

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Eliana Beatriz Magano dos Santos

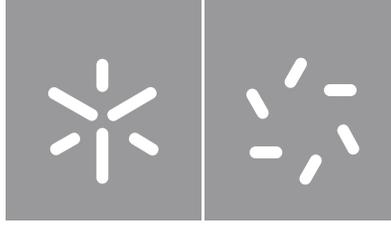
Ensaio físico-químico em produtos alimentares

Ensaio físico-químico em produtos alimentares

Eliana Santos

UMinho | 2019

outubro de 2019



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Eliana Beatriz Magano dos Santos

Ensaio físico-químicos em produtos alimentares

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Alice Helena Machado Freitas dos Santos
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

Quero agradecer à *Silliker Portugal S.A.* e à Universidade do Minho pela possibilidade de realizar a presente dissertação. A todas as pessoas da empresa que me acolheram tão bem, por toda a experiência e conhecimento transmitido. Agradeço à Dr^a. Alice Santos pela simpatia, disponibilidade e apoio prestado. Também não poderia deixar de agradecer a grande oportunidade que este estágio me proporcionou, juntar-me à família *Mérieux NutriSciences*.

À professora Dr^a. Dulce Geraldo por ser uma professora e orientadora incrível, sempre pronta a ajudar, por todo o apoio e disponibilidade. Gratifico também o mestrado e todos os meus colegas.

A todos os meus amigos e em especial à Andreia, por nunca me ter deixado cair.

Por último, um sincero e especial obrigado à minha família e ao meu namorado por serem o meu porto de abrigo.

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.

Título

Ensaio físico-químico em produtos alimentares.

Resumo

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do Projeto Individual do mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química do Departamento de Química da Universidade do Minho na *Silliker Portugal S.A.*, uma empresa independente de prestação de serviços analíticos e de consultadoria nos vários ramos do setor agroalimentar.

Para que os laboratórios cumpram com os requisitos da qualidade para garantir a obtenção de resultados confiáveis, a validação de métodos é de extrema importância. Durante o Projeto Individual, foi revalidado um método já implementado no laboratório – Determinação do teor de hidroxiprolina de acordo com a Norma NP 1987: 2002. A hidroxiprolina é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso em carne e produtos cárneos e a sua quantificação é um elemento importante na avaliação da qualidade da carne.

Para a validação foram realizados estudos que permitiram definir a curva de calibração, avaliar a linearidade e o limite de quantificação, determinar a precisão do método, a partir da repetibilidade e da precisão intermédia, a veracidade e ainda obter uma estimativa da incerteza. A validação foi realizada considerando uma grande variedade de amostras pertencentes à matriz do grupo das carnes, produtos cárneos e derivados.

Foram ainda desempenhadas diversas funções em análises de rotina da empresa como os ensaios de determinação do pH, do resíduo seco solúvel, do teor de sólidos solúveis e da acidez.

Palavras-chave: Exatidão, hidroxiprolina, incerteza, Norma NP 1987:2002, validação.

Title

Physicochemical tests on food products.

Abstract

This work was developed as part of a curricular internship project of the master's degree in Chemical Analysis and Characterization Techniques of the Department of Chemistry of the University of Minho at Silliker Portugal S.A., an independent company providing analytical and consulting services in agri-food sector.

For laboratories to meet quality requirements to ensure reliable results, validating a method is extremely important. During the internship, a method already implemented in the laboratory – Determination of hydroxyproline content according to Standard NP 1987:2002. Hydroxyproline is quantitatively determined as a measure of collagenous material in meat and meat products and its quantification is an important element in the evaluation of meat quality.

For validation, studies were carried out to define the calibration curve, to evaluate the linearity and the limit of quantification, to determine the accuracy of the method, based on repeatability and intermediate precision, veracity and to obtain an estimate of the uncertainty. Validation was performed considering a large variety of samples belonging to the group of meat, meat products and derivatives.

Several functions were also performed in routine company analyzes in the pH determination assays, of the soluble dry residue, soluble solids content and acidity.

Keywords: Accuracy, hydroxyproline, Standard NP 1987:2002, validation, uncertainty.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	A empresa.....	2
1.1.1.	Análises Físico-Químicas realizadas pela Siliker Portugal S.A.	3
1.2.	Objetivos do estágio.....	4
1.3.	Enquadramento geral.....	5
1.3.1.	Importância da qualidade alimentar e legislação	5
1.3.2.	Acreditação.....	7
1.3.3.	NP EN ISO/IEC 17025	7
1.3.4.	Sistema de Gestão da Qualidade da empresa.....	8
2.	Fundamentos teóricos.....	10
2.1.	Espetrofotometria	11
2.2.	Hidroxiprolina.....	14
2.3.	Validação de métodos.....	18
2.3.1.	Parâmetros de avaliação indireta.....	19
2.3.1.1.	Especificidade/seletividade	19
2.3.1.2.	Quantificação.....	22
2.3.1.3.	Curvas de calibração	22
2.3.1.4.	Limiares Analíticos	23
2.3.1.5.	Sensibilidade do método:	24
2.3.1.6.	Gama de trabalho e linearidade	24
2.3.1.7.	Precisão.....	26
2.3.1.8.	Robustez	29
2.3.2.	Parâmetros de avaliação direta.....	29

2.3.2.1.	Exatidão	29
2.3.2.2.	Incerteza	31
2.3.3.	Teste de rejeição de valores	32
3.	Parte Experimental	33
3.1.	Materiais e Reagentes:.....	34
3.2.	Preparação das amostras	35
3.3.	Matrizes alimentares estudadas	36
3.4.	Procedimento	36
3.4.1.	Preparação de soluções.....	36
3.4.2.	Análise das soluções padrão.....	37
3.4.3.	Análise da amostra	38
3.5.	Apresentação de resultados.....	39
4.	Tratamento e Discussão de Resultados.....	40
4.1.	Validação do método de determinação da Hidroxiprolina	41
4.1.1.	Calibração para o teor de hidroxiprolina.....	41
4.1.1.	Determinação do teor de hidroxiprolina nas amostras	43
4.1.2.	Sensibilidade	43
4.1.3.	Linearidade	44
4.1.4.	Limite de quantificação	45
4.1.5.	Gama de trabalho	46
4.1.6.	Precisão.....	48
4.1.6.1.	Repetibilidade	48
4.1.6.2.	Precisão Intermédia	50
4.1.7.	Veracidade	50
4.1.8.	Incerteza	51

4.2. Outras atividades realizadas	53
5. Conclusões.....	54
6. Referências bibliográficas.....	57
7. Anexos	63

Lista de abreviaturas e símbolos

ε - Coeficiente de absorvidade molar

a – Declive

A – Absorvância

Ala – Alanina

b – Ordenada na origem

c - Concentração

CE - Comissão Europeia

CV – Coeficiente de Variação

DG – Diretora Geral

DPC – Amostras diárias de controlo do processo (do inglês *Daily Process Control*)

DRRR – *Deutsche Referenzbüro für Ringversuche & Referenzmaterialien*

DS^2 – Diferença entre Variâncias

EA – European Cooperation for Accreditation

ECI – Ensaio de Comparação Interlaboratorial

EGI - Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade Industrial

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EN – Norma europeia (do inglês *European standart*)

En- Erro Normalizado

ER – Erro Relativo

EU – União Europeia

F – Valor tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor*

FAPAS – *Food Analysis Performance Assessment Scheme*

Gly - Glicina

H – Frases de Perigo

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High performance liquid chromatography*)

Hyl - Hidroxilisina

Hyp – Hidroxiprolina

I_0 - Intensidade da luz incidente na solução

I - Intensidade da luz que atravessa a solução

IPAC - Instituto Português de Acreditação

ISO – Organização Internacional para Padronização (do inglês *International Organization for Standardization*)

k – Fator de expansão

L – Percurso ótico

LA- Linha de aviso

LC- Linha de controlo

LCI- Limite inferior de controlo

LCS- Limite superior de controlo

LDC- Limite de detecção do método analítico

LQ- Limite de quantificação do método analítico

Lys - Lisina

m - Massa

MQ – Manual da Qualidade

MRC - Material de Referência Certificado

NP- Norma portuguesa

P – Frases de precaução

\bar{p} - Média da população

PAFQ - Procedimento de Análise Físico-Química

PDA – Detector de fotodíodo (do inglês *photodiode array*)

pH – Valor de potencial de hidrogénio

PG – Razão entre variâncias

Pro – Prolina

r – Coeficiente de correlação ou Limite de repetibilidade

R – Limite de reprodutibilidade

RQ – Responsável da Qualidade

Rw - Desvio padrão de amostras de controlo

s – Desvio padrão

SG – Sistema de Gestão

t – Parâmetro t de Student

$u(\text{bias})_{\text{relativo}}$ – Componente de incerteza associada ao *bias*

$u(R_{W, \text{relativo}})$ – Componente de incerteza de precisão intermédia

$u(C_{\text{Ref}})_{\text{relativo}}$ – Componente da incerteza do valor do certificado do circuito

u_{relativo} – Incerteza combinada

U_{relativo} – Incerteza expandida

UV-Vis – Ultravioleta-vível

V - Volume

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia

\bar{x} – Valor médio

X_{lab} – Valor obtido pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais

X_{ref} – Valor de referência para a amostra do circuito nos ensaios interlaboratoriais

x_s – Valor suspeito

Y_i – Valor observado

\hat{y}_i – Valor estimado

Z – Fator de desempenho Z-score

Índice de figuras

Figura 1: Instalações da <i>Silliker</i> Portugal S.A.	3
Figura 2: Esquema dos componentes principais de um espectrofotómetro 15.	13
Figura 3: Estrutura química da trans-4-hidroxi-L-prolina ²⁹	15
Figura 4: Mecanismo proposto para a oxidação da Hyp a pirrol ¹¹	16
Figura 5: Reação para determinação da Hyp ³³	17
Figura 6: Parâmetros de avaliação direta e indireta para validação de um método analítico ³⁵	19
Figura 7: Amostras contidas no matraz com 30 mL de ácido sulfúrico 3 M prontas para irem 16 horas à estufa a 105 °C.	38
Figura 8: Reta de calibração da absorvância ($\lambda=558$ nm) em função da concentração de Hyp ($\mu\text{g/mL}$).	42
Figura 9: Carta de controlo dos declives no período estudado.	45

Índice de tabelas

Tabela 1: Relação entre o colagénio e a proteína da carne em percentagem em diferentes tipos de carne picada ⁵	17
Tabela 2: Limites máximos de tecido conjuntivo para os ingredientes designados pelo termo "carne de..." ⁵	17
Tabela 3: Tabela resumo de parâmetros que possibilitam a estimativa da exatidão: erro relativo, Z-score, erro normalizado e teste t ³⁵	30
Tabela 4: Reagentes utilizados e as suas propriedades.	35
Tabela 5: Matrizes estudadas na validação do método: carnes, produtos cárneos e derivados.	36
Tabela 6: Concentração de Hyp ($\mu\text{g/ml}$) das soluções padrão e respetivos valores de absorvância.	41
Tabela 7: Concentração de referência do padrão mais baixo e concentração obtida experimentalmente desse padrão, erro relativo e aceitação.....	43
Tabela 8: Equações das retas de calibração do período estudado.....	44
Tabela 9: Valores das linhas central (média), LA e LC da carta de controlo dos declives da reta de calibração.	45
Tabela 10: Limite de detecção, LD, limites de quantificação, LQ, calculados no período do Projeto Individual e LQ estabelecido pelo laboratório.	46
Tabela 11: Valores obtidos nas dez réplicas independentes do padrão mais baixo e padrão mais alto analisadas no mesmo dia para realizar o teste de homogeneidade de variâncias.	47
Tabela 12: Resultados obtidos da aplicação do teste de homogeneidade de variâncias.	47
Tabela 13: Dados dos 43 duplicados analisados para evidenciar o cumprimento da repetibilidade.	49
Tabela 14: Parâmetros característicos da precisão intermédia. Desvio padrão da precisão intermédia, S_{PI} , Limite de precisão intermédia relativo, r_{PI} e coeficiente de variação da precisão intermédia, CV_{PI}	50

Tabela 15: Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais.	51
Tabela 16: Dados utilizados para calcular a componente da exatidão da incerteza ($\mu\text{g/mL}$). 52	
Tabela 17: Parâmetros da componente incerteza associados à precisão intermédia.	52
Tabela 18: Frases de perigo (H) e precaução (P) associados aos reagentes utilizados.	64

1. Introdução

1.1. A empresa

Em julho de 1992 surgiu, em Vila Nova de Gaia, a Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda. (EGI), como uma empresa de prestação de serviços no setor agroalimentar, dando resposta à prevenção da qualidade e segurança alimentar com serviços de análise e acessoria, tornando-se líder no seu setor. A EGI integra desde 1993 o Sistema Português da Qualidade através da acreditação do seu laboratório.

Depois do ano 2000 criou-se o laboratório de Análise Sensorial, onde se avaliam e caracterizam organoleticamente os produtos de consumos e a EGI foi forçada a aumentar as suas instalações em 2005, passando a localizar-se na zona industrial dos Terços, na freguesia de Canelas, onde se encontra atualmente.

Em 2008, a multinacional norte-americana *Silliker* adquire a empresa dando origem à *Silliker Portugal, S.A.* passando a integrar um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços desta área.

Outros marcos importantes da empresa são o lançamento em 2009 do serviço de Estudos de Vida Útil de modo a validar o período de validade para os diferentes produtos de cada cliente, e ainda a obtenção da acreditação dos primeiros 8 ensaios de águas de consumo humano integrados na oferta de serviços analíticos na área ambiental em novembro de 2010¹.

Em janeiro de 2012, ainda na área ambiental, obteve a acreditação das colheitas das amostras das águas de consumo e em mais dois ensaios físico-químicos. Também em 2011, a acreditação expandiu para as análises veterinárias, com a pesquisa de *Salmonella* em amostras de matéria fecal e ambientais provenientes da produção primária. Em 2013, surgiram novos serviços como o serviço de análises aos materiais de embalagens que entram em contacto direto com os alimentos, analisando todos os aspetos importantes desde o *design* da embalagem, fabrico até à utilização final e eliminação².

A *Silliker* encontra-se, atualmente, em 21 países com mais de 80 laboratórios, com o objetivo de responder às necessidades no que diz respeito à prevenção da qualidade e segurança alimentar. Pertencendo à *Mérieux NutriSciences* (figura 1), do Instituto *Mérieux*, a *Silliker* é um parceiro de confiança no âmbito da saúde pública por meio de análises laboratoriais, auditorias, consultadoria, formação e serviços de investigação³.



Figura 1: Instalações da *Silliker Portugal S.A.*

A *Mérieux NutriSciences*, na área da indústria alimentar, presta serviços analíticos qualitativos e/ou quantitativos de pesquisa de alergénios em alimentos, estudos de vida útil e estabilidade dos alimentos, detecção de contaminantes, monitorização de superfícies, ar e água, serviços de apoio ao controlo da fraude e autenticidade dos alimentos, auditorias ao Sistema de Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, análise de materiais em contacto com produtos alimentares e validação de rotulagem ³.

1.1.1. Análises Físico-Químicas realizadas pela *Silliker Portugal S.A.*

A *Silliker Portugal, S.A.* possui três laboratórios: laboratório de Físico-Química onde são executadas a maioria das técnicas clássicas de análise, laboratório de Métodos Instrumentais de Análise onde são realizadas análises por técnicas cromatográficas e espectrofotométricas e o laboratório de Microbiologia.

Relativamente aos ensaios físico-químico destacam-se as análises para determinar:

- a) Contaminantes: Metais pesados (arsénio, cádmio, chumbo...), alergénios (glúten, sulfitos...) e outros (acrilamida, micotoxinas...);
- b) Parâmetros de Qualidade: Acidez, desintegração, dissolução, cinzas, variação de peso e perda por secagem;
- c) Nutricionais: Hidratos de carbono (fibra alimentar, perfil de açúcares, amidos...), proteínas (teor de proteína, perfil de aminoácidos, trans-4-hidroxi-L-prolina, lípidos

(colesterol, matéria gorda, perfil de ácidos gordos, índice de peróxidos...) componentes principais (cinzas, fibra bruta...), vitaminas (hidrossolúveis e lipossolúveis) e minerais (cálcio, ferro, magnésio, zinco...).

d) Aditivos: Antioxidantes (ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo...), adoçantes (glicerol, frutose, galactose...), conservantes (ácido acético, benzóico, málico, perfil de ácidos orgânicos, benzoatos, nitrito e nitratos...) e corantes.

Todos os laboratórios do grupo *Mérieux NutriSciences* são acreditados por um organismo independente de acordo com o referencial ISO/IEC 17025. Este fornece uma avaliação objetiva da competência técnica dos laboratórios e assegura a precisão, exatidão e repetibilidade dos resultados analíticos ⁴.

O facto de se tratar de uma norma internacional é o ponto de partida para oferecer serviços harmonizados a nível mundial. O laboratório em Portugal é acreditado pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação, I.P.) e cumpre por isso com os critérios de acreditação para laboratórios de ensaio estabelecidos na NP EN ISO/IEC 17025, reconhecidos pelo IPAC (acreditação nº L0087) ⁴.

Tem também implementado um sistema de qualidade em que os elementos deste sistema estão documentados no Manual da Qualidade (MQ) que se encontra disponível e acessível na empresa ². Pelo facto de ser uma referência a nível mundial no setor alimentar, o grupo *Silliker* necessita de garantir a fiabilidade dos resultados analíticos publicados. Assim, a empresa submete-se a auditorias periódicas internas e externas, e participa a nível nacional e internacional, em circuitos de ensaios de comparação interlaboratorial (ECI), com o propósito de avaliar o seu desempenho. Para além disto, diariamente segue rigorosos procedimentos de controlo de qualidade como o uso de DPCS (*Daily Process Control Sample*), análises de amostras em duplicado e análises de padrões de controlo (em métodos de curva de calibração).

1.2. Objetivos do estágio

A presente dissertação surge no âmbito do Projeto Individual do mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química do Departamento de Química da Universidade do Minho

realizado na empresa *Silliker Portugal S.A.* em Canelas, Vila Nova de Gaia. O estágio teve uma duração de nove meses (setembro de 2018 a junho de 2019). Em janeiro de 2019, foi me endereçado o convite para integrar a equipa do Laboratório de Química da empresa.

Numa fase inicial, ocorreu a adaptação e integração à empresa, e procedeu-se à análise de documentação relevante, como o Manual de Qualidade da empresa. Seguidamente decorreu o acompanhamento dos analistas em ensaios de rotina acreditados e implementados no Laboratório de Química, conhecendo e utilizando os diferentes equipamentos do laboratório e software, dando ênfase às ferramentas de controlo de qualidade implementadas e utilizadas diariamente. Depois de realizar os métodos de ensaio em paralelo com os analistas principais, começou-se a realizar as análises de forma autónoma.

O principal objetivo consistiu em adquirir competências a todos os níveis no âmbito do trabalho de rotina de um laboratório acreditado, e em especial na validação de métodos químicos analíticos em produtos alimentares com recurso a técnicas de química clássica. Para além disso realizaram-se outros ensaios recorrendo a métodos instrumentais de análise. Nesta dissertação apresenta-se o estudo da revalidação de um método já implementado na empresa - Determinação do teor de hidroxiprolina (Hyp) de acordo com a norma NP 1987:2002. Este método analítico foi utilizado em condições de análise de amostras reais em diversas matrizes de carne. Foram avaliados os parâmetros de desempenho, nomeadamente a repetibilidade, precisão intermédia, veracidade e incerteza do método.

1.3. Enquadramento geral

1.3.1. Importância da qualidade alimentar e legislação

A alimentação afeta diretamente a saúde, sendo o conhecimento da informação nutricional e da qualidade dos alimentos ingeridos diariamente de extrema importância. A União Europeia (UE) lançou o Regulamento (UE) n.º 1169/2011 que estabelece os princípios, requisitos e responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, sobre a rotulagem. Este documento legal é aplicável a todos os géneros alimentícios destinados ao consumidor final, incluindo os que são fornecidos por

estabelecimentos de restauração coletiva e os que se destinam a ser fornecidos a esses estabelecimentos ⁵.

Um regulamento é um ato legislativo vinculado, aplicável a todos os países da UE. O regulamento é de aplicação direta e por isso não precisa de ser transposto para a legislação nacional, evitando-se assim as referidas interpretações divergentes ⁶.

O Regulamento (CE) n.º 1831/2003 da Comissão Europeia, de 22 de setembro de 2003, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios com a finalidade de proteger a saúde pública e manter os contaminantes em níveis que sejam aceitáveis do ponto de vista toxicológico. No caso dos contaminantes que sejam considerados como substâncias cancerígenas genotóxicas ou em casos em que a exposição atual da população ou dos grupos vulneráveis da população se aproxime ou exceda a dose admissível, o regulamento refere que devem definir-se teores máximos a um nível que seja tão baixo quanto razoavelmente possível ⁷.

Pela existência de um número cada vez maior de alimentos processados, rotulados e publicitados e de forma a ser possível assegurar um elevado nível de proteção dos consumidores e a facilitar as suas escolhas, os produtos colocados no mercado, incluindo os importados, deverão ser seguros e devidamente rotulados. Um regime alimentar variado e equilibrado é uma condição indispensável para a manutenção da saúde e os produtos considerados individualmente têm uma importância relativa no contexto do regime alimentar geral. Por isso, o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro de 2006, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, prevê uma uniformização das rotulagens para os géneros alimentícios ⁸.

Estes regulamentos visam ainda a diminuição do risco de fraude alimentar. A fraude alimentar é a produção e/ou a comercialização deliberada de produtos alimentares não conformes. Ocorre quando os produtos não estão em conformidade legal, ou seja, quando a legislação alimentar da UE é intencionalmente violada para obter um ganho económico ou financeiro, enganando o consumidor ⁹.

A qualidade e segurança alimentar tornam-se fundamentais na tentativa de garantir que os alimentos ingeridos são inócuos e que estão aptos para serem consumidos, havendo a necessidade acrescida de garantir que os produtos alimentares estão de acordo com as especificações e regulamentos de segurança existentes antes de chegar ao consumidor ¹⁰.

Os métodos de análise devem apresentar especificidade, pois os alimentos são de constituição química complexa, podendo seus componentes interferir nos resultados ¹¹.

1.3.2. Acreditação

A acreditação serve essencialmente para adquirir e transmitir confiança na execução de determinadas atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnica mínimo, reconhecido internacionalmente. A acreditação é por isso uma ferramenta de globalização e internacionalização da economia, promovendo as exportações nacionais. O Regulamento (CE) n.º 765/2008 obriga as autoridades nacionais dos Estados-Membros da UE a reconhecerem a equivalência das acreditações dos signatários do Acordo da EA (do inglês *European Cooperation for Accreditation*) ¹².

A acreditação consiste na demonstração e reconhecimento, através de uma avaliação efetuada pelo organismo de acreditação Instituto Português de Acreditação, I.P. (IPAC), da competência técnica e de gestão de uma organização, para esta efetuar atividades específicas de avaliação da conformidade de acordo com a mesma norma. O IPAC é o organismo nacional de acreditação requerido pelo Regulamento (CE) n.º 765/2008 ¹².

A acreditação de um laboratório não é uma certificação. Quando um laboratório passa a ser acreditado, o cumprimento das exigências desta acreditação é um requisito legal para o exercício de uma determinada atividade de avaliação da conformidade, ao contrário da certificação que é maioritariamente uma opção voluntária das empresas.

1.3.3. NP EN ISO/IEC 17025

Um dos requisitos para acreditação de qualquer laboratório segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025, é a existência de um sistema de gestão de qualidade documentado.

A norma NP EN ISO/IEC 17025 tem como requisitos de gestão a necessidade de realização de auditorias internas, realizadas periodicamente de forma a verificar se as atividades realizadas cumprem com os requisitos do Sistema de Gestão e da própria norma. As auditorias internas são uma ferramenta essencial para identificar e precaver falhas no Sistema de Gestão e na verificação da eficiência da Política de Qualidade ¹³.

Qualquer medição analítica realizada tem como objetivo a obtenção de dados fiáveis e precisos. O método deverá sempre ser validado, para demonstrar que o ensaio tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. Assim a validação de um método de análise, quando realizada de forma correta, melhora a fiabilidade e precisão dos dados analíticos obtidos.

1.3.4. Sistema de Gestão da Qualidade da empresa

A integridade de todos os dados e resultados gerados no laboratório depende da existência de um sistema de garantia da qualidade ¹⁴, ou seja, um Sistema de Gestão (SG) de forma a garantir a qualidade dos resultados dos ensaios, bem como a satisfação do cliente, e que tem como objetivos:

- ✓ Comunicar a política, os procedimentos e os requisitos da qualidade.
- ✓ Descrever e implementar um SG eficaz.
- ✓ Apresentar interna e externamente o SG como forma de demonstrar o cumprimento dos requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025.
- ✓ Proporcionar a base documental para auditar o SG.
- ✓ Formar o pessoal nos requisitos do SG e nos métodos do seu procedimento.
- ✓ Proporcionar a continuidade do SG e respetivos requisitos em situação de mudança.

O Manual da Qualidade (MQ) da empresa está acessível internamente a todos os funcionários, sendo assegurado pela Diretora Geral (DG) e pelo Responsável da Qualidade (RQ) que todas as pessoas dentro da empresa estejam familiarizadas com o seu conteúdo. Todos os novos colaboradores familiarizam-se com o SG implementado, lendo na íntegra o MQ e os procedimentos aplicáveis aquando da sua entrada ao serviço ².

Este sistema de gestão aplica-se a todas as atividades laboratoriais desenvolvidas na empresa e segundo os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025. De forma a garantir a qualidade dos resultados dos ensaios, todas as políticas, sistemas, programas, procedimentos e instruções do laboratório estão devidamente documentados. Toda a documentação

relacionada com o SG é comunicada, implementada, compreendida e está acessível a todo o pessoal afeto às atividades relacionadas com o sistema ².

2. Fundamentos teóricos

2.1. Espectrofotometria

A espectrofotometria na zona de radiação do visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas e é aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos. Baseia-se na energia de excitação necessária para a transição de elétrons entre orbitais moleculares ¹⁵.

A região ultravioleta do espectro encontra-se na faixa de 200 a 400 nm e a região do visível entre 400 a 800 nm. Em termos energéticos, esta gama de comprimentos de onda corresponde a energias com valores entre 36 e 286 kcal/mol ¹⁶.

A espectroscopia de ultravioleta - visível (UV-vis) fornece informação apenas sobre compostos orgânicos com elétrons π e não ligantes, pois a separação energética entre as orbitais σ é muito grande e desta forma os compostos que possuem apenas estas ligações não possuem bandas de absorção na região UV-vis. Só existem, por isso, dois tipos de transição eletrónica cuja energia corresponde à energia de radiação ultravioleta e visível, π - π^* e n - π^* ^{15 16}.

A absorção de radiação UV-vis depende da estrutura eletrónica da molécula e resulta na promoção de elétrons do estado fundamental para níveis de maior energia no estado excitado. Num espectro de UV-vis ocorrem bandas de absorção em que a posição destas bandas é relativa ao comprimento de onda ao qual corresponde a energia necessária para ocorrer a transição eletrónica. A intensidade depende da probabilidade da transição e da polaridade do estado excitado. A parte da molécula que é responsável pela absorção de radiação ultravioleta e visível denomina-se de cromóforo ¹⁷.

O solvente selecionado para a obtenção da solução do composto a analisar por UV-vis tem uma grande influência no espectro resultante. A posição, a intensidade e a forma das bandas de absorção podem variar devido à natureza do solvente. Estas variações dependem das interações físicas intermoleculares entre o composto a analisar e o solvente ¹⁶.

O aspeto mais importante é a determinação de quantidade de luz absorvida pela amostra. Esta absorção de luz é tanto maior quanto a concentração da solução e a absorção de luz é tanto maior quanto maior for a distância percorrida pelo feixe de radiação. Isto é descrito pela *lei de Beer-Lambert*, que relaciona a intensidade da luz incidente na solução (I_0),

e a intensidade da luz que atravessa (I) a solução contida numa célula com um percurso ótico (L), dado pela expressão 1¹⁷.

$$\text{Log}(I_0/I) = A = \epsilon cL$$

Expressão 1

em que A é a absorvância, ϵ o coeficiente de absorvidade molar, c a concentração da espécie em análise e L o percurso ótico.

Os instrumentos capazes de registar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda são denominados de espectrofotómetros. O primeiro espectrofotómetro foi criado em 1940, pelo químico americano Arnold O. Beckman e seus colegas dos Laboratórios de Tecnologias Nacionais, na empresa *Beckman Coulter Inc.*, fundada em 1935¹⁸.

O registo obtido é chamado de espectro de absorção ou de espectro de transmissão. O espectro de absorção é característico para cada espécie química, no entanto na região do UV-vis o espectro apresenta pouca definição. Nesta região do espectro, são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Existem dois tipos de espectrofotómetros, os de feixe simples e os de duplo feixe¹⁷.

A fonte de radiação emite luz que é fracionada pelo monocromador (prisma ou rede de difração) nos comprimentos de onda que a compõem, sofrendo refração. A faixa de comprimentos de onda, inicialmente selecionada, é dirigida para a amostra. Parte dessa luz é absorvida e parte é transmitida. A luz que é transmitida chega ao detector e é transformada num sinal elétrico. Finalmente, o sinal elétrico é recebido pelo computador que transmite esses dados em forma de espectro²⁹.

Os espectrofotómetros, em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (figura 2).

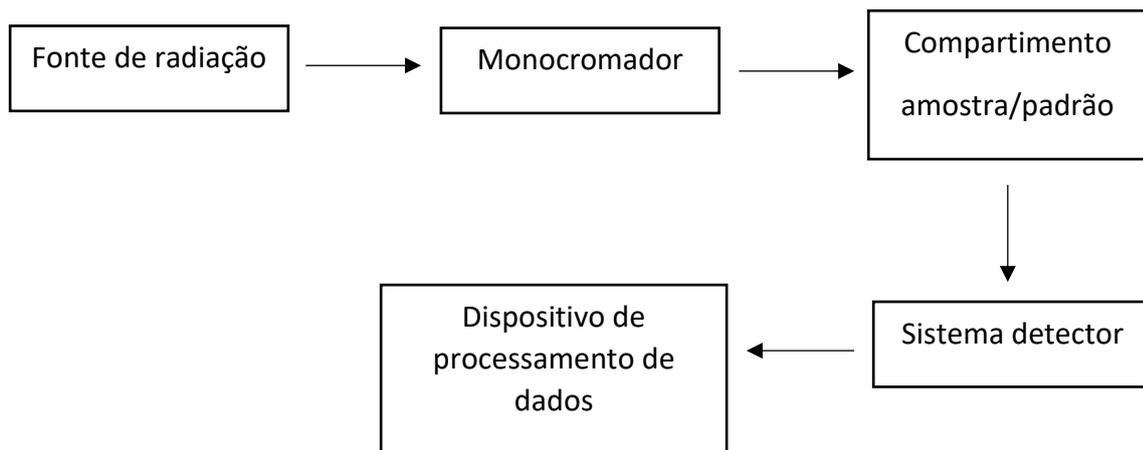


Figura 2: Esquema dos componentes principais de um espectrofotômetro ¹⁵.

As fontes de radiação são constituídas por filamentos de materiais que são excitados por descargas elétricas com elevada voltagem ou aquecimento elétrico. Em termos de células, têm de ser feitas de um material que não absorva no UV-vis como por exemplo células de quartzo (200-2500 nm) mas para estudos no visível podem usar-se células de vidro (320-2500 nm).

Os monocromadores são dispositivos essenciais dos espectrofotômetros e têm como função a seleção do comprimento de onda. Possuem uma fenda de entrada de um elemento de dispersão de radiação e uma fenda de saída. O elemento de dispersão pode ser um prisma ou uma rede de difração e a sua finalidade é difratar a luz de modo que diferentes comprimentos de onda irão incidir sobre a amostra, permitindo que se determine sua absorvância ¹⁵.

Em relação ao sistema de detecção, existem espectrofotômetros que utilizam como sistema de detecção um tubo fotomultiplicador e os mais complexos que utilizam arranjo de fotodíodos.

Um tubo fotomultiplicador é formado por um tubo de vidro ou de quartzo sob vácuo, no qual existe um conjunto de placas metálicas interligadas. O sistema ótico deve seleccionar cada comprimento de onda, sequencialmente, que deve incidir sobre o tubo, gerando um sinal de absorvância. Estes sistemas de detecção apresentam maior sensibilidade face a outros tipos.

O segundo tipo de detector é do tipo fotodíodo, PDA (do inglês *photodiode array*), e consiste numa série de fotodíodos de silício (dispositivos semicondutores que convertem luz em corrente elétrica pela absorção de fótons) posicionados num cristal de silício, de modo a que cada comprimento de onda difratado pela rede de difração atinge um ponto deste arranjo

e um detector. Desta forma, obtém-se uma análise mais rápida de vários comprimentos de onda em simultâneo e diminuição do ruído associado ao sinal medido²⁰.

Apesar do método espectrofotométrico ser o mais utilizado na quantificação do aminoácido Hyp devido à precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez, podem ser utilizadas outras técnicas como o método enzimático ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou a cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (do inglês: *High performance liquid chromatography*)¹¹.

2.2. Hidroxiprolina

A hidroxiprolina (Hyp) é um aminoácido não essencial que constitui proteínas e derivados da prolina. Encontra-se fundamentalmente no tecido conjuntivo e ósseo. A quantificação da Hyp é um elemento importante na avaliação da qualidade da carne, uma vez que está relacionada diretamente com a matéria-prima cárnea²¹. A detecção e a determinação de Hyp são um requerimento essencial para a ciência e tecnologia de carnes que procura explicar a verdadeira contribuição do colagénio para a estrutura e qualidade da carne²². Em geral, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade, devido à redução da sua maciez e valor nutricional, estando grande parte dos aminoácidos essenciais em proporção reduzida²³.

São utilizadas três características para definir a qualidade da carne: a aparência, maciez e sabor. A qualidade da carne está associada à interação de fatores biológicos do animal vivo e processos bioquímicos que ocorrem no *post mortem* como a conversão do músculo em carne durante o armazenamento²⁴.

As carnes utilizadas para elaboração de embutidos emulsionados são as carnes industriais da linha de abate, retalhos e aparas provenientes da desossa. Apresentam elevado teor de proteínas não miofibrilares, como as do tecido conjuntivo²⁵.

Com a elevação dos custos dos cortes cárneos, algumas indústrias têm incorporado fraudulentamente tecidos inferiores ou matérias-primas cárneas de baixo valor comercial, ricas em fibras de tecido conjuntivo, com a finalidade de obtenção de maior lucro²⁶.

Na existência de uma legislação que estabeleça teores máximos de proteína do tecido conjuntivo colagenoso em carnes e produtos cárneos, o teor de colagénio deve ser determinado com segurança, havendo a necessidade de métodos de análise de rotina que sejam simples, confiáveis e suficientemente rápidos ¹¹.

A prolina (Pro) foi sintetizada pela primeira vez por Willstater em 1900. Mas este aminoácido só foi reconhecido como componente das proteínas, quando em 1901, Fischer conseguiu isolá-lo a partir do hidrolisado ácido da gelatina usando um éster ²⁷.

Já a Hyp foi descoberta mais tarde também por Fischer. Em 1905, Leuchs obteve a Hyp através de uma síntese, onde foi esclarecida a sua estrutura química (ver figura 3) ²⁸.

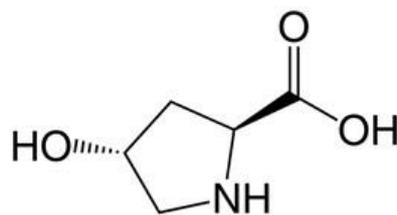


Figura 3: Estrutura química da trans-4-hidroxi-L-prolina ²⁹.

É ainda possível encontrar a Hyp na parede celular vegetal. O tecido conjuntivo colagenoso representa oito vezes o teor de Hyp, ou seja, contém 12,5 % deste aminoácido ¹¹.

O termo colagénio é utilizado para denominar uma família de 27 proteínas isoformas encontradas nos tecidos conjuntivos. Em termos de quantidade, é o constituinte mais importante do tecido conjuntivo e é um elemento estrutural importante em organismos multicelulares. O colagénio é uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal, contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina (Gly), Pro, lisina (Lys), hidroxilisina (Hyl), Hyp e alanina (Ala). Essas cadeias são organizadas de forma paralela a um eixo, formando as fibras de colagénio, que proporcionam resistência e elasticidade à estrutura presente ²³.

A sequência de aminoácidos no colagénio é, em geral, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxi-prolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão. Cada molécula de colagénio pode ter até três cadeias diferentes, que se unem na formação do procolagénio ³⁰.

Uma vez que a presença da Hyp é rara nas proteínas, ocorrendo apenas em algumas tais como a elastina (1,6 %), e ainda em menor extensão na proteína do complemento do soro, é

importante o desenvolvimento de métodos de quantificação deste aminoácido, de forma a quantificar indiretamente o teor de colagénio ³¹. A Hyp é quantitativamente determinada como medida do material colagenoso em carne e produtos cárneos ³².

Na hidroxilação da Pro em Hyp, a proteína prolil hidroxilase reconhece a Pro como o seu substrato desde que esta se encontre ao lado de uma Gly na sequência, no sentido amino a carboxilo, sendo então inserido um grupo OH⁻ no resíduo de Pro.

Na determinação espectrofotométrica da concentração de Hyp, a amostra é inicialmente hidrolisada com ácido sulfúrico a 105 °C para libertar a Hyp da ligação peptídica e separar da gordura. O aminoácido livre é determinado colorimetricamente após oxidação a pirrol pelo reagente cloramina T (figura 4) e reação com 4-dimetilaminobenzaldeído resultando num composto de coloração vermelho-púrpura pela adição do reagente 4-(dimetilamino)benzaldeído (figura 5) e a absorvância é medida espectrofotometricamente a 558 nm ¹¹.

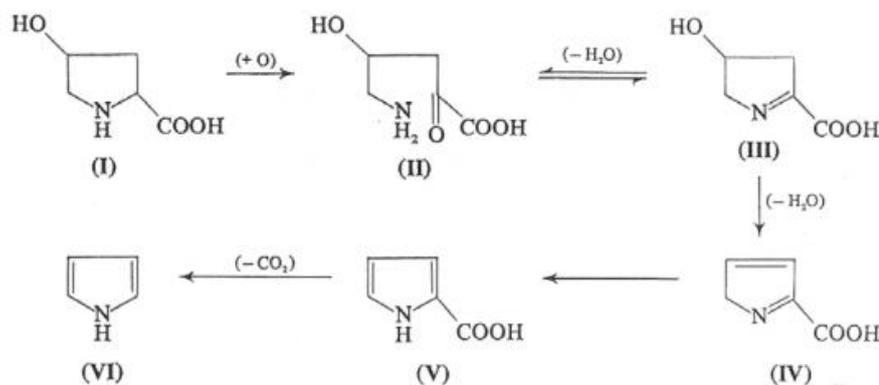


Figura 4: Mecanismo proposto para a oxidação da Hyp a pirrol ¹¹.

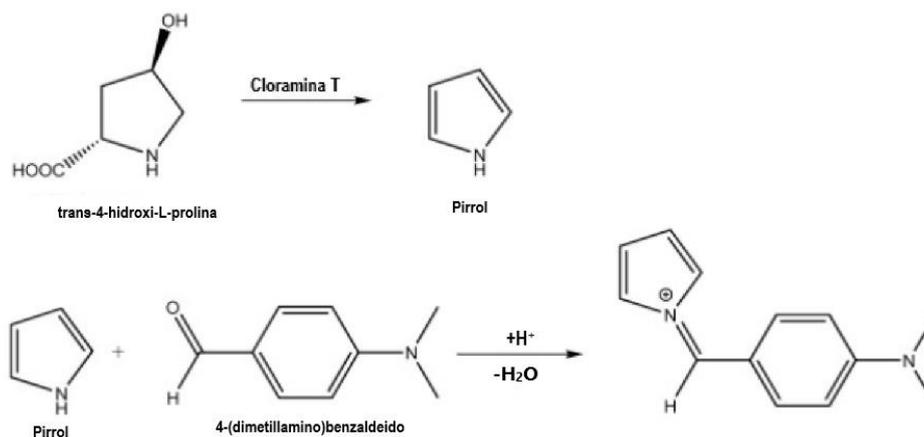


Figura 5: Reação para determinação da Hyp ³³.

A nível de legislação, o regulamento (UE) n.º 1169/2011 do parlamento europeu e do conselho de 25 de outubro de 2011 ⁵, define a relação colagénio/proteína da carne expressa como percentagem de colagénio na proteína da carne nos diferentes tipos de carne picada (tabela 1). Como já referido, o teor de colagénio representa oito vezes o teor de Hyp.

Tabela 1: Relação entre o colagénio e a proteína da carne em percentagem em diferentes tipos de carne picada ⁵.

	Colagénio/proteína da carne (%)
Carne picada magra	≤ 12
Carne pura de bovino picada	≤ 15
Carne picada de suíno	≤ 18
Carne picada de outras espécies	≤ 15

Define também o teor total de tecido conjuntivo que não deve ser excedido em diversos tipos de carne (tabela 2). Quando estes limites são ultrapassados, a lista de ingredientes do produto deve mencionar a presença de tecido conjuntivo.

Tabela 2: Limites máximos de tecido conjuntivo para os ingredientes designados pelo termo "carne de..." ⁵.

Espécie	Colagénio/proteína (%)
Mamíferos	25
Suíños	25
Aves e coelhos	10

A norma portuguesa NP 1987:2002 – Carnes e produtos cárneos. Determinação do teor de hidroxiprolina, tem como objetivo fixar um método para determinação da Hyp da carne e produtos cárneos recorrendo a um método espectrofotométrico. É aplicável aos produtos que contenham menos de 0,5 % (m/m) de Hyp. O teor de Hyp da carne e produtos cárneos é determinado de acordo o procedimento da norma e expresso em percentagem.

2.3. Validação de métodos

Validação é um conjunto de operações necessárias para demonstrar que um procedimento é adequado para a aplicação pretendida. A validação de um método analítico tem por objetivo o conhecimento de seu potencial aplicativo e de suas limitações, sendo essencial para a correta interpretação dos resultados obtidos na aplicação do método. O processo de validação tem o objetivo de avaliar a repetitividade e a reprodutibilidade do método, pela interpretação dos parâmetros que definem a exatidão e a precisão do mesmo ¹¹.

A validação de resultados segue o princípio básico de que um resultado para ser considerado válido tem de satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos ¹⁴. A validação de um método é um conceito antigo nos laboratórios analíticos. Desde há muito que cientistas validam os seus métodos antes de os utilizarem como rotina ³⁴.

Sempre que um laboratório pratica métodos internos de ensaio terá que realizar um processo de validação desses mesmos métodos, com todos os resultados obtidos, de forma a assegurar que estes são próximos o suficiente do valor verdadeiro desconhecido do analito nas amostras analisadas ³⁵.

A validação de um método é feita utilizando ferramentas de avaliação direta e de avaliação indireta (figura 6) sendo que é necessário adaptar os parâmetros da avaliação a cada tipo de método ³⁵.

Avaliação Indireta	Avaliação Direta
<ul style="list-style-type: none"> • Seletividade • Gama de trabalho • Quantificação • Precisão • Robustez 	<ul style="list-style-type: none"> • Materiais de Referência certificados • Ensaios interlaboratoriais • Testes comparativos • Exatidão • Incerteza

Figura 6: Parâmetros de avaliação direta e indireta para validação de um método analítico ³⁵.

Quando um laboratório utiliza uma norma ou um documento normativo, apenas necessita de demonstrar a robustez dos resultados que gera. A robustez pode ser demonstrada utilizando resultados de participações em ECI's ou de uma auditoria interna e podem ser utilizados registos que demonstrem que é cumprido o estabelecido na norma - nomeadamente os critérios de repetibilidade e de reprodutibilidade ¹⁴. Quando o laboratório executa uma adaptação de uma norma ou um método interno são necessários mais elementos para validar os resultados, ou seja, é necessário que o método seja validado ³⁵.

Para a validação de um resultado avaliam-se três parâmetros essenciais para determinar a qualidade deste resultado, sendo eles a veracidade, a precisão e a incerteza. A validação de um método de ensaio interno deve ser feita aquando da sua implementação e deve cumprir determinados requisitos. Devem ser determinados os parâmetros seletividade/especificidade, gama de trabalho, limiares analíticos, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, robustez e incerteza ³⁵.

2.3.1. Parâmetros de avaliação indireta

2.3.1.1. Especificidade/seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinónimo de seletividade, define a capacidade do método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes

da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de um grupo restrito de substâncias. É a capacidade do método identificar e distinguir um analito numa mistura complexa, sem interferências. Um método específico tem uma seletividade perfeita. A seletividade deve ser testada para qualquer interferente.

A seletividade deve ser avaliada quando se validam métodos desenvolvidos no laboratório, adaptados da literatura científica ou normalizados mas utilizados fora do âmbito especificado.

Uma forma de avaliar a seletividade de um método instrumental é a partir de ensaios de recuperação realizados em amostras da mesma matriz, respeitando as condições de repetibilidade e alterando a concentração do analito. Quando é verificada a ausência na íntegra de efeitos de interferência, considera-se que o método é específico ³⁶. Por isso, um método é específico quando a seletividade apresenta resultados de recuperação próximos a 100 % ³⁵. Alternativamente, pode-se avaliar amostras teste contendo o analito em estudo e quantidades conhecidas de possíveis interferentes e comparar as respostas obtidas. Também pode-se avaliar os resultados obtidos por dois métodos diferentes ou do mesmo método aplicado em matrizes diferentes. As respostas obtidas são comparadas através de testes de significância. Usam-se testes *two-tailed* (bicaudal) para avaliar se os valores obtidos diferem significativamente ³⁵.

1- Teste t de médias:

Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos sobre a mesma amostra e não é exigido que o número de amostras estudadas seja igual pois usa-se a média dos valores estudados.

Primeiramente é realizado o teste F de homogeneidade de variâncias - F Snedecor/ Fisher para n-1 graus de liberdade e 95 % de nível de confiança, através das expressões 2 e 3:

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ ou } PG = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad \text{Expressão 2}$$

de modo a PG ser sempre >1 e onde:

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{Expressão 3}$$

Depois é aplicado o Teste t- comparação de médias para comparar os valores médios obtidos. Permite testar se as diferenças observadas se devem apenas a erros aleatórios. Se as variâncias não diferirem significativamente (comprovado pelo teste F), então é aplicada a expressão 4 para n_1+n_2-2 graus de liberdade:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad \text{Expressão 4}$$

Se as variâncias diferirem significativamente, é aplicada a expressão 5:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Expressão 5}$$

onde o número de graus de liberdade é calculado pela expressão 6:

$$GL = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad \text{Expressão 6}$$

Compara-se o valor $|t|$ calculado com o valor t tabelado (nível de confiança de 95 %). Se o $|t|$ calculado for menor que o t tabelado, então o método é considerado seletivo.

2- Teste t das diferenças (amostras emparelhadas):

Este teste é aplicado quando se pretende comparar dois métodos sobre amostras iguais na mesma gama de concentração tendo como base o pressuposto de que qualquer erro aleatório e/ou sistemático é independente da concentração. São comparados dois conjuntos de valores e não se efetuam réplicas. Determina-se a diferença entre cada par de resultados, o valor médio das diferenças e o desvio padrão e calcula-se o valor de t pela expressão 7:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x}_d \sqrt{n}}{s_d} \quad \text{Expressão 7}$$

onde \bar{x}_d é a média aritméticas das diferenças, n é o número de amostras estudadas e S_d o desvio padrão associado à média das diferenças.

Compara-se o valor $|t|$ calculado com o valor t tabelado para $n-1$ graus de liberdade e nível de confiança de 95 %. Se o $|t|$ calculado for menor que o t tabelado, então pode-se concluir que o método é seletivo.

2.3.1.2. Quantificação

A quantificação requer o conhecimento de dependência da resposta medida com a concentração do analito. A quantificação de um método é feita recorrendo ao cálculo dos parâmetros curvas de calibração, limiares analíticos e sensibilidade ³⁵.

2.3.1.3. Curvas de calibração

Uma curva de calibração corresponde à representação gráfica de valores da resposta em função de valores de concentração. A forma algébrica da equação de uma reta é $y = mx + b$. Em relação às variáveis x e y pode-se ter duas situações:

1- Incertezas em y são independentes de x :

Na primeira situação, existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta e a regressão linear é determinada pelo método dos mínimos quadrados.

Associado às medições, cada valor determinado apresenta sempre uma incerteza associada. Assim, o declive e a ordenada na origem apresentam uma dispersão de valores que é função do método e para a determinação da sua incerteza é necessário calcular o desvio padrão residual Sy/x (desvio padrão da curva de calibração), que fornece a dispersão do sinal instrumental em torno da reta de calibração ³⁷. Com estes valores também é possível calcular o desvio padrão associado à concentração, desvio padrão do método e o coeficiente de variação do método (que mostra a extensão da variabilidade em relação à média dos dados). A calibração analítica pode ser avaliada pelo parâmetro coeficiente de correlação (r) com a expressão 8 ^{38 39}.

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

Expressão 8

O valor do coeficiente de correlação pode tomar valores entre -1 e 1, representando um declive negativo e positivo, respetivamente. Em análise química as curvas de calibração devem ter valores de r iguais ou superiores a 0,995 ³⁵.

2- Incertezas em y dependentes de x:

Nesta situação, não existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta e os pontos que têm menor desvio padrão (s_i) devem ter maior fator de ponderação (w_i) no cálculo dos parâmetros da reta. Este tipo de regressão denomina-se de regressão linear ponderada. Os fatores de ponderação são calculados a partir da expressão 9:

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i \frac{s_i^{-2}}{n}} \quad \text{Expressão 9}$$

Neste caso, os valores do desvio padrão da regressão linear ponderada e o desvio padrão associado aos valores de concentração determinados são calculados considerando os fatores de ponderação ³⁶.

2.3.1.4. Limiares Analíticos

O limite de deteção (LD) é a concentração mais baixa de analito que pode ser detetada pelo método com um determinado nível de confiança ^{35 38}. Corresponde à menor concentração que pode ser distinguida do branco e é calculado a partir da expressão 10:

$$LD = 3 \times S_0 \text{ ou } LD = 3 \times S_0' \quad \text{Expressão 10}$$

onde S_0' é desvio padrão considerando o número de réplicas em rotina; n o nº de réplicas efetuadas em análise de rotina e S_0 o desvio padrão de m ensaios realizados em condições de repetibilidade.

No entanto, se o método envolver uma calibração linear, o cálculo pode ser feito da recorrendo à expressão 11:

$$LD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad \text{Expressão 11}$$

onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da reta ³⁵.

O limite de quantificação (LQ) é a concentração mais baixa de analito que pode ser quantificada pelo método com um determinado nível de confiança. Corresponde à menor concentração para a qual o desempenho do método é aceitável para uma determinada aplicação e é obtido a partir da expressão 12:

$$LQ=10 \times S_0 \text{ ou } LQ=10 \times S_0' \quad \text{Expressão 12}$$

Em casos em que o método envolve a utilização de uma calibração linear, utiliza-se a expressão 13 ¹⁴:

$$LQ = \frac{10 \cdot S_y}{b} \quad \text{Expressão 13}$$

2.3.1.5. Sensibilidade do método:

A sensibilidade de um método avalia a capacidade do método (ou desempenho do equipamento) distinguir pequenas variações na concentração do analito e é definido pela expressão 14 ³⁸. Avalia a resposta do equipamento que corresponde a uma variação na concentração de analito correspondente. A sensibilidade também é definida como a primeira derivada da curva de calibração numa determinada zona de concentração. Por isso se a curva de calibração for linear, a sensibilidade é sempre a mesma em toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta. Quando a função é quadrática, a sensibilidade corresponde à primeira derivada.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \text{Expressão 14}$$

onde, ΔL é o acréscimo do valor lido e ΔC a variação correspondente a este acréscimo.

Um método é sensível quando pequenas variações nas concentrações, provocam grandes alterações nas respostas, permitindo distinguir concentrações próximas.

2.3.1.6. Gama de trabalho e linearidade

A gama de trabalho de um método é a gama de concentrações para o qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável ¹⁴. Na gama de trabalho do método faz-se a

representação da concentração do analito medida na amostra (através do método de análise estudado) em função da concentração de analito na amostra. Na gama de trabalho instrumental a resposta do equipamento em função da concentração obedece a uma relação conhecida.

Na validação de um método deve-se avaliar os dois parâmetros. O limite inferior desta gama corresponde ao limite de quantificação e o limite superior corresponde à concentração a partir da qual se observam anomalias significativas na sensibilidade do método dado pelo limite de linearidade. Para avaliar a gama de trabalho, é necessário considerar o procedimento de calibração proposto e a linearidade do método.

A linearidade do método é a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito. Pode-se avaliar visualmente, através da análise do coeficiente de correlação, por testes estatísticos e pela análise de resíduos.

1- Teste de homogeneidade de variâncias

Analisar 1 branco e 10 soluções padrão do analito (pelo menos 6) distribuídas de igual modo em toda a gama de concentrações. O primeiro e o último padrão devem ser analisados em 10 réplicas independentes. Determina-se o valor de PG de acordo com a expressão 2.

Compara-se o valor de PG com o valor tabelado de F para o número de graus de liberdade adequado. Se o valor de PG for menor ou igual ao valor de F, então as diferenças entre as variâncias não são significativas e por isso a gama de trabalho está bem ajustada.

2- Coeficiente de correlação

Para avaliar se uma correlação (r) é significativa faz-se um teste de significância para $n-2$ graus de liberdade. Determina-se o valor de t pela expressão 15:

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

Expressão 15

Compara-se o valor de t calculado com o valor de t tabelado. Se o valor calculado for maior que o tabelado, então existe correlação entre os valores de x e y .

3- Testes estatísticos – Teste de Mandel

O teste de Mandel avalia se a função mais adequada para representar a calibração é linear ou uma função quadrática. A diferença das variâncias é calculada com a expressão 16

35.

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2 \quad \text{Expressão 16}$$

Com isto, é calculado o valor teste PG com a equação 17:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2} \quad \text{Expressão 17}$$

Compara-se o valor PG com o F tabelado para nº graus de liberdade igual à 1 no numerador e n – 3 no denominador. Se PG for menor ou igual ao valor de F, então a função de calibração é linear.

4- Análise de Resíduos

A partir da análise dos resíduos calculados a partir da expressão $y_i - \hat{y}_i$. É possível analisar tendência e avaliar se a função é linear e ainda permite avaliar se é necessário rejeitar valores (se $y_i - \hat{y}_i$ for superior a 2 vezes o valor de $S_{y/x}$).

2.3.1.7. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetido sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão é geralmente avaliada em três condições: repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia. A precisão geralmente varia com a gama de concentrações. Esta pode ser representada pelo desvio padrão, conforme mostra a expressão 18³⁵:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Expressão 18}$$

onde s é o desvio padrão; n o número de réplicas; x_i valor individual e \bar{x} a média dos valores.

Também é possível a exprimir a precisão através do coeficiente de variação (CV), expresso pela expressão 19³⁸:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Expressão 19}$$

em que s é o desvio padrão e \bar{x} a média dos valores considerados.

2.3.1.7.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método realizado em condições idênticas, ou seja, a mesma amostra, mesmo laboratório, mesmo analista, equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo. É avaliada a partir da aproximação entre os resultados de medições sucessivas ³⁵.

A partir do desvio padrão, neste caso desvio padrão de repetibilidade (S_r) é calculado o limite de repetibilidade, r (expressão 20), que é definido como o valor abaixo do qual se deve situar, para uma dada probabilidade, a diferença entre dois ensaios.

$$r = 2,8 S_r \quad \text{Expressão 20}$$

O valor de r permite ao analista decidir se a diferença entre valores de duplicados de uma amostra (analisada sob condições de repetibilidade) é significativa de acordo com a expressão 21:

$$| X_i - X_{i-1} | \leq r \quad \text{Expressão 21}$$

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), para um determinado nível de concentração, é expresso, em percentagem através da expressão 22:

$$CV_r = \frac{S_r}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Expressão 22}$$

onde CV_r é numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade (S_r) dividido pela média dos valores considerados.

2.3.1.7.2. Reprodutibilidade

As condições de reprodutibilidade referem-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método, sobre a mesma amostra, variando condições tais como o laboratório, o operador, os equipamentos e épocas diferentes ³⁵.

Tal como a repetibilidade, a reprodutibilidade pode ser expressa a partir do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R) obtido em ensaios interlaboratoriais. O S_R permite determinar o limite de reprodutibilidade R (expressão 23).

$$R = 2,8 S_R \quad \text{Expressão 23}$$

Este limite define o valor abaixo do qual dois resultados de medida se devem situar, para uma dada probabilidade, em condições de reprodutibilidade.

Do mesmo modo, o coeficiente de variação de reprodutividade (CV_R) é expresso tal como o de repetibilidade, em percentagem, dado pela expressão 24:

$$CV_R = \frac{S_R}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Expressão 24}$$

Estas duas medidas de dispersão referidas representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida de variabilidade mínima e a reprodutibilidade uma medida de variabilidade máxima dos resultados.

2.3.1.7.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, o mesmo local, e medições repetidas ao longo de um período extenso de tempo, fazendo variar uma ou mais condições (diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes épocas; com/sem verificação da calibração, etc.). Esta medida de precisão é a mais representativa da variabilidade dos resultados habitual num laboratório ³⁵.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se pelo menos 6 medições em duplicado, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. No caso de as medições serem realizadas em duplicado, aplica-se a equação x para determinar o desvio padrão da precisão intermédia (S_i) dado pela expressão 25:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad \text{Expressão 25}$$

onde t é o número de amostras ensaiadas, j o número da amostra (que vai de 1 a t amostras), y_{j1} o primeiro resultado obtido para a amostra j, y_{j2} – segundo resultado obtido para a amostra j.

O coeficiente de variação médio (CV_{pi}), é calculado pela expressão 26:

$$CV_{pi} = \frac{S_i}{\bar{y}} \cdot 100 \quad \text{Expressão 26}$$

onde o desvio padrão da precisão intermédia (S_i) é dividido pela média dos resultados das amostras (\bar{y}) expresso em percentagem.

Através do desvio padrão da precisão intermédia pode ser calculado o limite da precisão intermédia relativo de acordo com a expressão 27:

$$r_i = \frac{s_i \times 2,8}{\bar{x}} \times 100$$

Expressão 27

2.3.1.8. Robustez

A robustez de um método analítico mede a capacidade do método a resistir a pequenas variações nas grandezas experimentais. Para testar se um método é robusto, recorre-se ao teste de *Youden*. Este teste para além de avaliar a robustez, permite verificar a influência dos fatores nos resultados e ordená-las. Pode-se realizar a variação de (até) 7 fatores diferentes que podem influenciar o resultado, através de ensaios realizados sobre uma amostra em replicado, permitindo assim, ordenar os fatores por ordem de influência e avaliar o efeito de cada fator estudado ^{38 39}.

2.3.2. Parâmetros de avaliação direta

2.3.2.1. Exatidão

A exatidão dos métodos de ensaio é indicada, essencialmente, através da avaliação direta que requer os componentes dos erros aleatórios e sistemáticos associados. A qualidade de um resultado analítico pode ser avaliada com base nos parâmetros de desempenho: veracidade (ou justeza), precisão e incerteza.

Apesar da exatidão se encontrar nas ferramentas da avaliação indireta, esta é determinada utilizando ferramentas da avaliação direta ³⁵. Corresponde ao grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro. Já a justeza, segundo o vocabulário internacional de metrologia, corresponde ao grau de concordância entre a média dum número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência ³⁹.

A exatidão tem o objetivo de analisar o quão próximo o valor obtido pelo método se encontra do valor de referência ⁴⁰. Assim, é afetada pela presença de erros sistemáticos, e

pode ser estabelecida através das análises realizadas com o auxílio de materiais de referência certificados (MRC), a partir de ensaios interlaboratoriais (ECI's) ou testes de recuperação e comparativos.

Os ensaios interlaboratoriais são ensaios que permitem avaliar o desempenho dos laboratórios, sob as mesmas condições ou condições relacionadas. Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais consoante os objetivos a que se destinam. Os ensaios de aptidão avaliam o desempenho dos laboratórios participantes sendo por vezes condição para a acreditação do laboratório.

Um material de referência certificado (MRC) é usado na validação de um método e possui um valor de concentração e incerteza associada. Vem acompanhado com um certificado e deve ser adquirido a um fornecedor credível e reconhecido. Através de um MRC é possível avaliar o desempenho do laboratório. O valor obtido é comparado com o valor certificado e determina-se a *bias*, avaliando assim a veracidade.

Para avaliar os resultados obtidos da análise de um MRC, pode-se calcular o erro relativo (% RE), o fator de desempenho (Z-score), o erro normalizado (En) e a percentagem de recuperação (% R), determinados a partir das expressões 28, 29 e 30, respetivamente. Podem também ser feitos testes de hipóteses recorrendo à expressão 31 (tabela 3) ³⁵.

Tabela 3: Tabela resumo de parâmetros que possibilitam a estimativa da exatidão: erro relativo, Z-score, erro normalizado e teste t ³⁵.

Parâmetro	Cálculo	Expressão	Observações
Erro relativo	$ER (\%) = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100$	28	X _{lab} é o valor médio do MRC obtido experimentalmente; X _v o valor aceite como verdadeiro do MRC.
Z-score	$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s}$	29	O desempenho é classificado consoante o valor de Z, em módulo. Se Z for inferior ou igual a 2, o desempenho é considerado satisfatório, se Z fica compreendido entre 2 e 3, o desempenho é questionável e nas situações em que Z é maior que 3, o desempenho é não satisfatório.
Erro normalizado	$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U^2_{lab} + \sqrt{U^2_{ref}}}}$	30	U _{lab} é a incerteza do laboratório no seu resultado; U _{ref} é a incerteza do valor verdadeiro
Teste de hipótese	$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{xlab}}$	31	O valor de t é comparado com t tabelado para n-1 graus de liberdade. Quando t ≤ t tabelado, não há evidências significativas que existem erros sistemáticos, logo o ensaio é satisfatório. Se t > t tabelado, há evidência significativa que existem erros sistemáticos, logo o ensaio é não satisfatório.

2.3.2.2. Incerteza

Segundo o Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Genéricos em Metrologia (VIM), define-se como incerteza o “resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurado” ⁴¹.

Em relação ao cálculo da incerteza, pode-se considerar a abordagem passo-a-passo, através de ensaios interlaboratoriais e através de dados intra-laboratoriais ⁴².

A norma ISO 11352 considera a estimativa de incerteza combinando a incerteza da precisão intermédia (reprodutibilidade intra-laboratorial – $u(R_{W, \text{relativo}})$) e justeza do método e/ou laboratório (quantificado ao *bias* - $u(\text{bias})_{\text{relativo}}$) ⁴³.

A incerteza associada aos erros aleatórios pode ser quantificada através do recurso a amostras de controlo (DPCS). A componente de incerteza de precisão intermédia ($u(R_{W, \text{relativo}})$) pode ser avaliada através do desvio padrão de amostras de controlo (R_w). Por sua vez o $R_{W, \text{relativo}}$ e o $u(R_{W, \text{relativo}})$ são calculados através das expressões 32 e 33:

$$R_{W, \text{relativo}} = \frac{R_w}{\bar{x}} \quad \text{Expressão 32}$$

$$u(R_{W, \text{relativo}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u(R_{W, \text{relativo}}))^2}{n_{R_w}}} \quad \text{Expressão 33}$$

O *bias* (desvio) é uma estimativa dos erros sistemáticos que pode ser estimado recorrendo a ensaios interlaboratoriais através da expressão 34 ⁴⁴.

$$u(\text{bias})_{\text{relativo}} = \sqrt{\text{RMS}_{\text{bias, relativo}}^2 + u(C_{\text{Ref}})_{\text{relativo}}^2} \quad \text{Expressão 34}$$

em que o $\text{RMS}_{\text{bias, relativo}}^2$ o $u(C_{\text{Ref}})_{\text{relativo}}$ são calculados pelas expressões 35 e 36 ⁴⁵:

$$\text{RMS}_{\text{bias, relativo}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{bias}_{\text{relativo}})^2}{n_{\text{PT}}}} \quad \text{Expressão 35}$$

$$u(C_{\text{Ref}})_{\text{relativo}} = 1,253 \times \frac{\bar{s}_{R, \text{relativo}}}{\sqrt{P}} \quad \text{Expressão 36}$$

A partir das incertezas relativas, obtém-se a incerteza combinada relativa através da expressão 37 ⁴⁶:

$$u_{\text{relativo}} = \sqrt{u(R_{W, \text{relativo}})^2 + u(\text{bias})_{\text{relativo}}^2} \quad \text{Expressão 37}$$

A incerteza expandida corresponde ao intervalo no qual se espera que haja uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser atribuídos à mensuranda. Para estimar a incerteza expandida multiplica-se o valor da incerteza combinada por um fator de expansão, k , para um dado nível de confiança (para 95 %, $k = 2$; expressão 38) ⁴⁶:

$$U_{\text{relativo}} = k \times u_{\text{relativo}} \quad \text{Expressão 38}$$

2.3.3. Teste de rejeição de valores

Antes de iniciar qualquer tratamento de resultados, deve-se verificar o afastamento ou resultados discrepantes das medições, sendo necessário utilizar o teste de Grubbs, de acordo com a expressão 39:

$$G_{\text{calculado}} = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s} \quad \text{Expressão 39}$$

onde x_s é o valor suspeito, o valor médio é \bar{x} e s é o desvio-padrão.

Para um dado número de observações e para um nível de confiança (90 %), o $G_{\text{calculado}}$ deve ser menor do que o G_{tabelado} para que o valor suspeito não seja considerado aberrante em relação ao conjunto de dados considerados ³⁸.

3. Parte Experimental

Para a validação do método NP 1987:2002 - Determinação do teor de Hyp em carnes e produtos cárneos, foram analisadas soluções padrões, amostras de controlo, amostras reais de carnes, produtos cárneos e derivados.

Durante a validação foram realizados ensaios para avaliar os seguintes parâmetros de desempenho: limite de quantificação, linearidade, gama de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), veracidade e incerteza.

3.1. Materiais e Reagentes:

- Balança analítica, Startorius, $\pm 0,1$ mg (gama: 0 a 220 g).
- Balança eletrónica de precisão, Startorius, ± 1 mg (gama: 0 a 620 g).
- Equipamento mecânico Retsch GM 200, para homogeneização a amostra.
- Banho de água com termóstato Julabo SW 22, regulável a $60 \pm 0,5$ °C (gama: 0 a 99,9 °C).
- Estufa de secagem regulável Venticell, a $105 \pm 0,5$ °C.
- Papel de filtro, Whatman de porosidade 150 mm.
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 $\pm 0,00001$ unidade de A, com lâmpada de halogénio e filamento de tungsténio (gama: 190 a 1100 nm).
- Células descartáveis.
- Matrizes de volume aproximado 50 mL.
- Balões volumétricos classe A de $250 \pm 0,15$ mL.
- Vidros de relógio de diâmetro 60 mm.
- Tubos de plástico de volume aproximado 10 mL e rolhas.
- Desionizador de água de leito misto, água do tipo 2, fornecedor ATS.
- Pipetas volumétricas classe A.

As características dos reagentes utilizados encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4: Reagentes utilizados e as suas propriedades.

Reagente	Fórmula	Pureza (%)	Massa molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Marca
Acetato de sódio anidro	CH ₃ COONa	99,9	82,03	1,53	Merck
4-(dimetilamino)benzaldeído	C ₉ H ₁₁ NO	100	149,19	1,22	Merck
Ácido cítrico monohidratado	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	99,5	210,14	1,54	Panreac
Hidróxido de sódio	NaOH	99,4	40,00	2,13	Merck
Trans-4-hidroxi-L-prolina	C ₅ H ₉ NO ₃	100,1	131,13	610	Alfa Aesar
Ácido sulfúrico 3 M	H ₂ SO ₄	96	98,08	1840	Honey well
1 Propanol	(CH ₃) ₂ CHOH	99,9	60,09	803	VWR
2 Propanol	(CH ₃) ₂ CHOH	100	60,1	786	VWR
Ácido perclórico	HClO ₄	61	100,46	1,67	VWR
Cloramina T trihidratada	C ₇ H ₇ ClNaNO ₂ S.3H ₂ O	99,3	281,69	540 - 680	Merck

Os resíduos devem ser eliminados num recipiente próprio para não halogenados.

3.2. Preparação das amostras

A quantidade de amostra não deverá ser inferior a 200 g sempre que possível. A amostra é preparada de acordo com o tipo de carne, e qualquer exsudado, gelatina ou gordura deve ser incluído na homogeneização ⁴⁷.

4.2.1. Fiambre inteiro ou em pedaços:

Cortar uma fatia de 1 cm de espessura na parte mais larga do fiambre, tirando uma tira de 3 cm de altura (ou o máximo possível) da camada de gordura, incluindo o courato.

4.2.2 Enchidos e ensacados de carne:

Retirar qualquer tripa e/ou película, que esteja a revestir o produto.

4.2.3 Produtos fumados:

Retirar toda a camada exterior fumada, incluindo os couratos e gordura adjacente.

4.2.4 Carne de animais de sangue quente, fígado e rins:

Remover os ossos, tendões, tecido conjuntivo e gordura visível. Não cortar o rim, mas sim homogeneizá-lo todo.

Depois de devidamente preparada, a amostra deve ser homogeneizada no moinho granulador, transferida para copo de plástico que deve ser completamente cheio. A amostra deverá ser analisada nas 24 horas subsequentes se for refrigerada, ou congelada até à data da análise.

Relativamente aos produtos crus, a amostra deve ser colocada no congelador de modo a que se atinja uma temperatura abaixo de 0 °C. Deve ser cortada fria, em pequenos cubos. Deve depois ser colocada em frascos de vidro fechados e aquecidos num banho de água de modo a manter a temperatura de, pelo menos, 70 °C, durante 30 minutos. Só depois de arrefecer deve ser homogeneizada e armazenada como descrito anteriormente ⁴⁶.

3.3. Matrizes alimentares estudadas

No presente trabalho foram utilizadas diversas matrizes para validar o método estudado. Estas matrizes encontram-se no grupo das carnes, produtos cárneos e derivados e estão representadas na tabela 5.

Tabela 5: Matrizes estudadas na validação do método: carnes, produtos cárneos e derivados.

Matrizes	Exemplos
Carne	Tiras de frango, bacon, toucinho e peito de peru
Carne processada	Fiambre, mortadela e salsicha
Carne picada	Carne picada
Enchidos, produtos cárneos e derivados	Chouriço, paio, alheira, morcela, paté e pratos cozinhados

3.4. Procedimento

3.4.1. Preparação de soluções

- Solução de ácido sulfúrico, (H₂SO₄) – 3 mol/L:

Medir 750 mL de água para um balão volumétrico de 2000 mL. Adicionar devagar, agitando sempre, 330 mL de ácido sulfúrico. Arrefecer à temperatura ambiente e completar o volume com água.

- Solução-tampão, pH 6,8:

Esta solução é preparada a partir de 26,0 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 14,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 78,0 g de acetato de sódio anidro ($NaCH_3CO_2$). Dissolver os reagentes indicados em 500 mL de água e transferir quantitativamente para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar 250 mL de 1-propanol e completar o volume com água. Esta solução é estável durante várias semanas, quando preservada a 4 °C no escuro.

- Reagente de cloramina T:

Dissolver 1,41 g de cloramina T trihidratada em 100 mL de solução tampão. Preparar esta solução e usá-la imediatamente.

- Reagente de cor:

Dissolver 10,0 g de 4-dimetilaminobenzaldeído em 35 mL de solução de ácido perclórico (60 %) e adicionar lentamente 65 mL de 2-propanol. Preparar esta solução no próprio dia da utilização.

- Soluções padrão de trans-4-hidroxi-L-prolina:

Preparar uma solução mãe por dissolução de 50 mg de trans-4-hidroxi-L-prolina em água, num balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 1 gota de solução de ácido sulfúrico e completar o volume com água. Esta solução é estável durante pelo menos um mês a 4 °C.

No dia da utilização, transferir 5 mL da solução mãe para um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água. Preparar 6 soluções-padrão, medindo com pipeta de precisão 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mL desta solução para balões de 100 mL. Prefazer os volumes com água e homogeneizar. Estas soluções padrão têm respetivamente 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de Hyp.

3.4.2. Análise das soluções padrão

- Transferir 4,00 mL da solução para um tubo de ensaio de plástico e adicionar 2,00 mL de reagente de cloramina T. Agitar e deixar 20 min \pm 1 min em repouso à temperatura ambiente.

- Adicionar 2,00 mL do reagente de cor a cada um dos tubos, agitar vigorosamente e tapar com rolha de plástico.
- Levantar rapidamente os tubos a um banho de água a $60 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min.
- Arrefecer os tubos sob água corrente durante pelo menos 3 min e manter à temperatura ambiente durante 30 min.
- Medir a absorvância a 558 nm numa célula de vidro contra água, usando o espectrofotómetro.
- Subtrair a absorvância medida para o branco e ler a concentração em Hyp, a partir da curva da calibração obtida.

3.4.3. Análise da amostra

- Pesar, com a aproximação de 0,001 g, cerca de 4 g de amostra para um matraz de 50 mL, garantindo que não fica amostra aderente às paredes do matraz.
- Adicionar $30 \text{ mL} \pm 1 \text{ mL}$ de solução de ácido sulfúrico 3 M à amostra contida no matraz. Cobrir com um vidro de relógio e colocar na estufa durante 16 h a $105 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (figura 7).



Figura 7: Amostras contidas no matraz com 30 mL de ácido sulfúrico 3 M prontas para irem 16 horas à estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$

- Filtrar o hidrolisado através de papel de filtro para um balão volumétrico de 250 mL. Lavar o balão e o papel de filtro 3 vezes com 10 mL de solução de ácido sulfúrico 3 M

aquecida e adicionar o líquido das lavagens ao filtrado do hidrolisado. Completar o volume com água e homogeneizar.

- Medir para um balão volumétrico de 250 mL um volume (V) do hidrolisado (entre 5 e 25 mL, dependendo da quantidade de tecido conjuntivo da amostra), tal que depois de completado o volume com água a concentração em Hyp esteja compreendida entre 0,25 µg/mL e 2,5 µg/mL.
- Transferir 4,00 mL desta solução para um tubo de ensaio de plástico e prosseguir como descrito nas soluções padrão.

Ensaio em branco: Executar o procedimento descrito substituindo o hidrolisado diluído por 4,00 mL de cada uma das quatro soluções-padrão diluídas de Hyp. O valor de absorvância deve ser inferior a 0,040, pois este é o critério de aceitação do branco definido na norma ⁴⁴.

3.5. Apresentação de resultados

Os resultados devem ser apresentados com arredondamento às centésimas em toda a gama de trabalho.

4. Tratamento e Discussão de Resultados

4.1. Validação do método de determinação da Hidroxiprolina

Para a validação deste método, utilizaram-se amostras analisadas no laboratório da *Silliker, Portugal S.A.*, cartas de controlo dos DPCS e dados de ensaios interlaboratoriais.

4.1.1. Calibração para o teor de hidroxiprolina

Neste método analítico, a curva de calibração obtida representa a absorvância avaliada no comprimento de onda de 558 nm em função da concentração de Hyp. A partir da reta de calibração é possível determinar por interpolação a concentração do analito na amostra.

Em cada análise foi traçada uma curva de calibração e na tabela 6 apresenta-se os dados de concentrações dos padrões e dos seus valores de absorvância referentes ao dia 30-07-2019.

Tabela 6: Concentração de Hyp ($\mu\text{g/ml}$) das soluções padrão e respetivos valores de absorvância.

Padrões	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância ($\lambda = 558 \text{ nm}$)
P5	0,25976	0,06393
P10	0,51952	0,12395
P20	1,03904	0,24590
P30	1,55856	0,36270
P40	2,07808	0,48132
P50	2,59760	0,58142

Apesar de na norma NP 1987:2002 referir a preparação de quatro soluções padrão para a construção da reta de calibração (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $\mu\text{g/mL}$), decidiu-se adicionar mais duas soluções padrão de modo a aumentar a gama de trabalho, acrescentando o padrão de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e o padrão de concentração mais elevada 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

A existência de outliers na reta de calibração foi avaliada através da aplicação da condição $|y_i - \hat{y}_i| > 2S_{y/x}$ e como nenhuma diferença entre o valor experimental e o valor interpolado na reta, em módulo, foi superior à duas vezes o valor dos resíduos, nenhum valor foi rejeitado.

A partir dos valores apresentados na tabela 6, traçou-se a reta de calibração apresentada na figura 8.

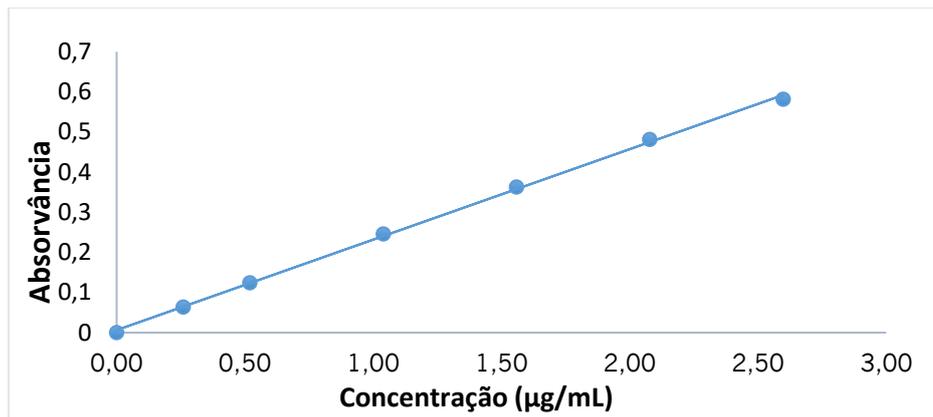


Figura 8: Reta de calibração da absorvância ($\lambda=558$ nm) em função da concentração de Hyp ($\mu\text{g/mL}$).

A reta de calibração de equação: $A = (0,226 \pm 0,011) C(\mu\text{g/mL}) + (0,0062 \pm 0,0076)$ apresenta um bom ajuste pois o coeficiente de correlação é elevado ($r = 0,9996$) e superior ao que é geralmente definido como aceitável ($0,995$)³⁵. Pode-se ainda verificar que a ordenada na origem engloba o ponto (0,0). Assim, pode concluir-se que a reta apresenta os parâmetros adequados para traduzir a variação da absorvância com a concentração da Hyp. Para além do valor do coeficiente de correlação, deve-se analisar numa curva de calibração a gama de trabalho, a linearidade e a estabilidade do declive.

Para a validação das curvas de calibração são analisados o padrão mais baixo e o padrão mais alto, no início de cada análise. A cada 10 amostras é analisado um padrão de controlo (consoante a gama de absorvâncias lidas) para verificar a validade da curva de calibração durante toda a análise. Considera-se que os valores obtidos para os padrões de controlo são aceitáveis se o seu erro relativo for igual ou inferior a 10 %. Este valor foi definido pelo laboratório.

O valor obtido para o padrão de menor concentração é registado sempre que se traça uma curva de calibração. Relativamente ao padrão mais alto, obtido no início de cada análise, apenas é feito o seu registo e verificada a sua conformidade.

Na tabela 7 estão representados os valores do padrão mais baixo registados tal como o critério para a sua aceitação.

O erro relativo do padrão de menor concentração obtido foi sempre inferior a 10 %, o que permitiu aceitar todos os valores.

Tabela 7: Concentração de referência do padrão mais baixo e concentração obtida experimentalmente desse padrão, erro relativo e aceitação.

Data	Concentração de referência do padrão (0,25 µg/mL)	Concentração obtida do padrão (2,5 µg/mL)	Erro relativo (%)	Aceitação (< 10 %)
24-07-2019	0,25976	0,25490	3,37	Sim
30-07-2019	0,25976	0,25770	1,87	Sim
05-08-2019	0,25976	0,25125	0,79	Sim
13-08-2019	0,23310	0,24610	7,79	Sim
19-08-2019	0,25125	0,25020	2,05	Sim
26-08-2019	0,25125	0,25720	0,42	Sim
04-09-2019	0,26527	0,25650	3,30	Sim
09-09-2019	0,26527	0,25610	3,46	Sim
16-09-2019	0,26527	0,26660	0,50	Sim
21-09-2019	0,26527	0,25660	3,27	Sim

4.1.1. Determinação do teor de hidroxiprolina nas amostras

A concentração de Hyp determinada nas amostras é expressa em g/100 g de Hyp, sendo obtida a partir da expressão 40:

$$C = \frac{6,25 \times C_i}{\text{massa} \times \text{volume}} \quad \text{Expressão 40}$$

sendo 6,25 o fator de conversão; C_i a concentração de Hyp na amostra determinada pela curva de calibração, expressa em µg/mL; V, o volume utilizado na diluição (entre 5 e 25 mL), em mL e m, a massa da toma da amostra em g.

4.1.2. Sensibilidade

Uma vez que a curva de concentração é representada pelo modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho, portanto corresponde ao declive da reta de calibração.

Como já foi referido foram traçadas diversas retas de calibração cujas equações encontram-se apresentadas na tabela 8. Como se pode observar durante o período apresentado, os declives mantiveram-se estáveis, isto é, constantes, havendo uma exceção no dia 09-09-2019 em que o declive é mais baixo (0,2079 mL/µg). Foi realizado um teste de rejeição de valores e verificou-se que o valor não era desprezável face à distribuição dos outros valores.

Tabela 8: Equações das retas de calibração do período estudado.

Data	Equação da reta de calibração
24-07-2019	$y = (0,2251 \pm 0,0070) x + (0,0059 \pm 0,0048)$
30-07-2019	$y = (0,225 \pm 0,011) x + (0,0062 \pm 0,0076)$
05-08-2019	$y = (0,2267 \pm 0,0069) x + (0,0052 \pm 0,0047)$
13-08-2019	$y = (0,230 \pm 0,010) x + (0,0055 \pm 0,0071)$
19-08-2019	$y = (0,2276 \pm 0,0081) x + (0,0050 \pm 0,0057)$
26-08-2019	$y = (0,2272 \pm 0,0047) x + (0,0045 \pm 0,0033)$
04-09-2019	$y = (0,2245 \pm 0,0011) x + (0,0061 \pm 0,0071)$
09-09-2019	$y = (0,2079 \pm 0,0073) x + (0,0044 \pm 0,0049)$
16-09-2019	$y = (0,2261 \pm 0,0026) x + (0,0024 \pm 0,0018)$
21-09-2019	$y = (0,2230 \pm 0,0099) x + (0,0067 \pm 0,0066)$

Assim pode concluir que os valores obtidos para os declives variam entre 0,2079 e 0,2276 apresentando um valor médio de 0,2243 com um desvio padrão de 0,0057.

4.1.3. Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através da representação gráfica da função linear e do cálculo e análise do coeficiente de correlação (r) de pelo menos 5 curvas de calibração.

No laboratório, a estabilidade dos declives é avaliada através de uma carta de controlo já estabelecida em que o valor central e os limites de aviso superior e inferior e de controlo superior e inferior são 0,2181; 0,2340; 0,2023; 0,2420 e 0,1943; respetivamente. Assim, sempre que é traçada uma nova curva de calibração, o declive é determinado, registado e monitorizado numa carta de controlo

No período entre 24-07-2019 e 21-09-2019 traçaram-se 10 retas de calibração, cujos declives já foram apresentados na tabela 8 e cuja a média dos coeficientes de correlação foi de 0,9998.

Na figura 9 é apresentada a carta de controlo de amplitudes obtida onde estão apresentados 10 declives obtidos durante o período estudado. A linha central é obtida pelo valor atribuído correspondente à média das medições repetidas, \bar{x} , do ano 2018 no laboratório. Os limites de aviso e controlo (LA e LC, respetivamente) são determinados pelas expressões 41 e 42:

$$LA = \bar{x} \pm 2 s \quad \text{Expressão 41}$$

$$LC = \bar{x} \pm 3 s \quad \text{Expressão 42}$$

Os valores obtidos referentes aos parâmetros da carta de controlo estão apresentados na tabela 9:

Tabela 9: Valores das linhas central (média), LA e LC da carta de controlo dos declives da reta de calibração.

Média \bar{x} (mL/ μ g)	Desvio Padrão (mL/ μ g)	LAS $\bar{x}+2\sigma$ (mL/ μ g)	LCS $\bar{x}+3\sigma$ (mL/ μ g)	LAI $\bar{x}-2\sigma$ (mL/ μ g)	LCI $\bar{x}-3\sigma$ (mL/ μ g)
0,2181	0,0079	0,2340	0,2420	0,2023	0,1943

Pela análise da carta de controlo, pode concluir que existiu apenas uma situação em que o declive diminuiu e esteve a baixo da linha central, ao contrário dos outros valores que estiveram sempre acima desta linha. Como este valor foi uma situação única, esta não representou uma situação fora de controlo.

No laboratório, é considerado uma tendência sistemática fora do controlo, séries de 7 ou mais pontos consecutivos a moverem-se para cima ou para baixo ou um conjunto de 8 ou mais pontos acima ou a baixo da média. Nesta carta de controlo, caso o declive de dia 09-09-2019 não tivesse diminuído, ter-se-ia verificado esta situação.

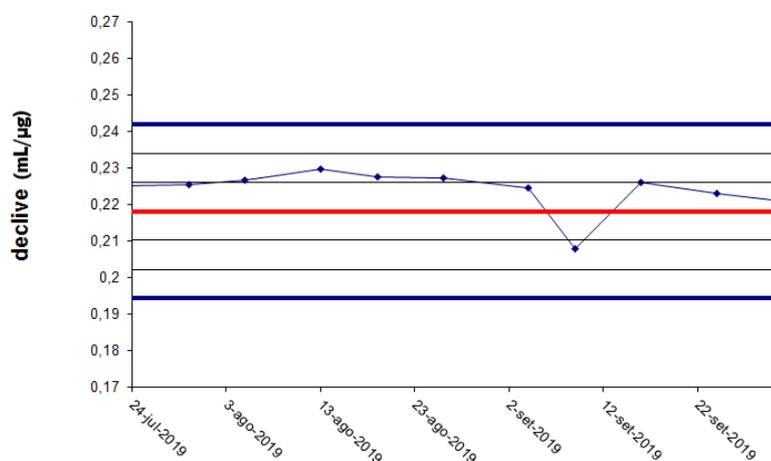


Figura 9: Carta de controlo dos declives no período estudado.

4.1.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da equação da reta de calibração. Como o LQ é a concentração mínima que o método é capaz de quantificar é necessário

converter esse valor em unidades de concentração (em g/100 g) recorrendo à equação 40 (considerando a massa utilizada de 4 g assim como o volume máximo de 25 mL).

O LQ foi determinado sempre que se traçou uma nova reta de calibração e foi monitorizado numa carta de controlo. O valor aceite pelo laboratório, para este limite foi definido a partir do valor obtido utilizando o padrão de quantificação, que nestes casos é o padrão menor concentração (0,25 µg/mL considerando o valor estimado para volume de filtrado 25 mL e massa da toma, 4 g).

O LQ obtido pelo método gráfico é calculado sempre que realizada uma curva de calibração, como forma de controlo e para confirmar que é inferior ao estabelecido pelo laboratório.

Na tabela 10 são apresentados os limites de detecção e quantificação determinados, assim como o limite de quantificação definido pelo laboratório. Estes limites são registados e controlados diariamente.

Tabela 10: Limite de detecção, LD, limites de quantificação, LQ, calculados no período do Projeto Individual e LQ estabelecido pelo laboratório.

Data	LD (g/100 g)	LQ (g/100 g)	LQ estabelecido pelo laboratório (g/100 g)
24-07-2019	0,00644	0,01951	0,0200
30-07-2019	0,00409	0,00124	
05-08-2019	0,00397	0,01204	
13-08-2019	0,00572	0,01732	
19-08-2019	0,00463	0,01404	
26-08-2019	0,00269	0,00816	
04-09-2019	0,00616	0,01866	
09-09-2019	0,00459	0,01391	
16-09-2019	0,00151	0,00459	
21-09-2019	0,00577	0,01749	
Média	0,00456	0,01270	

Pode verificar-se que todos os LQ se encontram abaixo do limite estabelecido pelo laboratório.

4.1.5. Gama de trabalho

No laboratório, a gama de trabalho é atualizada anualmente e é realizado um estudo de todo o histórico das amostras, onde se encontra registada a menor concentração de Hyp

quantificada e também a maior. As concentrações no ano de 2019 encontram-se compreendidas entre 0,02 g/100 g (limite de quantificação) e 1,00 g/100 g.

Foi realizado um teste de homogeneidade de variâncias (tabelas 11 e 12) para confirmar o ajuste da gama de trabalho. Foram analisadas dez réplicas independentes, no mesmo dia, do padrão mais baixo e do mais alto, com a concentração do branco corrigida e foi realizado um teste F de Snedecor/Fisher para 95 % de probabilidade.

Tabela 11: Valores obtidos nas dez réplicas independentes do padrão mais baixo e padrão mais alto analisadas no mesmo dia para realizar o teste de homogeneidade de variâncias.

Data	Padrão menor corrigido com o branco (0,25 µg/mL)	Padrão maior corrigido com o branco (2,5 µg/mL)
16-09-2019	0,1217	2,270
16-09-2019	0,1290	2,382
16-09-2019	0,1120	2,318
16-09-2019	0,1190	2,330
16-09-2019	0,1279	2,340
16-09-2019	0,1108	2,356
16-09-2019	0,1117	2,351
16-09-2019	0,1280	2,266
16-09-2019	0,1091	2,248
16-09-2019	0,1216	2,256

Tabela 12: Resultados obtidos da aplicação do teste de homogeneidade de variâncias.

Parâmetros	Padrão menor (0,25 µg/mL)	Padrão maior (2,5 µg/mL)
Média (µg/mL)	0,1191	2,312
Variância (µg/mL) ²	0,000060	0,0023
Desvio padrão (µg/mL)	0,0078	0,048
Variância relativa (%)	0,051	0,099
Desvio padrão relativo (%)	6,5	2,1
PGcal	1,96	
Ftab	3,18	

A partir da análise da tabela 12 pode-se observar que como o valor do PG é menor que o valor de F tabelado, pode-se concluir que a gama de trabalho se encontra bem ajustada.

4.1.6. Precisão

Para a determinação da precisão foram realizados estudos ao nível da repetibilidade e da precisão intermédia em diversas soluções padrão, amostras de controlo e amostras reais, realizados no mesmo dia e em dias diferentes.

4.1.6.1. Repetibilidade

Como já foi referido, a repetibilidade corresponde à precisão de um método analítico, quando efetuado sobre uma mesma amostra e em condições idênticas, nomeadamente no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento e em curtos intervalos de tempo.

Para avaliar a repetibilidade, determina-se o limite de repetibilidade para cada tipo de amostra, que corresponde ao valor abaixo do qual se deve situar a diferença entre dois resultados. No entanto, neste método, o critério de aceitação para a repetibilidade já é definido pela norma NP 1987:2002 a partir da expressão 43:

$$r=0,0131+0,0322 \omega$$

Expressão 43

Assim, o valor absoluto da diferença entre dois resultados independentes em condições de repetibilidade não deve ser superior ao valor r obtido nessa expressão, em que ω é a média das duas réplicas.

Os valores obtidos entre o período 12-11-2018 e 24-07-2019 estão apresentados na tabela 13.

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que na matriz carne picada o critério de repetibilidade é 0,022 é sempre muito superior à diferença entre réplicas (0,012), cerca de 1,8 vezes. Para a matriz carne processada verifica-se que a diferença entre réplicas é muito inferior (mais de 2 vezes). Já na matriz carne, a variação ainda é superior (cerca de 2,8) e na matriz enchidos o valor médio do critério de repetibilidade (0,026) é igualmente superior à diferença média entre réplicas (0,014) correspondendo a 1,8 vezes.

Verifica-se que, para a matriz enchidos, o critério de repetibilidade tem um valor superior em relação às restantes matrizes, uma vez que neste tipo de produtos, o valor de Hyp é maior e por consequência, a média entre réplicas é também mais elevada.

Tabela 13: Dados dos 43 duplicados analisados para evidenciar o cumprimento da repetibilidade.

Matriz	Data	Média replicados (g/100 g)	Critério de repetibilidade r (g/100 g)	 R1-R2 (g/100 g)	Aceitação R1-R2 ≤ r
Carne picada	13-12-2018	0,44	0,03	0,02	OK
	08-01-2019	0,34	0,02	0,02	OK
	17-01-2019	0,30	0,02	0,00	OK
	23-01-2019	0,33	0,02	0,02	OK
	12-02-2019	0,43	0,03	0,01	OK
	18-02-2019	0,18	0,02	0,02	OK
	27-03-2019	0,24	0,02	0,02	OK
	29-03-2019	0,23	0,02	0,00	OK
	08-04-2019	0,34	0,02	0,01	OK
	26-06-2019	0,20	0,02	0,02	OK
	03-07-2019	0,27	0,02	0,01	OK
	03-07-2019	0,24	0,02	0,01	OK
	05-07-2019	0,21	0,02	0,01	OK
	10-07-2019	0,28	0,02	0,01	OK
	10-07-2019	0,20	0,02	0,01	OK
15-07-2019	0,27	0,02	0,01	OK	
Carne processada (fiambre, mortadela e salsicha)	12-11-2018	0,16	0,02	0,01	OK
	19-11-2018	0,15	0,02	0,01	OK
	19-11-2018	0,19	0,02	0,02	OK
	07-02-2019	0,28	0,02	0,00	OK
	11-03-2019	0,43	0,03	0,01	OK
	20-03-2019	0,11	0,02	0,01	OK
	08-04-2019	0,35	0,02	0,01	OK
	01-04-2019	0,08	0,02	0,01	OK
	17-04-2019	0,16	0,02	0,00	OK
	24-06-2019	0,34	0,02	0,02	OK
	26-06-2019	0,18	0,02	0,01	OK
24-07-2019	0,09	0,02	0,01	OK	
Carne (tiras de frango, bacon, toucinho e peito de peru)	26-02-2019	0,12	0,02	0,00	OK
	06-05-2019	0,25	0,02	0,01	OK
	24-06-2019	0,31	0,02	0,01	OK
	26-06-2019	0,07	0,02	0,00	OK
	12-07-2019	0,49	0,03	0,02	OK
Enchidos (chouriço, paio, alheira e morcela) e produtos cárneos (patê e pratos cozinhados)	15-05-2019	0,13	0,02	0,00	OK
	15-05-2019	0,73	0,04	0,01	OK
	15-05-2019	0,22	0,02	0,01	OK
	19-05-2019	0,11	0,02	0,01	OK
	19-05-2019	0,51	0,03	0,02	OK
	18-06-2019	0,13	0,02	0,02	OK
	03-07-2019	0,94	0,04	0,02	OK
	05-07-2019	0,29	0,02	0,02	OK
	10-07-2019	0,29	0,02	0,01	OK
15-07-2019	0,65	0,03	0,02	OK	

Assim, observa-se que independentemente da matriz estudada o cumprimento do critério de repetibilidade é sempre verificado, ou seja, num curto espaço de tempo, a diferença entre dois duplicados é sempre inferior ao valor do critério de repetibilidade definido pela norma.

4.1.6.2. Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia foram analisados 43 duplicados de amostras de diferentes matrizes.

Com os ensaios de cada amostra em duplicado realizados em dias diferentes é possível avaliar a precisão em condições de precisão intermédia a partir da determinação do desvio padrão dos resultados obtidos e ainda exprimir o resultado a partir do coeficiente de variação. A tabela 14 apresenta estes valores respetivamente.

Tabela 14: Parâmetros característicos da precisão intermédia. Desvio padrão da precisão intermédia, s_{PI} , Limite de precisão intermédia relativo, r_{PI} e coeficiente de variação da precisão intermédia, CV_{PI} .

Nº de amostras	s_{PI} ($\mu\text{g/mL}$)	r_{PI} (%)	CV_{PI} (%)
43	0,0091	9	3

Através dos dados dos duplicados, foi possível obter o valor do desvio padrão da precisão intermédia (0,0091). Por sua vez, o valor de limite de precisão intermédia obtido foi 9 %, o que significa que a diferença entre dois valores obtidos deverá ser inferior a 9 % independentemente do tempo que decorre entre os ensaios.

Pode-se concluir que o método é preciso, em condições de precisão intermédia, uma vez que o CV_{PI} tem um valor baixo (3 %).

4.1.7. Veracidade

A veracidade pode ser demonstrada com base nos resultados obtidos das matrizes analisadas e nos resultados dos ensaios de comparação interlaboratorial. Neste caso foram utilizadas amostras de circuitos das empresas LGC, *Deutsche Referenzbüro für Ringversuche & Referenzmaterialien* (DRRR) e *Food Analysis Performance Assessment Scheme* (FAPAS) (tabela

15). Estes ensaios servem para avaliar o desempenho dos laboratórios, sob as mesmas condições ou condições relacionadas.

Tabela 15: Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais.

Data	Circuito	Matriz	X _{lab} (µg/mL)	X _{ref} (µg/mL)	Nº lab. participantes	S (µg/mL)	Bias (%)	Z-score
03-2017	LGC	Carne	0,30	0,26	32	0,025	15,4	1,60
03-2017	LGC	Carne	0,29	0,26	32	0,025	11,5	1,20
03-2017	LGC	Carne	0,42	0,38	18	0,025	10,5	1,60
03-2017	LGC	Carne	0,40	0,38	18	0,025	5,3	0,80
12-2017	DRRR	linguiça cozida	0,20	0,24	10	0,036	17,0	1,11
12-2017	DRRR	linguiça cozida	0,26	0,28	11	0,022	7,3	0,91
10-2018	FAPAS	Carne enlatada	1,26	1,29	42	0,084	2,3	0,36
10-2018	FAPAS	Carne enlatada	1,22	1,29	42	0,084	5,4	0,83
10-2018	FAPAS	Carne enlatada	1,14	1,29	42	0,084	11,6	1,79
04-2019	LGC	Carne	0,34	0,32	27	0,025	6,3	0,80

A aceitação é feita através do valor de desempenho Z-score. Quando este é igual ou inferior a 2, o desempenho é considerado satisfatório. Apesar de alguns valores de *bias* não serem satisfatórios, os valores do Z-score são todos aceitáveis.

Por isso, com base nestes resultados, demonstra-se que os valores de veracidade obtidos cumprem os critérios estabelecidos para as matrizes estudadas e que o método pode ser considerado justo.

4.1.8. Incerteza

A incerteza de medição associada ao método foi calculada também através de ensaios interlaboratoriais.

Para a componente de incerteza de medição associado ao *bias* (veracidade) do método e do laboratório, ub foram calculados os parâmetros representados na tabela 16.

O valor de u_b foi calculado através da expressão 34 e do U_{cref} relativo, obtendo-se um valor de 7,1 %. Este valor é considerado baixo, uma vez que se encontra abaixo do critério de aceitação definido pelo laboratório (10 %).

Tabela 16: Dados utilizados para calcular a componente da exatidão da incerteza ($\mu\text{g/mL}$).

Circuito	Matriz	X_{lab} ($\mu\text{g/mL}$)	X_{ref} ($\mu\text{g/mL}$)	Bias relativo	Desvio Padrão ($\mu\text{g/mL}$)	Média população	u_{cref} relativo ($\mu\text{g/mL}$)
LGC	Carne	0,40	0,38	5,263	0,025	30,333	1,588
DRRR	Linguiça cozida	0,26	0,28	-7,273	0,020		
FAPAS	Carne enlatada	1,26	1,29	-2,326	0,080		
FAPAS	Carne enlatada	1,22	1,29	-5,426	0,080		
FAPAS	Carne enlatada	1,14	1,29	-11,628	0,080		
LGC	Carne	0,34	0,32	6,250	0,030		

Em relação à componente associada à precisão intermédia ou reprodutibilidade intralaboratorial do laboratório, foram utilizados as médias dos valores dos DPCS ao longo do ano e os valores e parâmetros calculados encontram-se na tabela 17.

Tabela 17: Parâmetros da componente incerteza associados à precisão intermédia.

$R_{W, \text{relativo}}$	$u(R_{W, \text{relativo}, c})$
3,329	5,7
3,317	
7,149	
7,512	

Como o valor do u_b (7,1 %) é baixo, assim como o valor da estimativa da incerteza associada à precisão $u_{R_{W, \text{relativo}}}$ (5,7 %), portanto a abordagem mostrou ser adequada para a estimativa da incerteza.

A partir das incertezas relativas, foi obtida a incerteza combinada relativa segundo a expressão 37, tendo-se obtido o valor de 9,1 %. A incerteza combinada relativa, multiplicada pelo fator de expansão, $k = 2$ (expressão 38), permite estimar o valor da incerteza expandida que representa um valor final da incerteza do método de 18 %. Embora o método utilizado não apresente um valor referente a esta grandeza, considera-se que este valor é aceitável uma vez que cada uma das componentes da incerteza são baixas.

4.2. Outros atividades realizadas

Para além da validação do método apresentado foi também possível desenvolver outras atividades durante o Projeto Individual enquanto analista do laboratório de físico-química. Acompanhei as analistas principais nos diversos métodos analíticos do laboratório, ajudando na localização das amostras, preparação de material, soluções e reagentes.

Foram realizadas análises de rotina no laboratório na matriz sumos de frutos e produtos hortícolas sendo determinado o resíduo seco solúvel segundo o procedimento PAFQ.211 e a norma NP 785, o teor de sólidos solúveis segundo o procedimento interno PAFQ.065 e norma NP EN 12143 e determinação da acidez total segundo o procedimento PAFQ.197, norma NP 1421 e norma NP EN 12147. Semanalmente estes três parâmetros foram analisados em média cerca de 25 amostras.

Relativamente à determinação do pH, as análises foram realizadas segundo o procedimento PAFQ.129, norma NP 3441 (matriz carne), norma ISO 7238 (matriz manteiga) e NP EN 1132 (sumos de frutos e produtos hortícolas). Diariamente foram analisadas em média 20 amostras.

5. Conclusões

Atualmente, numa sociedade em que a fraude alimentar e a preocupação com a qualidade e segurança alimentar são cada vez maiores, os consumidores preocupam-se cada vez mais com a informação nutricional dos alimentos, e a necessidade de existência de métodos analíticos rápidos e seguros capazes de responder a estes desafios é inquestionável.

O presente trabalho apresenta a validação de uma metodologia analítica para a determinação do teor de Hyp de acordo com a norma NP 1987:2002, em matrizes de carne, produtos cárneos e derivados através da técnica de espectrofotometria.

O processo de validação do método estudado iniciou-se com a construção de retas de calibração. Pela análise de declives foi possível comprovar a sensibilidade do método. Foi possível também verificar e concluir que a gama de trabalho estava bem ajustada (entre 0,02 g/100 g e 1,00 g/100 g), tendo-se obtido uma boa linearidade (0,9998), permitindo confirmar que o ajuste linear é adequado ao uso pretendido.

A partir do estudo da determinação do limite de quantificação (0,02 g/100 g) foi possível concluir que este é apropriado para análise de rotina.

Os ensaios efetuados para avaliar a precisão através de duplicados em condições de repetibilidade permitiram verificar o cumprimento do critério definido e em condições de precisão intermédia (CV_{PI} de 3 %) permitiram demonstrar que os resultados são satisfatórios por se encontrarem dentro dos critérios estipulados (< 10 %). Foi possível averiguar ainda que todos os duplicados analisados cumpriram o critério de repetibilidade definido pela norma NP 1987:2002 ($r=0,0131+0,0322 \omega$).

Os resultados de ensaios interlaboratoriais em que o laboratório obteve resultados satisfatórios permitiram concluir acerca da veracidade demonstrando que o método é justo considerando os valores de Z-score obtidos. Foi ainda possível obter a estimativa de incerteza que demonstrou ser adequada (18 %), para o método estudado, dado que os valores de u_b , e de u_{RW} estão abaixo do valor máximo definido para o critério de aceitação do laboratório (10 %).

O trabalho desenvolvido foi muito relevante para a *Silliker* dado que a revalidação deste método possibilitou a realização de ajustes à norma de modo a elaborar um procedimento interno e poder submeter posteriormente o método ao processo de acreditação.

No período de estágio, os conhecimentos adquiridos no primeiro ano do mestrado foram consolidados e as diversas técnicas estudadas foram colocadas em prática,

nomeadamente nos ensaios físico-químicos realizados em análises de rotina do laboratório, tais como determinação do pH, do resíduo seco solúvel, do teor de sólidos solúveis e da acidez.

Salienta-se ainda o aumento de competências ao nível do trabalho em equipa, desenvolvimento do espírito crítico, resolução de problemas e ainda a gestão da pressão devido ao contexto industrial/empresarial.

Esta experiência conduziu a um crescimento a nível profissional e pessoal e permitiu a entrada para o mundo do trabalho.

6. Referências bibliográficas

[1] Merieuxnutrisciences.com. (2017). Silliker Portugal, S. A. | Mérieux NutriSciences Portugal. [online] Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> [Acedido a 24 de maio de 2019].

[2] Silliker Portugal S.A. (2014), Manual da Qualidade, Silliker Portugal S.A.

[3] Merieuxnutrisciences.com. (2017). Qualidade e Segurança Alimentar | Mérieux NutriSciences Portugal. [online] Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar> [Acedido a 24 maio de 2019].

[4] Merieuxnutrisciences.com. (2017). Acreditação e Reconhecimentos | Mérieux NutriSciences Portugal. [online] Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar> [Acedido a 24 maio de 2019].

[5] Regulamento (UE) No 1169/2011 que estabelece os princípios, requisitos e responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e, em particular, sobre a rotulagem. Jornal Oficial da União Europeia.

[6] União Europeia. (n.d.). Regulamentos, diretivas e outros atos legislativos | União Europeia. [online] Disponível em: https://europa.eu/european-union/eu-law/legal-acts_pt [Acedido a 10 de setembro de 2019].

[7] Regulamento (CE) No 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia. 324-365.

[8] Regulamento (CE) Nº 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais de saúde sobre os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia.

[9] Merieuxnutrisciences.com. (2017). Qualidade e segurança alimentar, o que é a fraude alimentar | Mérieux NutriSciences Portugal. [online] Disponível em:

<https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar> [Acedido a 24 maio de 2019].

[10] Fao.org. (2019). About Codex | CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO. [online] Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/> [Acedido a 19 de setembro de 2019].

[11] C. de M. Della Torre; J., Lichtig, J.; J. Beraquet, N. (2004). Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 63ª edição. São Paulo, 35-42.

[12] Ipac.pt. (n.d.). Instituto Português de Acreditação. [online] Disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/contactos.asp> [Acedido a 13 de julho de 2019].

[13] NP EN ISO/IEC 17025 (2017). Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

[14] Guia Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, Guia 3, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE) ISBN 972-96727-2-5.

[15] Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. (1991), Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 5ª edição, LTC.

[16] Costa S. Apontamentos da Unidade Curricular Análise Estrutural. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2017/2018).

[17] Skoog; et al. (2007). Principles of Instrumental Analysis (6th ed.). Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. 169–173.

[18] Sciencing. (2017). The History of Spectrophotometry. [online] Disponível em: <https://sciencing.com/history-spectrophotometry-6595173.html> [Acedido a 29 de setembro de 2019].

[19] Koogan G.; Compri-Nardy M.; Stella M.B.; Oliveira C. (2009), Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica, 200.

- [20] M. Raimundo Jr, I.; Pasquini, C. (1997). Espectrofotometria multicanal e arranjos de fotodiodos. Química Nova vol.2, 1ª edição. Campinas - São Paulo: Departamento de Química Analítica - Instituto de Química.
- [21] R.A.A. Reis; W.L.M. Santos; A.L. Oliveira; R.M. Souza; C.R.V. Veloso (1999). Quantificação da hidroxiprolina como índice de qualidade de salsicha comercializada em Belo Horizonte-MG. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.51, 6ª edição. Minas Gerais: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- [22] Steinhart, H.; Bosselmann, A.; Möller, C. (1994), Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. J. Agric. Food Chem. 42, 1943-1947.
- [23] Bayley, A.J.; Light, N.D. (1989) Connective tissue in meat and meat products. England: Elsevier Science Publishers; 355.
- [24] Lomiwes, Dominic & Farouk, M.M.; Wu, G.; Young, O. (2013). The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. Meat science. 96. 646-651. 10.1016/j.meatsci.2013.08.022.
- [25] Oliveira, A; Oliveira, R. (2011). Determinação do teor de hidroxiprolina em diversas classes de embutidos e em carnes industriais. [online] Revistamvez-crmvsp.com.br. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/158> [Acedido a 11 de outubro de 2019].
- [26] C. de M. Della Torre; J. Beraquet, N. (2005). Proximate composition and collagen content in beef minced meat. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 64ª edição. São Paulo, 223-231.
- [27] Paes Vieira, L. (2010). Caracterização Molecular e bioquímica da prolina desidrogenase de Trypanosoma cruzi, um possível alvo terapêutico. Pós-Graduação. Vocabulário Internacional de Metrologia.
- [28] Noguci da Silva, R. (2013). Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina. Mestre. Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo.

- [29] Anulab. (n.d.). L-4-Hidroxiprolina. [online] Disponível em: <https://www.anulab.com/es/product/1695562/l-4-hidroxiprolina> [Acedido a 10 de outubro de 2019].
- [30] Prestes, C.; R., Golunski, S.; Toniazzo, G.; Pinto Kempka, A.; di Luccio, M. (2013). Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4ª edição. Campina Grande, 375-382.
- [31] da Silva, T.; Barreto Penna, A. (2012). Chemical characteristics and functional properties of collagen. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 3ª edição. São Paulo, 530-539.
- [32] AOAC International. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*. 16. ed., Arlington: AOAC International, 1995. Cap. 39 (Meat and Meat Products), 13-15.
- [33] Determination of Hydroxyproline in Meat after Acid Hydrolyzation (Photometric method). (2010). In: *Application Note 053*. Switzerland: BÜCHI Labortechnik AG.
- [34] Huber L. (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Informa Healthcare USA, Inc., ISBN 9780849382673.
- [35] *Guia Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Guia 13*, Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (RELACRE); ISBN 972 8574-02-9.
- [36] Gustavo González, A.; Ángeles Herrador, M. (2007), A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, 227–238.
- [37] Miller. James N; Miller. Jane C. (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, ISBN: 978-0-273-730-42-2.
- [38] Geraldo D. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Validação de Métodos Analíticos. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2017/2018).
- [39] Harvey D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. 1st Edition. Modern analytical chemistry. ISBN 0-07-237547-7.

- [40] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (2007). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.
- [41] Instituto Português da Qualidade (IPQ) (2012). Vocabulário Internacional de Metrologia, ISBN 978-972-763-00-6.
- [42] IUPAC (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. Pure Applied Chemical. vol. 74: 835-855.
- [43] Nordtest TR 569 (2011). Internal Quality Control. 4th Edition. Handbook for Chemical Laboratories. Norway. ISSN 0283-7234.
- [44] Nordtest TR 537 (2012). Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. 3ª Edição.
- [45] ISO 11352 (2012). Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data. 1ª edição.
- [46] Fifield F.; Kealey D. (2008). Principles and Practice of Analytical Chemistry. Blackwell. USA.
- [47] Silliker, Procedimento de Análise Físico-Química.044, Métodos de preparação das amostras para análise.

7. Anexos

Anexo A - Frases de perigo (H) e precaução (P) dos reagentes utilizados ao longo do estudo da validação do método.

Tabela 18: Frases de perigo (H) e precaução (P) associados aos reagentes utilizados.

Reagente	Frases de perigo (H) e precaução (P)
Acetato de sódio anidro	H303, H316, H320, H333 P264, P305 + P351 + P338, P312, P332 + P313, P337 + P313
4-(dimetilamino)benzaldeído	H317, H319, H411 P273, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338
Ácido cítrico monohidratado	H319 P305+P351+P338
Hidróxido de sódio	H290, H314 P233, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310
Trans-4-hidroxi-L-prolina	-
Ácido sulfúrico 3 M	H290, H314 P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P309+P310
1 Propanol	H225, H318, H336
2 Propanol	P210, P233, P280, P305+P351+P338, P310
Ácido perclórico	H271, H290, H314 P220, P260, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310
Cloramina T trihidratada	H302, H314, H334 P280, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P304 + P340, P308 + P310