418,6 | 1424,3 | 32,49   | 1421,5 |
| Não registada | 1194,9 | 1248,4 | 2862,25 | 1221,7 |
| Não registada | 622,8  | 662,4  | 1568,16 | 642,6  |
| Não registada | 1289,8 | 1275,6 | 201,64  | 1282,7 |
| Não registada | 1076,3 | 1084,6 | 68,89   | 1080,5 |
| Não registada | 1313,6 | 1311,9 | 2,89    | 1312,8 |
| Não registada | 530,5  | 523,8  | 44,89   | 527,2  |
| Não registada | 1033,7 | 1083,2 | 2450,25 | 1058,5 |
| Pastelaria    | 594,8  | 573,4  | 457,96  | 584,1  |

|                                     |        |        |         |        |
|-------------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| Chocolate de leite com frutos secos | 1149,1 | 1184,1 | 1225,00 | 1166,6 |
| Drageias de chocolate               | 1422,8 | 1395,0 | 772,84  | 1408,9 |
| Cereais                             | 616,2  | 609,8  | 40,96   | 613,0  |
| Salame de chocolate                 | 1720,3 | 1695,8 | 600,25  | 1708,1 |
| Cereais                             | 1813,6 | 1816,8 | 10,24   | 1815,2 |
| Bolacha                             | 1333,7 | 1367,6 | 1149,21 | 1350,7 |
| Bolacha                             | 1227,5 | 1197,0 | 930,25  | 1212,3 |
| Chocolate                           | 870,7  | 916,3  | 2079,36 | 893,5  |
| Bolacha                             | 1335,5 | 1351,0 | 240,25  | 1343,3 |
| Chocolate de leite                  | 1535,4 | 1514,7 | 428,49  | 1525,1 |
| Bolacha                             | 1437,0 | 1475,7 | 1497,69 | 1456,4 |
| Barras de cereais                   | 817,1  | 885,7  | 4705,96 | 851,4  |
| Chocolate de leite                  | 1550,9 | 1557,0 | 37,21   | 1554,0 |
| Chocolate de leite                  | 578,8  | 569,8  | 81,00   | 574,3  |
| Barras de cereais                   | 638,3  | 612,5  | 665,64  | 625,4  |
| Creme para barrar                   | 1044,1 | 1059,8 | 246,49  | 1052,0 |
| Creme para barrar                   | 559,9  | 551    | 79,21   | 555,5  |
| Mousse                              | 1277,5 | 1254,8 | 515,29  | 1266,2 |
| Mousse                              | 1256,4 | 1267,4 | 121,00  | 1261,9 |
| Bolacha                             | 1461   | 1456,9 | 16,81   | 1459,0 |
| Pastelaria                          | 1090,3 | 1032,1 | 3387,24 | 1061,2 |
| Gelado                              | 1144,1 | 1117,4 | 712,89  | 1130,8 |
| Bolacha                             | 974,6  | 1004,8 | 912,04  | 989,7  |
| Bolacha                             | 671,9  | 661,5  | 108,16  | 666,7  |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1328,2 | 1326,3 | 3,61    | 1327,3 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1335,6 | 1359,4 | 566,44  | 1347,5 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1409,6 | 1473,9 | 4134,49 | 1441,8 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1553,8 | 1495,5 | 3398,89 | 1524,7 |
| Mousse                              | 1378,4 | 1369,9 | 72,25   | 1374,2 |



|                                     |        |        |         |        |
|-------------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| Mousse                              | 1358,9 | 1303,6 | 3058,09 | 1331,3 |
| Mousse                              | 1290,1 | 1365,9 | 5745,64 | 1328,0 |
| Mousse                              | 1259,8 | 1314,4 | 2981,16 | 1287,1 |
| Mousse                              | 1253,4 | 1292,8 | 1552,36 | 1273,1 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1120,3 | 1178,7 | 3410,56 | 1149,5 |
| Mousse                              | 1323,9 | 1247,5 | 5836,96 | 1285,7 |
| Bolacha                             | 1690,6 | 1702,3 | 136,89  | 1696,5 |
| Bolacha                             | 1681,7 | 1687,1 | 29,16   | 1684,4 |
| Bolacha                             | 1683,2 | 1684,1 | 0,81    | 1683,7 |
| Chocolate de leite com frutos secos | 1232,5 | 1244   | 132,25  | 1238,3 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1290,5 | 1268,7 | 475,24  | 1279,6 |
| Bolacha                             | 1696,9 | 1658,2 | 1497,69 | 1677,6 |
| Bolacha                             | 1689,1 | 1658,6 | 930,25  | 1673,9 |
| Drageias de chocolate               | 819,1  | 825,9  | 46,24   | 822,5  |
| Creme para barrar                   | 1595,6 | 1607   | 129,96  | 1601,3 |
| Bolacha                             | 1430   | 1396,7 | 1108,89 | 1413,4 |
| Mousse                              | 1010,4 | 1001,5 | 79,21   | 1006,0 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1085,7 | 1016,2 | 4830,25 | 1051,0 |
| Mousse                              | 1283,4 | 1275,8 | 57,76   | 1279,6 |
| Bolacha                             | 1691,6 | 1694,4 | 7,84    | 1693,0 |
| Mousse                              | 1255,8 | 1262,1 | 39,69   | 1259,0 |
| Mistura para bolo de chocolate      | 1288,6 | 1293,4 | 23,04   | 1291,0 |
| Bolacha                             | 1687,5 | 1690,7 | 10,24   | 1689,1 |
| Mousse                              | 1295,6 | 1307,7 | 146,41  | 1301,7 |
| Bolacha                             | 1744,4 | 1735,9 | 72,25   | 1740,2 |
| Chocolate com Frutos Secos          | 1248,7 | 1249   | 0,09    | 1248,9 |
| Chocolate com Frutos Secos          | 1225,3 | 1217,8 | 56,25   | 1221,6 |
| Chocolate com Frutos Secos          | 1232   | 1224,3 | 59,29   | 1228,2 |

|                            |        |        |          |        |
|----------------------------|--------|--------|----------|--------|
| Chocolate com Frutos Secos | 1232,7 | 1240,2 | 56,25    | 1236,5 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1232,9 | 1224,4 | 72,25    | 1228,7 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1235,3 | 1243,7 | 70,56    | 1239,5 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1226,8 | 1210,5 | 265,69   | 1218,7 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1237,1 | 1178,6 | 3422,25  | 1207,9 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1210,9 | 1242,9 | 1024,00  | 1226,9 |
| Chocolate com Frutos Secos | 1251,8 | 1268,3 | 272,25   | 1260,1 |
| Bolacha                    | 1514,3 | 1529,8 | 240,25   | 1522,1 |
| Gelado                     | 788,5  | 801,6  | 171,61   | 795,1  |
| Bolacha                    | 886,6  | 887,8  | 1,44     | 887,2  |
| Cereais                    | 1149,5 | 1162,7 | 174,24   | 1156,1 |
| Matéria Prima-Química      | 1225,4 | 1219,2 | 38,44    | 1222,3 |
| Gelado                     | 1992,6 | 1948   | 1989,16  | 1970,3 |
| Pastelaria                 | 574,3  | 574,7  | 0,16     | 574,5  |
| Cereais                    | 1138,7 | 1145,4 | 44,89    | 1142,1 |
| Bolacha                    | 997,2  | 992,3  | 24,01    | 994,8  |
| Bolacha                    | 1295   | 1305,8 | 116,64   | 1300,4 |
| Cereais                    | 1724,4 | 1730   | 31,36    | 1727,2 |
| Cereais                    | 1755,9 | 1703,2 | 2777,29  | 1729,6 |
| Cereais                    | 1633,7 | 1670,5 | 1354,24  | 1652,1 |
| Cereais                    | 1676,4 | 1729,9 | 2862,25  | 1703,2 |
| Cereais                    | 1700,8 | 1703,1 | 5,29     | 1702,0 |
| Cereais                    | 1716,1 | 1625   | 8299,21  | 1670,6 |
| Matéria Prima-Química      | 1801,8 | 1772,1 | 882,09   | 1787,0 |
| Matéria Prima-Química      | 1781   | 1694,1 | 7551,61  | 1737,6 |
| Cereais                    | 1722,9 | 1756,7 | 1142,44  | 1739,8 |
| Cacau                      | 1797   | 1685,5 | 12432,25 | 1741,3 |
| Gelado Cones               | 864,3  | 875,8  | 132,25   | 870,1  |

|                                     |        |        |         |        |
|-------------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| Cereais                             | 1554,1 | 1639,4 | 7276,09 | 1596,8 |
| Cereais                             | 1331,4 | 1340,8 | 88,36   | 1336,1 |
| Cereais                             | 723,1  | 733,1  | 100,00  | 728,1  |
| Creme para Barrar                   | 528,1  | 536,1  | 64,00   | 532,1  |
| Cereais                             | 1288,7 | 1310,5 | 475,24  | 1299,6 |
| Bolacha                             | 712,4  | 717,9  | 30,25   | 715,2  |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1266,7 | 1238,8 | 778,41  | 1252,8 |
| Bolacha                             | 683,9  | 685    | 1,21    | 684,5  |
| Bolacha                             | 1340,3 | 1320,7 | 384,16  | 1330,5 |
| Bolacha                             | 1930,6 | 1937,3 | 44,89   | 1934,0 |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1458,9 | 1480,8 | 479,61  | 1469,9 |
| Chocolate de Leite                  | 682,8  | 689,8  | 49,00   | 686,3  |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1596,6 | 1566,8 | 888,04  | 1581,7 |
| Cereais                             | 877,4  | 870,8  | 43,56   | 874,1  |
| Chocolate de Leite                  | 1666,2 | 1627,3 | 1513,21 | 1646,8 |
| Chocolate                           | 1674,2 | 1667,6 | 43,56   | 1670,9 |
| Barras de Cereais                   | 763,1  | 741,4  | 470,89  | 752,3  |
| Bolacha                             | 1879,6 | 1822,5 | 3260,41 | 1851,1 |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1173,3 | 1159,6 | 187,69  | 1166,5 |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1394,3 | 1353   | 1705,69 | 1373,7 |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1154,1 | 1166,6 | 156,25  | 1160,4 |
| Cereais                             | 1382,5 | 1358,3 | 585,64  | 1370,4 |
| Matéria Prima Química               | 1062,2 | 1074,5 | 151,29  | 1068,4 |
| Cereais                             | 1468,9 | 1483,7 | 219,04  | 1476,3 |
| Matéria Prima Química               | 1178,6 | 1197,5 | 357,21  | 1188,1 |
| Chocolate leite                     | 594    | 575    | 361,00  | 584,5  |
| Amendoins chocolate                 | 1765,8 | 1669,4 | 9292,96 | 1717,6 |
| Bolacha                             | 1142,8 | 1150,9 | 65,61   | 1146,9 |

|                         |        |        |           |        |
|-------------------------|--------|--------|-----------|--------|
| Bolacha                 | 1150,8 | 1137,6 | 174,24    | 1144,2 |
| Suplemento Alimentar    | 1643,2 | 1643,9 | 0,49      | 1643,6 |
| Chocolate leite         | 1597,8 | 1605,7 | 62,41     | 1601,8 |
| Amendoins chocolate     | 1675,9 | 1744,2 | 4664,89   | 1710,1 |
| Bolacha                 | 1150,8 | 1137,6 | 174,24    | 1144,2 |
| Suplemento Alimentar    | 1643,2 | 1643,9 | 0,49      | 1643,6 |
| Chocolate de leite      | 1597,8 | 1605,7 | 62,41     | 1601,8 |
| Amendoins com chocolate | 1675,9 | 1744,2 | 4664,89   | 1710,1 |
| Chocolate de leite      | 1571,8 | 1581,9 | 102,01    | 1576,9 |
| Bolacha                 | 1154,4 | 1149,4 | 25,00     | 1151,9 |
| <b>Soma</b>             | ————   | ————   | 166809,41 | ————   |

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 17A**, determinou-se o  $s_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sabendo que  $t$  é igual a 159, isto é (**Equação 50A**):

$$s_{PI} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 159} \times 166809,41} = 23 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 50A})$$

#### 6.1.9.2.2 Determinação do $CV_{PI}$ e do $CV_{r_{PI}}$

O  $CV_{PI}$  foi determinado de acordo com a **Equação 58**, sabendo que o  $s_{PI}$  corresponde a 23 mg/Kg e o valor médio a 1283 mg/Kg, isto é (**Equação 51A**):

$$CV_{PI} = \frac{23}{1283} \times 100 = 1,8 \% \quad (\text{Equação 51A})$$

O  $CV_{r_{PI}}$  foi calculado como descrito na **Equação 57**, isto é (**Equação 52A**):

$$CV_{r_{PI}} = 2,8 \times \frac{23}{1283} \times 100 = 5,0 \% \quad (\text{Equação 52A})$$

Como o valor do  $CV_R$  calculado foi inferior ao valor máximo admitido internamente pelo laboratório (10 %), concluiu-se que, também na gama de trabalho intermédia, os erros aleatórios observados em análises realizadas em condições de precisão intermédia não influenciam a confiança nos resultados obtidos.

### 6.1.9.3 Gama de trabalho alta

#### 6.1.9.3.1 Apresentação dos resultados

Para a gama alta, entre  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000 \text{ mg/Kg}$ , foram considerados os resultados da concentração de teobromina de 90 amostras, obtidos em duplicado, cujos valores se encontram apresentados na **Tabela 18A**.

**Tabela 18A: Determinação da precisão intermédia na gama de trabalho alta.** Valores auxiliares necessários para a determinação da precisão intermédia na gama de trabalho alta, compreendida entre  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000 \text{ mg/Kg}$ , nomeadamente, a concentração de teobromina em dois ensaios ( $[\text{Teo}]$ ), bem como o valor médio ( $\overline{[\text{Teo}]}$ ) obtido.

| Matriz        | $[\text{Teo}]_1$<br>(mg/Kg) | $[\text{Teo}]_2$<br>(mg/Kg) | $([\text{Teo}]_1 - [\text{Teo}]_2)^2$<br>(mg/Kg) <sup>2</sup> | $\overline{[\text{Teo}]}$<br>(mg/Kg) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| Não registada | 18185,0                     | 18635,5                     | 202950,25   | 18410,3                              |
| Não registada | 2610,1                      | 2620,7                      | 112,36  | 2615,4                               |
| Não registada | 3901,5                      | 3906,7                      | 27,04   | 3904,1                               |
| Não registada | 2886,5                      | 2871,0                      | 240,25  | 2878,8                               |
| Não registada | 6748,0                      | 6696,0                      | 2704,00   | 6722,0                               |
| Não registada | 4678,0                      | 4640,7                      | 1391,29   | 4659,4                               |
| Não registada | 4729,0                      | 4733,0                      | 16,00   | 4731,0                               |
| Não registada | 4118,1                      | 4061,4                      | 3214,89   | 4089,8                               |
| Não registada | 6272,7                      | 6075,7                      | 38809,00  | 6174,2                               |
| Não registada | 4999,4                      | 4991,8                      | 57,76   | 4995,6                               |
| Não registada | 18801,7                     | 19199,5                     | 158244,84   | 19000,6                              |
| Não registada | 4474,9                      | 4518,3                      | 1883,56   | 4496,6                               |
| Não registada | 5525,2                      | 5406,6                      | 14065,96  | 5465,9                               |
| Não registada | 5937,3                      | 5848,2                      | 7938,81   | 5892,8                               |
| Não registada | 4382,1                      | 4400,8                      | 349,69  | 4391,5                               |
| Não registada | 2644,1                      | 2609,0                      | 1232,01   | 2626,6                               |
| Não registada | 5231,5                      | 5399,0                      | 28056,25  | 5315,3                               |
| Não registada | 3932,4                      | 3963,1                      | 942,49  | 3947,8                               |

|                                |         |         |          |         |
|--------------------------------|---------|---------|----------|---------|
| Não registada                  | 5573,3  | 5570,9  | 5,76     | 5572,1  |
| Não registada                  | 5561,7  | 5584,7  | 529,00   | 5573,2  |
| Não registada                  | 3672,6  | 3609,4  | 3994,24  | 3641,0  |
| Não registada                  | 5411,1  | 5398,6  | 156,25   | 5404,9  |
| Não registada                  | 7560,0  | 7643,6  | 6988,96  | 7601,8  |
| Não registada                  | 18091,1 | 18006,8 | 7106,49  | 18049,0 |
| Não registada                  | 6932,5  | 6957,4  | 620,01   | 6945,0  |
| Não registada                  | 5906,2  | 5897,4  | 77,44    | 5901,8  |
| Não registada                  | 3715,0  | 3716,4  | 1,96     | 3715,7  |
| Não registada                  | 15529,8 | 15501,5 | 800,89   | 15515,7 |
| Não registada                  | 6999,0  | 7055,3  | 3169,69  | 7027,2  |
| Não registada                  | 7027,6  | 7033,1  | 30,25    | 7030,4  |
| Não registada                  | 4699,0  | 4625,2  | 5446,44  | 4662,1  |
| Não registada                  | 2257,2  | 2267,1  | 98,01    | 2262,2  |
| Não registada                  | 5111,3  | 5130,7  | 376,36   | 5121,0  |
| Não registada                  | 4263,0  | 4244,6  | 338,56   | 4253,8  |
| Não registada                  | 5778,9  | 6032,3  | 64211,56 | 5905,6  |
| Drageias                       | 4056,1  | 4147,1  | 8281,00  | 4101,6  |
| Bolacha                        | 3321,1  | 3360,2  | 1528,81  | 3340,7  |
| Chocolate de culinária         | 4409,9  | 4406,8  | 9,61     | 4408,4  |
| Chocolate de culinária         | 4592,0  | 4643,4  | 2641,96  | 4617,7  |
| Chocolate                      | 5427,5  | 5637,8  | 44226,09 | 5532,7  |
| Chocolate                      | 4444,0  | 4481,7  | 1421,29  | 4462,9  |
| Chocolate de culinária         | 7062,3  | 6948,9  | 12859,56 | 7005,6  |
| Bolacha                        | 3544,7  | 3568,2  | 552,25   | 3556,5  |
| Chocolate                      | 4988,2  | 4823,1  | 27258,01 | 4905,7  |
| Mistura para bolo de chocolate | 2111,0  | 2146,7  | 1274,49  | 2128,9  |
| Chocolate                      | 4325,1  | 4264,7  | 3648,16  | 4294,9  |
| Chocolate                      | 2695,0  | 2718,8  | 566,44   | 2706,9  |

|                       |        |         |          |         |
|-----------------------|--------|---------|----------|---------|
| Bolacha               | 4502,9 | 4385,2  | 13853,29 | 4444,1  |
| Bolacha               | 2099,6 | 2111,4  | 139,24   | 2105,5  |
| Chocolate Culinária   | 4420,5 | 4395,9  | 605,16   | 4408,2  |
| Chocolate Culinária   | 4384,3 | 4410,6  | 691,69   | 4397,5  |
| Chocolate Culinária   | 4416,4 | 4339    | 5990,76  | 4377,7  |
| Chocolate Culinária   | 4349,2 | 4375,9  | 712,89   | 4362,6  |
| Chocolate Culinária   | 4331,4 | 4312,9  | 342,25   | 4322,2  |
| Chocolate Culinária   | 4295,4 | 4296,4  | 1,00     | 4295,9  |
| Bolacha               | 4053   | 4019,9  | 1095,61  | 4036,5  |
| Chocolate Culinária   | 4406,9 | 4398,5  | 70,56    | 4402,7  |
| Chocolate Culinária   | 4472,8 | 4491,9  | 364,81   | 4482,4  |
| Chocolate             | 3881   | 3863,6  | 302,76   | 3872,3  |
| Chocolate             | 5772,8 | 5780,2  | 54,76    | 5776,5  |
| Chocolate preto       | 6520,4 | 6565,9  | 2070,25  | 6543,2  |
| Chocolate             | 4078,8 | 4060    | 353,44   | 4069,4  |
| Bolacha               | 2469,7 | 2505,7  | 1296,00  | 2487,7  |
| Cacau                 | 23801  | 23678,1 | 15104,41 | 23739,6 |
| Matéria Prima Química | 5644   | 5610,8  | 1102,24  | 5627,4  |
| Matéria Prima Química | 5641,5 | 5761,5  | 14400,00 | 5701,5  |
| Chocolate preto       | 5232,3 | 5118,2  | 13018,81 | 5175,3  |
| Bolacha               | 4296   | 4280,5  | 240,25   | 4288,3  |
| Chocolate preto       | 6475,5 | 6380,2  | 9082,09  | 6427,9  |
| Bolacha               | 4176,6 | 4019    | 24837,76 | 4097,8  |
| Matéria Prima Química | 2762,3 | 2738,5  | 566,44   | 2750,4  |
| Chocolate preto       | 5450,5 | 5247,7  | 41127,84 | 5349,1  |
| Bolacha               | 3355,9 | 3266,2  | 8046,09  | 3311,1  |
| Chocolate preto       | 4232,9 | 4078,1  | 23963,04 | 4155,5  |
| Chocolate preto       | 6266,9 | 6227,6  | 1544,49  | 6247,3  |
| Bombons com recheio   | 2049,6 | 2094,5  | 2016,01  | 2072,1  |

|                                     |         |         |            |         |
|-------------------------------------|---------|---------|------------|---------|
| Matéria Prima Química               | 2044,4  | 2066,8  | 501,76     | 2055,6  |
| Chocolate de Culinária              | 4178,4  | 4166,7  | 136,89     | 4172,6  |
| Matéria Prima Química               | 2744,9  | 2797,7  | 2787,84    | 2771,3  |
| Bolacha                             | 2342,7  | 2381,3  | 1489,96    | 2362,0  |
| Chocolate de Leite com frutos secos | 1487,8  | 1507,6  | 392,04     | 1497,7  |
| Cacau                               | 18145,6 | 17600,5 | 297134,01  | 17873,1 |
| Não registada                       | 2106,2  | 2106,9  | 0,49       | 2106,6  |
| Cacau                               | 18145,6 | 17600,5 | 297134,01  | 17873,1 |
| Não registada                       | 2106,2  | 2106,9  | 0,49       | 2106,6  |
| Cacau                               | 17995,6 | 17997,6 | 4,00       | 17996,6 |
| Não registada                       | 2368,9  | 2374,3  | 29,16      | 2371,6  |
| Cacau                               | 17095,6 | 17016,5 | 6256,81    | 17056,1 |
| Não registada                       | 2138,9  | 2128,9  | 100,00     | 2133,9  |
| Bolacha                             | 1154,4  | 1149,4  | 25,00      | 1151,9  |
| Soma                                | ————    | ————    | 1449442,39 | ————    |

A partir dos resultados ilustrados acima, determinou-se o  $s_{PI}$ , de acordo com a **Equação 56**, sabendo que  $t$  é igual a 90, isto é (**Equação 53A**):

$$s_{PI} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 90} \times 1449442,39} = 90 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 53A})$$

#### 6.1.9.3.2 Determinação do $CV_{PI}$ e do $CV_{r_{PI}}$

O  $CV_{PI}$  desta gama de trabalho foi determinado de acordo com a **Equação 58**, sabendo que o  $s_{PI}$  corresponde a 90 mg/Kg e o valor médio a 5738 mg/Kg, isto é (**Equação 54A**):

$$CV_{PI} = \frac{90}{5738} \times 100 = 1,6 \% \quad (\text{Equação 54A})$$



O  $CV_{r_{PI}}$  foi calculado como descrito na **Equação 57**, isto é (**Equação 55A**):

$$CV_{r_{PI}} = 2,8 \times \frac{90}{5738} \times 100 = 4,4 \% \quad (\text{Equação 55A})$$

De acordo com o procedimento interno do laboratório, os resultados são satisfatórios se o  $CV_{r_{PI}}$  for inferior a 10 %. Como tal se verificou, concluiu-se que os erros aleatórios observados em ensaios efetuados em condições de precisão intermédia não influenciam a confiança nos resultados obtidos pelo método na gama de trabalho alta

## 6.1.10 Justeza/Veracidade

### 6.1.10.1 Determinação do *z-score*

Para avaliar o desempenho do laboratório na participação de ensaios interlaboratoriais, procedeu-se à determinação do *z-score* em cada um dos ensaios realizados. Tomando como exemplo o primeiro ensaio considerado, o *z-score* foi calculado como ilustrado na **Equação 14**, sabendo que o desvio padrão do ensaio foi de 92 mg/Kg, o valor médio de concentração de teobromina na amostra foi de 1910 mg/Kg e conhecendo o valor de referência de concentração de teobromina na amostra de 1775 mg/Kg, teve-se que (**Equação 56A**):

$$z - score = \frac{(1910 - 1775)}{92} = 1,47 \quad (\text{Equação 56A})$$

De acordo com o definido internamente pelo laboratório, os resultados obtidos na análise são satisfatórios se o valor do *z-score* for inferior a 2, em módulo. Como tal se verificou, concluiu-se que nos resultados obtidos pelo laboratório não foram encontradas evidências da ocorrência de erros sistemáticos e, como tal, o método é justo.

### 6.1.10.2 Determinação do *bias* absoluto e do *bias* relativo

O *bias* absoluto foi calculado de acordo com a **Equação 62**, sabendo que o valor médio da concentração de teobromina na amostra foi de 1910 mg/Kg e o valor de referência é de 1775 mg/Kg, isto é (**Equação 57A**):

$$bias = |1910 - 1775| = 135 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 57A})$$

Para além do *z-score*, o desempenho do laboratório também foi avaliado de acordo com o *bias* relativo calculado, de acordo com a **Equação 63**. Neste caso, considerando novamente o primeiro ensaio realizado teve-se que (**Equação 58A**):

$$bias \text{ relativo} = \frac{(1910 - 1775)}{1775} \times 100 = 8,0 \% \quad (\text{Equação 58A})$$

Neste caso, consideram-se os resultados satisfatórios se o *bias* relativo for inferior a 10 %. Como tal foi observado, constatou-se que não foram encontradas evidências da ocorrência de erros sistemáticos logo, o método é justo, o que corrobora a conclusão referida anteriormente.

### 6.1.11 Estimativa da incerteza do método

#### 6.1.11.1 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho baixa

##### 6.1.11.1.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão

A  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  foi estimada através do  $CV_{\text{R}}$  determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 2,0 %.

##### 6.1.11.1.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza

Para se estimar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  na gama de trabalho de  $20 \leq [\text{Teobromina}] < 500$  mg/Kg, determinou-se, em primeiro lugar, o *bias* relativo como descrito na **Equação 63**, sabendo que após realização do ensaio de recuperação, a  $[\overline{\text{Teo}}]_{\text{obs}}$  foi de 22,6 mg/Kg e a  $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$  é de 24,6 mg/Kg, isto é (**Equação 59A**):

$$bias \text{ relativo} = \frac{|22,6 - 24,6|}{24,6} \times 100 = 8,1 \% \quad (\text{Equação 59A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{add})\text{relativa}}$  de acordo com a **Equação 92**, considerou-se a  $u_{\text{add}}$  que foi de 6,0 mg/Kg e a  $[\text{Teo}]_{\text{add}}$  que equivaleu a 496,7 mg/Kg, isto é (**Equação 60A**):

$$u_{(\text{add})\text{relativa}} = \frac{6,0}{496,7} \times 100 = 1,2 \% \quad (\text{Equação 60A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$  de acordo com a **Equação 93**, considerou-se a  $u_{\text{Vol}}$  que foi de 0,0005 mL e o  $V_{\text{add}}$  que equivaleu a 0,5 mL isto é (**Equação 61A**):

$$u_{(\text{Vol})\text{relativa}} = \frac{0,0005}{0,5} \times 100 = 0,10 \% \quad (\text{Equação 61A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$  de acordo com a **Equação 94**, combinou-se a  $u_{(\text{add})\text{relativa}}$  com a  $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$  dado que estas se apresentam nas mesmas unidades e teve-se que (**Equação 62A**):

$$u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}} = \sqrt{1,2^2 + 0,10^2} = 1,2 \% \quad (\text{Equação 62A})$$

De seguida, calculou-se a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  combinando o *bias* relativo com a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$ , isto é (**Equação 63A**):

$$u_{(\text{justeza})\text{relativa}} = \sqrt{8,1^2 + 1,2^2} = 8,2 \% \quad (\text{Equação 63A})$$

#### 6.1.11.1.3 Estimativa das incertezas combinada e expandida

Calculou-se a  $u_c(y)$  da gama de trabalho baixa através da **Equação 78**, combinando a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  com a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , isto é (**Equação 64A**):

$$u_c(y) = \sqrt{2,0^2 + 8,2^2} = 8,5 \% \quad (\text{Equação 64A})$$

e, a  $U$  como indicado na **Equação 65**, ou seja (**Equação 65A**):

$$U = 8,5 \times 2 = 17 \% \quad (\text{Equação 65A})$$

#### 6.1.11.2 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho intermédia

##### 6.1.11.2.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão

A  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  foi estimada através do  $CV_{\text{PI}}$  determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 1,8 %.

##### 6.1.11.2.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR

Para se estimar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  na gama de trabalho de  $500 \leq [\text{Teobromina}] < 2000 \text{ mg/Kg}$ , considerando a análise de um MR, em concreto uma amostra de chocolate de leite, determinou-se, em

primeiro lugar, o valor médio da concentração de teobromina nesta amostra, considerando os resultados apresentados na **Tabela 19A**.

**Tabela 19A: Determinação da concentração de teobromina na amostra de chocolate de leite.** Valores determinados para a concentração de teobromina ( $[Teo]_{obs}$ ) em oito replicados de uma amostra de chocolate de leite

| Ensaio | $[Teo]_{obs}$<br>mg/Kg |
|--------|------------------------|
| 1      | 1200,5                 |
| 2      | 1200,7                 |
| 3      | 1219,6                 |
| 4      | 1272,6                 |
| 5      | 1227,9                 |
| 6      | 1239,1                 |
| 7      | 1226,9                 |
| 8      | 1212,0                 |

De seguida, determinou-se o *bias* relativo como descrito na **Equação 63**, sabendo que a  $\overline{[Teo]}_{obs}$  foi de 1225 mg/Kg e, este material, apresenta uma  $[Teo]_{ref}$  de 1200 mg/Kg (**Equação 66A**):

$$bias \text{ relativo} = \frac{|1225 - 1200|}{1200} \times 100 = 2,1 \% \quad (\text{Equação 66A})$$

A  $u_{Cref}$  foi calculada de acordo com a **Equação 81** sabendo que o UCL e o LCL deste MR equivalem a 1400 mg/Kg e 1100 mg/Kg, respetivamente, ou seja (**Equação 67A**):

$$u_{Cref} = \frac{|1400 - 1100|}{2 \times 2} = 75 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 67A})$$

Para determinar a  $u_{(Cref)relativa}$  como ilustrado na **Equação 82**, consideraram-se os valores da  $u_{Cref}$  determinada anteriormente e,  $[Teo]_{ref}$  e teve-se que (**Equação 68A**):

$$u_{(Cref)relativa} = \frac{75}{1200} \times 100 = 6,3 \% \quad (\text{Equação 68A})$$

Para determinar o  $S_{(bias)relativo}$  como indicado na **Equação 83**, consideraram-se os valores do  $S_{bias}$  e da  $\overline{[Teo]}_{obs}$  que equivalem a 24 e 1225 mg/Kg, respetivamente. Então (**Equação 69A**):

$$S_{(bias)relativo} = \frac{24}{1225} \times 100 = 1,9 \% \quad (\text{Equação 69A})$$

Deste modo, encontrando-se todas as variáveis na forma relativa, para determinar a  $u_{(justeza)relativa}$  consideraram-se os valores do *bias* relativo, da  $u_{(Cref)relativa}$  e do  $S_{(bias)relativo}$ , sabendo que se efetuaram oito análises à amostra (**Equação 70A**):

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{2,1^2 + \left(\frac{1,9}{\sqrt{8}}\right)^2 + 6,3^2} = 6,6 \% \quad (\text{Equação 70A})$$

#### 6.1.11.2.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais

Para se estimar a  $u_{(justeza)relativa}$  na gama de trabalho intermédia, considerando a participação em oito ensaios interlaboratoriais, começou por registar-se os resultados obtidos pelo laboratório, juntamente com os valores efetivos da concentração de teobromina nas amostras analisadas em cada ensaio na **Tabela 20A** e, de seguida, para cada um dos ensaios, determinou-se o *bias* relativo.

**Tabela 20A: Resultados obtidos na participação em ensaios interlaboratoriais.** Valores determinados para a concentração de teobromina nas amostras analisadas pelo laboratório no ensaio interlaboratorial ( $[Teo]_{obs}$ ) em oito replicados de uma amostra de chocolate de leite, bem como a concentração efetiva de teobromina nessa amostra ( $[Teo]_{ref}$ ). Número de participantes em cada ensaio (Nº de lab participantes), o desvio padrão robusto obtido pelo laboratório ( $S_{ro}$ ) e o desvio padrão relativo ( $S_{(ro)relativo}$ ).

| Ensaio     | Nº de lab | $[Teo]_{obs}$ | $[Teo]_{ref}$ | Bias relativo (%) | $S_{ro}$ | $S_{(ro)relativo}$ (%) |
|------------|-----------|---------------|---------------|-------------------|----------|------------------------|
| 1 (mg/Kg)  | 38        | 1910          | 1775          | 7,6               | 92       | 4,8                    |
| 2 (mg/Kg)  | 38        | 1920          | 1775          | 8,2               | 92       | 4,8                    |
| 3 (mg/Kg)  | 38        | 1270          | 1203          | 5,6               | 66       | 5,2                    |
| 4 (mg/Kg)  | 38        | 1230          | 1203          | 2,2               | 66       | 5,4                    |
| 5 (g/100g) | 9         | 0,18          | 0,16          | 12,5              | 0,014    | 7,8                    |
| 6 (g/100g) | 9         | 0,17          | 0,16          | 6,3               | 0,014    | 8,2                    |
| 7 (g/100g) | 10        | 0,12          | 0,12          | 0,0               | 0,004    | 3,3                    |
| 8 (g/100g) | 10        | 0,11          | 0,12          | 8,3               | 0,004    | 3,6                    |

Para determinar a  $RMS_{(bias)relativa}$  de acordo com a **Equação 86**, considerou-se o somatório dos quadrados dos *bias* relativos, que foi de 425 e, o facto de terem sido considerados oito ensaios interlaboratoriais, isto é (**Equação 71A**):

$$RMS_{(bias)relativa} = \sqrt{\frac{425}{8}} = 7,3 \% \quad (\text{Equação 71A})$$

Para determinar a  $u_{(Cref)relativa}$ , para cada ensaio interlaboratorial registou-se o  $s_{ro}$  fornecido pela entidade organizadora, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 20A**, e, de seguida calculou-se o  $s_{(ro)relativo}$ . Tomando como exemplo o primeiro ensaio de recuperação, o  $s_{(ro)relativo}$  foi calculado como (**Equação 72A**):

$$s_{(ro)relativo} = \frac{92}{1910} \times 100 = 4,8 \% \quad (\text{Equação 72A})$$

Deste modo, a  $u_{(Cref)relativa}$  foi calculada considerando o valor médio dos  $s_{(ro)relativo}$ , que foi de 5,4 % e o valor médio do número de participantes em todos os ensaios, ou seja, 24 (**Equação 73A**):

$$u_{(Cref)relativa} = 1,253 \times \frac{5,4}{\sqrt{24}} = 1,4 \% \quad (\text{Equação 73A})$$

Assim, encontrando-se todas as variáveis na forma relativa, para determinar a  $u_{(justeza)relativa}$  combinaram-se os valores da  $RMS_{(bias)relativa}$  e, da  $u_{(Cref)relativa}$  (**Equação 74A**):

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{7,3^2 + 1,4^2} = 7,4 \% \quad (\text{Equação 74A})$$

#### 6.1.11.2.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida

Calculou-se a  $u_c(y)$  da gama de trabalho intermédia através da **Equação 78**, combinando a  $u_{(precisão)relativa}$  com a  $u_{(justeza)relativa}$  calculada considerando a participação em ensaios interlaboratoriais, isto é (**Equação 75A**):

$$u_c(y) = \sqrt{1,8^2 + 7,4^2} = 7,6 \% \quad (\text{Equação 75A})$$

e, a  $U$  como indicado na **Equação 65**, ou seja (**Equação 76A**):

$$U = 7,6 \times 2 = 15 \% \quad (\text{Equação 76A})$$

### 6.1.11.3 Estimativa da incerteza associada à gama de trabalho alta

#### 6.1.11.3.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão

A  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  foi estimada através do  $CV_{\text{R}}$  determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 1,6 %.

#### 6.1.11.3.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR

Para se estimar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  na gama de trabalho alta,  $2000 \leq [\text{Teobromina}] < 20000$  mg/Kg, considerando a análise de uma MR, isto é, uma amostra de uma mistura para bolo de chocolate, determinou-se, em primeiro lugar, o valor médio da concentração de teobromina nesta amostra, considerando os resultados apresentados na **Tabela 21A**.

**Tabela 21A: Determinação da concentração de teobromina na amostra de mistura para bolo de chocolate.** Valores determinados para a concentração de teobromina ( $[\text{Teo}]_{\text{obs}}$ ) em oito replicados de uma amostra de mistura para bolo de chocolate

| Ensaio | $[\text{Teo}]_{\text{obs}}$<br>mg/Kg |
|--------|--------------------------------------|
| 1      | 2128                                 |
| 2      | 2153                                 |
| 3      | 2167                                 |
| 4      | 2083                                 |
| 5      | 1981                                 |
| 6      | 2044                                 |
| 7      | 2067                                 |
| 8      | 2189                                 |

De seguida, determinou-se o *bias* relativo, como descrito na **Equação 63**, sabendo que a  $\overline{[\text{Teo}]_{\text{obs}}}$  foi de 2189 mg/Kg e, este material, apresenta  $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$  de 2154 mg/Kg (**Equação 77A**):

$$\text{bias relativo} = \frac{|2189 - 2154|}{2154} \times 100 = 1,6 \% \quad (\text{Equação 77A})$$

A  $u_{\text{Cref}}$  foi calculada de acordo com a **Equação 81** sabendo que o UCL e o LCL deste MR equivalem a 2371 mg/Kg e 1937 mg/Kg, respetivamente, ou seja (**Equação 78A**):

$$u_{\text{Cref}} = \frac{|2371 - 1937|}{2 \times 2} = 109 \text{ mg/Kg} \quad (\text{Equação 78A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{Cref})\text{relativa}}$  como ilustrado na **Equação 82**, consideraram-se os valores da  $u_{\text{Cref}}$  determinada anteriormente e, da  $[\text{Teo}]_{\text{ref}}$  e teve-se que (**Equação 79A**):

$$u_{(\text{Cref})\text{relativa}} = \frac{109}{2154} \times 100 = 5,0 \% \quad (\text{Equação 79A})$$

Para determinar o  $s_{(\text{bias})\text{relativo}}$  como indicado na **Equação 83**, consideraram-se os valores do  $s_{\text{bias}}$  e da  $[\overline{\text{Teo}}]_{\text{obs}}$ , que equivalem a 70 e 2189 mg/Kg, respetivamente. Então (**Equação 80A**):

$$s_{(\text{bias})\text{relativo}} = \frac{70}{2189} \times 100 = 3,2 \% \quad (\text{Equação 80A})$$

Deste modo, encontrando-se todas as variáveis na forma relativa, para determinar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  consideraram-se os valores do *bias* relativo, da  $u_{(\text{Cref})\text{relativa}}$  e do  $s_{(\text{bias})\text{relativo}}$ , sabendo que se efetuaram oito análises à amostra (**Equação 81A**):

$$u_{(\text{justeza})\text{relativa}} = \sqrt{1,6^2 + \left(\frac{3,2}{\sqrt{8}}\right)^2 + 5,0^2} = 5,4 \% \quad (\text{Equação 81A})$$

### 6.1.11.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a participação em ensaios interlaboratoriais

Para se estimar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  na gama de trabalho alta, considerando a participação em quatro ensaios interlaboratoriais, começou por registar-se os resultados obtidos pelo laboratório, juntamente com os valores efetivos da concentração de teobromina nas amostras analisadas em cada ensaio na **Tabela 22A** e, de seguida, para cada um dos ensaios, determinou-se o *bias* relativo.



**Tabela 22A: Resultados obtidos na participação em ensaios interlaboratoriais.** Valores determinados para a concentração de teobromina nas amostras analisadas pelo laboratório no ensaio interlaboratorial ( $[Teo]_{obs}$ ), bem como a concentração efetiva de teobromina nessa amostra ( $[Teo]_{ref}$ ). Número de participantes em cada ensaio (Nº de lab participantes), o desvio padrão robusto obtido pelo laboratório ( $s_{ro}$ ) e o desvio padrão relativo ( $s_{(ro)relativo}$ ).

| Ensaio      | Nº de lab | $[Teo]_{obs}$ | $[Teo]_{ref}$ | Bias relativo (%) | $s_{ro}$ | $s_{(ro)relativo}$ (%) |
|-------------|-----------|---------------|---------------|-------------------|----------|------------------------|
| 1 (g/100 g) | 9         | 1,7           | 1,8           | 5,5               | 0,21     | 12                     |
| 2 (g/100 g) | 9         | 1,8           | 1,8           | 4,4               | 0,21     | 12                     |
| 3 (mg/Kg)   | 37        | 2050          | 2154          | 4,8               | 109      | 5,3                    |
| 4 (mg/Kg)   | 37        | 2010          | 2154          | 6,7               | 109      | 5,4                    |

Para determinar a  $RMS_{(bias)relativa}$  de acordo com a **Equação 86**, considerou-se o somatório dos quadrados dos *bias* relativos, que foi de 117 % e, o facto de terem sido considerados quatro ensaios interlaboratoriais, isto é (**Equação 82A**):

$$RMS_{(bias)relativa} = \sqrt{\frac{117}{4}} = 5,4 \% \quad (\text{Equação 82A})$$

Para determinar a  $u_{(Cref)relativa}$ , para cada ensaio interlaboratorial registou-se o  $s_{ro}$  fornecido pela entidade organizadora, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 22A**, e, de seguida calculou-se o  $s_{(ro)relativo}$ . Tomando como exemplo o primeiro ensaio de recuperação, o  $s_{(ro)relativo}$  foi calculado como (**Equação 83A**):

$$s_{(ro)relativo} = \frac{0,21}{1,7} \times 100 = 12 \% \quad (\text{Equação 83A})$$

Deste modo, a  $u_{(Cref)relativa}$  foi calculada considerando o valor médio dos  $\bar{s}_{(ro)relativo}$ , que foi de 8,6 % e o valor médio do número de participantes em todos os ensaios, ou seja, 23 (**Equação 84A**):

$$u_{(Cref)relativa} = 1,253 \times \frac{8,6}{\sqrt{23}} = 2,3 \% \quad (\text{Equação 84A})$$

Assim, encontrando-se todas as variáveis na forma relativa, para determinar a  $u_{(justeza)relativa}$  combinaram-se os valores da  $RMS_{(bias)relativa}$  e, da  $u_{(Cref)relativa}$  (**Equação 85A**):

$$u_{(\text{justeza})\text{relativa}} = \sqrt{2,3^2 + 5,4^2} = 5,9 \% \quad (\text{Equação 85A})$$

#### 6.1.11.3.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida

Calculou-se a  $u_c(y)$  da gama de trabalho alta através da **Equação 78**, combinando a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  com a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , considerando a participação em ensaios interlaboratoriais, isto é (**Equação 86A**):

$$u_c(y) = \sqrt{1,6^2 + 5,9^2} = 6,1 \% \quad (\text{Equação 86A})$$

e, a  $U$  como indicado na **Equação 65**, ou seja (**Equação 87A**):

$$U = 6,1 \times 2 = 12 \% \quad (\text{Equação 87A})$$

## 6.2 Validação do método de quantificação de mercúrio em géneros alimentícios recorrendo ao analisador direto de mercúrio





### 6.2.1 Ficha de segurança dos reagentes

Ao longo da realização do procedimento experimental foram adotados determinados cuidados de acordo com a ficha de segurança dos reagentes utilizados, como ilustrado na **Tabela 23A**.

Tabela 23A: Ficha de segurança dos reagentes.

| Reagente              | Ficha de segurança   |
|-----------------------|--|
| Mercúrio              | H290; H314<br>P280; P301+P330+P331; P305+P351+P338; P308+P310  |
| Ácido nítrico 68 %    | H272; H290; H331; H314<br>P210; P220; P280; P301+P330+P331;<br>P302+P352; P304+P340; P305+P351+P338; P308+P310 |
| Ácido clorídrico 37 % | H290; H314; H335<br>P280; P301+P330+P331; P305+P351+P338; P308+P310  |

| Reagente           | Pictograma  | Perigo                         |
|--------------------|---|--------------------------------|
| Mercúrio           |    | Corrosivo                      |
| Ácido nítrico 68 % |    | Comburente; tóxico e corrosivo |

Ácido clorídrico 37 %



Corrosivo e irritante

| Ficha de segurança | Declaração de perigo                                  |
|--------------------|---|
| H314               | Causa queimaduras severas na pele e danos oculares    |
| H272               | Pode agravar incêndios, comburente.                   |
| H290               | Pode ser corrosivo para os metais.                    |
| H314               | Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. |
| H331               | Tóxico por inalação.                                  |
| H335               | Pode causar irritação respiratória.                   |

| Ficha de segurança | Declaração de precaução  |
|--------------------|--|
| P210               | Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar                          |
| P220               | Manter/guardar afastado de roupa/matérias combustíveis.  |
| P280               | Usar luvas, vestuário, óculos e máscara de proteção  |
| P301+P330+P331     | Se ingerido, enxaguar a boca e nunca provocar o vômito   |
| P302+P352          | Se em contacto com a pele, enxaguar abundantemente com água  |
| P304+P340          | Se inalado, remover o indivíduo para o ar livre e manter numa posição que facilite a respiração                                    |
| P305+P351+P338     | Se em contacto com os olhos, enxaguar abundantemente com água durante vários minutos. Remover as lentes de contacto, se presentes. |
| P308+P310          | Em caso de exposição, chamar de imediato os serviços de urgência   |

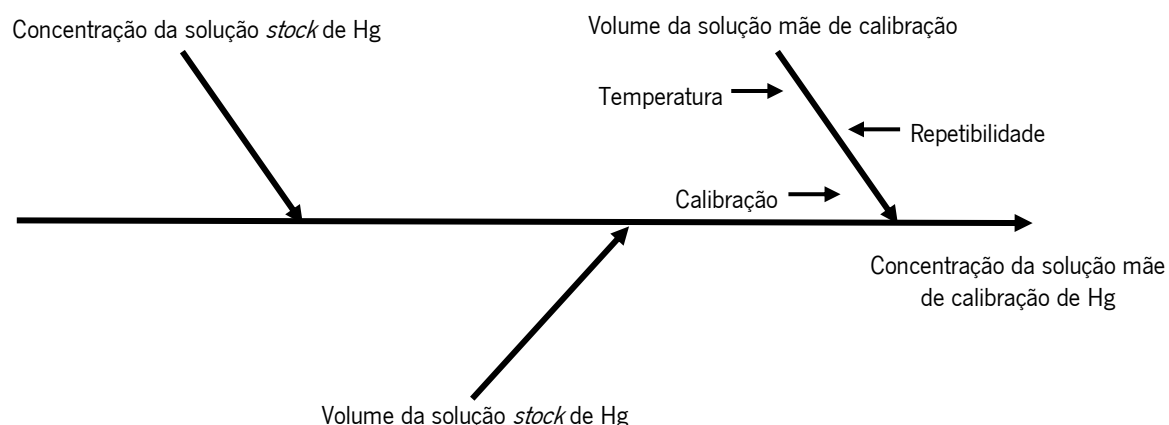
## 6.2.2 Soluções de calibração de mercúrio

### 6.2.2.1 Concentração efetiva da solução mãe de calibração de mercúrio, 10 ppm e, respetiva incerteza combinada associada

Como o reagente de mercúrio se encontra no estado líquido, a  $[\text{Hg}]_{\text{cm}}$  foi calculada como indicado na **Equação 66**, sabendo que se transferiram 0,1 mL de reagente de Hg com concentração efetiva de  $947 \pm 7$  ppm, para um volume final de 10 mL, isto é (**Equação 88A**):

$$[\text{Hg}]_{\text{cm}} = \frac{947 \times 0,1}{10} = 9,47 \text{ ppm} \quad (\text{Equação 88A})$$

A  $u_c([\text{Hg}]_{\text{cm}})$  foi determinada considerando todas as etapas ilustradas na metodologia passo-a-passo, como indicado na **Equação 72**. Por este motivo, em primeiro lugar, determinaram-se as fontes de incerteza e, representou-se o diagrama em espinha de peixe para este caso em particular, como representado na **Figura 3A**.



**Figura 3A: Diagrama em espinha de peixe.** Ilustração do diagrama em espinha de peixe para determinar a incerteza combinada associada à concentração da solução mãe de calibração de Hg.

Deste modo, identificadas as fontes de incerteza, determinou-se, em primeiro lugar, a  $u_{V_{\text{cm}}}$ , como indicado na **Equação 71**. Para tal, inicialmente, determinou-se a  $u_{M_V}$ , como referido na **Equação 68**, sabendo que a T do balão volumétrico de 10 mL equivale a 0,025 mL (**Equação 89A**):

$$u_{M_V} = \frac{0,025}{\sqrt{6}} = 0,010 \text{ mL} \quad (\text{Equação 89A})$$

Para além disso, a  $u_T$  correspondeu a 0,032 g como mostrado anteriormente. Por fim, para calcular a  $u_T$  como indicado na **Equação 70**, determinou-se a  $\Delta V$  dada pela **Equação 69**, isto é (**Equação 90A**):

$$\Delta V = \pm(4 \times 10 \times 2,1 \times 10^{-4}) = 0,0084 \text{ mL} \quad (\text{Equação 90A})$$

Assim,  $u_T$  correspondeu a (**Equação 91A**):

$$u_T = \frac{0,0084}{\sqrt{3}} = 0,0048 \text{ mL} \quad (\text{Equação 91A})$$

Deste modo,  $u_{V_{\text{cm}}}$  foi dado por (**Equação 92A**):

$$u_{V_{cm}} = \sqrt{(0,010)^2 + (0,032)^2 + (0,0048)^2} = 0,034 \text{ mL} \quad (\text{Equação 92A})$$

A  $u_{V_S}$  encontrava-se referida no certificado da micropipeta e correspondeu a 0,00013 mL, e, a  $u_{C_S}$  foi referenciada no certificado do reagente de Hg e equivaleu a 7 ppm.

Assim, a  $u_c([Hg]_{Cm})$  correspondeu a (Equação 93A):

$$u_c([Hg]_{Cm}) = 9,47 \times \sqrt{\left(\frac{7}{947}\right)^2 + \left(\frac{0,00013}{0,10000}\right)^2 + \left(\frac{0,034}{10,000}\right)^2} = 0,078 \text{ ppm} \quad (\text{Equação 93A})$$

Assim, a  $[Hg]_{Cm}$  foi apresentada na forma (Equação 94A):

$$[Hg]_{Cm} = 9,470 \pm 0,078 \text{ ppm} \quad (\text{Equação 94A})$$

O mesmo raciocínio foi aplicado para o cálculo da  $u_c([Hg]_{Cm})$  da segunda solução mãe de calibração de Hg, bem como, para o cálculo da  $u_c([Hg]_{Pc})$  das soluções padrão de Hg uma vez que todas elas foram preparadas através da diluição de outras soluções.

## 6.2.3 Curva de calibração do mercúrio

### 6.2.3.1 Teste de Mandel

Para realizar o teste de Mandel, admitindo como exemplo a primeira curva de calibração, em primeiro lugar obtiveram-se as equações das retas do modelo de regressão linear e do modelo de regressão quadrático que corresponderam a Absorvância =  $(0,0360 \pm 0,0039)$  (Massa Hg) (ng) e Absorvância =  $(-0,00101 \pm 0,00023)$  (Massa Hg)<sup>2</sup> (ng)<sup>2</sup> +  $(0,0522 \pm 0,0044)$  (Massa Hg) (ng), respetivamente. De seguida, foi necessário determinar os valores do  $s_{y/x}$  e  $s_{y^2}$  do de acordo com as Equações 29 e 40, respetivamente. Para determinar o valor do  $s_{y/x}$  foi necessário realizar alguns cálculos intermédios, como apresentado na Tabela 24A.

**Tabela 24A: Valores auxiliares para o cálculo do desvio padrão residual do modelo de regressão linear.** Valores das absorvâncias das soluções padrão de Hg ( $y$ ) obtidos experimentalmente, bem como os valores das absorvâncias estimadas a partir do modelo de regressão linear ( $\hat{y}_i$ ).

|           | $y_i$  | $\hat{y}_i$ | $(y_i - \hat{y}_i)^2$ |
|-----------|--------|-------------|-----------------------|
|           | 0,0095 | 0,0000      | 0,0001                |
|           | 0,0440 | 0,0170      | 0,0007                |
|           | 0,0687 | 0,0338      | 0,0012                |
|           | 0,1104 | 0,0678      | 0,0018                |
|           | 0,1511 | 0,1014      | 0,0025                |
|           | 0,2263 | 0,1693      | 0,0033                |
|           | 0,3815 | 0,3392      | 0,0018                |
|           | 0,6284 | 0,6777      | 0,0024                |
| Somatório | —      | —           | 0,0138                |

Através dos dados apresentados acima, determinou-se o valor do  $s_{y/x}$ , isto é (Equação 95A):

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{0,0138}{8 - 2}} = 0,048 \quad \text{(Equação 95A)}$$

Para determinar o valor de  $s_{y^2}$  também foi necessário efetuar alguns cálculos auxiliares, como indicado na Tabela 25A.

**Tabela 25A: Valores auxiliares para o cálculo do desvio padrão residual do modelo de regressão quadrático.** Valores das absorvâncias das soluções padrão de Hg ( $y$ ) obtidos experimentalmente, bem como os valores das absorvâncias estimadas a partir do modelo de regressão quadrático ( $\hat{y}_i$ ).

|  | $y_i$  | $\hat{y}_i$ | $(y_i - \hat{y}_i)^2$ |
|--|--------|-------------|-----------------------|
|  | 0,0095 | 0,0000      | 0,00009               |
|  | 0,0440 | 0,0244      | 0,00039               |
|  | 0,0687 | 0,0481      | 0,00042               |
|  | 0,1104 | 0,0946      | 0,00025               |
|  | 0,1511 | 0,1388      | 0,00015               |
|  | 0,2263 | 0,2229      | 0,00001               |
|  | 0,3815 | 0,4018      | 0,00041               |

|           |        |        |          |
|-----------|--------|--------|----------|
|           | 0,6284 | 0,6240 | 0,000019 |
| Somatório | —      | —      | 0,0017   |

Assim, teve-se (Equação 96A):

$$s_{y^2} = \sqrt{\frac{0,0017}{8-3}} = 0,019 \quad \text{(Equação 96A)}$$

Deste modo, calculou-se o  $DS^2$  recorrendo à Equação 46, isto é (Equação 97A):

$$DS^2 = (8-2) \times (0,048)^2 - (8-3) \times (0,019)^2 = 0,012 \quad \text{(Equação 97A)}$$

Por fim, de acordo com a Equação 47, calculou-se o valor PG, ou seja (Equação 98A):

$$PG = \frac{0,012}{(0,019)^2} = 34,63 \quad \text{(Equação 98A)}$$

Verificou-se que o valor de PG calculado foi superior ao valor de F indicado na tabela F de Fisher para 1 G.L no numerador, n-3 G.L no denominador (n = 8) e 95 % de confiança, que corresponde a 10,01, reforçando a correlação quadrática entre as absorvâncias e a massa de Hg nas soluções padrão.

Relativamente à curva de calibração de gama alta, constatou-se, do mesmo modo que, o valor de PG calculado de 69,68 foi superior ao valor de F indicado na tabela F de Fisher para 1 G.L no numerador, n-3 G.L no denominador (n = 6) e 95 % de confiança, que corresponde a 17,44, o que vai ao encontro da evidência anterior.

### 6.2.3.2 Determinação do erro relativo

O  $E_r$  foi calculado de acordo com a Equação 11. Tomando como exemplo o coeficiente de segundo grau determinado para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia, o erro relativo entre este coeficiente calculado pelo DMA e pelo Excel foi dado por (Equação 99A):

$$E_r = \frac{|-0,00101 - (-0,00100)|}{-0,00101} \times 100 = 0,52 \% \quad \text{(Equação 99A)}$$

O mesmo cálculo foi efetuado para os restantes coeficientes de ambas as curvas de calibração tendo-se verificado que, em todos os casos as diferenças entre os coeficientes determinados pelo Excel e pelo equipamento não diferem significativamente.

## 6.2.4 Sensibilidade

### 6.2.4.1 Carta de controlo de indivíduos dos coeficientes do modelo de regressão quadrático

Para avaliar se a curva de calibração se mantinha estável ao longo do tempo realizou-se o controlo dos coeficientes do modelo de regressão quadrático, isto é, do c e do b, através da elaboração de cartas de controlo de indivíduos. De acordo com o definido pelo laboratório, são necessários sete valores dos coeficientes para elaborar uma carta de controlo provisória. Assim, recolheram-se sete coeficientes de segundo e primeiro grau da curva de calibração de gamas baixa e intermédia e da gama alta obtidos de 25/09/2019 a 14/11/2020 e realizou-se o teste de Grubbs para todas as situações. Consideraram-se como suspeitos os coeficientes máximo e mínimo registados quando se efetuaram as curvas de calibração.

Considerando como exemplo o coeficiente de segundo grau obtido para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia, consideraram-se como suspeitos os valores  $-0,00134 \text{ ng}^2$  e  $-0,00104 \text{ ng}^2$ . O valor médio deste coeficiente, como indicado pela **Equação 1**, foi de  $-0,00114 \text{ ng}^2$  e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de  $0,00012 \text{ ng}^2$ , considerando estes dois valores para o seu cálculo. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 26A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações ( $n = 7$ ) e 95 % de confiança. Na mesma tabela, encontram-se apresentados os mesmos parâmetros para a curva de calibração de gama alta.

**Tabela 26A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar algum coeficiente de ambas as gamas de trabalho consideradas para o estudo da sensibilidade, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações ( $n = 7$ ) e, 95 % de confiança.

| Gama               | c<br>( $\text{ng}^2$ ) | G calculado | b<br>( $\text{ng}^2$ ) | G calculado | G tabelado |
|--------------------|------------------------|-------------|------------------------|-------------|------------|
| Baixa e intermédia | -0,00104               | 0,88        | 0,0582                 | 1,31        | 2,02       |
|                    | -0,00134               | 1,73        | 0,0640                 | 1,19        |            |
| Alta               | -0,00000020            | 1,34        | 0,000838               | 1,50        |            |
|                    | -0,00000042            | 1,56        | 0,001012               | 1,51        |            |



Considerando o mesmo exemplo, o valor de G foi calculado como indicado na **Equação 3**, isto é (**Equação 100A**):

$$G = \frac{|-0,00104 - (-0,00114)|}{0,00012} = 0,88 \quad (\text{Equação 100A})$$

Verificou-se que nenhum dos suspeitos considerados para ambas as gamas de trabalho deveria ser rejeitado para o estudo da sensibilidade dado que os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado.

Assim, tomando como exemplo o coeficiente de segundo grau da curva de calibração de gamas baixa e intermédia, determinou-se o valor alvo da carta de controlo que correspondeu ao valor médio deste parâmetro, isto é,  $-0,00114 \text{ ng}^2$ . A partir do desvio padrão calculado, que foi de  $0,00012 \text{ ng}^2$ , determinaram-se os LSA, LIA, LSC e, LIC (**Equações 101A, 102A, 103A e, 104A**, respetivamente):

$$\text{LSA} = -0,00114 + 2 \times 0,00012 = -0,00091 \text{ ng}^{-2} \quad (\text{Equação 101A})$$

$$\text{LIA} = -0,00114 - 2 \times 0,00012 = -0,00137 \text{ ng}^{-2} \quad (\text{Equação 102A})$$

$$\text{LSC} = -0,00114 + 3 \times 0,00012 = -0,00080 \text{ ng}^{-2} \quad (\text{Equação 103A})$$

$$\text{LIC} = -0,00114 - 3 \times 0,00012 = -0,00149 \text{ ng}^{-2} \quad (\text{Equação 104A})$$

#### 6.2.4.2 Determinação do coeficiente de variação

A sensibilidade do método analítico foi avaliada através da determinação do CV, como descrito na **Equação 51**. Considerando como exemplo o coeficiente de segundo grau determinado para a curva de calibração de gamas baixa e intermédia, teve-se que (**Equação 105A**):

$$\text{CV} = \left| \frac{0,00012}{-0,00111} \right| \times 100 = 10 \% \quad (\text{Equação 105A})$$

Como o CV calculado foi igual a 10 %, admite-se que este coeficiente não sofreu alterações significativas ao longo do tempo. O mesmo cálculo foi efetuado para os restantes coeficientes tendo-se concluído que a sensibilidade das curvas de calibração não sofreu alterações significativas durante três meses.

## 6.2.5 Limite de quantificação

### 6.2.5.1 Determinação da massa de mercúrio na amostra

A massa de Hg na amostra de açúcar (Massa de Hg amostra) foi calculada tendo em conta a massa de amostra pesada (Massa da toma), em g, e, o valor médio da concentração de Hg na amostra quantificado pelo equipamento ( $[\overline{\text{Hg}}]_{\text{amostra}}$ ), em ppb. Considerando o primeiro ensaio efetuado, sabe-se que a  $[\overline{\text{Hg}}]_{\text{amostra}}$  foi de 1,66 ppb e, a Massa da toma foi de 0,3944 g, logo (**Equação 106A**):

$$\text{Massa de Hg amostra} = 1,66 \times 0,3944 = 0,655 \text{ ng} \quad (\text{Equação 106A})$$

### 6.2.5.2 Determinação da massa de mercúrio adicionada no ensaio de recuperação

A massa de Hg adicionada (Massa de Hg padrão), em ng, em cada um dos ensaios de recuperação realizados foi determinada considerando a concentração de Hg da solução padrão de Hg, que equivaleu a  $47,35 \pm 0,39$  ppb e, o volume de solução padrão de Hg adicionado, que foi de 100  $\mu\text{L}$ . Contudo, este volume foi pesado, em g, quando adicionado à barqueta de quartzo contendo a amostra (Massa de padrão), pelo que a massa transferida do padrão variou de ensaio para ensaio. Assim, considerando o primeiro ensaio efetuado, sabendo que se transferiram 0,0994 g de solução de padrão de Hg para a barqueta com a amostra, teve-se que (**Equação 107A**):

$$\text{Massa de Hg padrão} = 47,35 \times 0,0994 = 4,71 \text{ ng} \quad (\text{Equação 107A})$$

### 6.2.5.3 Determinação da concentração efetiva de mercúrio nas amostras fortificadas

Para determinar a concentração efetiva de Hg em cada uma das amostras de açúcar fortificadas ( $[\text{Hg}]_{\text{efetiva fortificada}}$ ), em ppb, determinou-se, em primeiro lugar, a massa efetiva de mercúrio em cada uma destas amostras, em ng (Massa de Hg fortificada). Para tal, somaram-se os valores da Massa de Hg amostra com os valores da Massa de Hg padrão. Tomando como exemplo o primeiro ensaio de recuperação efetuado teve-se que (**Equação 108A**):

$$\text{Massa de Hg fortificada} = 0,655 + 4,71 = 5,36 \text{ ng} \quad (\text{Equação 108A})$$

Assim, a  $[\text{Hg}]_{\text{efetiva fortificada}}$  correspondeu à razão entre a Massa de Hg fortificada e a massa total analisada, que equivaleu à soma da Massa da toma com a Massa de Padrão. Deste modo, para o primeiro ensaio de recuperação veio (**Equação 109A**):

$$[\text{Hg}]_{\text{efetiva fortificada}} = \frac{5,36}{0,0994 + 0,3944} = 10,86 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 109A})$$

#### 6.2.5.4 Determinação da taxa de recuperação

A R obtida em cada ensaio de recuperação foi calculada como descrito na **Equação 13**. Considerando como exemplo o Ensaio 1, observou-se que (**Equação 110A**):

$$R = \frac{11,23}{10,86} \times 100 = 103,4 \% \quad (\text{Equação 110A})$$

De seguida, efetuou-se o teste de Grubbs para avaliar se algum dos valores da R calculados deveria ser rejeitado. Para tal, em primeiro lugar determinou-se a  $\bar{R}$  considerando os valores suspeitos, que foi de 95,8 % e, o respetivo desvio padrão que correspondeu a 4,5 %, sendo que se consideraram como suspeitos os extremos da R obtidos, isto é, 91,4 e 103,4 %. Os valores de G calculados para cada um dos suspeitos encontram-se apresentados na **Tabela 27A**, juntamente com o valor de G tabelado para n = 6 e 95 % de confiança.

**Tabela 27A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma taxa de recuperação (R) calculada nos ensaios de recuperação efetuados, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 6) e 95 % de confiança.

| R (%) | G calculado | G tabelado |
|-------|-------------|------------|
| 91,4  | 0,98        | 1,89       |
| 103,4 | 1,68        |            |

Verificou-se que nenhum dos suspeitos considerados deveria ser rejeitado porque os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado (n = 6) e, como a  $\bar{R}$  foi de 95,8 %, concluiu-se que o LDQ do método correspondia a 10 ppb.

## 6.2.6 Gama de trabalho

### 6.2.6.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor das absorvâncias determinado para cada um dos padrões de calibração de Hg quando se procedeu ao estudo da gama de trabalho.

Relativamente à curva de calibração de gamas baixa e intermédia, considerando o padrão de calibração com menor concentração de Hg, assumiram-se como suspeitos as absorvâncias máxima e mínima registadas quando se analisou este padrão, que corresponderam a 0,0751 e 0,0647, respetivamente. O valor médio das absorvâncias, determinado como indicado pela **Equação 1**, foi de 0,0698 e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,0039, considerando estes dois suspeitos. Admitindo o padrão com maior concentração de Hg, assumiram-se como suspeitos as absorvâncias 0,7819 e 0,7439, respetivamente. O valor médio das absorvâncias, determinado como indicado pela **Equação 1**, foi de 0,762 e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,014, considerando estes dois suspeitos. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 28A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 10) e 95 % de confiança.

**Tabela 28A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma absorvância obtida na análise dos padrões com menor e maior concentração de Hg das gamas de trabalho baixa e intermédia, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações, (n = 10) e 95 % de confiança.

| Gama               | [Hg] padrão (ppb) | Absorvância | G calculado | G tabelado |
|--------------------|-------------------|-------------|-------------|------------|
| Baixa e intermédia | 10                | 0,0642      | 1,44        | 2,29       |
|                    |                   | 0,0751      | 1,35        |            |
|                    | 200               | 0,7436      | 1,28        |            |
|                    |                   | 0,7819      | 1,42        |            |

Verificou-se que nenhum dos suspeitos considerados no estudo das gamas de trabalho baixa e intermédia deveria ser rejeitado dado que os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado.

Quanto à curva de calibração de gama alta, considerando o padrão de calibração concentração de Hg de 500 ppb, assumiram-se como suspeitos as absorvâncias 0,0452 e 0,0348. O valor médio das absorvâncias, determinado como indicado pela **Equação 1**, foi de 0,0401 e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,0036, considerando estes dois suspeitos. Admitindo o padrão com concentração de Hg de 10000 ppb, assumiram-se como suspeitos as absorvâncias 0,6478 e 0,5238. O valor médio das absorvâncias, determinado como indicado pela **Equação 1**, foi de 0,596 e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 0,043, considerando estes dois suspeitos. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os

resultados apresentados na **Tabela 29A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 6) e 95 % de confiança.

**Tabela 29A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma absorvância obtida na análise dos padrões com menor e maior concentração de Hg da curva de calibração de gama alta, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 6) e, 95 % de confiança.

| Gama | [Hg] padrão (ppb) | Absorvância | G calculado | G tabelado |
|------|-------------------|-------------|-------------|------------|
| Alta | 500               | 0,0348      | 1,47        | 1,89       |
|      |                   | 0,0452      | 1,38        |            |
|      | 10000             | 0,5238      | 1,68        |            |
|      |                   | 0,6478      | 1,20        |            |

Concluiu-se que nenhum dos suspeitos considerados no estudo da gama de trabalho alta deveria ser rejeitado dado que os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado.

#### 6.2.6.2 Teste F de Snedecor Fisher

Para avaliar se a gama de trabalho se encontrava bem ajustada, avaliou-se a homogeneidade das variâncias ao longo da mesma e, para tal, aplicou-se o teste F de Snedecor-Fisher às duas curvas de calibração. Neste caso, o valor de F, tendo como exemplo a curva de calibração de gamas baixa e intermédia, foi calculado, como descrito na **Equação 6**, isto é (**Equação 111A**):

$$F = \frac{0,00020}{0,000015} = 13,215 \quad (\text{Equação 111A})$$

Verificou-se que em ambas as gamas de trabalho, o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado logo as gamas de trabalho encontram-se mal ajustadas.

### 6.2.7 Seletividade

#### 6.2.7.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para se avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor das  $\bar{R}$  determinadas para cada um dos ensaios de recuperação efetuados para o estudo da seletividade.

Deste modo, admitiram-se como valores suspeitos as  $\bar{R}$  máxima e mínima registadas que corresponderam a 136,1 e 57,8 %, respetivamente. O  $\bar{R}$ , determinado como indicado pela **Equação 1**,

foi de 102 % e, o desvio padrão, de acordo com a **Equação 2**, foi de 24 %, considerando estes dois suspeitos. Deste modo, os valores de G foram calculados para ambos os casos, como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 30A**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 7) e 95 % de confiança.

**Tabela 30A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado) para avaliar a possibilidade de rejeitar alguma taxa de recuperação média ( $\bar{R}$ ) obtida na realização de ensaios de recuperação, bem como, o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 7) e, 95 % de confiança.

| $\bar{R}$<br>(%) | G calculado | G tabelado |
|------------------|-------------|------------|
| 57,8             | 1,83        | 2,02       |
| 136,1            | 1,43        |            |

Concluiu-se que nenhum dos suspeitos considerados no estudo da seletividade deveria ser rejeitado dado que os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado.

#### 6.2.7.2 Carta de controlo de médias

Para avaliar se a  $\bar{R}$  obtida nos ensaios de recuperação efetuados no estudo da seletividade podia ser aceite, internamente, realizou-se uma carta de controlo de médias. De acordo com o definido pelo laboratório, são necessários sete valores de  $\bar{R}$  para elaborar uma carta de controlo de médias provisória. Assim, recolheram-se sete  $\bar{R}$  obtidas nos ensaios de recuperação encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 31A**.

**Tabela 31A: Estudo da seletividade.** Valores auxiliares necessários para avaliar seletividade do método analítico, nomeadamente, as matrizes utilizadas no estudo e a taxa de recuperação média ( $\bar{R}$ ) juntamente com o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV) obtidos nos ensaios de recuperação efetuados com cada matriz.

| Ensaio | Matriz       | $\bar{R} \pm s$<br>(%) | CV<br>(%) |
|--------|--------------|------------------------|-----------|
| 1      | Pescado      | 113,4 ± 4,5            | 4,0       |
| 2      | Chocolate    | 57,8 ± 7,6             | 13        |
| 3      | Pescado      | 104,4 ± 3,0            | 2,9       |
| 4      | Açúcar       | 107,8 ± 5,7            | 5,3       |
| 5      | Açúcar       | 136 ± 41               | 30        |
| 6      | Batata frita | 89,1 ± 5,8             | 6,5       |
| 7      | Pescado      | 104,358 ± 0,010        | 0,0010    |

De seguida, determinou-se o valor alvo da carta de controlo que correspondeu ao  $\bar{R}$ , calculado de acordo com a **Equação 1**, isto é, 102 %. A partir do desvio padrão calculado, que foi de 24 %, determinaram-se os LSA, LIA, LSC e LIC (**Equações 112A, 113A, 114A e, 115A**, respetivamente):

$$LSA = 102 + \frac{2 \times 24}{\sqrt{7}} = 120 \% \quad (\text{Equação 112A})$$

$$LIA = 102 - \frac{2 \times 24}{\sqrt{7}} = 84 \% \quad (\text{Equação 113A})$$

$$LSC = 102 + \frac{3 \times 24}{\sqrt{7}} = 129 \% \quad (\text{Equação 114A})$$

$$LIC = 102 - \frac{3 \times 24}{\sqrt{7}} = 75 \% \quad (\text{Equação 115A})$$

## 6.2.8 Precisão

### 6.2.8.1 Teste de Grubbs

Realizou-se um teste de Grubbs para avaliar a possibilidade de se rejeitar algum valor das concentrações de Hg determinadas para oito replicados de uma amostra de arroz integral analisada ao longo de oito dias.

Para cada dia, admitiram-se como valores suspeitos as concentrações de Hg máxima e mínima registadas e, calcularam-se os valores médios da concentração de Hg e os respetivos desvios padrão, a partir dos quais se determinou o valor de G. Deste modo, os valores de G foram calculados como descrito na **Equação 3**, encontrando-se os resultados apresentados na **Tabela 32A.**, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs para n observações (n = 8) e 95 % de confiança.

**Tabela 32A: Teste de Grubbs.** Valores obtidos na realização do teste de Grubbs (G calculado), considerando como suspeitos as concentrações mínima e máxima de Hg obtidas para a matriz considerada no estudo da precisão, juntamente com o valor de G indicado na tabela de Grubbs (G tabelado) para n observações (n = 8) e, 95 % de confiança.

| Data       | [Hg] (ppb) | G calculado | [Hg] (ppb) | G calculado | G tabelado |
|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 13/01/2020 | 27,96      | 1,45        | 25,54      | 1,62        | 2,13       |
| 22/01/2020 | 26,92      | 1,46        | 25,33      | 1,69        |            |
| 11/02/2020 | 27,29      | 1,41        | 25,43      | 1,80        |            |
| 14/02/2020 | 25,92      | 1,24        | 25,39      | 1,39        |            |

|            |       |      |       |      |
|------------|-------|------|-------|------|
| 17/02/2020 | 26,12 | 1,08 | 25,05 | 2,02 |
| 18/02/2020 | 27,15 | 1,46 | 25,11 | 1,52 |
| 21/02/2020 | 27,79 | 1,97 | 25,32 | 1,32 |
| 27/02/2020 | 25,96 | 0,86 | 25,02 | 2,11 |

Verificou-se que nenhum dos suspeitos considerados no estudo da precisão deveria ser rejeitado uma vez que os valores de G calculados foram inferiores ao valor de G tabelado.

### 6.2.8.2 Teste de Cochran

De modo a avaliar a necessidade de eliminar alguma matriz para o estudo da precisão do método, realizou-se um teste de Cochran, que tem por base a análise das variâncias calculadas para cada matriz utilizada nesse estudo. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 33A**.

**Tabela 33A: Teste de Cochran.** Valor de C calculado para o dia que apresentou maior variância nas concentrações de Hg ( $s^2$ ) consideradas no estudo da precisão, bem como o valor do somatório de todas as  $s^2$  calculadas. Para além disso, encontra-se apresentado o valor de C tabelado para um número de ensaios (n) igual a 8 e número de dias (k) igual a 8 e, 95 % de confiança.

| Dia        | Maior $s^2$<br>(ppb <sup>2</sup> ) | $\sum s^2$<br>(ppb <sup>2</sup> ) | C calculado | C tabelado | k |
|------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------|------------|---|
| 13/01/2020 | 0,62                               | 2,5                               | 0,248       | 0,319      | 8 |

O valor de C foi calculado como descrito na **Equação 10**, isto é (**Equação 116A**):

$$C = \frac{0,62}{2,5} = 0,248 \quad (\text{Equação 116A})$$

Verificou-se que o ensaio com maior  $s^2$  considerado no estudo da precisão não deveria ser rejeitado uma vez que o valor de C calculado foi inferior ao valor de C tabelado.

### 6.2.8.3 Determinação do $s_r$ e do $s_R$

O  $s_r$  foi determinado de acordo com a **Equação 59**, sabendo que o MS dentro do grupo correspondeu a 0,31, isto é (**Equação 117A**):

$$s_r = \sqrt{0,31} = 0,56 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 117A})$$



O  $s_{PI}$  foi calculado como descrito na **Equação 60**, sabendo que o  $s_w$  foi de 0,36, isto é (**Equação 118A**):

$$s_{PI} = \sqrt{(0,36)^2 + (0,56)^2} = 0,67 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 118A})$$

#### 6.2.8.4 Determinação do CV<sub>r</sub> e do CV<sub>PI</sub>

O CV<sub>r</sub> foi determinado de acordo com a **Equação 52**, sabendo que o valor médio da concentração de Hg na amostra considerando os 64 ensaios efetuados foi de 26,13 ppb, ou seja (**Equação 119A**):

$$CV_r = \frac{0,56}{26,13} \times 100 = 2,1 \% \quad (\text{Equação 119A})$$

O CV<sub>PI</sub> foi calculado como descrito na **Equação 58**, considerando o mesmo valor médio calculado, isto é (**Equação 120A**):

$$CV_{PI} = \frac{0,67}{26,13} \times 100 = 2,5 \% \quad (\text{Equação 120A})$$

Como os CV calculados foram inferiores a 10 % concluiu-se que não existem evidências de erros aleatórios significativos quer em condições de repetibilidade, quer em condições de precisão intermédia logo, o método é preciso.

#### 6.2.8.5 Determinação do $r_r$ , CV<sub>r</sub>, $r_{PI}$ e CV<sub>PI</sub>

O  $r_r$  foi determinado de acordo com a **Equação 53**, ou seja (**Equação 121A**):

$$r_r = 2,8 \times 0,56 = 1,6 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 121A})$$

O CV<sub>r</sub> foi calculado como descrito na **Equação 54**, isto é (**Equação 122A**):

$$CV_{r_r} = 2,8 \times \frac{0,56}{26,13} \times 100 = 6,0 \% \quad (\text{Equação 122A})$$

O  $r_{PI}$  foi determinado de acordo com a **Equação 53**, substituindo o  $s_r$  pelo  $s_{PI}$  ou seja (**Equação 123A**):

$$r_{PI} = 2,8 \times 0,67 = 1,9 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 123A})$$

O  $CV_{r_{PI}}$  foi calculado de acordo com a **Equação 57**, ou seja, (**Equação 124A**):

$$CV_{r_{PI}} = 2,8 \times \frac{0,67}{26,13} \times 100 = 7,1 \% \quad (\text{Equação 124A})$$

## 6.2.9 Justeza/Veracidade

### 6.2.9.1 Determinação do *bias* absoluto e do *bias* relativo

O *bias* absoluto foi calculado de acordo com a **Equação 62**, sabendo que o valor médio da concentração de Hg na amostra foi de 26,13 ppb e o valor de referência é de 26,2, isto é (**Equação 125A**):

$$bias = |26,13 - 26,2| = 0,070 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 125A})$$

O *bias* relativo foi calculado, de acordo com a **Equação 63**, ou seja (**Equação 126A**):

$$bias \text{ relativo} = \frac{|26,13 - 26,2|}{26,2} \times 100 = 0,27 \% \quad (\text{Equação 126A})$$

Como o *bias* relativo calculado foi inferior a 10 %, concluiu-se que não existem diferenças significativas entre o valor médio da concentração de Hg determinado pelo laboratório e o valor de referência o que significa que não existem evidências da ocorrência de erros sistemáticos e, como tal, o método é justo.

### 6.2.9.2 Teste t

Aplicou-se um teste t para comparação entre o valor médio da concentração de Hg na amostra e o valor de referência, como indicado na **Equação 7** para avaliar a justeza do método em estudo. Assim, sabendo que o valor médio da concentração de Hg na amostra foi de 26,13 ppb, o valor de referência é de 26,2 ppb, foram considerados 64 ensaios e o desvio padrão foi de 0,65 ppb, teve-se que (**Equação 127A**):

$$|t| = |26,13 - 26,2| \times \frac{\sqrt{64}}{0,65} = 0,85 \quad (\text{Equação 127A})$$

Como o valor de t calculado foi inferior ao valor de t tabelado (n = 64) concluiu-se uma vez mais que o método é justo pelas razões referidas anteriormente.

### 6.2.9.3 Determinação da recuperação aparente

A  $R_a$  foi calculada como indicado na **Equação 64**, isto é (**Equação 128A**):

$$R_a = \frac{26,13}{26,2} \times 100 = 99,7 \% \quad (\text{Equação 128A})$$

Como a  $R_a$  correspondeu ao valor ideal, concluiu-se que o método é justo.

## 6.2.10 Estimativa da incerteza do método

### 6.2.10.1 Estimativa da incerteza associada à componente da precisão

A  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  foi estimada através do  $CV_{\text{R}}$  determinado no estudo da precisão intermédia do método e, correspondeu a 2,5 %.

### 6.2.10.2 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando um MR

Para se estimar a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , considerando a análise de uma amostra de arroz integral determinou-se o *bias* relativo como descrito na **Equação 63**, sabendo que a  $[\overline{\text{Hg}}]_{\text{obs}}$  foi de 26,13 ppb e, que esta amostra, apresenta uma  $[\text{Hg}]_{\text{ref}}$  de 26,2 ppb (**Equação 129A**):

$$\text{bias relativo} = \frac{|26,13 - 26,2|}{26,2} \times 100 = 0,27 \% \quad (\text{Equação 129A})$$

A  $u_{\text{Cref}}$  foi calculada de acordo com a **Equação 81** sabendo que o UCL e o LCL deste MR equivalem a 31,5 e 21,7 ppb, respetivamente, ou seja (**Equação 130A**):

$$u_{\text{Cref}} = \frac{|31,5 - 21,7|}{2 \times 2} = 2,5 \text{ ppb} \quad (\text{Equação 130A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{Cref})\text{relativa}}$  como ilustrado na **Equação 82**, consideraram-se os valores da  $u_{\text{Cref}}$  determinada anteriormente e,  $[\text{Hg}]_{\text{ref}}$  e teve-se que (**Equação 131A**):

$$u_{(\text{Cref})\text{relativa}} = \frac{2,5}{26,2} \times 100 = 9,4 \% \quad (\text{Equação 131A})$$

Para determinar o  $S_{(bias)relativo}$  como indicado na **Equação 83**, consideraram-se os valores do  $S_{bias}$  e da  $\overline{[Hg]}_{obs}$  que equivalem a 0,65 e 26,13 ppb, respetivamente. Então (**Equação 132A**):

$$S_{(bias)relativo} = \frac{0,65}{26,13} \times 100 = 2,5 \% \quad (\text{Equação 132A})$$

Deste modo, encontrando-se todas as variáveis na forma relativa, para determinar a  $u_{(justeza)relativa}$  consideraram-se os valores do *bias* relativo, da  $u_{(Cref)relativa}$  e do  $S_{(bias)relativo}$ , sabendo que se efetuaram 64 análises à amostra (**Equação 133A**):

$$u_{(justeza)relativa} = \sqrt{0,27^2 + \left(\frac{2,5}{\sqrt{64}}\right)^2 + 9,4^2} = 9,4 \% \quad (\text{Equação 133A})$$

### 6.2.10.3 Estimativa da incerteza associada à componente da justeza considerando a realização de um ensaio de recuperação

Para se estimar a  $u_{(justeza)relativa}$ , determinou-se, em primeiro lugar, o *bias* relativo como descrito na **Equação 63**, sabendo que após realização do ensaio de recuperação, a  $\overline{[Hg]}_{obs}$  foi de 58 ppb e a  $\overline{[Hg]}_{efetiva}$  é de 45 ppb, isto é (**Equação 134A**):

$$bias \text{ relativo} = \frac{|58 - 45|}{45} \times 100 = 27 \% \quad (\text{Equação 134A})$$

Para determinar a  $u_{(add)relativa}$  de acordo com a **Equação 92**, considerou-se a  $u_{add}$  que foi de 0,72 ppb e a  $[Hg]_{add}$  que equivaleu a 94,70 ppb, isto é (**Equação 135A**):

$$u_{(add)relativa} = \frac{0,72}{94,70} \times 100 = 0,76 \% \quad (\text{Equação 135A})$$

Para determinar a  $u_{(Vol)relativa}$  de acordo com a **Equação 93**, considerou-se a  $u_{Vol}$  que foi de 0,00013 mL e o  $V_{add}$  que equivaleu a 0,1 mL isto é (**Equação 136A**):

$$u_{(Vol)relativa} = \frac{0,00013}{0,1} \times 100 = 0,13 \% \quad (\text{Equação 136A})$$

Para determinar a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$  de acordo com a **Equação 94**, combinou-se a  $u_{(\text{add})\text{relativa}}$  com a  $u_{(\text{Vol})\text{relativa}}$  dado que estas se apresentam nas mesmas unidades e teve-se que (**Equação 137A**):

$$u_{(\text{recuperação,c})\text{relativo}} = \sqrt{0,76^2 + 0,13^2} = 0,77 \% \quad (\text{Equação 137A})$$

De seguida, calculou-se a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$  combinando o *bias* relativo com a  $u_{(\text{recuperação,c})\text{relativa}}$ , isto é (**Equação 138A**):

$$u_{(\text{justeza})\text{relativa}} = \sqrt{27^2 + 0,77^2} = 27 \% \quad (\text{Equação 138A})$$

#### 6.2.10.4 Estimativa das incertezas combinada e expandida

Calculou-se a  $u_c(y)$  através da **Equação 78**, combinando a  $u_{(\text{precisão})\text{relativa}}$  com a  $u_{(\text{justeza})\text{relativa}}$ , considerando a realização de um ensaio de recuperação, isto é (**Equação 139A**):

$$u_c(y) = \sqrt{2,5^2 + 27^2} = 28 \% \quad (\text{Equação 139A})$$

e, a  $U$  como indicado na **Equação 65**, ou seja (**Equação 140A**):

$$U = 28 \times 2 = 55 \% \quad (\text{Equação 140A})$$