



Universidade de Aveiro

Departamento de Química

Ano 2018

**ANA MARGARIDA
FIGUEIREDO MARQUES**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE QUÍMICA NO SETOR
ALIMENTAR EM CONTEXTO DE UM LABORATÓRIO ACREDITADO**



**ANA MARGARIDA
FIGUEIREDO MARQUES**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE QUÍMICA NO SETOR
ALIMENTAR EM CONTEXTO DE UM LABORATÓRIO ACREDITADO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Alimentar, realizada sob orientação científica da Professora Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Cláudia Batista Lopes, Bolseira de Pos-Doc da Universidade de Aveiro e supervisão da Doutora Alice Santos, responsável do laboratório de físico-química da empresa Silliker Portugal S.A.

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”***

- Antoine de Saint-Exupéry

O JÚRI

presidente

**Professora Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins
Leal**

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientadora

Professora Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Mestre Lina Dulce Magalhães Carvalho Santos

Responsável pelo Laboratório de ICP do Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro

AGRADECIMENTOS

Como não poderia deixar de acontecer, o meu primeiro e maior obrigada vai para a minha família, meu porto de abrigo em todos os momentos. A vocês, mãe, pai e Marianita “fofima”, agradeço do fundo do coração por, mais do que não me terem deixado cair, terem-me ensinado que cair faz parte, mas o importante é saber levantar. Sem vocês, isto não teria sido possível.

À Professora Eduarda Pereira, um agradecimento especial pelo acompanhamento, apoio e preocupação que teve comigo durante todo o tempo. Apesar de longe da universidade, senti um carinho e disponibilidade aos quais estarei para sempre grata.

À Mónica Ferreira, analista da *Silliker* e minha “macaquinha”, obrigada por me teres acompanhado e te teres tornado um dos meus pilares dentro e fora da empresa. Mais do que uma colega de trabalho, ganhei uma amiga.

À Elisabete Feiteira, a “mãe Bétchi”, que foi muito mais do que uma analista da *Silliker* e que, apesar de pouco mais velha do que eu, abraçou o papel de mãe na empresa. O que aprendi contigo foi muito mais do que o que poderia alguma vez imaginar. Obrigada por todos os conselhos e dicas!

À Alice Santos, responsável pelo laboratório de análises, pela oportunidade e por ter confiado que seria capaz de pertencer à família *Mérieux NutriSciences* mesmo antes de ter terminado o estágio.

O meu agradecimento muito sincero e profundo a toda a equipa *Silliker*. O ambiente é incrível e o espírito de união de fazer inveja. Obrigada por me terem ensinado muito mais do que técnica. Apesar de estar longe, fizeram-me sentir como se estivesse em casa. Um especial obrigada às “Marias”, por me brindarem com um sorriso e abraço todas as manhãs.

Por fim, mas não menos importante, uma palavra a todos vocês, que sempre estiveram cá. À Soninha e ao Mimoso, por se terem tornado na minha família fora de casa. À Jéssica, ao Rui e à Diana, obrigada por me fazerem pertencer à melhor equipa de sempre. Obrigada por me compreenderem quando os compromissos são muitos e o tempo para os cumprir é pouco mas, ainda assim, estarem lá para me apoiar. E ao Paulo, por ter marcado a minha vinda para o Porto como ninguém. Pelo carinho, compreensão e apoio nas noites infundáveis a trabalhar: muito obrigada.

Muito obrigada a todos que, não estando aqui mencionados, estarão sempre no meu coração!

PALAVRAS-CHAVE

Validação de métodos de ensaio, Acidez titulável, Teor de matéria gorda, Repetibilidade, Precisão Intermédia, Qualidade alimentar

RESUMO

O presente relatório foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular do mestrado em Biotecnologia Alimentar da Universidade de Aveiro na *Silliker Portugal S.A.*, uma empresa do setor agro-alimentar que disponibiliza serviços que permitem uma abordagem integrada da higiene e segurança alimentares, promovendo uma melhoria contínua e significativa na gestão da qualidade.

Este estágio teve como objetivos a validação de dois métodos de análise já implementados no laboratório de forma a que pudessem ser aplicados em novas matrizes alimentares – *Determinação de matéria gorda total em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 232) e *Determinação da acidez em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 197). Pretendeu-se, ainda, a validação de um método para que o mesmo venha a ser implementado na empresa e, posteriormente, acreditado – *Determinação da acidez titulável em leites fermentados* (norma ISO/TS 11869).

O trabalho realizado no âmbito deste estágio e descrito no presente relatório permitiu o estudo da precisão dos dois métodos já implementados neste laboratório acreditado, a nível de repetibilidade e de precisão intermédia. Permitiu, também, a extensão da sua aplicabilidade para diferentes matrizes das já validadas. Foi, ainda, possível iniciar o estudo da incerteza do método novo, que passou a estar implementado na empresa após o trabalho desenvolvido.

KEYWORDS

Method validation, Titratable acidity, Fat content, Repeatability, Intermediate precision, Food quality

ABSTRACT

The present work was developed under the curricular internship of the master's degree in Food Biotechnology of the University of Aveiro at *Silliker Portugal S.A.*, a company in the agri-food sector that provides services in the fields of health and food safety, promoting continuous and significant improvement in the quality management.

The aim of this internship was the validation of two analysis methods, already implemented in the company, therefore extending their applicability in different food matrices - *Determination total fat content* (internal method PAFQ. 232) and *Determination of titratable acidity* (internal method PAFQ. 197). Moreover, it was also intended to validate a new method - *Determination of titratable acidity in fermented milks* (ISO/TS 11869).

The work carried out in this internship consisted in the study of the precision of the two methods already implemented in this company, in terms of repeatability and intermediate precision, allowing the extension of its application to different food matrices. It was also possible to start the study of the validation of a new method, which was intended to be implemented in the company after the developed work.

ÍNDICE

A.	LISTA DE FIGURAS	I
B.	LISTA DE TABELAS	II
C.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
I.	INTRODUÇÃO	1
1.	CONTEXTUALIZAÇÃO	2
2.	OBJETIVOS DO ESTÁGIO	4
3.	A EMPRESA DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO	5
3.1.	<i>INSTITUT MÉRIEUX E MÉRIEUX NUTRISCIENCES</i>	5
3.2.	<i>SILLIKER PORTUGAL S.A.</i>	6
4.	SISTEMA DE GESTÃO DE QUALIDADE DA <i>SILLIKER PORTUGAL S.A.</i>	8
5.	MÉTODOS DE ENSAIO UTILIZADOS NO ÂMBITO DESTE ESTÁGIO.....	9
5.1.	MATÉRIA GORDA	9
5.2.	ACIDEZ TITULÁVEL	13
6.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS E ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS.....	14
II.	REALIZAÇÃO EXPERIMENTAL	23
1.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS A ANALISAR.....	24
2.	MATÉRIA GORDA.....	25
2.1.	DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA GORDA TOTAL PELO MÉTODO PAFQ. 232	25
3.	ACIDEZ TITULÁVEL	29
3.1.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO PAFQ. 197	29
3.2.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO ISO/TS 11869.....	31
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ENSAIO UTILIZADOS NO ÂMBITO DO ESTÁGIO.....	34
1.1.	REPETIBILIDADE	35
1.2.	PRECISÃO INTERMÉDIA	37

2.	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE RESULTADOS.....	39
3.	MATÉRIA GORDA.....	44
3.1.	DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA GORDA TOTAL PELO MÉTODO PAFQ. 232	44
4.	ACIDEZ TITULÁVEL	56
4.1.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO PAFQ. 197	56
4.2.	DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO ISO/TS 11869.....	65
IV.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
V.	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS FORA DO ÂMBITO DOS OBJETIVOS DO ESTÁGIO	71
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
VII.	ANEXOS.....	77

A. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Logótipos das cinco empresas pertencentes ao <i>Institut Mérieux – Biomérieux, Mérieux Développement, Transgene, ABL Inc., Mérieux NutriSciences</i>	5
Figura 2 – Instalações da <i>Silliker Portugal S.A.</i>	6
Figura 3 – Pirâmide documental da <i>Silliker Portugal S.A.</i>	8
Figura 4 – Grau de validação de métodos dependendo do caso. A validação é progressivamente mais exigente e exaustiva no sentido 1-5. O mais frequente são situações que se enquadram nos valores 1 e 2, sendo que 4 e 5 se verifica principalmente em laboratórios de investigação.....	19
Figura 5 – Elementos identificadores da descrição de qualquer método de ensaio na <i>Silliker Portugal S.A.</i>	20
Figura 6 – Material utilizado no equipamento ANKOM: sacos porosos ANKOMXT4 (A), unidade de selagem a quente (B), suporte de unidade de hidrólise (C), suporte de unidade de secagem (D), suporte metálico de extração (E).....	28
Figura 7 – Equipamento ANKOM: unidade de hidrólise ANKOM HCI Hydrolysis System (A), unidade de secagem ANKOM RD Dryer (B), unidade de extração ANKOM XT15 Extractor (C).....	28
Figura 8 – Esquema das cartas de controlo de amplitudes utilizadas na <i>Silliker Portugal S.A.</i> para monitorização da temperatura dos equipamentos	40
Figura 9 – Avaliação do desempenho com “Z-scores”	67
Figura A1 – Informação nutricional contida nos rótulos das amostras de arroz (A), <i>corn flakes</i> (B), farinha não láctea (C), sementes de linhaça (D) e quinoa (E). O parâmetro utilizado foi o teor total de lípidos para a norma PAFQ. 232.	81
Figura A2 – Certificado do MRC utilizado para estudos da norma ISO/TS 11869 (parte 1).	82
Figura A3 – Certificado do MRC utilizado para estudos da norma ISO/TS 11869 (parte 2).	83

B. LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Matrizes analisadas para validação do método PAFQ. 232. Apresentam-se os valores de referência do teor de matéria gorda total, em g/100g de amostra, para cada tipo de matriz, assim como o valor para o mesmo parâmetro incluído no rótulo da amostra utilizada para estudo da repetibilidade, nas mesmas unidades.....25
- Tabela 2** – Matrizes analisadas para validação do método PAFQ. 197.....27
- Tabela 3** – Critério de seleção das massas de celite e amostra adequadas para cada tipo de matriz analisada, tendo em conta o teor de matéria gorda estimado de cada uma delas.30
- Tabela 4** – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para as matrizes *cat food*, sementes de linhaça e quinoa, posteriormente excluídas da validação deste método.....45
- Tabela 5** – Comparação dos resultados obtidos (valores médios) para as matrizes *cat food*, (MRC fornecido pela *Bipea*), quinoa e linhaça, pelo método a ser validado (PAFQ. 232, com equipamento *ANKOM*) e um método alternativo já existente e validado para as matrizes em causa (PAFQ. 069).47
- Tabela 6** – Comparação dos resultados obtidos (valores médios) nas matrizes cereal e farinha não láctea pelo método a ser validado (PAFQ. 232, com equipamento *ANKOM*) e um método alternativo já existente e validado para as matrizes em causa (PAFQ. 069).47
- Tabela 7** – Valores obtidos para o estudo da repetibilidade do procedimento PAFQ. 232. A variância, limite da repetibilidade e limite da repetibilidade relativo foram calculados pelas **Equações 1, 2 e 3**, respetivamente.49
- Tabela 8** – Diferença absoluta entre os resultados obtidos em condições de repetibilidade para análise do teor de matéria gorda na matriz farinha láctea. ($E1-E2$) representa a diferença absoluta entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, e assim sucessivamente.50
- Tabela 9** – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Grubbs do método PAFQ.232. O valor G_{exp} foi calculado pela **Equação 7** e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 99%.51

Tabela 10 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.232. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela Equação 6 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.....	52
Tabela 11 – Valores obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento PAFQ. 232. $ E1-E2 $ representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.....	54
Tabela 12 – Valores obtidos para o estudo da repetibilidade do procedimento PAFQ. 197. A variância, limite da repetibilidade e limite da repetibilidade relativo foram calculados pelas Equações 1, 2 e 3 , respetivamente.....	57
Tabela 13 – Diferença absoluta entre os resultados obtidos em condições de repetibilidade para análise da acidez titulável na matriz vinagre balsâmico. $(E1-E2)$ representa a diferença absoluta entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, e assim sucessivamente.	58
Tabela 14 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Grubbs do método PAFQ.197. O valor G_{exp} foi calculado pela Equação 7 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 99%.....	59
Tabela 15 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.197. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela Equação 6 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.....	60
Tabela 16 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.197, divididos por gamas de acidez titulável. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela Equação 6 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.....	61
Tabela 17 – Divisão por gamas do PAFQ.197 e parâmetros de repetibilidade para cada uma delas.	62
Tabela 18 – Resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento PAFQ. 197. $ E1-E2 $ representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.....	63
Tabela 19 – Valores obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento ISO/TS 11869. $ E1-E2 $ representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.....	66

Tabela 20 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método ISO/TS 11869 para um MRC de iogurte. Os resultados apresentam-se nas unidades presentes no certificado do referido MRC, mg ácido láctico/100 g.....	67
Tabela A1 – Valoress obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para todas as matrizes constituintes do plano de validação.	78
Tabela A2 – Valores obtidos (em duplicado) para as matrizes <i>cat food</i> , sementes de linhaça, quinoa, cereal e farinha não láctea por um método já implementado na empresa e validado para estas matrizes (PAFQ-069).	79
Tabela A3 – Diferença de massas dos sacos porosos <i>ANKOM^{XT4}</i> antes e após extração num ciclo de brancos, de forma a avaliar se o equipamento estava em boas condições de utilização após manutenção.	80
Tabela A4 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para o DPCS <i>Triscuit</i> que apresenta um intervalo aceitável de teor de matéria gorda de 14,040 – 12,710 g/100g.....	80
Tabela A5 – Valores da função <i>t</i> -Student para vários níveis de confiança e números de graus de liberdade.	84
Tabela A6 – Valores críticos de Cochran (95% de confiança).....	85
Tabela A7 – Valores críticos de Grubbs, com um nível de confiança de 99%	86

C. LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC *Association of Official Agricultural Chemists*

CEN Comité Europeu de Normalização

DPCS *Daily Process Control Sample* (Amostra de Controlo Diário)

ECI Ensaio de Comparação Interlaboratorial

FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FDA *Food and Drug Administration*

IPAC Instituto Português de Acreditação

ISO *International Organization for Standardization* (Organização Internacional de Normalização)

LD Limite de deteção

LQ Limite de quantificação

MRC Material de Referência Certificado

MRI Material de Referência Interno

NP Norma Portuguesa

PAFQ Procedimento de análises físico-químicas

PCQ Procedimento de Controlo da Qualidade

SCQ Sistema de Controlo da Qualidade

SGQ Sistema de Gestão da Qualidade

USDA *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)

I. INTRODUÇÃO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A preocupação das indústrias alimentares na resposta às exigências do mercado é cada vez maior, procurando a melhor qualidade dos seus produtos com menor custo. A qualidade e segurança alimentares são dois conceitos que têm adquirido cada vez maior importância neste tipo de indústria.

Em 1996, no *World Food Summit*, foi definido que existe segurança alimentar quando “todas as pessoas, em qualquer altura, têm acesso físico e económico a alimentos nutritivos suficientes e seguros que respondam às necessidades da dieta e a alimentos para uma vida ativa e saudável”. Assim, o conceito de segurança alimentar está assente em quatro pilares: acessibilidade, disponibilidade, utilização e estabilidade (FAO & ESA 2006; Napoli et al. 2011). Segundo a norma ISO 22000:2005, a segurança alimentar é o “conceito de que um género alimentício não causará dano ao consumidor quando preparado e/ou ingerido de acordo com a utilização prevista” (ISO 2005c).

O conceito de qualidade alimentar, por sua vez, pode ter uma vasta gama de definições. De um ponto de vista regulatório, qualidade alimentar é associada à integridade (limpeza e segurança do produto alimentar), identidade (validade no que toca a peso, espécie e características gerais do produto alimentar) e características de frescura (grau de decomposição física, química e microbiológica) de um alimento (York 1995). Segundo a norma ISO 9000:2005, qualidade alimentar refere-se ao “grau no qual um conjunto de características inerentes satisfaz a requisitos” (ISO 2005a).

No que se relaciona com estes dois conceitos, existem três questões importantes e que estão interligadas entre si: a procura do consumidor por qualidade e segurança alimentares, a provisão de qualidade e segurança alimentares e a perceção do consumidor da qualidade e segurança alimentares. A primeira questão prende-se, essencialmente, com as preferências do consumidor no sentido da predisposição a pagar mais por um alimento de maior qualidade e/ou segurança. Relativamente à segunda situação, esta é mais dependente das empresas do setor, tendo sempre em conta regulamentações e legislações. A perceção do consumidor foca-se, principalmente, na resposta à pergunta “*O que motiva um consumidor a comprar um produto alimentar em detrimento de outro?*”. Quando um produto alimentar é considerado atrativo por parte do consumidor, este facto está intimamente ligado à sua perceção das características do

produto, na forma como o mesmo pode interferir na sua vida. Esta questão encontra-se, de alguma maneira, na interseção de outras questões, na medida em que esta percepção é influenciada pela predisposição de um consumidor para pagar mais por um alimento cuja empresa que o comercializa tem especial atenção a questões relacionadas com a segurança e qualidade alimentares (Grunert 2005).

É neste contexto que surgem cada vez mais empresas focadas na melhoria da segurança e qualidade alimentares através de investigação nutricional e inovação em todos os passos da cadeia de valor dos produtos alimentares.

2. OBJETIVOS DO ESTÁGIO

O presente relatório surge no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Biotecnologia Alimentar da Universidade de Aveiro, desenvolvido na empresa *Silliker Portugal S.A.*, em Vila Nova de Gaia, uma empresa líder de mercado no setor em que opera e que aposta na excelência científica para responder às necessidades crescentes do mercado.

O estágio curricular com duração de nove meses teve como objetivos a aquisição de competências na validação de métodos de análise química em produtos alimentares, com recurso a técnicas clássicas de química analítica e técnicas instrumentais, em contexto de trabalho num laboratório acreditado. Numa primeira fase, o estágio consistiu na integração na empresa, através do acompanhamento de ensaios acreditados implementados no Laboratório de Química, adaptação, conhecimento e utilização dos equipamentos e respetivo *software* analítico e, ainda, utilização das ferramentas do controlo da qualidade implementadas no laboratório.

Pretendeu-se com este estágio apoiar na validação de dois métodos de análise já implementados na empresa – *Determinação de matéria gorda total em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 232) e *Determinação da acidez em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 197) – e validar um método de forma a que o mesmo pudesse vir a ser implementado na empresa e acreditado – *Determinação da acidez titulável em leites fermentados* (norma ISO/TS 11869). Pretendeu-se, com estas validações, demonstrar que os procedimentos analíticos alusivos às normas mencionadas são apropriados para finalidade desejada.

Os métodos analíticos descritos foram realizados experimentalmente e validados internamente, em condições de análise de amostras reais. Por questões de confidencialidade das normas internas utilizadas, os procedimentos foram descritos neste relatório de uma forma mais geral.

No âmbito deste estágio, foi avaliada a precisão dos métodos (repetibilidade e precisão intermédia), sendo que estes serão os parâmetros abordados com mais detalhe neste relatório.

3. A EMPRESA DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO

3.1. INSTITUT MÉRIEUX E MÉRIEUX NUTRISCIENCES

Marcel Mérieux estabeleceu o *Institut Mérieux* em 1897, líder mundial no campo das vacinas humanas e veterinárias. Depois de aquisições de outras empresas, existem, atualmente, cinco companhias que fazem parte do grupo *Institut Mérieux* (**Figura 1**).



Figura 1 – Logótipos das cinco empresas pertencentes ao grupo *Institut Mérieux* – *Biomérieux*, *Mérieux Développement*, *Transgene*, *ABL Inc.*, *Mérieux NutriSciences* (da esquerda para a direita).

A *Mérieux NutriSciences* foi criada em 1990, na sequência da ampliação do instituto de forma a incluir áreas de segurança alimentar e da nutrição. Surgiu através da aquisição da *Silliker*, empresa Norte Americana sediada em Chicago e um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar.

A *Mérieux NutriSciences* tem como missão proteger a saúde dos consumidores, disponibilizando uma vasta oferta de serviços analíticos e de consultadoria para as indústrias do setor alimentar e da nutrição, prestando serviços que permitem desenvolver e implementar programas integrados para proteção dos seus produtos alimentares, minimizar os riscos e proteger o valor da marca (*Mérieux NutriSciences Portugal 2017d*).

A *Mérieux NutriSciences* engloba, ainda, o projeto-piloto *Biofortis*, cuja principal função é a inovação na área da nutrição, através do design e coordenação de estudos clínicos relacionados com a nutrição, saúde intestinal, imunidade, metabolismo cardíaco e diabetes. A *Biofortis* realiza, ainda, estudos em alimentos, nutrientes e suplementos de forma a obter mais informações acerca da segurança alimentar, tolerâncias, biodisponibilidade e eficácia, assim como testes ao microbioma humano (*Mérieux NutriSciences Portugal 2017b*).

Estando presente em 22 países, a *Mérieux NutriSciences* é uma rede de cerca de 100 laboratórios acreditados segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, com 50 anos de experiência e quase 7000 funcionários em todo o mundo (*Mérieux NutriSciences Portugal 2017e*).

3.2. *SILLIKER PORTUGAL S.A.*

A *Silliker Portugal S.A.* é uma empresa do setor agro-alimentar que disponibiliza serviços que permitem uma abordagem integrada da higiene e segurança alimentares, promovendo uma melhoria contínua e significativa na gestão da qualidade. Engloba serviços de gestão da qualidade, segurança alimentar e proteção da marca (*Silliker Portugal S.A. 2016*). Nascida em Vila Nova de Gaia em julho de 1992, foi denominada inicialmente por *EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda*. Em 1993, pela acreditação do seu laboratório, a empresa foi integrada no Sistema Português da Qualidade. Em 2005, a *EGI* mudou para novas instalações, na Zona Industrial dos Terços, em Canelas, local de atividade atual. Em 2008, a *EGI* foi adquirida pela multinacional norte-americana *Silliker*, passando a apresentar-se como *Mérieux NutriSciences* (**Figura 2**) (*Mérieux NutriSciences Portugal 2017e*).



Figura 2 – Instalações da *Silliker Portugal S.A.*

Os ensaios e serviços mais comuns da *Silliker Portugal S.A.* incluem ensaios laboratoriais (microbiológicos e físico-químicos), auditorias a sistemas de gestão da qualidade e segurança alimentar (incluindo a risco de alergénios), consultoria (gestão da segurança alimentar, consultoria técnica, rotulagem e legislação), formação (inter- e intra-empresas), investigação e desenvolvimento (estudos de vida útil e de estabilidade, validação de processos e produtos, inovação) e ainda de análise sensorial (descritiva, estudo ao consumidor, consultoria e formação) (Silliker Portugal S.A. 2016).

Os laboratórios da *Silliker Portugal S.A.* utilizam uma grande variedade de instrumentação e tecnologias, sendo que aplicam ensaios em matrizes alimentares que incluem carne e derivados, pescado e derivados, laticínios, água e bebidas, frutas e vegetais, cereais e grãos, ingredientes e aditivos, alimentação animal, produtos acabados e materiais em contacto com produtos alimentares (Mérieux NutriSciences Portugal 2017c).

De forma a que as informações nutricionais sejam confirmadas e validadas analiticamente, para serem incluídas nos rótulos das embalagens, a *Silliker Portugal S.A.* oferece uma ampla gama de análises nutricionais, entre os quais (Mérieux NutriSciences Portugal 2017a):

- Lípidos, gorduras e óleos
 - perfis de ácidos gordos, ácidos gordos *trans*, colesterol, ácidos gordos ómega, ácidos gordos livres, índice de peróxidos, ácido tiobarbitúrico
- Proteínas
 - perfis de aminoácidos, teor de proteínas
- Hidratos de carbono
 - fibra alimentar total, fibra alimentar total segundo o *Codex Alimentarius*, novas fibras, fibra bruta, edulcorantes, amido, açúcares e perfis de açúcares (rotinas elementares ou mais completas), polióis
- Vitaminas
 - hidrossolúveis, lipossolúveis
- Minerais
 - minerais mais comuns, análise individual de elementos, rotinas elementares ou mais completas
- Composição básica
 - acidez, cinza, gordura, fibra bruta, humidade, proteína, sal

4. SISTEMA DE GESTÃO DE QUALIDADE DA *SILLIKER PORTUGAL S.A.*

Um dos requisitos para a acreditação de um laboratório segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2005 é a existência de um sistema de gestão de qualidade (SGQ) documentado (ISO 2005b).

A *Silliker Portugal S.A.* tem todas as suas políticas de gestão da qualidade documentadas, sendo que o SGQ se encontra devidamente estruturado de acordo com uma pirâmide documental (**Figura 3**). O topo da pirâmide (Manual da Qualidade) representa o documento mais importante, no qual está incluída a apresentação da empresa, a sua política de qualidade e os objetivos e requisitos do SGQ da empresa (Silliker Portugal S.A. 2016).

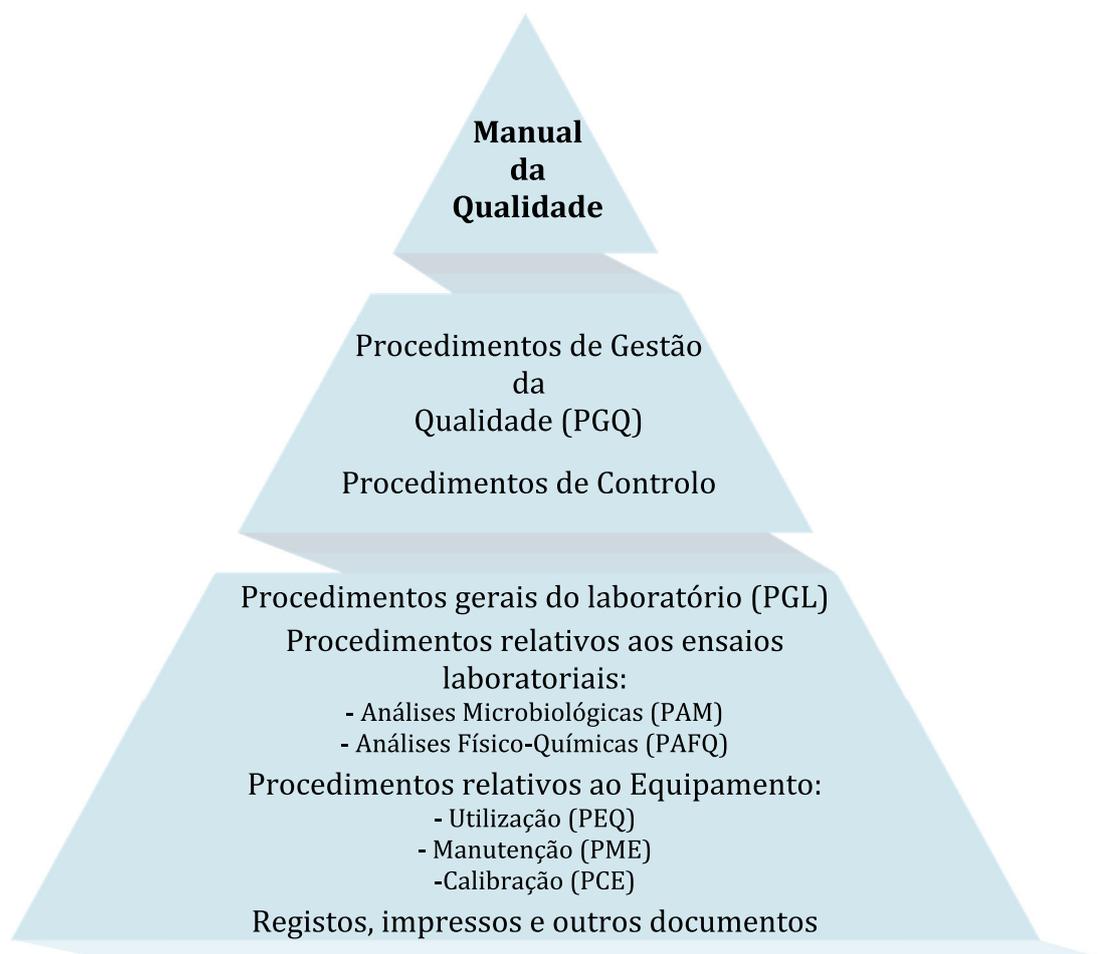


Figura 3 – Pirâmide documental da *Silliker Portugal S.A.* Adaptado de (Silliker Portugal S.A. 2016).

Todos os ensaios laboratoriais realizados na *Silliker Portugal S.A.* têm por base uma norma, quer seja internacional (como por exemplo ISO), portuguesa (NP) ou interna (PAM ou PAFQ). Todas as normas utilizadas seguem uma estrutura semelhante.

5. MÉTODOS DE ENSAIO UTILIZADOS NO ÂMBITO DESTE ESTÁGIO

No âmbito deste estágio curricular, foram validados dois métodos de análise já implementados na empresa – *Determinação de matéria gorda total (PAFQ. 232)* e *Determinação da acidez (PAFQ. 197)* em novas matrizes – e validado um método ainda não implementado no laboratório – *Determinação da acidez titulável em leites fermentados (ISO/TS 11869)*.

Neste tipo de ensaios, é necessário que as amostras analisadas sejam estáveis, suficientemente homogêneas e representativas da matriz e/ou da concentração do analito que se pretende analisar (Ellison et al. 2009).

5.1. MATÉRIA GORDA

A classificação dos lípidos poder ser feita com base nas suas propriedades físicas à temperatura ambiente (óleos no caso de serem líquidos e gorduras se forem sólidos), na sua polaridade (polares ou apolares), no facto de serem ou não essenciais para os humanos ou na sua estrutura (simples ou complexa) ou na sua solubilidade (solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água), sendo a insolubilidade em soluções aquosas uma das propriedades usadas para separar a matéria gorda de compostos como proteínas e hidratos de carbono. No entanto, existem alguns lípidos parcialmente solúveis em água e/ou parcialmente insolúveis em solventes orgânicos. Ácidos gordos de cadeia muito curta, por exemplo, são miscíveis com água e insolúveis em solventes orgânicos (Nielsen 2017; Simpson 2012; Akoh 2017).

A nível nutricional e fisiológico, os lípidos são muito importantes pelo seu papel energético e pela fonte de ácidos gordos essenciais e vitaminas. Algumas propriedades deste tipo de moléculas são indispensáveis no manuseamento e processamento alimentares (Belitz et al. 2009).

Na natureza, os lípidos podem estar associados a outras moléculas através de ligações de *van der Waals* e ligações de hidrogénio e eletrostáticas, principalmente com proteínas, e ainda por ligações covalentes, quer entre lípidos, quer com hidratos de carbono ou proteínas (Akoh 2017).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), o conteúdo total de lípidos em produtos alimentares é a “soma dos componentes com características lipídicas que são extraídos por métodos de procedimentos fidedignos e apropriados”. Assim, uma análise quantitativa e qualitativa dos lípidos de uma forma exata e precisa nos produtos alimentares é muito importante quer para a realização do rótulo nutricional, para garantir se o produto está de acordo com as especificações do fabricante ou simplesmente para perceber e estudar o efeito dos lípidos nas características dos alimentos. Cerca de 95% dos lípidos presentes nos produtos alimentares são triacilgliceróis, sendo que os restantes são mono- e diacilgliceróis, fosfolípidos e glicolípidos (Nielsen 2017; Akoh 2017).

O conteúdo total de lípidos é usualmente determinado através de métodos de extração com recurso a solventes orgânicos, quer isoladamente quer combinados. Este tipo de métodos tem em conta a hidrofobicidade dos lípidos. A variada gama desta propriedade química dos diferentes lípidos leva a que seja difícil selecionar um solvente universal para a sua extração e quantificação. Para além deste tipo de métodos, outros que não utilizam este tipo de solventes ou métodos instrumentais apresentam-se como viáveis para este tipo de ensaios, utilizando normalmente as propriedades físicas dos lípidos para a sua determinação (Nielsen 2017; Simpson 2012).

Os procedimentos tipicamente utilizados para a extração de lípidos (com solvente) e posterior determinação do seu teor incluem alguns passos-chave (Akoh 2017):

1. Pré-tratamento da amostra (que pode incluir secagem, redução de tamanho, hidrólise, etc.)
2. Separação da fração líquida (incluindo fração orgânica e aquosa) da fase sólida
3. Separação da fração lipídica da fração aquosa (extração)
4. Remoção do solvente e secagem do extrato

O pré-tratamento da amostra tem como objetivo facilitar a extração lipídica. No caso da secagem, aconselha-se este passo uma vez que muitos solventes orgânicos utilizados na extração não penetram facilmente em amostras húmidas, dado que poderão ser higroscópicos (como é o caso do éter dietílico, por exemplo) e ficam saturados ao entrarem em contacto com a amostra, levando a uma extração lipídica não eficiente. Um outro fator que influencia a eficiência da extração lipídica é o tamanho das partículas da amostra. A redução do tamanho das partículas leva a um aumento da área superficial, permitindo uma maior área de contacto com o solvente e melhorando a extração. É importante ter em conta, também, que em muitas matrizes alimentares os lípidos se encontram ligados a outros constituintes, como proteínas e hidratos de carbono, por ligações de vários tipos. De forma a tornar os lípidos mais disponíveis para o solvente utilizado na extração, recorre-se muitas vezes a uma hidrólise (ácida ou básica) prévia, rompendo as ligações covalentes e iónicas que possam estar estabelecidas. A hidrólise básica é, normalmente, utilizada para produtos lácteos, sendo que a hidrólise ácida é utilizada numa variada gama de matrizes, normalmente utilizando HCl 3 a 6 mol/L) (Nielsen 2017; Akoh 2017).

Durante a extração com solvente, ligações de *van der Waals*, ligações de hidrogénio e eletrostáticas são quebradas. As ligações covalentes permanecem intactas, podendo haver a necessidade, então, de uma pré-hidrólise. Relativamente à extração, o tipo de solvente e o método escolhido dependem da natureza da amostra, do tipo de extrato lipídico desejado e da própria capacidade analítica do laboratório que o realiza. A característica principal do solvente selecionado é, então, a alta solubilidade dos lípidos no mesmo, acoplado com a baixa ou nenhuma solubilidade de proteínas e hidratos de carbono. Para além de ser importante que o solvente seja capaz de penetrar toda a amostra eficazmente, este também deve ter um ponto de ebulição relativamente baixo, para que evapore rapidamente e para evitar a deposição de resíduos até à análise dos lípidos. É de realçar que o solvente de extração escolhido pode ter, também, um papel importante na prevenção da hidrólise enzimática dos lípidos, evitando que ocorram reações paralelas. Os solventes mais utilizados para a extração lipídica são álcoois, acetona, acetonitrilo, éteres, halocarbonetos, hidrocarbonetos ou a conjugação de vários. Dentro destes grupos, os mais comuns são éter dietílico e éter de petróleo (Akoh 2017).

Para determinar o teor de matéria gorda total, existem disponíveis diversos métodos e equipamentos, sendo que os métodos gravimétricos são os mais utilizados. Neste tipo de procedimentos, os lípidos são extraídos de forma contínua, semi-contínua ou descontínua. No primeiro caso, o solvente é aplicado na amostra na forma de uma corrente contínua por um determinado período de tempo, levando a uma extração mais rápida, mas pode originar uma extração incompleta da matéria gorda. Por outro lado, numa extração semi-contínua, o solvente acumula-se numa câmara de extração durante algum tempo e depois volta a ser canalizado para recipiente próprio, demorando mais tempo do que no primeiro caso, mas garantindo extrações mais eficientes. Por fim, uma extração descontínua não contém uma corrente de solvente, sendo que a amostra é extraída com um volume fixo do mesmo. Em todos os casos, o conteúdo em lípidos é quantificado pela perda de massa da amostra ou pela massa de lípidos ganha após extração, dependendo do método e equipamento utilizados (Akoh 2017).

Um dos métodos mais fáceis e muito utilizado para determinar o teor de matéria gorda total numa amostra alimentar é o método de *Soxhlet*, um procedimento semi-contínuo que utiliza quantidades de solventes orgânicos relativamente pequenas. Neste método, as amostras sólidas são colocadas numa câmara e completamente submersas no solvente quente, de forma a extrair a fração lipídica. O processo é repetido várias vezes até toda a matéria gorda ser removida. O teor total em lípidos, é depois calculado pela diferença de massas – pela perda de massa da amostra após extração ou pelo ganho de massa no reservatório para o qual é direcionada a matéria gorda depois da sua remoção (Simpson 2012).

A FDA apresenta uma dose diária recomendada (DDR) de vários constituintes dos alimentos, funcionando como referência aos consumidores de forma a que possam planear a sua dieta com base na informação contida nos rótulos. Relativamente à quantidade total de matéria gorda, é recomendada a ingestão de 65 – 80 g por dia, dependendo do sexo, idade e atividade física (Gebhardt & Thomas 2002).

5.2. ACIDEZ TITULÁVEL

Na análise alimentar, os conceitos de pH e acidez titulável estão interrelacionados, mas são determinados de formas diferentes e dão informações distintas relativamente à qualidade alimentar. No que se refere ao impacto que os ácidos presentes num determinado alimento podem ter no seu sabor, a acidez titulável é um parâmetro mais adequado do que o pH. No entanto, para outro tipo de análises (por exemplo, para estudar o crescimento de microrganismos nos alimentos), o pH é mais relevante (Nielsen 2017).

A acidez titulável é a medida da concentração total de ácidos num determinado alimento, determinada através da neutralização dos ácidos presentes com uma quantidade conhecida (massa ou volume) de uma solução padrão básica. O volume e concentração do titulante utilizado, juntamente com a massa ou volume da amostra titulada, permitem calcular a acidez titulável. O ponto de equivalência é o ponto teórico no qual a quantidade de titulante adicionado é equivalente quimicamente à quantidade de analito da amostra (titulado). No entanto, experimentalmente, não é possível determinar este parâmetro. Assim, o que se faz normalmente é estimar a sua posição por observação de mudanças associadas ao ponto de equivalência, denominando-se este de ponto termo. Este pode ser um pH alvo (no caso de uma titulação potenciométrica) ou a mudança de cor (no caso de uma titulação à viragem de um indicador). Normalmente, as soluções-padrão usadas como titulantes neste tipo de neutralizações são ácidos ou bases fortes, uma vez que reagem de forma mais completa com o analito do que ácidos ou bases fracas, levando a que o ponto termo da titulação seja próximo do ponto de equivalência teórico (Nielsen 2017; Harvey 2008; Skoog et al. 2014).

Uma vez que a titulação não diferencia os vários ácidos presentes, a acidez titulável é normalmente expressa para o ácido orgânico predominante. Na maioria dos casos, é possível identificar qual o ácido em maior quantidade. No entanto, mesmo nos casos em que existe mais do que um ácido presente em grandes concentrações, a acidez titulável não é afetada por uma predominância de vários ácidos ou pela seleção incorreta do ácido maioritariamente presente, uma vez que todos os ácidos comuns em alimentos têm uma massa equivalente semelhante (Nielsen 2017). Os ácidos mais comuns nos alimentos são orgânicos, sendo o cítrico, málico, láctico, tartárico e acético os predominantes. Têm um papel importante não só no sabor, mas também na cor, estabilidade microbiana e qualidade dos alimentos (Nielsen 2017).

6. ACREDITAÇÃO DE LABORATÓRIOS E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

A acreditação é um procedimento pelo qual uma entidade competente e autorizada atribuiu um reconhecimento formal de que o laboratório em causa é competente tecnicamente para efetuar atividades específicas. Este tipo de avaliação é realizado através de ensaios, calibrações, certificações e/ou inspeções. A acreditação pode incluir inspeção qualitativa às atividades desenvolvidas no laboratório de forma a averiguar parâmetros como as boas práticas, a documentação adequada, a validação de métodos, a participação em ensaios interlaboratoriais. Cada Estado-Membro da União Europeia tem um único organismo nacional de acreditação, sujeito a legislação comunitária. Em Portugal, o organismo responsável é o Instituto Português de Acreditação (IPAC), respondendo ao Regulamento (CE) n.º765/2008 e atuando sob a supervisão do Ministro da Economia (IPAC 2017).

Apesar da acreditação de um laboratório ser normalmente voluntária, pode ser legalmente exigida quando está relacionada com a segurança de determinado produto ou serviço. Após acreditação de um determinado laboratório, serão realizadas auditorias externas periódicas, que poderão não ser anunciadas (Christian 2004). É de salientar que a acreditação difere da certificação em vários aspetos, não só nos critérios e metodologias usadas, como também pelo facto de existir apenas uma entidade acreditadora – em Portugal, o IPAC. Pelo contrário, podem existir várias entidades certificadoras, entidades essas que são, também, sujeitas a regulação por parte do IPAC (IPAC 2017).

A Norma Portuguesa EN ISO/IEC 17025:2005 - *Requisitos gerais para competência para laboratórios de ensaio e calibração* (ISO 2005b) tem como objetivo estabelecer um sistema de gestão de laboratórios que especifica requisitos gerais de competência para realizar ensaios e/ou calibrações realizados por métodos normalizados, não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório. Segundo a mesma, “a validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos”.

A validação de um método é o processo que define um requisito analítico e a confirmação de que o mesmo tem capacidades consistentes com o que é requerido. Muitas vezes, a validação de um método é feita como parte do processo do desenvolvimento do mesmo. No entanto, é importante realçar que deve haver uma

validação formal da versão finalizada do método em causa (Christian 2004; Magnusson & Ornemark 2014).

Por outro lado, a norma ISO 9000:2005 (ISO 2005a) define verificação como a “confirmação, através da apresentação de evidências objetivas, de que um determinado requisito foi cumprido”. Este tipo de avaliação é realizado quando um laboratório pretende adotar um procedimento já validado, mas tem que proceder à confirmação da sua capacidade para aplicar o método. Isto é realizado através de trabalho laboratorial de forma a demonstrar que o método pode ser utilizado no laboratório em causa com amostras rotineiras (Magnusson & Ornemark 2014). Também a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 pressupõe que um laboratório confirme que é capaz de utilizar devidamente métodos normalizados (ISO 2005b).

A *RELACRE - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal* tem como missão apoiar e promover os laboratórios portugueses, de forma a contribuir para o reconhecimento, desenvolvimento e credibilização da sua atividade. Segundo o Guia Relacre 3 (RELACRE 1996a), “um resultado para ser dado como válido tem de satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos.”, sendo este o princípio básico da validação de resultados.

Usualmente, as características estudadas aquando da validação de um método são (Magnusson & Ornemark 2014):

- Gama de trabalho/Linearidade
- Limites analíticos (detecção e quantificação)
- Sensibilidade analítica
- Precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade)
- Exatidão

A gama de trabalho de um determinado método é o intervalo de concentrações para o qual são obtidos valores de exatidão e precisão aceitáveis. Inclui, muitas vezes, avaliação da linearidade (aplicável em métodos que envolvam o traçado de curvas de calibração). O estudo deste parâmetro verifica se a resposta é linearmente proporcional à concentração do analito na gama de trabalho definida para um determinado método. O estudo deve ser feito com soluções-padrão medidas em triplicado, em cinco níveis de concentração. O estudo da gama de trabalho e da linearidade deve ser realizado durante a fase de validação e implementação do método no laboratório. No entanto, se estes fatores estiverem já descritos na norma, poderá ser desnecessário avaliar novamente (Christian 2004; RELACRE 2000). No caso de métodos que não envolvam o traçado de curvas de calibração, o procedimento relativo ao controlo da qualidade PCQ.34.6 utilizado na *Silliker Portugal S.A.* prevê que a gama de trabalho possa ser determinada em função da quantidade de amostra disponível, da boa visualização dos pontos de viragem e/ou volumes gastos em volumetria.

O limite de deteção (LD) é o nível de concentração mais baixo que pode ser detetado de forma a ser estatisticamente diferente do branco. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito em estudo. Existem muitas formas de determinar este parâmetro. Tipicamente, são analisados brancos da matriz em análise, replicados (entre 10 e 20 ensaios), de forma a determinar um valor médio e o seu desvio-padrão. O limite de deteção é calculado pela concentração de analito que dá uma resposta igual ao sinal do branco mais três vezes o desvio-padrão (Christian 2004; RELACRE 2000).

O limite de quantificação (LQ) é o valor mínimo que um determinado analito pode ser quantificado numa determinada matriz, com níveis de precisão e exatidão aceitáveis. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração. O limite de quantificação pode, também, ser calculado pela concentração de analito que dá uma resposta igual ao sinal do branco mais dez vezes o desvio-padrão (Christian 2004; RELACRE 2000).

A sensibilidade analítica é capacidade de distinguir duas concentrações diferentes e é determinada pela derivada de primeira ordem da curva de calibração (ou declive, se a calibração for definida por um modelo linear). A sensibilidade é, então, uma característica que está associada à magnitude do sinal (Christian 2004; RELACRE 2000).

Um estudo da precisão consiste na análise repetida de uma determinada amostra sob as condições requeridas. A precisão tem em conta, por um lado, a concordância entre resultados obtidos pelo mesmo procedimento, nas mesmas condições (repetibilidade) e, por outro, fazendo variar as condições (reprodutibilidade), sendo que essas condições incluem o laboratório, o operador, o equipamento e/ou o intervalo de tempo em que se realiza a análise. De forma a contemplar a situação de variabilidade dos resultados a longo prazo, a precisão inclui, ainda, o conceito de precisão intermédia, que avalia a concordância dos resultados obtidos no mesmo laboratório, utilizando o mesmo método, mas em ensaios espaçados no tempo e independentes (Ellison et al. 2009; RELACRE 1996a).

A exatidão avalia a concordância entre o valor obtido experimentalmente e o valor aceite como verdadeiro convencionalmente. Este 'valor verdadeiro' é, por vezes, difícil de definir, pelo que se aceita internacionalmente como valor verdadeiro o valor certificado de um Material de Referência Certificado (MRC) ou o valor médio obtido em Ensaios Interlaboratoriais (ECI's). Um MRC é um material que tem o valor da(s) sua(s) propriedade(s) certificado por um processo validado tecnicamente e por uma entidade certificadora competente e em que os valores de cada parâmetro têm uma incerteza associada. Assim, o laboratório pode avaliar o seu desempenho pela análise dos MRC, por comparação do valor obtido com o valor certificado e determinação da exatidão e erro associado. Conforme os requisitos de qualidade de cada laboratório, o mesmo poderá eliminar ou aceitar as causas de um eventual desvio dos resultados obtidos relativamente ao intervalo de incerteza indicado para o valor certificado. De realçar que os MRC's não devem ser usados para traçar curvas de calibração, mas apenas para a sua verificação periódica, dependendo da frequência com que esse tipo de análises é realizado no laboratório, do grau de conhecimento das próprias amostras e da complexidade dos procedimentos utilizados. No entanto, uma análise por ano é um valor utilizado normalmente como referência (RELACRE 1996a).

Relativamente aos ensaios de comparação interlaboratorial, estes baseiam-se na realização e avaliação de ensaios ao mesmo material por pelo menos dois laboratórios (preferencialmente mais do que dez). De forma a avaliar o desempenho do laboratório em ensaios interlaboratoriais de aptidão ou análise de MRC, é utilizada uma escala de "Z-scores". No caso de o resultado obtido ser considerado questionável ou incorreto, deve

ser elaborado um plano de ações corretivas, de forma a procurar as causas, corrigi-las e reavaliar para verificar a eliminação do erro (RELACRE 1996a).

A incerteza exprime a possibilidade de erro do resultado, sendo este a diferença entre o valor obtido experimentalmente e o valor aceite como verdadeiro convencionalmente. Para o cálculo da incerteza, devem ser consideradas a precisão e exatidão do laboratório como parte das componentes aleatória e sistemática, respetivamente. A incerteza é uma forma de medição da qualidade de um resultado (RELACRE 1996a).

De forma a garantir o cumprimento de todos os requisitos de qualidade pressupostos, devem existir critérios de aceitação e rejeição da qualidade do resultado obtido, de uma forma clara e quantitativa, para que a avaliação não seja ambígua e a verificação do seu cumprimento seja fácil. Este tipo de critérios deve incluir não só aqueles realizados no final da análise, mas sub-critérios que possam controlar e gerir as diferentes fases do processo de obtenção do resultado e ações corretivas no caso de rejeição de resultados (RELACRE 1996a).

Um método deve ser validado quando é necessário demonstrar que o seu modo de funcionamento é adequado para um determinado objetivo. A validação deve ser aplicada a métodos novos cuja viabilidade necessite de ser testada, a métodos já existentes mas que irão ser utilizados num laboratório pela primeira vez ou a métodos já existentes e utilizados num laboratório mas cuja aplicação será modificada ou expandida para novas matrizes. Além disso, a validação é também requerida em casos nos quais é necessário demonstrar a equivalência de resultados obtidos por dois métodos (como, por exemplo, no caso de um ter sido recentemente desenvolvido e o outro ser um método *standard* já existente) (Miller & Miller 2010; Magnusson & Ornemark 2014; ISO 2005b).

A validação deve ser tão exaustiva quanto o necessário para ir de encontro aos seus requerimentos e/ou aplicação – dependendo da natureza das alterações ao método desenvolvido e/ou circunstâncias em que o método será usado (RELACRE 2000; ISO 2005b; Magnusson & Ornemark 2014). Desta forma, a validação de métodos deve ser progressivamente aplicada segundo a **Figura 4**.

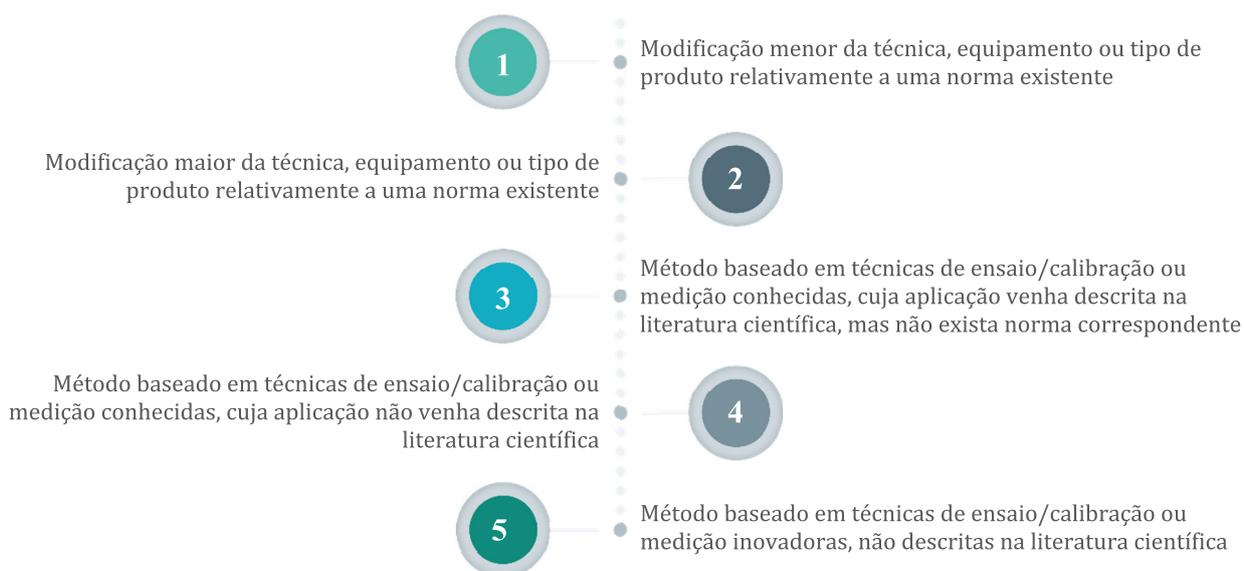


Figura 4 – Grau de validação de métodos dependendo do caso. A validação é progressivamente mais exigente e exaustiva no sentido 1-5. O mais frequente são situações que se enquadram nos valores 1 e 2, sendo que os valores 4 e 5 se verificam principalmente em laboratórios de investigação (adaptado de (RELACRE 2000)).

A validação deve ser realizada seguindo as diretrizes de um procedimento documentado, onde está indicada a descrição e caracterização do método. Existem alguns elementos identificadores que este tipo de documento deve conter, à semelhança de uma norma (RELACRE 2000). No caso da *Silliker Portugal S.A.*, a validação dos seus métodos tem por base o procedimento relativo ao controlo da qualidade PCQ.34.6, com os objetivos de definir metodologias e ferramentas usadas na validação de métodos em análise química, identificar os responsáveis na empresa por aquela validação e definir a gestão dos ensaios do âmbito da acreditação flexível global. A primeira versão deste procedimento foi realizada a 17 de setembro de 2012, sendo que a versão utilizada atualmente corresponde à sexta revisão, emitida em 21 de julho de 2017. Os seus elementos identificadores são apresentados na **Figura 5**.

Título ou designação do ensaio		Código identificador do ensaio
Breve descrição do ensaio		Revisão/edição
Responsáveis pela sua elaboração	Responsáveis pela sua aprovação	Número da página / número total de páginas
		Data de emissão

Figura 5 – Elementos identificadores da descrição de qualquer método de ensaio na *Silliker Portugal S.A.*

A descrição do método deve, também, ser realizada de forma detalhada, sendo que a *Silliker Portugal S.A.* apresenta geralmente os elementos descritivos do método com a seguinte organização:

0. Índice
1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Histórico de revisões
4. Termos e definições
5. Responsabilidades
6. Procedimento
 - a. Resumo do procedimento
 - b. Reagentes
 - c. Aparelhos e utensílios
 - d. Preparação da amostra
 - e. Técnica
 - f. Resultados
 - g. Controlo da qualidade
7. Documentos associados
8. Segurança
9. Documentos de referência
10. Fluxograma (quando aplicável)
11. Anexos

Adicionalmente, todos os laboratórios devem possuir um Sistema de Controlo da Qualidade (SCQ) dos resultados obtidos, englobando as técnicas e atividades operacionais que respondem às exigências de qualidade. Este tipo de SCQ pode englobar dois tipos de ações (1996a):

- Realizadas pelo próprio laboratório, mas que dependem de intervenção externa (SCQ externo). São indispensáveis para qualquer laboratório, avaliando geralmente a exatidão dos resultados obtidos;
- Cujas implementações dependem apenas do próprio laboratório (SCQ interno). Visam geralmente controlar a precisão dos resultados obtidos.

II. REALIZAÇÃO EXPERIMENTAL

1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS A ANALISAR

À semelhança de todas as amostras para análise, as amostras utilizadas para a validação de métodos são preparadas na sala de preparação de amostras (SPA), tendo em conta o procedimento interno PAFQ.044 – *Métodos de preparação das amostras para análise*.

Para o método interno PAFQ. 232 – *Determinação de matéria gorda total*, todas as amostras utilizadas para validação eram secas e foram previamente trituradas e homogeneizadas de forma a que as mesmas fossem suficientemente representativas da matriz que se pretendia analisar.

O método interno PAFQ. 197 – *Determinação da acidez* foi validado para matrizes muito variadas. Todas as amostras foram analisadas sem qualquer tratamento à exceção do produto fermentado à base de soja, que foi triturado uma vez que continha pedaços de fruta, e do queijo flamengo, que foi picado.

Por fim, para análise dos iogurtes para validação da norma ISO/TS 11869 – *Determinação da acidez titulável em leites fermentados*, o iogurte com pedaços de fruta foi triturado.

Durante o período de validação, as amostras secas foram armazenadas num local apropriado e as amostras frescas e mais perecíveis foram guardadas no frigorífico.

2. MATÉRIA GORDA

2.1. DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA GORDA TOTAL PELO MÉTODO PAFQ. 232

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) apresenta uma lista dos valores de nutrientes em alimentos de maior consumo, incluindo o teor de matéria gorda total. No entanto, é de salientar que esses valores podem variar de alimento para alimento, com base no tipo de matérias-primas que são utilizadas e o tipo de processamento. Assim, é importante ter em conta não só estes valores, que podem funcionar como referência, mas também o valor descrito no rótulo de cada alimento. No presente trabalho, teve-se como objetivo validar este método em quatro grupos de alimentos, num total de oito matrizes alimentares. A **Tabela 1** apresenta as matrizes alimentares testadas, o valor expectável de teor total de matéria gorda com base em documentos oficiais e o teor de matéria gorda descrito no rótulo.

Tabela 1 – Matrizes analisadas para validação do método PAFQ. 232. Apresentam-se os valores de referência do teor de matéria gorda total, em g/100 g de amostra, para cada tipo de matriz (Gebhardt & Thomas 2002; USDA 2017), assim como o valor para o mesmo parâmetro incluído no rótulo da amostra utilizada para estudo da repetibilidade, nas mesmas unidades.

Grupo de alimentos	Matrizes analisadas	Teor de matéria gorda (g/100 g de amostra)	
		Valor de referência	Valor do rótulo
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	4,8	5,5
	Farinha não láctea	3,4	3,0
Alimentos para animais (simples e compostos) ¹	<i>Cat food</i>	ND	11,9 ± 0,9
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	0,5	0,7
	Cereal ¹	ND	10,54 ± 0,95
	<i>Corn flakes</i>	Tr ²	1,1
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Quinoa	5,8	6
	Sementes de linhaça	40,0	40

ND – Não disponível

¹ Amostras provenientes da *Bipea*

² *Trace* (Tr) – Valores de teor de matéria gorda entre 0 – 0,5 g/100g de amostra

A metodologia aplica-se a amostras de cereais e derivados, produtos dietéticos e suplementos alimentares, chocolates, alimentos simples e compostos para animais. Apesar deste método estar preparado para analisar amostras com um teor de matéria gorda entre 0 – 100 g/100 g de amostra, na *Silliker Portugal S.A.* é utilizado em amostras com teores de matéria gorda entre 0,5 – 50,0 g/100 g de amostra, correspondendo o teor de matéria gorda de 0,5 g/100 g ao limite de quantificação do método.

O procedimento utilizado na *Silliker Portugal S.A.* é realizado com auxílio de materiais e equipamentos *ANKOM* (**Figuras 6 e 7**), que apresentam procedimentos oficiais aprovados pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS), uma organização internacional com base nos Estados Unidos da América dedicada a dar apoio a todas as entidades envolvidas na análise de gorduras, óleos, surfactantes e outros materiais relacionados (AOCS 2017).

Todos os reagentes utilizados neste procedimento são de qualidade analítica e a água é desionizada. A amostra é previamente preparada de modo a obter uma amostra homogénea e representativa do produto a ser analisado. O procedimento de análise físico-química utilizado para determinação da matéria gorda total (PAFQ. 232), adaptado do procedimento aconselhado pelo fabricante (ANKOM 2017c), pode ser dividido em três etapas:

1. Hidrólise ácida – Numa primeira fase, são pesados entre 0,5 a 1,0 g de celite, um material inerte que facilita a dispersão da amostra, para um saco poroso *ANKOM^{XT4}* (**Figura 6A**) previamente seco. Estes sacos são produzidos com uma porosidade de 2-3 µm e os materiais utilizados na sua produção permitem o uso dos solventes orgânicos mais comuns (como éter de petróleo, hexano, éter etílico) e permitem encapsular uma variada gama de amostras para a extração de matéria gorda (ANKOM 2017). De seguida, são pesados entre 0,5 a 1,0 g de amostra no mesmo saco poroso e a massa registada. Dado que é possível ter acesso prévio ao teor de matéria gorda de todas as matrizes utilizadas para a validação deste método (**Tabela 1**), foi selecionada a massa de celite e de amostra de acordo com o critério enunciado na **Tabela 2**. No caso de análises de amostras para clientes, tenta-se utilizar este critério sempre que o teor aproximado de matéria gorda é conhecido.

Tabela 2 – Critério de seleção das massas de celite e amostra adequadas para cada tipo de matriz analisada, tendo em conta o teor de matéria gorda estimado de cada uma delas.

	Teor de matéria gorda estimado	
	Mais de 20%	Menos de 20%
Massa de celite (g)	1,0	0,5
Massa de amostra (g)	0,5	1,0

Por cada ciclo realizado (tipicamente com dez amostras), é realizado um branco, no qual o saco poroso contém apenas celite, e um padrão (DPCS). Dado que o tipo de material de referência deverá ter uma matriz semelhante às amostras analisadas, nas análises rotineiras com este método é utilizado o DPCS *Triscuit*. Com a unidade de selagem a quente (**Figura 6B**), os sacos porosos são, de seguida, fechados e o seu conteúdo homogeneizado por agitação. Seguidamente, são colocados no suporte da unidade de hidrólise *ANKOM HCI Hydrolysis System* (**Figura 6C**) e colocados na câmara da respetiva unidade (**Figura 7A**). É adicionado um volume de 500 mL de ácido clorídrico 4 mol/L e o equipamento é colocado em funcionamento tendo em conta um tempo de hidrólise de 60 minutos a 90 °C, e posterior neutralização com lavagem com água corrente durante 40 minutos. Após este processo, as amostras são lavadas uma a uma com água desionizada a ferver, de forma a garantir que toda a amostra foi neutralizada.

2. Secagem pós-hidrólise – Os sacos porosos são colocados entre camadas de papel absorvente e secos com auxílio da placa de secagem *ANKOM*. Após este processo, são colocados no suporte de secagem (**Figura 6D**) e na unidade *ANKOM RD Dryer* (**Figura 7B**), durante 30 minutos a 110 °C. Esta unidade tem como objetivo não só secar os sacos porosos contendo as amostras, mas também garantir, mais uma vez, a neutralização das mesmas, uma vez que contém um filtro específico para esse fim. Depois deste procedimento de secagem, as amostras são colocadas durante mais 30 minutos na estufa a 103 °C. Após arrefecerem dentro de um saco exsicante, os sacos que contêm amostra e o saco do branco são pesados e a sua massa registada.

3. Extração da matéria gorda – Colocam-se os sacos porosos no suporte metálico de extração (**Figura 6E**) do equipamento *ANKOM XT15 Extractor* (**Figura 7C**) e procede-se à extração da matéria gorda das amostras durante 90 minutos com éter de petróleo a 90 °C. Após este procedimento, os sacos são novamente secos numa estufa a 103 °C durante 30 minutos. Depois de arrefecerem dentro de um saco exsiccante, os sacos são pesados e a sua massa registada.

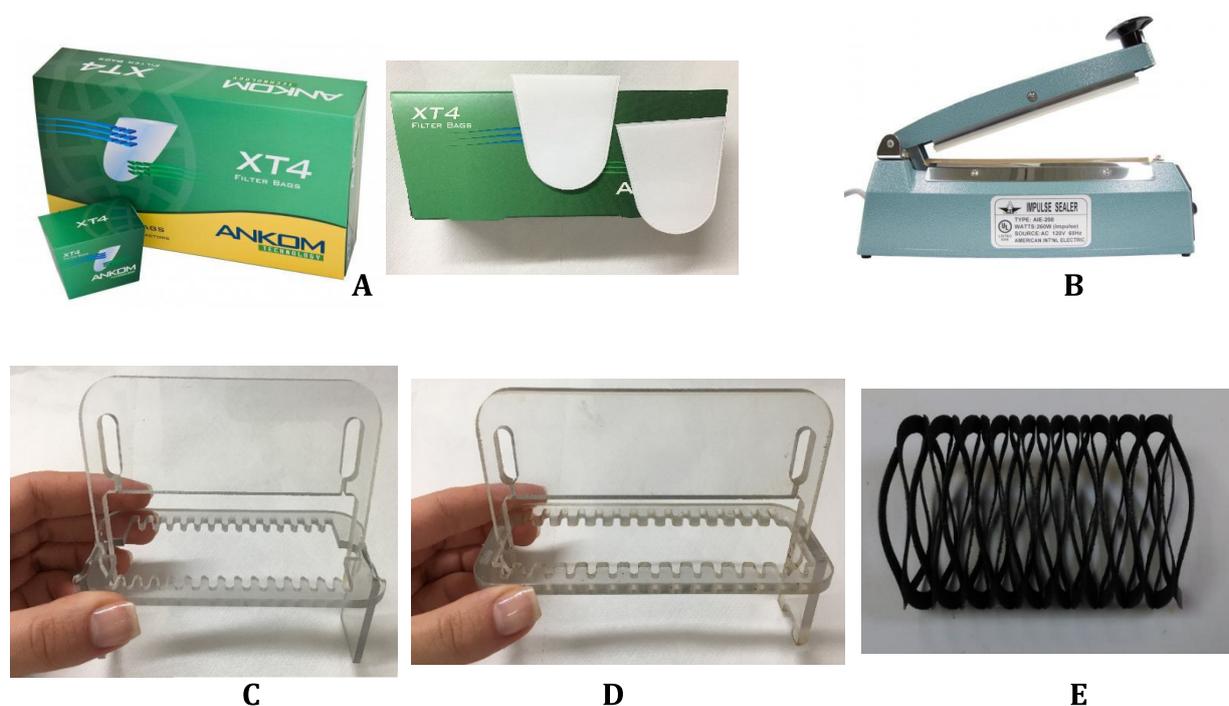


Figura 6 – Material utilizado no equipamento *ANKOM*: sacos porosos *ANKOM^{XT4}* (A), unidade de selagem a quente (B), suporte da unidade de hidrólise (C), suporte da unidade de secagem (D), suporte metálico de extração (E).

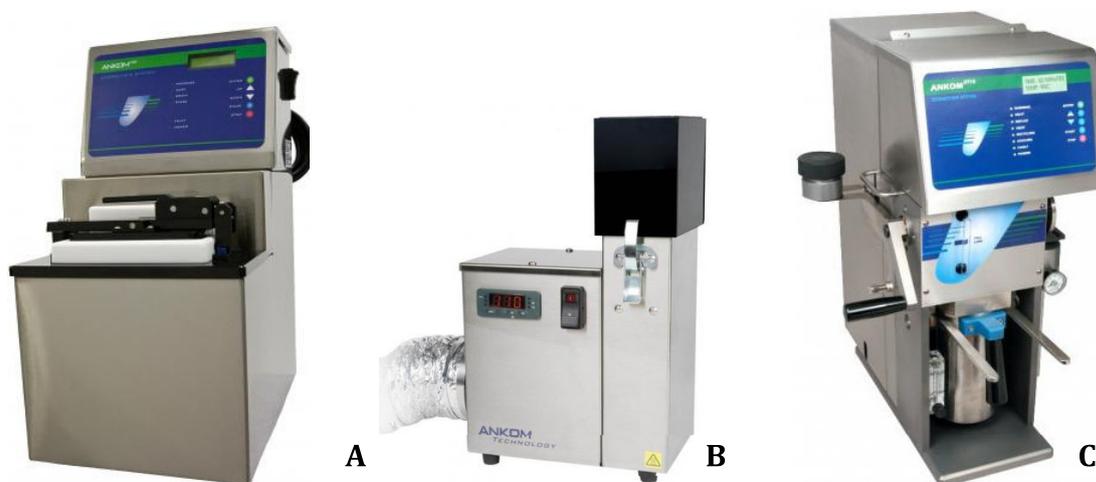


Figura 7 – Equipamento *ANKOM*: unidade de hidrólise *ANKOM HCl Hydrolysis System* (A), unidade de secagem *ANKOM RD Dryer* (B), unidade de extração *ANKOM XT15 Extractor* (C).

Com esta metodologia a amostra é, primeiramente, hidrolisada de forma a libertar a fração lipídica e posteriormente toda a matéria gorda é extraída, permanecendo dentro do saco a fração não lipídica. A determinação da matéria gorda total de cada amostra é feita por diferença de massa dos sacos porosos *ANKOM^{XT4}* antes e após extração.

Para avaliação da precisão deste método, estudou-se a repetibilidade e a precisão intermédia. Efetuaram-se dez ensaios nas mesmas condições (curto intervalo de tempo, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmos reagentes e mesmo ciclo de análise) para o estudo da repetibilidade. Para análise da precisão intermédia, analisaram-se duplicados de cada matriz em dias diferentes.

3. ACIDEZ TITULÁVEL

3.1. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO PAFQ. 197

Este método baseia-se numa titulação à viragem da fenolftaleína como indicador em meio aquoso, com solução de NaOH. Por uma questão de simplicidade no trabalho diário neste tipo de laboratórios, soluções indicadoras ácido/base, como a fenolftaleína, são utilizadas para determinar o ponto termo da titulação, através de uma alteração física observável. Um indicador ácido/base é um ácido orgânico fraco ou uma base orgânica fraca, cujas formas dissociadas têm cor diferente da sua forma conjugada (Skoog et al. 2014; Nielsen 2017).

A fenolftaleína é um dos indicadores mais utilizados, sendo que altera a sua cor de incolor para vermelho na região de pH 8,3 – 10,0 (Christian 2004).

No presente trabalho, expandiu-se a validação deste método, já utilizado pela empresa, a quatro grupos de alimentos, num total de oito novas matrizes alimentares (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Matrizes analisadas para validação do método PAFQ. 197.

Grupo de alimentos	Matrizes analisadas
Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre balsâmico
	Vinagre de sidra
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite condensado
	Queijo flamengo
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Bebida fermentada à base de soja
	Molho béchamel
	Mostarda
	Molho de alho
	Maionese
	Molho de cocktail
	Molho de alho frito

O procedimento de análise físico-química utilizado para determinação da acidez titulável (PAFQ. 197) aplica-se a uma vasta gama de matrizes alimentares, como açúcar, produtos açucarados e derivados, alimentos confeccionados e pré-confeccionados, bebidas não alcoólicas, carnes, produtos cárneos e derivados, cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados, frutos, algas, produtos hortícolas e derivados, leite, produtos lácteos e derivados, especiarias, condimentos e derivados. O seu limite de quantificação, descrito na respetiva norma, é de 0,20 mmol NaOH 1 mol/L /100 g de amostra.

Todos os reagentes utilizados neste procedimento são de qualidade analítica e a água é desionizada. Após preparação da amostra, de modo a obter uma amostra homogénea e representativa do produto a ser analisado, são pesados 25 g de amostra para um gobelé e a massa registada. Seguidamente, a amostra pesada é transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 250 mL e o volume perfeito com água desionizada. Este é um passo crucial no procedimento, uma vez que é necessário transferir a totalidade da amostra pesada para que obtenha um resultado verdadeiro. Além disso, dado que a acidez titulável é dada pela totalidade de ácidos presentes em solução, é preciso garantir

que estes são extraídos na totalidade para a solução aquosa. Desta forma, teve-se especial atenção à matriz de queijo flamengo, que foi homogeneizada em água a 35 – 40 °C e só depois transferida para o balão volumétrico. Esta temperatura garante a extração dos ácidos para a solução aquosa dentro do balão.

Após ser homogeneizado, o conteúdo do balão é, então, filtrado com papel de filtro. Este passo é importante para que não haja partículas em solução aquando da titulação e para retirar alguma cor em amostras muito coradas (como é o caso do vinagre balsâmico), evitando interferências na deteção do ponto termo da titulação. De seguida, é pipetado um volume de 50,00 mL de filtrado para um *erlenmeyer*. Por fim, são adicionadas três gotas de indicador (solução de fenolftaleína) ao filtrado que foi pipetado e é realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio (0,1 ou 0,5 mol/L, no caso dos vinagres, dada a acidez titulável bastante superior) até aparecimento de uma coloração rosa. O volume de titulante utilizado é registado.

Por cada dez amostras é realizado um padrão (DPCS). Dado que este tipo de material de referência deverá ter uma matriz semelhante às amostras analisadas, nas análises rotineiras com este método é utilizado o DPCS *Powdered Beverage*.

No âmbito da validação deste método, a repetibilidade foi estudada analisando cada matriz em oito ensaios nas mesmas condições de repetibilidade – curto intervalo de tempo, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmos reagentes e mesmo ciclo de análise). Para análise da precisão intermédia, analisaram-se duplicados de cada matriz em seis dias diferentes.

3.2. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO ISO/TS 11869

A acidez titulável é determinada na indústria de produtos lácteos principalmente por duas razões – verificar a frescura dos produtos e controlar o fabrico correto de produtos fermentados, como iogurtes. Fosfatos, proteínas, citrato e dióxido de carbono são os principais responsáveis pelos valores de acidez titulável neste tipo de produtos alimentares, sendo normalmente expressa em percentagem de ácido láctico (Chemistry 2009).

Segundo a FDA, os iogurtes não devem ter uma acidez titulável abaixo de 0,9 g ácido láctico/100 g amostra antes da adição de aromas (FDA 2017).

A norma ISO/TS 11869 é o método recomendado para a análise da acidez total de leites fermentados, por potenciometria, de acordo com a lista atualizada de métodos recomendados pela Comissão do *Codex Alimentarius* (Codex Alimentarius Commission 2017).

Esta norma é aplicável a iogurte natural, iogurte de aroma, iogurte de fruta, iogurte líquido, queijo fresco (com ou sem fruta), *buttermilk* (com ou sem fruta) e outros produtos lácteos fermentados.

Neste trabalho, a validação deste método visa a implementação do mesmo no laboratório. Dado que o mesmo já foi validado por ensaios interlaboratoriais, foi apenas necessário neste estágio realizar um estudo de precisão intermédia, de forma a confirmar que o método é utilizado da forma correta pelo laboratório. Fez-se, portanto, uma verificação do método (Ellison et al. 2009).

Este método foi validado para quatro matrizes diferentes, de forma a tentar abranger os vários tipos de iogurtes: iogurte líquido natural, iogurte líquido de aroma, iogurte cremoso natural e iogurte com pedaços.

Todos os reagentes utilizados neste procedimento são de qualidade analítica e a água é desionizada. A amostra é preparada de modo a obter uma amostra homogénea e representativa do produto a ser analisado. De seguida, 10 g de amostra são pesados para um gobelé e a massa registada. São adicionados 10 mL de água e a suspensão é homogeneizada numa placa de agitação magnética, onde permanece durante toda a titulação. É colocado um elétrodo medidor de pH na suspensão e procede-se à titulação com NaOH 0,1 mol/L até um pH de $8,30 \pm 0,01$, estável durante 4 - 5 segundos.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE ENSAIO UTILIZADOS NO ÂMBITO DO ESTÁGIO

A validação de um método pode incluir o estudo de parâmetros por avaliação direta e/ou indireta (RELACRE 2000).

A avaliação direta é efetuada por comparação dos resultados obtidos com métodos normalizados/referência, com padrões ou materiais de referência certificados ou por comparações interlaboratoriais e tem como objetivo conhecer a exatidão dos métodos de ensaio (Magnusson & Ornemark 2014; RELACRE 2000).

Por outro lado, a avaliação indireta é realizada por evidência das suas características. Inclui estudos da representatividade do método, dos fundamentos teóricos do método, de interferências e fontes de erro, de otimização das condições de operação e dos parâmetros característicos do método. Neste tipo de estudo, analisam-se parâmetros como a especificidade, quantificação, precisão, exatidão e robustez (Magnusson & Ornemark 2014; RELACRE 2000).

Relativamente à forma como pode ser feita a validação de métodos, existem duas abordagens principais – por comparação interlaboratorial ou num laboratório único. Cabe a cada laboratório selecionar a abordagem mais adequada e, caso seja necessário, levar a cabo trabalho extra para suplementar os dados de validação existentes, tendo em consideração que a mesma é sempre um equilíbrio entre custos, riscos e possibilidades técnicas (ISO 2005b; Magnusson & Ornemark 2014). Se determinado método a ser utilizado não está publicado numa norma *standard* e tem como objetivo ser utilizado em apenas um laboratório, a abordagem num laboratório único é mais aconselhada. Este tipo de situação pode acontecer, por exemplo, se não houver interesse generalizado no método ou no caso de haver outros laboratórios competidores (Magnusson & Ornemark 2014).

Para a validação dos métodos descritos neste relatório, a *Silliker Portugal S.A.* adota uma avaliação indireta com abordagem de laboratório único. O processo de validação deve abranger, pelo menos, a parte do método cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido.

No caso da validação dos três métodos descritos, as características analisadas variaram, dependendo da informação que se encontrava com a análise ainda em falta. Dado que o PAFQ. 232 (*Determinação de matéria gorda total em diversas matrizes*) e o PAFQ. 197 (*Determinação da acidez em diversas matrizes*) são procedimentos internos com a validação já iniciada na empresa, nas matrizes analisadas foram estudados os parâmetros associados à precisão (repetibilidade e precisão intermédia). O procedimento descrito pela norma ISO/TS 11869 (*Determinação da acidez titulável em leites fermentados*) foi já validado por uma organização competente e alguns parâmetros já se encontram estudados e enunciados na respetiva norma. Nestes casos, com métodos validados por organizações como ISO, CEN ou AOAC *International*, o laboratório que o utiliza terá apenas que verificar os dados publicados do seu desempenho para o seu caso em particular (Magnusson & Ornemark 2014; RELACRE 2000). Assim, este método foi apenas verificado, estudando o parâmetro de precisão intermédia e comparando com os limites da repetibilidade apresentados. Adicionalmente, foi analisado um MRC, com o objetivo de avaliar a aptidão do laboratório para a realização do método e, posteriormente, vir a ser calculada a sua incerteza.

1.1. REPETIBILIDADE

A repetibilidade exprime a variação a curto-prazo de um determinado resultado e é utilizada principalmente para estimar a diferença entre replicados analisados na mesma série (Ellison et al. 2009).

A estimativa da variação do método, que permite o cálculo do desvio-padrão da repetibilidade, pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de séries de análises nas condições escolhidas. A **Equação 1** exprime a variância associada à repetibilidade de um método em validação.

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

Equação 1

na qual,

S_r^2 – Variância da repetibilidade associada aos resultados obtidos pelo laboratório

x_i – Valor obtido

\bar{x} – Média dos resultados obtidos para cada matriz

n – Número de amostras

O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com um nível de confiança específico (neste caso, 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio nessas condições. Caso essa diferença seja superior ao limite de repetibilidade, deve ser feita uma análise crítica e repetição do ensaio (RELACRE 2000). O limite de repetibilidade é calculado usando a **Equação 2**.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_r$$

Equação 2

na qual:

r – Valor do limite de repetibilidade

t – Valor da função t -Student para o nível de confiança selecionado e o número de graus de liberdade apropriado. Neste caso, foi utilizado o valor de t para ∞ graus de liberdade, que corresponde a 1,96 (**Anexo, Tabela A5**)

S_r – Desvio-padrão da repetibilidade (calculado pela **Equação 2**, através da sua raiz quadrada)

O limite de repetibilidade relativo foi calculado usando a **Equação 3**.

$$r_{rel} = \frac{r}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 3

na qual:

r_{rel} – Valor do limite de repetibilidade relativo

r – Valor do limite de repetibilidade

\bar{x} – Média dos resultados obtidos para cada matriz

A determinação do limite de repetibilidade pode ser feita através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efetuados no próprio laboratório. Neste trabalho, não foi determinada a repetibilidade para a norma ISO/TS 11869, uma vez que a mesma já foi determinada (por ensaios interlaboratoriais) e está descrita na referida norma. Os valores de repetibilidade para as normas PAFQ. 232 e o PAFQ. 197 foram determinados tendo em conta as indicações descritas nos documentos oficiais. Para cada matriz, o procedimento PCQ.34.6 da *Silliker Portugal S.A.* exige que se proceda a pelo menos sete ensaios nas condições de repetibilidade – mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curto intervalo de tempo entre ensaios.

1.2. PRECISÃO INTERMÉDIA

A precisão intermédia corresponde à precisão estimada de resultados obtidos no mesmo laboratório, mas em condições ligeiramente diferentes. Este parâmetro deve refletir as alterações que podem ocorrer na rotina das análises realizadas no laboratório, sendo o mais representativo da variabilidade dos resultados intralaboratoriais (Ellison et al. 2009; RELACRE 2000).

Para determinar a precisão intermédia de um determinado método, efetuam-se algumas medições em replicado nas condições pré-definidas de repetibilidade. Dependendo do ensaio e do tipo de estudo que se está a realizar, existem vários métodos para determinação e controlo da precisão intermédia. No âmbito deste trabalho de validação, dado que foram realizadas seis medições, todas em duplicado, este parâmetro de qualidade foi determinado através da **Equação 4** (RELACRE 2000).

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{j=1}^n (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Equação 4

na qual,

S_i – Desvio-padrão da precisão intermédia

n – Número de amostras

y_{j1} – Primeiro resultado obtido para uma amostra j

y_{j2} – Segundo resultado obtido para uma amostra j

De forma semelhante à utilizada para calcular o limite de repetibilidade relativo, foi também calculado o limite de precisão intermédia, pela **Equação 5**.

$$PI = t \times \sqrt{2} \times \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 5

na qual:

PI – Valor do limite de precisão intermédia

t – Valor da função t -Student para o nível de confiança selecionado e o número de graus de liberdade apropriado. Neste caso, foi utilizado o valor de t para ∞ graus de liberdade, que corresponde a 1,96 (**Anexo, Tabela A5**)

S_r – Desvio-padrão da precisão intermédia (calculado pela **Equação 4**)

\bar{x} – Média dos resultados obtidos para cada matriz

2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE RESULTADOS

Para garantir a robustez e qualidade dos resultados analíticos obtidos pela *Silliker Portugal S.A.*, a empresa realiza uma série de testes diários e periódicos intra- e interlaboratoriais, assim como auditorias internas, que diminuem a probabilidade da ocorrência de erros e garantem a veracidade dos resultados. O sistema de controlo interno da *Silliker Portugal S.A.* inclui testes de *outliers*, utilização de brancos, amostras de controlo diário, cartas de controlo, amostras cegas, duplicados e participação em circuitos interlaboratoriais. A definição das metodologias e ferramentas usadas no controlo da qualidade dos diferentes laboratórios da *Silliker Portugal S.A.* está descrita no procedimento relativo ao controlo da qualidade PCQ.04.5, revisto cinco vezes e emitido na sua atual versão em 24 de julho de 2017.

Para detetar eventuais contaminações ou deterioração de reagentes, a *Silliker Portugal S.A.* analisa a flutuação da resposta de brancos em praticamente todos os métodos que realiza, assim como a utilização de amostras de controlo diário (DPCS). Os DPCS são um tipo de material de referência interno (MRI), utilizado para controlar a precisão dos resultados obtidos pelo laboratório. Idealmente, a sua matriz e a das amostras a analisar devem ser semelhantes (RELACRE 1996a). No âmbito deste trabalho, apenas se analisou a resposta de brancos e de DPCS no método PAFQ. 232 – *Determinação de matéria gorda total*.

A análise de determinada amostra em duplicado (ou outro número de réplicas), pretende detetar a ocorrência de erros acidentais e controlar a repetibilidade. No entanto, esta ferramenta não pode ser utilizada para avaliação de erros sistemáticos, uma vez que, na ocorrência de um erro deste tipo, ambas as amostras serão afetadas, não permitindo, por isso, garantir maior exatidão dos resultados. Normalmente, recomenda-se que se façam duplicados em 5 – 10% das amostras analisadas (RELACRE 1996a).

Na *Silliker Portugal S.A.*, são realizados duplicados em 10% das amostras analisadas e registados num impresso específico, de forma a poder monitorizar os mesmos. O valor máximo aceite para a diferença entre duplicados está descrito pelo limite de repetibilidade na norma de cada análise, quer seja uma norma interna, portuguesa ou internacional. A escolha das amostras a realizar em duplicado é da responsabilidade do analista que realiza o ensaio. No caso de, numa série de trabalho, a diferença entre

duplicados ser superior ao limite de repetibilidade e, portanto, o duplicado não for aceite, o próprio sistema interno não aceita o referido valor e é emitida uma lista de confirmação de ensaios. Um dos objetivos deste estágio é calcular o limite de repetibilidade dos métodos PAFQ. 232 – *Determinação de matéria gorda total* e PAFQ. 197 – *Determinação da acidez titulável*.

Outro meio muito eficiente de detetar erros são as cartas de controlo, sendo recomendadas por muitas entidades certificadas a nível internacional. A *Silliker Portugal S.A* utiliza cartas de controlo de médias ou de indivíduos, que avaliam a variação no tempo de um parâmetro selecionado, para controlo dos DPCS. Na construção destas cartas de controlo, a empresa utiliza pelo menos vinte pontos, obtidos por ensaios previamente realizados, sempre que possível num período de tempo semelhante àquele em que depois se irão representar os dados. Além disso, a empresa utiliza cartas de controlo de amplitudes para monitorização de temperaturas dos equipamentos, por exemplo (**Figura 8**). Os valores devem situar-se dentro dos limites, sendo que no caso de algum sair do intervalo definido o responsável técnico da empresa deverá ser informado. Apesar de não terem sido construídas cartas de controlo no âmbito do estágio, foram utilizadas as cartas associadas sempre que se utilizou um equipamento com este tipo de controlo.

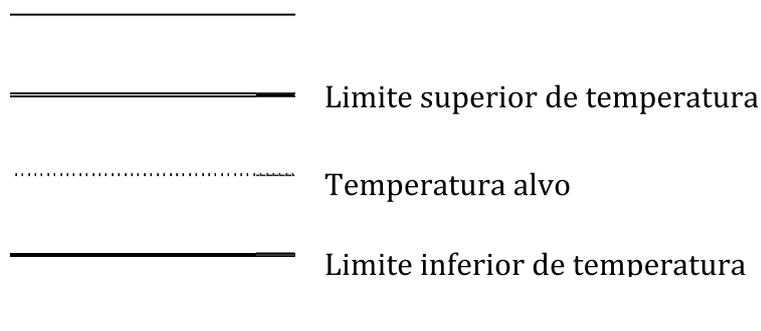


Figura 8 – Esquema das cartas de controlo de amplitudes utilizadas na *Silliker Portugal S.A.* para monitorização da temperatura dos equipamentos. Neste tipo de carta, está incluído o tipo e código do equipamento utilizado, o responsável pela atualização da carta, o mês e ano de registo e a frequência de registos (usualmente, sempre que utilizado).

Relativamente aos ensaios de comparação interlaboratorial (ECI's), existem vários, dependendo da finalidade para a qual é realizado, nomeadamente (RELACRE 1996a; RELACRE 1996b):

- Ensaio de aptidão/competência, que avalia o desempenho dos analistas e dos laboratórios através da avaliação de parâmetros como a exatidão e precisão dos resultados
- Ensaio colaborativo, que determina as características para a realização de um determinado método
- Ensaio comparativo, que utiliza vários métodos de análise de forma a comparar resultados
- Ensaio de conformidade, que visa caracterizar as propriedades de um determinado material que poderá servir para controlo de qualidade futuro
- Ensaio de certificação, que certifica um determinado valor para um material candidato a MRC

A *Silliker Portugal S.A.* realiza essencialmente ensaios de aptidão, de forma a que o seu desempenho seja analisado e, conseqüentemente, continuamente melhorado. Sendo um laboratório acreditado, este é um tipo de ensaio muito importante. A *Silliker Portugal S.A.* realiza ECI's pelo menos duas vezes por ano para cada método implementado e acreditado na empresa, sendo que todos os meses há a participações externas neste tipo de ensaios.

Todos os fornecedores do grupo *Mérieux NutriSciences* para a realização de ECI's globais são acreditados de acordo com a norma internacional ISO/IEC 17043. Os ECI's realizados pela *Silliker Portugal S.A.* são maioritariamente executados através da *Bipea*, uma associação sem fins lucrativos criada em 1970 com o objetivo de contribuir para a avaliação e otimização do desempenho de laboratórios em todo o mundo a curto, médio e longo prazo. A *Bipea* faculta não só programas de ensaios interlaboratoriais de aptidão (que poderão ser personalizados) como também materiais de referência externos, avaliações técnicas e sessões de treino (BIPEA n.d.). Para além deste organismo, a empresa adquire MRC de outros organismos reconhecidos e com credibilidade, como FAPAS, LGC e MICROBIOLOGICS.

Para avaliar o desempenho do analista que realiza os ensaios, recorre-se também à utilização de amostras cegas, cujos teores são apenas conhecidos pelos supervisores, mas não pelos analistas. Podem ser amostras excedentes de clientes, MRC's, DPCS ou de ensaios interlaboratoriais. As amostras-cegas permitem avaliar a precisão dos resultados ou a exatidão, no caso de serem analisados MRC ou DPCS, sendo que o objetivo deste tipo de amostras é avaliar o desempenho do analista que realiza os ensaios (RELACRE 1996a; Harvey 2008). As amostras-cegas são utilizadas na *Silliker Portugal S.A.* quando, por exemplo, um analista está a ser validado para determinado método ou sempre que o responsável da qualidade considere necessário. Caso se utilizem amostras excedentes de clientes como amostras cegas, os resultados são avaliados tendo em conta o boletim analítico da amostra cega e o boletim da amostra original. Para as restantes amostras cegas, apenas é necessário avaliar de acordo com o seu boletim analítico. Os resultados são, depois, avaliados tendo em conta o desvio-padrão da precisão intermédia do método. No âmbito do estágio, não foram realizadas amostras cegas.

Na *Silliker Portugal S.A.*, sempre que o resultado de um ensaio seja questionado, internamente ou pelo cliente, é emitida uma lista de confirmação. Após esta emissão, o analista verifica se não ocorreu nenhum erro de introdução dos dados do ensaio no sistema informático interno. No caso de existirem dados incorretamente introduzidos, estes devem ser corrigidos e esta evidência deve ser constatada na lista de confirmação. Caso contrário, o ensaio deverá ser repetido em duplicado e a não conformidade registada no impresso adequado, enunciado no procedimento de gestão da qualidade PGQ.05. Nestas situações, é iniciada uma ação corretiva de forma a eliminar a causa da não conformidade detetada e uma ação de sensibilização entre os analistas envolvidos para evitar que a mesma se repita.

No presente trabalho foi avaliada a qualidade dos resultados através de testes de *outliers*.

De forma a averiguar a existência de possíveis variâncias mais elevadas fora do normal aplicou-se o Teste de Cochran. O valor C obtido pela **Equação 6** compara a maior variância individual com a soma de todas as variâncias. Este valor foi calculado e posteriormente comparado com os valores críticos tabelados (**Anexo, Tabela A6**).

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

Equação 6

na qual:

s_{max}^2 – Maior variância obtida nos ensaios
 $\sum s_i^2$ – Soma das variâncias de todos os ensaios

O teste para avaliação de *outliers* recomendado pela ISO é o Teste de Grubbs. Este teste compara o valor do potencial *outlier* (o mais afastado do valor médio) com o valor médio, em termos do desvio-padrão da amostra, traduzindo-se num valor G_{exp} (Harvey 2008; Miller & Miller 2010). Considerando a existência de um *outlier* suspeito, o valor G_{exp} é calculado pela **Equação 7** e posteriormente comparado com os valores críticos tabelados, para um nível de confiança de 99% (**Anexo, Tabela A7**). O valor G_{exp} foi calculado para os valores mínimo e máximo obtidos, de forma a salvaguardar o afastamento do valor médio quer por excesso, quer por defeito. Assim, $x_{suspeito}$ assumirá os valores máximo e mínimo, obtendo-se dois valores G_{exp} para cada situação. Se os valores G_{exp} forem superiores ao valor crítico tabelado, esses valores devem ser rejeitados como *outliers* (Harvey 2008; Miller & Miller 2010).

$$G_{exp} = \frac{|x_{suspeito} - \bar{x}|}{s}$$

Equação 7

na qual:

$x_{suspeito}$ – Valor mais afastado do valor médio
 \bar{x} – Valor médio
 s – Desvio-padrão

3. MATÉRIA GORDA

3.1. DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA GORDA TOTAL PELO MÉTODO PAFQ. 232

No presente trabalho, este método tinha como objetivo ser validado em quatro grupos de alimentos, num total de oito matrizes alimentares (**Tabela 1**). É de referir que todas as amostras utilizadas para a validação são utilizadas unicamente para este fim, sendo que algumas delas poderão já estar armazenadas há mais tempo do que o desejado. Isto poderá ter alguma influência nos resultados a nível de valores absolutos, mas não interfere na análise dos parâmetros de precisão.

Para estudar a precisão deste método, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermédia do mesmo.

Para avaliar a repetibilidade, efetuaram-se dez ensaios no mesmo dia utilizando as mesmas condições – mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e mesmo ciclo de análise. Os resultados do teor de matéria gorda total de cada amostra analisada por este método de análise encontram-se descritos na **Tabela A1, Anexo**.

Dado que era possível ter acesso prévio aos valores de matéria gorda de cada matriz, fez-se uma avaliação breve do valor médio absoluto obtido por comparação com os valores estabelecidos no rótulo antes de proceder ao cálculo dos parâmetros de precisão do método. Verificou-se que, no caso dos alimentos para animais, o valor médio obtido na matriz *cat food* era inferior ao estabelecido no rótulo. Sendo este um material de referência externo, fornecido pela *Bipea*, verificou-se que o valor obtido se encontrava fora do intervalo aceitável para este resultado (**Tabela 4**). Verificou-se, também, que os resultados obtidos para as duas matrizes de sementes analisadas (quinoa e linhaça) variavam muito relativamente aos valores nos rótulos destes alimentos (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para as matrizes *cat food*, sementes de linhaça e quinoa, posteriormente excluídas da validação deste método.

Grupo de alimentos	Matriz	Teor de matéria gorda (g/100g)										Valor médio	Valor rotulado
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10		
Alimentos para animais (simples e compostos)	<i>Cat food</i>	8,69	9,20	9,10	9,35	8,54	8,39	9,28	9,75	9,10	9,74	9,11	11,9 ± 0,9
		29,24	19,56	21,97	19,18	23,20	18,05	18,52	17,95	19,49	18,49		
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Sementes de linhaça	4,10	3,81	4,12	4,02	3,91	3,99	3,99	3,94	3,92	3,84	3,96	6

De forma a averiguar se o problema seria do método ou das próprias matrizes, que já se encontravam armazenadas há algum tempo e, por conseguinte, poderia ter havido deterioração das mesmas, analisou-se a matéria gorda destas matrizes (utilizando exatamente as mesmas amostras) através de um método alternativo existente na empresa, já validado e acreditado para este tipo de matrizes alimentares (PAFQ. 039). Este método baseia-se no mesmo princípio – hidrólise ácida prévia, neutralização, secagem, extração com éter de petróleo e nova secagem. Também neste caso o resultado é obtido por diferença de massas, sendo que a principal diferença relativamente ao método descrito neste relatório é o equipamento utilizado. O ensaio foi feito em duplicado e encontra-se enunciado na **Tabela A2, Anexo**.

Por avaliação dos resultados obtidos e apresentados na **Tabela 5**, verificou-se que o valor de matéria gorda para a matriz *cat food* se encontrava dentro do intervalo do valor de referência, quando analisado pelo método já implementado. Assim, concluiu-se que o método a ser validado não deverá ser adequado para este tipo de matriz, optando-se por excluir os alimentos para animais como matrizes aplicáveis por este método nesta fase. A empresa optou, portanto, por continuar a analisar este tipo de matrizes apenas com o referido método já validado e acreditado. No entanto, registou-se a necessidade de fazer mais estudos no futuro de forma a tentar averiguar de uma alternativa possível para que esta matriz venha a ser validada para o método em estudo neste relatório.

No caso das sementes analisadas, verificou-se que estas apresentavam valores de matéria gorda muito díspares do esperado quando utilizado o método que se pretende validar. Por outro lado, o método já validado revelou resultados mais próximos do expectável – a diferença poderá ser explicada pelo tempo de armazenamento das amostras. Decidiu-se excluir as sementes oleaginosas das matrizes viáveis para serem analisadas por este método.

Tabela 5 – Comparação dos resultados obtidos (valores médios) para as matrizes *cat food*, (MRC fornecido pela *Bipea*), quinoa e linhaça, pelo método a ser validado (PAFQ. 232, com equipamento *ANKOM*) e um método alternativo já existente e validado para as matrizes em causa (PAFQ. 069).

Matriz	Teor de matéria gorda do rótulo	Teor de matéria gorda obtido pelo método PAFQ. 232	Teor de matéria gorda obtido pelo método PAFQ. 069
	g/100g		
<i>Cat food</i>	11,9 ± 0,9	9,11	11,50
Quinoa	6	3,96	4,71
Linhaça	40	20,57	38,41

Optou-se por realizar a validação deste método com as outras matrizes presentes no plano. Comparando o valor médio de teor de matéria gorda com o rotulado (**Tabela A1, Anexo**) a nível absoluto, verificou-se que o valor obtido para o cereal se encontrava fora do intervalo aceitável para esta matriz, fornecido pela *Bipea*. Da mesma forma, verificou-se que a farinha não láctea é a matriz cujo resultado mais difere do rotulado. Antes de se proceder ao resto da análise dos dados e cálculo do limite de repetibilidade, analisaram-se estas duas matrizes, em duplicado (utilizando a mesma amostra), através do supracitado método já implementado na empresa. Os resultados encontram-se no **Anexo, Tabela A2** e a **Tabela 6** apresenta a comparação de resultados médios para estas duas matrizes.

Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos (valores médios) nas matrizes cereal e farinha não láctea pelo método a ser validado (PAFQ. 232, com equipamento *ANKOM*) e um método alternativo já existente e validado para as matrizes em causa (PAFQ. 069).

Matriz	Teor de matéria gorda do rótulo	Teor de matéria gorda obtido pelo método PAFQ. 232	Teor de matéria gorda obtido pelo método PAFQ. 069
	g/100g		
Cereal	10,54 ± 0,95	9,56	9,31
Farinha não láctea	2,1	1,75	1,74

Relativamente ao cereal, o valor obtido pelo método já implementado na empresa é muito próximo do obtido pelo método PAFQ.232 e também se encontra fora do intervalo. Suspeita-se, assim, que o problema seja da própria matriz, que se poderá ter deteriorado dado o tempo muito elevado de armazenamento. O valor médio obtido para o teor de matéria gorda da farinha não láctea pelos dois métodos é muito semelhante, suspeitando-se que a diferença relativamente ao valor do rótulo seja derivada da mesma causa. Dado que a diferença nas duas matrizes não é significativa e que para a avaliação da precisão do método não são utilizados valores absolutos, optou-se por manter estas matrizes no plano de validação.

Assim, as matrizes seleccionadas foram utilizadas para a validação do método. Na **Tabela 7** apresentam-se os resultados obtidos e a análise dos mesmos a nível de repetibilidade.

Tabela 7 – Valores obtidos para o estudo da repetibilidade para o procedimento PAFQ. 232. A variância, limite da repetibilidade e limite da repetibilidade relativo foram calculados pelas **Equações 1, 2 e 3**, respetivamente.

Teor de matéria gorda (g/100g)														
Grupo de alimentos	Matriz	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Ensaio	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
		Valor médio	Variância	Desvio-padrão										
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	5,41	5,21	5,55	5,54	5,61	5,65	5,45	5,59	5,56	5,58	0,36	6,49	
		1,64	1,81	1,89	1,45	1,91	1,80	1,85	1,87	1,86	1,87	0,40	22,18	
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	0,68	0,67	0,65	0,54	0,60	0,57	0,53	0,57	0,64	0,65	0,15	25,22	
	Cereal	9,62	9,43	9,51	9,69	9,49	9,62	9,45	9,61	9,75	9,47	0,30	3,14	
	Corn flakes	1,11	1,22	1,21	1,25	1,18	1,26	1,22	1,03	1,05	1,16	0,23	19,67	

Pela análise da **Tabela 7**, verifica-se que os valores obtidos para o teor de matéria gorda em condições de repetibilidade variam entre 0,53 g/100 g e 9,75 g/100 g, correspondentes ao arroz e ao cereal, respetivamente. Para cada matriz analisada é possível observar que a diferença absoluta entre os valores obtidos nunca é superior ao limite de repetibilidade calculado individualmente para cada uma delas. Este facto está evidenciado na **Tabela 8**, que toma a matriz farinha láctea como exemplo, sendo que este estudo foi feito em todas as matrizes. Os resultados consideram-se, assim, aceitáveis, considerando-se que a repetibilidade do método é adequada.

Tabela 8 – Diferença absoluta entre os resultados obtidos em condições de repetibilidade para análise do teor de matéria gorda na matriz farinha láctea. (E1-E2) representa a diferença absoluta entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, e assim sucessivamente.

Teor de matéria gorda (g/100g)											Limite da repetibilidade
Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	
Farinha láctea	5,41	5,21	5,55	5,54	5,61	5,65	5,45	5,59	5,56	5,58	0,36
	E1-E2	E2-E3	E3-E4	E4-E5	E5-E6	E6-E7	E7-E8	E8-E9	E9-E10		
	0,20	0,34	0,01	0,07	0,04	0,20	0,14	0,03	0,02		

Para detetar possíveis *outliers* em cada ciclo de análises de uma determinada matriz, recorreu-se ao Teste de Grubbs. O valor de G_{exp} foi calculado através da **Equação 7** e comparado com o valor $G_{crítico}$ tabelado e enunciado na **Tabela A7, Anexo**, para um nível de confiança de 99%. Verificou-se que, em todas as matrizes, os valores máximo e mínimo obtidos se encontravam aceitáveis tendo em conta que o valor de G_{exp} foi sempre inferior ao $G_{crítico}$ (**Tabela 9**), não sendo, por isso, detetado nenhum *outlier*.

Tabela 9 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Grubbs do método PAFQ.232. O valor G_{exp} foi calculado pela Equação 7 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 99%.

Teste de Grubbs									
Grupo de alimentos	Matriz	População	Valor crítico 99%	Valor mínimo (g/100g)	G_{exp} Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo (g/100g)	G_{exp} Valor máximo	Teste ao valor máximo
Alimentos dietéticos, suplementares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	10	2,482	5,21	2,36	Aceitável	5,65	1,05	Aceitável
	Farinha não láctea	10	2,482	1,45	2,41	Aceitável	1,91	0,80	Aceitável
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	10	2,482	0,53	1,39	Aceitável	0,68	1,31	Aceitável
	Cereal	10	2,482	9,43	1,19	Aceitável	9,75	1,71	Aceitável
	Corn flakes	10	2,482	1,03	1,71	Aceitável	1,26	1,07	Aceitável

De forma a detetar eventuais valores de variância demasiado altos e fora do normal, a empresa *Silliker Portugal S.A.* recorre ao Teste de Cochran (**Tabela 10**). Assim, para as cinco matrizes utilizadas para avaliar a repetibilidade deste método, verificou-se que aquela que apresentava o maior valor de variância era a farinha não láctea. Este valor foi utilizado para calcular o valor C , através da **Equação 6**, obtendo-se um valor C de 0,349. Comparando com o valor de $C_{crítico}$, tabelado para um nível de confiança de 95%, e enunciado na **Tabela A6, Anexo**, verifica-se que $C_{calculado} < C_{crítico}$, isto é, o valor obtido é inferior ao valor crítico tabelado e, portanto, os resultados são aceitáveis.

Tabela 10 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.232. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela **Equação 6** e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Teste de Cochran						
Nº de matrizes	Nº de ensaios para cada matriz	Maior variância	Valor $C_{calculado}$	Valor $C_{crítico}$ 95%	Avaliação	Conclusão
5	10	0,020	0,349	0,4241	$C_{calculado} < C_{crítico}$	Aceitável

Tendo em conta que os resultados obtidos foram aceites pelos dois testes estatísticos aplicados, obteve-se então um valor de limite de repetibilidade médio de 0,29 g/100g. Posteriormente, este será o valor máximo aceite para a diferença entre duplicados realizados nas análises rotineiras da empresa, em condições de repetibilidade. O limite de repetibilidade relativo médio obtido foi de 15,3% e o coeficiente de variação médio relativo, dado pela média dos desvios-padrão relativos obtidos para todas as matrizes utilizadas para validação deste método foi de 5,5%, valores que traduzem a repetibilidade adequada do método em estudo.

A precisão intermédia foi determinada analisando a mesma matriz em duplicado durante seis dias diferentes. Todos os ensaios foram realizados pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento (**Figuras 6 e 7**), mas tendo em conta a variabilidade intrínseca a análises rotineiras realizadas no laboratório. Os resultados do teor de matéria gorda dos duplicados analisados encontram-se na **Tabela 11**. De salientar que podem existir diferenças entre os vários duplicados uma vez que os ensaios para a avaliação deste parâmetro foram realizados utilizando diferentes amostras, mas sempre da matriz correspondente. Destaca-se, no entanto, que na análise de cada duplicado respeitaram-se as condições de repetibilidade.

Pela análise da **Tabela 11**, observa-se que a diferença entre duplicados realizados em condições de repetibilidade é sempre inferior ao limite de repetibilidade previamente calculado (0,29 g/100 g), sendo os duplicados, por isso, considerados aceitáveis.

Obteve-se um valor do desvio-padrão da precisão intermédia deste método, calculado pela **Equação 4**, de 0,049 g/100 g. Este valor será utilizado, posteriormente, para a atualização do cálculo da incerteza deste método, agora validado para estas novas cinco matrizes. Foi, ainda, calculado o limite de precisão intermédia pela **Equação 5**, tendo-se obtido um valor de 3,6%, o que demonstra que o laboratório é capaz de utilizar este método de forma eficaz, mesmo em condições diferentes e intrínsecas à variabilidade de resultados.

Tabela 11 – Valores obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento PAFQ. 232. |E1-E2| representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.

Grupo de alimentos	Matriz	Dia	Teor de matéria gorda (g/100g)			
			Ensaio 1	Ensaio 2	E1-E2	Valor médio
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	1	9,40	9,34	0,06	9,37
		2	8,27	8,26	0,01	8,27
		3	9,15	9,29	0,15	9,22
		4	9,21	9,27	0,06	9,24
		5	8,23	8,23	0,00	8,23
		6	9,16	9,15	0,01	9,15
	Farinha não láctea	1	5,11	5,17	0,06	5,14
		2	3,33	3,19	0,14	3,26
		3	3,13	3,14	0,01	3,13
		4	5,34	5,39	0,05	5,36
		5	3,36	3,33	0,02	3,35
		6	1,48	1,54	0,06	1,51
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	1	0,75	0,79	0,04	0,77
		2	1,16	0,92	0,25	1,04
		3	0,63	0,72	0,09	0,67
		4	0,56	0,55	0,01	0,55
		5	0,78	0,78	0,00	0,78
		6	0,68	0,67	0,01	0,68
	Cereal	1	4,57	4,53	0,04	4,55
		2	3,18	3,16	0,03	3,17
		3	3,80	3,80	0,00	3,80
		4	4,00	4,01	0,01	4,01
		5	5,77	5,71	0,07	5,74
		6	6,54	6,51	0,04	6,53
Corn flakes	1	1,05	1,12	0,06	1,08	
	2	1,11	1,12	0,01	1,12	
	3	1,17	1,19	0,02	1,18	
	4	1,20	1,18	0,02	1,19	
	5	1,33	1,33	0,01	1,33	
	6	1,13	1,09	0,04	1,11	

Durante o processo de validação deste método, ocorreu a necessidade de realizar manutenção ao equipamento, estando este algum tempo sem utilização. Após essa manutenção, foi realizado um ciclo de brancos. De acordo com a norma PAFQ. 232, a diferença de massas dos sacos porosos *ANKOM^{XT4}* do branco antes e após extração deve ser inferior a 0,0005. Assim, tendo em conta o ciclo de onze brancos realizados e os valores da referida diferença de massas apresentados na **Tabela A3, Anexo**, verificou-se que todos os valores se encontravam abaixo do exigido.

A carta de controlo referente ao DPCS *Triscuit* (atualizada a 11 de maio de 2018) apresenta um limite superior para o teor de matéria gorda de 14,04 g/100g e inferior de 12,71 g/100g. De forma a garantir que o equipamento se encontrava pronto a analisar amostras rotineiras, realizou-se um ciclo com dez amostras do DPCS *Triscuit*, no qual se verificou que todos os valores obtidos se encontravam dentro do intervalo aceitável (**Tabela A4, Anexo**).

4. ACIDEZ TITULÁVEL

4.1. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO PAFQ. 197

De forma a completar as validações deste método já realizadas, o presente trabalho aplicou-se a quatro grupos de alimentos, em oito matrizes alimentares (**Tabela 3**).

Para estudar a precisão deste método, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermédia do mesmo, à semelhança do anterior. Neste método, foi utilizada sempre a mesma amostra para análise da repetibilidade e da precisão intermédia, à exceção dos molhos e maionese. Neste caso, assumiram-se as quatro amostras – maionese, molho de alho, molho de cocktail e molho de alho frito – como pertencentes à mesma matriz, sendo que a repetibilidade foi calculada utilizando o molho de cocktail e a precisão intermédia determinada através de duplicados das quatro amostras.

Para avaliar a repetibilidade, efetuaram-se oito ensaios no mesmo dia utilizando as mesmas condições – mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e mesmo tipo de reagentes. Os resultados da acidez titulável de cada amostra, expressa em mmol NaOH 1 mol/L /100 g, assim como os parâmetros estudados para análise da repetibilidade, encontram-se na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade do procedimento PAFQ. 197. A variância, limite da repetibilidade e limite da repetibilidade relativo foram calculados pelas **Equações 1, 2 e 3**, respetivamente.

Acidez titulável (mmol NaOH 1N/100g)														
Grupo de alimentos	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Valor médio	Variância	Desvio-padrão	Limite da repetibilidade	Limite da repetibilidade relativo
Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre balsâmico	97,74	98,13	97,45	98,79	98,32	95,95	98,59	98,86	97,98	0,914	0,956	2,68	2,73
	Vinagre de sidra	82,24	85,54	84,22	85,11	85,00	81,34	87,37	84,54	84,42	3,580	1,892	5,30	6,28
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite condensado	3,29	3,13	3,31	3,29	3,22	3,25	3,27	3,30	3,26	0,004	0,059	0,17	5,09
	Queijo flamengo	8,76	8,40	8,34	8,95	9,03	8,70	8,51	8,66	8,67	0,061	0,246	0,69	7,95
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Bebida fermentada à base de soja	3,18	3,16	3,15	3,20	3,15	3,19	3,18	3,21	3,18	0,001	0,023	0,06	1,98
	Mostarda	24,85	24,46	24,69	24,26	24,61	24,55	24,20	24,74	24,55	0,052	0,228	0,64	2,60
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho béchamel	1,17	1,18	1,10	1,08	1,05	1,10	1,09	1,16	1,12	0,002	0,047	0,13	11,91
	Molho de cocktail	26,09	26,22	26,51	26,25	26,31	26,13	26,47	26,32	26,29	0,022	0,148	0,42	1,58

A **Tabela 12**, permite verificar que os valores obtidos para a acidez titulável em condições de repetibilidade variam entre 1,05 mmol NaOH 1mol/L /100g e 98,86 mmol NaOH 1 mol/L /100 g, correspondentes ao molho béchamel e ao vinagre de sidra, respetivamente. Para cada matriz analisada é possível observar que a diferença absoluta entre os valores obtidos nunca é superior ao limite de repetibilidade calculado individualmente para cada uma delas. Este facto está evidenciado na **Tabela 13**, que toma a matriz vinagre balsâmico como exemplo, sendo que este estudo foi feito em todas as matrizes. Os resultados consideram-se, assim, aceitáveis, uma vez que a repetibilidade do método é adequada.

Tabela 13 – Diferença absoluta entre os resultados obtidos em condições de repetibilidade para análise da acidez titulável na matriz vinagre balsâmico. (E1-E2) representa a diferença absoluta entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, e assim sucessivamente.

Matriz	Acidez titulável (mmol NaOH 1mol/L /100g)								Limite da repetibilidade
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	
Vinagre balsâmico	97,74	98,13	97,45	98,79	98,32	95,95	98,59	98,86	2,68
	E1-E2	E2-E3	E3-E4	E4-E5	E5-E6	E6-E7	E7-E8		
	0,39	0,68	1,34	0,47	2,37	2,64	0,27		

Recorreu-se ao Teste de Grubbs para detetar eventuais *outliers* em cada ciclo de análises de uma determinada matriz. O valor de G_{exp} foi calculado através da **Equação 7** e comparado com o valor $G_{crítico}$ (**Tabela F, Anexo F**), para um nível de confiança de 99%. Verificou-se que, em todas as matrizes, os valores máximo e mínimo obtidos se encontravam aceitáveis tendo em conta que o valor de G_{exp} foi sempre inferior ao $G_{crítico}$ (**Tabela 14**).

Tabela 14 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Grubbs do método PAFQ.197. O valor G_{exp} foi calculado pela Equação 7 e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 99%.

Teste de Grubbs									
Grupo de alimentos	Matriz	População	Valor crítico 99%	Valor mínimo (mmol/NaOH /100g)	G_{exp} Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo (mmol/NaOH /100g)	G_{exp} Valor máximo	Teste ao valor máximo
Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre balsâmico	8	2,274	95,95	2,12	Aceitável	98,86	0,92	Aceitável
	Vinagre de sidra	8	2,274	81,34	1,63	Aceitável	87,37	1,56	Aceitável
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite condensado	8	2,274	3,13	2,15	Aceitável	3,31	0,89	Aceitável
	Queijo flamengo	8	2,274	8,34	1,34	Aceitável	9,03	1,47	Aceitável
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Bebida fermentada à base de soja	8	2,274	3,15	1,22	Aceitável	3,21	1,44	Aceitável
	Mostarda	8	2,274	24,20	1,51	Aceitável	24,85	1,34	Aceitável
Alimentos confeccionados e pré-confeccionados	Molho béchamel	8	2,274	1,05	1,40	Aceitável	1,18	1,34	Aceitável
	Molho de cocktail	8	2,274	26,09	1,33	Aceitável	26,51	1,50	Aceitável

Possíveis valores de variância demasiado altos e fora do normal foram analisados tendo em conta o Teste de Cochran. Para as oito matrizes utilizadas para avaliar a repetibilidade deste método, verificou-se que aquela que apresentava o maior valor de variância era o vinagre de sidra. Este valor foi utilizado para calcular o valor C , através da **Equação 6**, obtendo-se um valor C de 0,772 (**Tabela 15**). Comparando com o valor de $C_{crítico}$, tabelado para um nível de confiança de 95%, e enunciado na **Tabela A6, Anexo**, verifica-se que $C_{calculado} > C_{crítico}$, isto é, teoricamente este resultado deveria ser considerado como *outlier* e a análise desta matriz rejeitada. No entanto, dada a grande variabilidade de resultados e a consecutiva variância, devido às diferentes matrizes analisadas, a empresa optou por dividir os resultados por gamas de valores de acidez titulável, tendo em conta os grupos de alimentos de cada uma delas. Assim, dividiram-se os resultados em duas gamas e separaram-se os vinagres, com valores de acidez titulável muito altos, das restantes matrizes (**Tabela 16**).

Tabela 15 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.197. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela **Equação 6** e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Teste de Cochran						
Nº de matrizes	Nº de ensaios para cada matriz	Maior variância	Valor $C_{calculado}$	Valor $C_{crítico}$ 95%	Avaliação	Conclusão
8	8	3,580	0,772	0,3185	$C_{calculado} > C_{crítico}$	Rejeitar a matriz com maior variância

Tabela 16 – Parâmetros para análise da qualidade de resultados pelo teste de Cochran do método PAFQ.197, divididos por gamas de acidez titulável. O valor $C_{calculado}$ foi calculado pela **Equação 6** e comparado com o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Teste de Cochran							
Matrizes	Nº de matrizes	Nº de ensaios para cada matriz	Maior variância	Valor $C_{calculado}$	Valor $C_{crítico}$ 95%	Avaliação	Conclusão
Vinagre balsâmico	2	8	3,580	0,797	0,8332	$C_{calculado} < C_{crítico}$	Aceitável
Vinagre de sidra							
Leite condensado	6	8	0,053	0,395	0,398	$C_{calculado} < C_{crítico}$	Aceitável
Queijo flamengo							
Produto fermentado à base de soja							
Mostarda							
Molho béchamel							
Molho de cocktail							

Com esta divisão por gamas, obtiveram-se dois valores de C inferiores aos valores críticos tabelados e, portanto, os resultados são válidos e aceites pelos dois testes estatísticos realizados, originando dois valores de limite de repetibilidade diferentes (**Tabela 17**).

Tal como era expectável, o limite de repetibilidade no caso de produtos com acidez titulável acima de 50,00 mmol NaOH 1 mol/L /100 g é bastante superior ao das restantes matrizes, dado que em ambos os casos analisados o valor de acidez titulável foi sempre superior a 81 mmol NaOH 1 mol/L /100 g. De salientar que se pretende, no futuro, intercalar estes resultados com os já existentes de forma a obter gamas o mais adequado possível à variabilidade de amostras recebidas pelo laboratório para análise pelo método PAFQ.197.

Tabela 17 – Divisão por gamas do PAFQ.197 e parâmetros de repetibilidade para cada uma delas.

Matrizes	Gama de acidez titulável (mmol NaOH 1mol/L /100 g)	Limite de repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo	Coefficiente de variação médio relativo
Vinagre balsâmico	> 50,00	3,99	4,50	1,61
Vinagre de sidra				
Leite condensado	0,20 – 50,00	0,34	5,09	1,82
Queijo flamengo				
Produto fermentado à base de soja				
Mostarda				
Molho béchamel				
Molho de cocktail				

A precisão intermédia foi determinada pela análise de cada matriz em duplicado durante seis dias diferentes, respeitando-se as condições de repetibilidade em cada duplicado. No caso dos molhos, dado que a precisão intermédia foi avaliada tendo em conta quatro amostras diferentes (maionese, molho de alho, molho de cocktail e molho de alho frito), em vez de seis pares de duplicados fizeram-se oito pares, também todos eles em dias diferentes. Todos os ensaios foram realizados pelo menos analista, tendo em conta a variabilidade intrínseca de análises rotineiras realizadas neste laboratório. Os resultados da acidez titulável dos duplicados analisados encontram-se na **Tabela 18**.

Pela análise da **Tabela 18**, observa-se que a diferença entre duplicados realizados em condições de repetibilidade é sempre inferior ao limite de repetibilidade previamente calculado (0,34 mmol NaOH 1 mol/L /100 g para produtos com acidez titulável entre 0,20 – 50,00 mmol NaOH 1 mol/L /100g e 3,99 mmol NaOH 1 mol/L /100 g para produtos com acidez titulável acima de 50,00 mmol NaOH 1 mol/L /100 g), sendo os duplicados considerados aceitáveis.

Tabela 18 – Valores obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento PAFQ. 197. |E1-E2| representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.

Grupo de alimentos	Matriz	Dia	Acidez titulável (mmol NaOH 1 mol/L /100g)			
			Ensaio 1	Ensaio 2	E1-E2	Valor médio
Especiarias, condimentos e derivados	Vinagre balsâmico	1	97,27	97,29	0,02	97,28
		2	98,67	97,76	0,91	98,22
		3	98,82	99,11	0,29	98,97
		4	98,61	97,65	0,96	98,13
		5	98,74	99,77	1,03	99,26
		6	99,43	98,66	0,77	99,05
	Vinagre de sidra	1	84,53	84,52	0,01	84,53
		2	85,30	85,32	0,02	85,31
		3	84,94	85,95	1,01	85,45
		4	84,68	83,19	1,49	83,94
		5	84,73	84,20	0,53	84,47
		6	84,06	84,81	0,75	84,44
Leite, produtos lácteos e derivados	Leite condensado	1	3,02	3,00	0,02	3,01
		2	3,00	3,00	0,00	3,00
		3	3,01	3,08	0,07	3,05
		4	3,10	3,10	0,00	3,10
		5	3,19	3,06	0,13	3,13
		6	3,06	3,15	0,09	3,11
	Queijo flamengo	1	8,05	7,99	0,06	8,02
		2	7,80	8,03	0,23	7,92
		3	6,00	5,76	0,24	5,88
		4	8,70	8,72	0,02	8,71
		5	7,40	7,55	0,15	7,48
		6	8,01	7,88	0,13	7,95
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Bebida fermentada à base de soja	1	3,18	3,17	0,01	3,18
		2	3,14	3,15	0,01	3,15
		3	3,26	3,18	0,08	3,22
		4	3,22	3,19	0,03	3,21
		5	3,23	3,22	0,01	3,23
		6	3,26	3,24	0,02	3,25

	1	24,26	24,38	0,12	24,32	
	2	24,38	24,34	0,04	24,36	
Mostarda	3	23,76	23,96	0,20	23,86	
	4	23,94	23,69	0,25	23,82	
	5	24,03	24,11	0,08	24,07	
	6	24,02	24,23	0,21	24,13	
	1	1,13	1,13	0,00	1,13	
	2	1,10	1,06	0,04	1,08	
Alimentos confeccionados e pré- confeccionados	Molho béchamel	3	1,11	1,13	0,02	1,12
		4	1,00	1,05	0,05	1,03
		5	0,99	1,10	0,11	1,05
		6	1,09	1,16	0,07	1,13
		1	7,54	7,75	0,21	7,65
		2	8,02	7,73	0,29	7,88
Molhos de alho, cocktail e maionese	3	25,98	25,98	0,00	25,98	
	4	25,66	25,70	0,04	25,68	
	5	26,54	26,41	0,13	26,48	
	6	25,75	26,04	0,29	25,90	
	7	26,10	25,94	0,16	26,02	
	8	18,95	19,21	0,26	19,08	

Obteve-se um valor do desvio-padrão da precisão intermédia deste método, calculado pela **Equação 4**, de 0,29 mmol NaOH 1 mol/L /100g. Este valor será utilizado posteriormente para a atualização do cálculo da incerteza deste método, agora validado para estas novas oito matrizes. Foi, ainda, calculado o limite de precisão intermédia pela **Equação 5**, tendo-se obtido um valor de 2,7%, o que demonstra que o laboratório é capaz de utilizar este método de forma eficaz, mesmo em condições diferentes e intrínsecas à variabilidade de resultados.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ TITULÁVEL PELO MÉTODO ISO/TS 11869

Este método já foi validado por ensaios interlaboratoriais por uma entidade competente. Fez-se um estudo de precisão intermédia em quatro matrizes de iogurtes diferentes, com o objetivo de verificar se o método é utilizado da forma correta pelo laboratório, por comparação com o limite de repetibilidade descrito na norma. Foi ainda feito um ensaio com dez réplicas de um material de referência certificado de forma a, posteriormente, ser calculada a incerteza do método neste laboratório.

Segundo o descrito na norma ISO/TS 11869, a diferença absoluta entre dois resultados independentes obtidos pelo mesmo método a uma determinada amostra no mesmo laboratório e pelo mesmo analista usando o mesmo equipamento num espaço de tempo reduzido não deverá ser superior a 0,20 mmol NaOH/100 g em mais do que 5% dos casos analisados.

A precisão intermédia foi determinada pela análise de cada matriz em duplicado durante seis dias diferentes, respeitando-se as condições de repetibilidade em cada duplicado. Todos os ensaios foram realizados pelo menos analista, tendo em conta a variabilidade intrínseca a análises rotineiras realizadas neste laboratório. Os resultados da acidez titulável dos duplicados analisados encontram-se na **Tabela 19**.

Por análise da **Tabela 19**, o valor do desvio-padrão da precisão intermédia deste método, calculado pela **Equação 4** é 0,035 mmol NaOH 1 mol/L /100g. Este valor irá ser utilizado para o cálculo da estimativa da incerteza do método. Foi calculado o limite de precisão intermédia pela **Equação 5**, tendo-se obtido um valor de 0,9%, o que demonstra que o laboratório é capaz de utilizar este método de forma eficaz, mesmo em condições diferentes e intrínsecas à variabilidade de resultados.

Tabela 19 – Valores obtidos para o estudo da precisão intermédia do procedimento ISO/TS 11869. |E1-E2| representa a diferença entre os resultados obtidos nos ensaios 1 e 2, em valor absoluto.

Grupo de alimentos	Matriz	Dia	Acidez titulável (mmol NaOH 1mol/L /100g)			
			Ensaio 1	Ensaio 2	E1-E2	Valor médio
Leite, produtos lácteos e derivados	Iogurte com pedaços	1	11,52	11,47	0,05	11,50
		2	11,57	11,55	0,02	11,56
		3	11,57	11,60	0,03	11,59
		4	11,61	11,59	0,02	11,60
		5	11,65	11,64	0,01	11,65
		6	11,62	11,61	0,01	11,62
	Iogurte cremoso natural	1	11,14	11,12	0,02	11,13
		2	11,14	11,12	0,02	11,13
		3	11,17	11,15	0,02	11,16
		4	11,24	11,28	0,04	11,26
		5	11,38	11,46	0,08	11,42
		6	11,12	11,30	0,18	11,21
	Iogurte líquido com aroma	1	8,98	8,98	0,00	8,98
		2	9,06	9,09	0,03	9,08
		3	9,03	9,01	0,02	9,02
		4	9,03	8,99	0,04	9,01
		5	9,04	9,04	0,00	9,04
		6	9,04	9,09	0,05	9,07
Iogurte líquido natural	1	9,75	9,78	0,03	9,77	
	2	9,70	9,70	0,00	9,70	
	3	9,67	9,67	0,00	9,67	
	4	9,88	9,84	0,04	9,86	
	5	9,97	9,90	0,07	9,94	
	6	9,88	9,89	0,01	9,89	

Para o cálculo da incerteza, o desvio-padrão da precisão intermédia previamente calculado será utilizado como parte da componente aleatória. A componente sistemática deste parâmetro será determinada tendo em conta um MRC (código RM CP L JO 22), analisado dez vezes em condições de repetibilidade (**Tabela 20**).

Tabela 20 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método ISO/TS 11869 para um MRC de iogurte. Os resultados apresentam-se nas unidades presentes no certificado do referido MRC, mg ácido láctico/100 g.

Matriz	Acidez titulável (mg ácido láctico/100g)										Valor médio
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	
RM CP L JO 22	1291	1299	1291	1298	1298	1297	1303	1308	1303	1309	1300

O valor de acidez titulável médio obtido no laboratório para este material foi de 1300 mg ácido láctico/100g, sendo o valor descrito no certificado desta amostra de 1259 mg ácido láctico/100g (**Anexo E**).

Para analisar o desempenho do laboratório na análise deste MRC, foi utilizada a escala de “Z-scores” apresentada na **Figura 9** e calculada pela **Equação 8** (RELACRE 1996a).

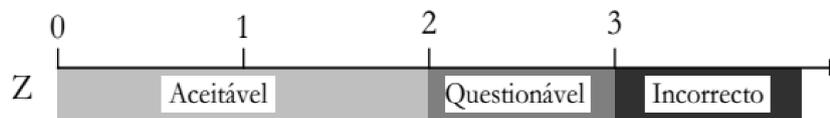


Figura 9 – Avaliação do desempenho com “Z-scores”. Adaptado de (RELACRE 1996a).

$$Z = \frac{X_{lab} - X_V}{s}$$

Equação 8

na qual:

X_{lab} – Valor obtido pelo laboratório

X_V – Valor aceite como verdadeiro (obtido pelo certificado do MRC)

s – Unidade de desvio (pode ser o desvio-padrão do MRC, da média dos laboratórios no ensaio ou ainda a incerteza de X_V)

Pretende-se que o laboratório tenha “Z-scores” inferiores a 2, isto é, que a diferença entre o valor obtido pelo laboratório e o valor aceite convencionalmente como verdadeiro seja inferior ao dobro do desvio-padrão do MRC, da média dos laboratórios no ensaio ou da incerteza do valor aceite como verdadeiro.

O fator de desempenho Z do laboratório, calculado pela **Equação 4**, foi de 0,6 e, portanto, abaixo de 2. Desta forma, conclui-se que o laboratório teve um bom desempenho na análise deste MRC e o mesmo será utilizado para o posterior cálculo da incerteza deste método.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controlo da qualidade e segurança alimentares tem-se tornado uma necessidade permanente e contínua, de forma a que o consumidor esteja informado acerca dos produtos que adquire e consome. Existem, por isso, um conjunto de normas e leis que visam assegurar todos os passos do processo de produção, transporte, armazenamento dos produtos alimentares, até que os mesmos sejam consumidos.

Neste contexto, a *Silliker Portugal S.A.* apresenta-se como a empresa em Portugal líder de mercado na garantia da qualidade dos produtos alimentares através de análises laboratoriais, auditorias, consultadoria, formação ou serviços de investigação.

O estágio curricular integrado no Sistema de Gestão da Qualidade de uma empresa como a *Silliker Portugal S.A.* foi extremamente enriquecedor, permitindo adquirir competências não só em áreas específicas das técnicas laboratoriais desenvolvidas, mas também na resolução e gestão de problemas usuais neste tipo de empresas.

Os três métodos validados no âmbito deste estágio – *Determinação de matéria gorda total em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 232), *Determinação da acidez em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 197) e *Determinação da acidez titulável em leites fermentados* (norma ISO/TS 11869) revelaram-se apropriados para as matrizes alimentares analisadas, permitindo à empresa a extensão das matrizes viáveis a serem analisadas pelos métodos avaliados.

No futuro, proceder-se-á à análise dos parâmetros em falta para que a validação fique concluída e será feita uma nova revisão aos procedimentos.

V. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS FORA DO ÂMBITO DOS OBJETIVOS DO ESTÁGIO

Para além dos três métodos realizados experimentalmente e validados no âmbito deste estágio curricular – *Determinação de matéria gorda total em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 232), *Determinação da acidez em diversas matrizes* (método interno PAFQ. 197) e *Determinação da acidez titulável em leites fermentados* (norma ISO/TS 11869), foram desenvolvidas outras atividades, enunciadas de seguida.

A nível de validação, foi também validado um método de referência para análise do resíduo seco em quatro matrizes diferentes de iogurtes – *Yogurt – Determination of total solids content (Reference Method)* (ISO 13580) e iniciada a validação da norma para *Determinação de nitratos e nitritos por cromatografia iónica* (método interno PAFQ. 215).

Foram, ainda, realizados ensaios de investigação no laboratório de forma a desenvolver dois procedimentos internos com base em normas portuguesas e/ou artigos científicos. Foram ambos bem-sucedidos, sendo que foram escritas as normas internas PAFQ.010 – *Pesquisa de atividade fosfatásica*, com testes realizados em três matrizes de produtos lácteos, e PAFQ.349 – *Determinação da cor do mel*, com testes realizados em sete tipos diferentes de mel e com diferentes colorações.

Por fim, surgiu a oportunidade de fazer parte da equipa da *Silliker Portugal S.A.*, sendo que os últimos dois meses e meio do estágio foram realizados nesta nova função, participando nas análises rotineiras da empresa nos ensaios de análise de fibra alimentar, determinação de humidade de vácuo, determinação de água, determinação de óleo volátil e determinação de finura.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akoh, C.C., 2017. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology* 4th ed., Taylor & Francis.
- ANKOM, 2017. *ANKOM Product Catalog*. Disponível em: <https://www.ankom.com/product-catalog/fatoil-filter-bags> [Acedido em 20 de Dezembro de 2017].
- AOCS, 2017. *The American Oil Chemists' Society*. Disponível em: <https://www.aocs.org/> [Acedido em 8 de Dezembro de 2017].
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P., 2009. *Food Chemistry* 4th ed., Springer.
- BIPEA, *BIPEA: A non profit association dedicated to testing laboratories since 1970*. Disponível em: <https://www.bipea.org/node/87> [Acedido em 27 de Dezembro de 2017].
- Chemistry, A.D., 2009. *Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents* 3rd ed. P. F. FOX & P. L. L. McSweeney, eds., Springer.
- Christian, G.D., 2004. *Analytical Chemistry* 6th ed., John Wiley & Sons, Inc.
- Codex Alimentarius Commission, 2017. *Recommended methods of analysis and sampling*, CXS 234-1999
- Ellison, S.L.R., Barwick, V.J. & Farrant, T.J.D., 2009. *Practical Statistics for the Analytical Scientist* 2nd ed., RSC Publishing.
- FAO & ESA, 2006. *Food Security*. , (2), pp.1-4.
- FDA, 2017. Code of Federal Regulations. 21. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=131.200&SearchTerm=yogurt> [Acedido a 2 de Janeiro de 2018].
- Gebhardt, S.E. & Thomas, R.G., 2002. *Nutritive Value of Foods*. Home and Garden Bulletin, (72).
- Grunert, K.G., 2005. *Food quality and safety : consumer perception and demand*. , 32(3), pp.369-391.

Harvey, D., 2008. *Analytical Chemistry 2.0*, McGraw-Hill Companies.

IPAC, 2017. *A Acreditação*. Disponível em: <http://www.ipac.pt/ipac/funcao.asp>

[Acedido a 28 de Dezembro de 2017].

ISO, 2005a. *ISO 9000: Quality Management Systems - Fundamentals And Vocabulary*,

ISO, 2005b. *NP EN ISO/IEC 17025: Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração*,

ISO, 2005c. *NP EN ISO 22000: Sistemas de gestão da segurança alimentar; Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar*,

Magnusson, B. & Ornemark, U., 2014. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* 2nd ed.,

Mérieux NutriSciences Portugal, 2017a. *Mérieux NutriSciences - Análise Nutricional*. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar/controlo-analitico-de-alimentos/analise-nutricional%0A> [Acedido a 1 de Novembro de 2017].

Mérieux NutriSciences Portugal, 2017b. *Mérieux NutriSciences - Areas of Expertise*. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/corporate/article/areas-expertise#biofortis> [Acedido a 1 de Novembro de 2017].

Mérieux NutriSciences Portugal, 2017c. *Mérieux NutriSciences - Ensaios Físico-químicos*. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar/controlo-analitico-de-alimentos/ensaios-fisico-quimicos> [Acedido a 1 de Novembro de 2017].

Mérieux NutriSciences Portugal, 2017d. *Mérieux NutriSciences - Indústria Alimentar*. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar/industria-alimentar> [Acedido a 1 de Novembro de 2017].

Mérieux NutriSciences Portugal, 2017e. *Silliker Portugal, S. A.* Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> [Acedido a 1 de Novembro de 2017].

Miller, J.N. & Miller, J.C., 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* 6th ed.,

Pearson Education Limited.

Napoli, M., Muro, P.P. De & Mazziotta, P.M., 2011. *Towards a Food Insecurity Multidimensional Index (FIMI)* , pp.1–72.

Nielsen, S.S., 2017. *Food Analysis* 5th ed. D. Heldman, ed., Springer.

RELACRE, 2000. *Guia RELACRE 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.

RELACRE, 1996a. *Guia RELACRE 3: Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*.

RELACRE, 1996b. *Guia RELACRE 7: Ensaio Interlaboratoriais em Química*.

Silliker Portugal S.A., 2016. *Manual da Qualidade*,

Simpson, B.K., 2012. *Food Biochemistry and Food Processing* 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc.

Skoog, D.A. et al., 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry* 9th ed., Saunders College Publishing.

USDA, 2017. *USDA Food Composition Databases*. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list> [Acedido a 26 de Dezembro de 2017].

York, R.K., 1995. *Quality assessment in a regulatory environment*. Food Quality and Preference, 6, pp.137–141.

VII. ANEXOS

Tabela A1 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para todas as matrizes constituintes do plano de validação.

Grupo de alimentos	Matriz	Teor de matéria gorda (g/100g)										Valor médio	Valor rotulado
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10		
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Farinha láctea	5,41	5,21	5,55	5,54	5,61	5,65	5,45	5,59	5,56	5,58	5,51	5,5
	Farinha não láctea	1,64	1,81	1,89	1,45	1,91	1,80	1,85	1,87	1,86	1,87	1,79	3,0
Alimentos para animais (simples e compostos)	Cat food	8,69	9,20	9,10	9,35	8,54	8,39	9,28	9,75	9,10	9,74	9,11	11,9
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Arroz	0,68	0,67	0,65	0,54	0,60	0,57	0,53	0,57	0,64	0,65	0,61	0,7
	Cereal	9,62	9,43	9,51	9,69	9,49	9,62	9,45	9,61	9,75	9,47	9,56	10,54
	Corn flakes	1,11	1,22	1,21	1,25	1,18	1,26	1,22	1,03	1,05	1,16	1,17	1,1
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Sementes de linhaça	29,24	19,56	21,97	19,18	23,20	18,05	18,52	17,95	19,49	18,49	20,56	40
	Quinoa	4,10	3,81	4,12	4,02	3,91	3,99	3,99	3,94	3,92	3,84	3,96	6

Tabela A2 – Valores obtidos (em duplicado) para as matrizes *cat food*, sementes de linhaça, quinoa, cereal e farinha não láctea por um método já implementado na empresa e validado para estas matrizes (PAFQ-069).

Matriz	Teor de matéria gorda (g/100g)	
<i>Cat food</i>	11,55	11,46
Sementes de linhaça	38,37	38,44
Quinoa	4,65	4,77
Cereal	9,29	9,35
Farinha não láctea	1,78	1,71

Tabela A3 – Diferença de massas dos sacos porosos *ANKOM^{XT4}* antes e após extração num ciclo de brancos, de forma a avaliar se o equipamento estava em boas condições de utilização após manutenção.

Branco	Diferença de massas antes e após extração	Avaliação
1	0,0003	OK
2	0,0004	OK
3	0,0004	OK
4	0,0001	OK
5	0,0004	OK
6	0,0003	OK
7	0,0003	OK
8	0,0003	OK
9	0,0002	OK
10	0,0003	OK
11	0,0004	OK

Tabela A4 – Valores obtidos em condições de repetibilidade pelo método PAFQ. 232 para o DPCS *Triscuit* que apresenta um intervalo aceitável de teor de matéria gorda de 14,040 – 12,710 g/100g.

Matriz	Teor de matéria gorda (g/100g)									
	<i>Ensaio</i> 1	<i>Ensaio</i> 2	<i>Ensaio</i> 3	<i>Ensaio</i> 4	<i>Ensaio</i> 5	<i>Ensaio</i> 6	<i>Ensaio</i> 7	<i>Ensaio</i> 8	<i>Ensaio</i> 9	<i>Ensaio</i> 10
<i>Triscuit</i>	13,370	13,092	13,121	13,361	13,122	13,623	12,843	13,355	13,038	12,786

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL	POR 100g DE PRODUTO	POR PORÇÃO (50g)	%DR*	DR*
ENERGIA	1527kJ 360kcal	764kJ 180kcal	9	8400kJ 2000kcal
LÍPIDOS DOS QUAIS: ÁCIDOS GORDOS SATURADOS	0,7g	0,4g	1	70g
HIDRATOS DE CARBONO DOS QUAIS: AÇÚCARES	80g	40g	15	260g
FIBRA	0,1g	0,1g	<1	90g
PROTEÍNAS	2,6g	1,3g		
SAL	7,1g	3,6g	7	50g
	0g	0g	0	6g

A

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL	POR 100g DE PRODUTO	POR PORÇÃO (30g)	%DR*	DR*
ENERGIA	1598kJ 377kcal	479kJ 113kcal	6	8400KJ 2000kcal
LÍPIDOS DOS QUAIS: SATURADOS	1,1g	0,3g	0	70g
HIDRATOS DE CARBONO DOS QUAIS: AÇÚCARES	0,5g	0,2g	1	20g
FIBRA	84g	25g	10	260g
PROTEÍNAS	7g	2,1g	2	90g
SAL	3,4g	1,0g		
	6,0g	1,8g	4	50g
	1,80g	0,54g	9	6g

B

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL			
Composição média		Por 100g (%VR*)	Por refeição: 25g + 160ml de leite de transição ¹⁾ (%VR*)
energia	kJ	1673	867
	kcal	395	206
Lípidos	g	2,1	5,6
dos quais saturados	g	0,3	2,1
Hidratos de carbono	g	81,2	33,6
dos quais açúcares	g	26,3	14,3
Fibra	g	3,4	0,9
Proteínas	g	11	4,8
Sal**	g	0,10	0,12

C

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL	POR 100g DE PRODUTO
ENERGIA	2128kJ 516kcal
LÍPIDOS DOS QUAIS: ÁCIDOS GORDOS SATURADOS	40g
HIDRATOS DE CARBONO DOS QUAIS: AÇÚCARES	3,2g
FIBRA	3,6g
PROTEÍNAS	1,7g
SAL	27,0g
	21,8g
	0,1g

D

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL/ NUTRITION DECLARATION	POR 100g DE PRODUTO/ PER 100g OF PRODUCT
ENERGIA/ ENERGY	1485kJ 352kcal
LÍPIDOS/ FAT DOS QUAIS/ OF WHICH: SATURADOS/ SATURATES	6g
HIDRATOS DE CARBONO/ CARBOHYDRATE DOS QUAIS/ OF WHICH: AÇÚCARES/ SUGARS	0,7g
FIBRA/ FIBRE	57g
PROTEÍNAS/ PROTEINS	2g
SAL/ SALT	7g
	14g
	0,01g

E

Figura A1 – Informação nutricional contida nos rótulos das amostras de arroz (A), *corn flakes* (B), farinha não láctea (C), sementes de linhaça (D) e quinoa (E). O parâmetro utilizado foi o teor total de lípidos para a norma PAFQ. 232.

Certificate of Reference Materials		Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien			
yoghurt 3.5-3.8% fat					
RM CP L JO 22					
ref. 07.03.2018					
reference values					
parameter	reference value	uncertainty	unit		
fat	3,78	0,08	g/100g		
dry matter	15,91	0,35	g/100g		
protein (N x 6,38)	4,75	0,08	g/100g		
pH value	4,14	0,02			
total lactic acid	1259	73	mg/100g		
<p>The reference values are established on the basis of the corresponding statistical data and reported as rounded data. For the uncertainty of the reference value the uncertainty of the best estimate of the true value out of the proficiency testing will be chosen.</p>					
statistical data					
parameter	weighted and combined standard deviation / MAD of the best estimate	total uncertainty of the best estimate (95,5%)	method of choice	number of values	number of proficiency testing schemes
fat	± 0,16	± 0,08	alle Methoden/ all methods	19	1
dry matter	± 0,49	± 0,35	102°C±2°C, Seesand	10	1
protein (N x 6,38)	± 0,11	± 0,08	Kjeldahl	10	1
pH value	± 0,02	± 0,02	elektrom.	7	1
total lactic acid	± 87,00	± 72,90	alle Methoden/ all methods	8	1
<p>For the calculation of the reference values 3 different statistical methods were used: sensitive statistic, sensitive statistic including outlier elimination and robust statistic. Each of the statistical methods were rated according the chi2-goodness of fit test. A chi2-value smaller than 7,82 reflects a high confidence in the applied statistics.</p>				<p>Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien GmbH Sitz der Gesellschaft: Kempten Handelsregister HRB 9496 Amtsgericht Kempten</p>	
<p>The uncertainty indicates the limits of reliability of the mean at 95,5 % statistical significance.</p>				<p>Fon: +49 (0)8 31/960 878-0 Fax: +49 (0)8 31/960 878-99 E-Mail: info@DRRR.de Website: www.DRRR.de Bodmanstraße 4 D-87435 Kempten</p>	
<p>The traceability is based on the method/s of choice if available the reference method. Therefore only the results of those participants which use the method/s of choice or where available the reference method are considered for the best estimate.</p>				<p>Sitz der Gesellschaft: Kempten Handelsregister HRB 9496 Amtsgericht Kempten Geschäftsführer: Dr. rer. nat. Ulrich Leist, Thorsten Helbig M.Eng.</p>	

Figura A2 – Certificado do MRC utilizado para estudos da norma ISO/TS 11869 (parte 1).

Certificate of Reference Materials		Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien
general information		
SAMPLES ARE UNFIT FOR CONSUMPTION!		
yoghurt 3.5-3.8% fat		
<u>produced:</u>	10/2017	
<u>sample quantiti</u>	500g	<u>packaging:</u> glas
The material has to be used within:		04/2018
(Storage sealed at + 6-8 °C)		
The material is checked regularly by DRRR.		
Before opening the pack for use bring it to room temperature.		
The contents may change in the opened package or due to incorrect storage. The material is suitable to be used for regular performance control in chemical analysis of yoghurt 3.5-3.8% fat and to control the reference analytic. It is also especially with regard to accuracy, as well as for validation of a laboratories' own method.		
A guarantee of the reference values and their uncertainties is only given under the precondition that the material is unopened, stored and used as described above.		
homogeneity		
The homogeneity testing was carried out on	19.10.2017	Lactosone
A homogeneity test was carried out at representative random samples in double determination acc. to ISO 13528 (Intern. Harmonised Protocol).		
The homogeneity test was carried out at chosen indicator parameters to get information about the principal suitability of the material. If the between-sample standard deviation S_s of the material homogeneity is smaller than 30 % of a material specific test statistic the samples are classified as homogeneity (for further information please see our statistical protocol). When this rule cannot be followed it will be proved if the higher variance is usual for this material type. Only materials which achieve these requirements are used.		
Certificate checked:	Milena Funk	
Certificate approved:	Dr. Ulrich Leist	
		

After sample opening the testing has to be carried out immediately. The reference values are only guaranteed until first sample opening

Figura A3 – Certificado do MRC utilizado para estudos da norma ISO/TS 11869 (parte 2).

Tabela A5 – Valores da função *t*-Student para vários níveis de confiança e números de graus de liberdade (Adaptado de (Miller & Miller 2010)).

Graus de liberdade	Intervalo de confiança			
	90%	95%	98%	99%
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
∞	1,64	1,96	2,33	2,58

Tabela A6 – Valores críticos de Cochran (95% de confiança) (Adaptado de (Ellison et al. 2009)).

Nº de matrizes	Número de ensaios para cada matriz								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0,9985	0,975	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,801
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,653	0,6333	0,6167
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,398	0,3817	0,3682
7	0,7271	0,5612	0,48	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,391	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659
10	0,602	0,445	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439
12	0,541	0,3924	0,3264	0,288	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,116
30	0,2929	0,198	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958
40	0,237	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,078	0,0745

Tabela A7 – Valores críticos de Grubbs, com um nível de confiança de 99% (Adaptado de (Ellison et al. 2009)).

N	G _{99%}	N	G _{99%}
3	1,155	22	3,060
4	1,496	23	3,087
5	1,764	24	3,112
6	1,973	25	3,135
7	2,139	26	3,157
8	2,274	27	3,178
9	2,387	28	3,199
10	2,482	29	3,218
11	2,564	30	3,236
12	2,636	31	3,253
13	2,699	32	3,270
14	2,755	33	3,286
15	2,806	34	3,301
16	2,852	35	3,316
17	2,894	36	3,330
18	2,932	37	3,343
19	2,968	38	3,356
20	3,001	39	3,369
21	3,031	40	3,381