



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
Ano 2020

**Mariana Pinheiro  
Marçal Valgode  
Aparício**

**Validação de um método por cromatografia líquida  
de alta eficiência para determinação de teobromina**



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2020**

Departamento de Química

**Mariana Pinheiro**  
**Marçal Valgode**  
**Aparício**

**Validação de um método por cromatografia  
líquida de alta eficiência para determinação de  
teobromina**

Relatório apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira, Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**o júri**

presidente

Prof. Doutor João Filipe Colardelle da Luz Mano  
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira  
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutor Valdemar Inocência Esteves  
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu percurso académico até à data, bem como para a realização deste projeto.

Ao Professor Doutor João Oliveira por todos os esclarecimentos, conselhos e incentivo transmitidos durante esta etapa tão importante.

A toda a equipa *Silliker* Portugal, em especial à doutora Alice Santos pela oportunidade, à doutora Laura Sousa e aos colaboradores do laboratório de MIA, pelo acolhimento, apoio e ajuda prestados durante a minha passagem pela empresa.

Às minhas colegas estagiárias que viveram comigo esta última etapa do meu percurso académico. Agradeço a ajuda, o carinho e a alegria prestados diariamente.

À minha mãe e a toda a minha família por estar sempre presente e me apoiar nos momentos menos fáceis.

Ao Paulo e aos meus amigos de sempre por todo o amor, carinho e, acima de tudo, incentivo e paciência.

**palavras-chave**

Validação, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Teobromina, AOAC 980.14.

**resumo**

O presente relatório de estágio foi desenvolvido no âmbito do mestrado em Biotecnologia, ramo Alimentar, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro no laboratório de Métodos Instrumentais de Análise da *Silliker* Portugal, S.A., uma empresa acreditada que se dedica à prestação de serviços analíticos e de consultoria no setor agroalimentar.

A validação de métodos é imprescindível para assegurar resultados precisos e fiáveis e a qualidade dos serviços analíticos prestados.

Durante o período de estágio foram analisados Materiais de Referência Certificados (MRC) e amostras de clientes para a validação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de teobromina em produtos à base de cacau e numa ração baseado no método 980.14 da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC), tendo sido desenvolvido um procedimento de análise interno.

A nível experimental foram realizados diversos ensaios que permitiram avaliar a sensibilidade, linearidade, limite de quantificação, gama de trabalho, seletividade, repetibilidade, precisão intermédia, veracidade e estimativa da incerteza, bem como traçar curvas de calibração diárias.

Para a validação do método da teobromina foram consideradas catorze matrizes à base de cacau, entre as quais dois MRC, e uma ração animal, pertencentes a sete grupos alimentares.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, o que permitiu confirmar a fiabilidade do método no contexto laboratorial e qualidade pretendidos.

**keywords**

Validation, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Theobromine, AOAC 980.14.

**abstract**

The present internship report was developed within the scope of the master's degree in Biotechnology, Food branch, from the Department of Chemistry of the University of Aveiro in the laboratory of Instrumental Methods of Analysis of Silliker Portugal, SA, an accredited company dedicated to providing analytical and consultancy services in the agri-food sector.

Validation of methods is essential to ensure accurate and reliable results as well as the quality of analytical services provided.

During the internship period, Certified Reference Materials (CRM) and customers samples were analysed for validation of a method by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to determine theobromine content in cacao products and animal food based on 980.14 method published by Association of Official Analytical Chemists (AOAC). An internal analysis procedure was developed for the theobromine method.

In laboratory, several experiments were carried out to assess sensitivity, linearity, limit of quantification, working range, selectivity, repeatability, intermediate precision, trueness and uncertainty estimation, as daily calibration curves.

For theobromine's method validation fourteen cocoa-based matrices, including two CRM, and one animal food were considered.

The results obtained were satisfactory, which allowed to confirm the method's reliability in the laboratory context and required quality.

# Índice

Índice .....	i
Índice de figuras .....	iii
Índice de tabelas .....	iv
Lista de abreviaturas e símbolos .....	vi
1. Introdução .....	1
1.1. A empresa .....	2
1.2. Objetivos do estágio .....	4
1.3. Importância da Segurança e Qualidade Alimentar .....	4
1.4. Controlo de Qualidade Interno da <i>Silliker</i> .....	6
1.4.1. Amostras diárias do controlo do processo .....	6
1.4.2. Cartas de controlo.....	7
1.4.3. Amostras em duplicado .....	8
1.4.4. Amostras cegas .....	9
1.4.5. Ensaio de comparação interlaboratorial (EI) .....	9
2. Revisão Bibliográfica .....	10
2.1. Teobromina .....	11
2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	13
2.3. Validação de métodos em Análise Química .....	16
2.3.1. Parâmetros de avaliação indireta.....	17
2.3.1.1. Especificidade e seletividade.....	17
2.3.1.2. Quantificação.....	18
2.3.1.2.1. Sensibilidade .....	18
2.3.1.2.2. Curvas de Calibração .....	19
2.3.1.2.3. Limiares analíticos .....	21
2.3.1.3. Precisão .....	23

2.3.1.3.1. Repetibilidade.....	23
2.3.1.3.2. Reprodutibilidade.....	25
2.3.1.3.3. Precisão intermédia.....	26
2.3.2.Parâmetros de avaliação direta.....	27
2.3.2.1.Exatidão .....	27
2.3.2.2.Incerteza.....	30
3. Parte experimental .....	33
3.1. Validação do método: “Determinação de teobromina”.....	34
3.1.1. Reagentes e soluções .....	34
3.1.2. Material e equipamentos.....	35
3.1.3. Preparação das amostras .....	35
3.1.4. Técnica experimental.....	35
3.1.5. Condições cromatográficas .....	36
3.1.6. Matrizes .....	37
4. Resultados e Discussão .....	38
4.1. Validação do método: “Determinação de teobromina”.....	39
4.1.1. Quantificação .....	39
4.1.2. Especificidade e seletividade.....	47
4.1.3. Precisão.....	48
4.1.4. Veracidade.....	58
4.1.5. Estimativa da incerteza.....	60
5. Conclusões e Perspetivas futuras .....	62
6. Referências bibliográficas .....	65



## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Instalações da <i>Silliker Portugal, S.A.</i> , em Canelas.....	2
<b>Figura 2-</b> Esquema representativo da organização estrutural da <i>Silliker Portugal, S.A.</i> .....	3
<b>Figura 3 -</b> Estrutura de uma carta de controlo de médias ou de indivíduos. ....	8
<b>Figura 4-</b> Estrutura química das metilxantinas principais: teobromina (a), cafeína (b), teofilina (c). (Sena, Assis, & Branco, 2011) .....	11
<b>Figura 5 -</b> Representação de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução. Adaptado de Grubert (2018). ....	14
<b>Figura 6 -</b> Carta de controlo dos declives no período estudado. ....	44

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Preparação das soluções de calibração por diluição da solução-mãe de teobromina. ....	34
<b>Tabela 2</b> - Massa da toma de cada matriz estudada, em gramas. ....	36
<b>Tabela 3</b> - Condições cromatográficas para a determinação da teobromina. ....	37
<b>Tabela 4</b> - Matrizes estudadas, e respetivo grupo, para validação do método AOAC 980.14. ....	37
<b>Tabela 5</b> – Concentração das soluções-padrão de teobromina, em mg/L, e respetivas áreas obtidas, em mAU.s, no ensaio realizado no dia 30/01/2020.....	39
<b>Tabela 6</b> – Erro relativo, em percentagem, dos padrões lidos na análise do dia 30/01/2020 para validação e avaliação da estabilidade do equipamento ao longo das leituras.....	40
<b>Tabela 7</b> - Equações das retas de calibração no período estudado.....	41
<b>Tabela 8</b> – Teste de Grubbs para rejeição de valores aberrantes dos declives das retas de calibração.....	41
<b>Tabela 9</b> - Valores considerados no teste de Tukey para comparação múltipla dos declives. ....	42
<b>Tabela 10</b> - Comparação múltipla dos declives. ....	43
<b>Tabela 11</b> - Valores das linhas central (média), limites superior e inferior de controlo (LSC e LIC) e limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA) da carta de controlo dos declives da reta de calibração.....	44
<b>Tabela 12</b> - Concentração de teobromina, em mg/kg, em 2 amostras de chocolate branco, média e desvio-padrão. ....	45
<b>Tabela 13</b> - Valor de recuperação média obtida para a fortificação de chocolate branco com o padrão 2 mg/L e respetivos parâmetros (média e desvio-padrão). ....	45
<b>Tabela 14</b> - Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias para a gama de trabalho.....	47
<b>Tabela 15</b> - Valor de recuperação média obtida para a fortificação da matriz ‘ração para gato’ com solução-padrão para uma concentração de 75 mg/L e respetivos parâmetros (média e desvio-padrão). ....	48
<b>Tabela 16</b> – Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg.....	50
<b>Tabela 17</b> - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade da matriz eliminada. ....	50

<b>Tabela 18</b> - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg, .....	51
<b>Tabela 19</b> - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg. ....	52
<b>Tabela 20</b> - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg. ....	53
<b>Tabela 21</b> - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg.....	54
<b>Tabela 22</b> - Valores obtidos para o estudo da repetibilidade na amostra chocolate de leite. .	54
<b>Tabela 23</b> - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg.....	55
<b>Tabela 24</b> - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg.....	56
<b>Tabela 25</b> - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg. ....	56
<b>Tabela 26</b> - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg. ....	57
<b>Tabela 27</b> – Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia para o método de determinação de teobromina (AOAC 980.14).....	58
<b>Tabela 28</b> - Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais com amostras de circuito. ....	59
<b>Tabela 29</b> - Resultados obtidos nas matrizes certificadas analisadas pelo método em equipamento.....	60
<b>Tabela 30</b> – Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg.....	61
<b>Tabela 31</b> - Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina maior ou igual a 500 mg/kg e menor que 2000 mg/kg. ....	61
<b>Tabela 32</b> - Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina igual ou superior a 2000 mg/kg.....	61

## Lista de abreviaturas e símbolos

$\Delta C$	Variação da concentração
$\Delta L$	Acréscimo do valor lido
a	Ordenada na origem
AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais (do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i> )
b	Declive da reta da curva de calibração
BRC	Consórcio do Retalho Britânico (do inglês <i>British Retail Consortium</i> )
CC	Carta de Controlo
Cf	Concentração final
Cfo	Concentração fortificada
Ci	Concentração inicial
CQ	Controlo de Qualidade
$CV_{pi}$	Coefficiente de variação da precisão intermédia
$CV_r$	Coefficiente de variação da repetibilidade
$CV_R$	Coefficiente de variação da reprodutibilidade
DCV	Doenças Cardiovasculares
DPCS	Amostras diárias do controlo do processo (do inglês <i>Daily Process Control Samples</i> )
DRRR	Gabinete de referência alemão para testes de proficiência alimentar (do alemão <i>Deutsches Referenzbüro für Ringversuche und Referenzmaterialien</i> )
$DS^2$	Diferença entre Variâncias
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (do inglês <i>European Food Safety Authority</i> )
EGI	Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade Industrial
EI	Ensaio de comparação interlaboratorial
EN	Norma Europeia
F	Valor tabelado da distribuição de Fisher-Snedecor
FAPAS	Esquema de Avaliação de Desempenho de Análise de Alimentos (do inglês <i>Food Analysis Performance Assessment Scheme</i> )
FSC	Centro da Ciência Alimentar (do inglês <i>Food Science Center</i> )
GHP	Boas Práticas de Higiene (do inglês <i>Good Hygiene Practice</i> )

GMP	Boas Práticas de Fabrico (do inglês <i>Good Manufacturing Practice</i> )
HACCP	Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (do inglês <i>Hazard Analysis and Critical Control Point</i> )
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> )
HSD	Diferença Honestamente Significativa (do inglês <i>Honest Significant Difference</i> )
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês <i>International Electrotechnical Commission</i> )
IPAC	Instituto Português De Acreditação
ISO	Organização Internacional para Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i> )
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
$k$	Fator de expansão
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MIA	Métodos Instrumentais de Análise
MRC	Materiais de Referência Certificados
MSE	Erro Quadrático Médio (do inglês <i>Mean Squared Error</i> )
$n$	Número de resultados
NP	Norma Portuguesa
$n_{PT}$	Número de resultados no Teste de Proficiência
$\bar{P}$	Média das populações usadas no Teste de Proficiência
PG	Razão entre variâncias
PI	Precisão intermédia
$r$	Limite da repetibilidade
R	Limite da reprodutibilidade
Rw	Desvio-padrão da população
$s$	Desvio-padrão
$S_0$	Desvio-padrão associado a $X_0$
$S^2$	Variância
$s_b$	Desvio-padrão do declive

SNC	Sistema Nervoso Central
Sri	Desvio-padrão da repetibilidade
SRi	Desvio-padrão da reprodutibilidade
S <sub>Xlab</sub>	Desvio-padrão dos valores obtidos pelo laboratório
S <sub>y/x</sub>	Desvio padrão residual
t <sub>r</sub>	Tempo de retenção
u <sub>c</sub>	Incerteza combinada
UE	União Europeia
u <sub>lab</sub>	Incerteza do laboratório
u <sub>ref</sub>	Incerteza do valor verdadeiro
V <sub>f</sub>	Volume final
V <sub>i</sub>	Volume inicial
$\bar{x}$	Valor médio
X <sub>0</sub>	Média de brancos
X <sub>lab</sub>	Valor obtido pelo laboratório (EI)
X <sub>ref</sub>	Valor de referência para a amostra (EI)
x <sub>s</sub>	Valor suspeito
X <sub>v</sub>	Valor aceite como verdadeiro
Y <sub>i</sub>	Valor observado
$\hat{y}_i$	Valor esperado
Z	Fator de desempenho valor-Z

# 1. Introdução

---

## 1.1. A empresa

A empresa surgiu em 1992 em Vila Nova de Gaia como EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda. – onde rapidamente assumiu uma posição líder nacional no setor agroalimentar ao nível da Qualidade e Segurança Alimentar. (Mérieux NutriSciences, 2017)

Desde 1993, a empresa é acreditada pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação, I.P.), com a acreditação nº L0087.

A acreditação constitui uma ferramenta vantajosa por transmitir confiança na execução das atividades técnicas, oferecer serviços harmonizados e confirmar a existência de um nível de competência técnica mínimo reconhecido internacionalmente.

Resultante do seu crescimento, adquiriu, em 2005, novas instalações em Canelas, no mesmo concelho, onde atualmente ainda se localiza (Figura 1).

Mais tarde, em 2008, a multinacional norte-americana *Silliker* adquiriu a empresa, originando a *Silliker Portugal, S.A.*, e tornando esta numa parte integrante de um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços de qualidade e segurança alimentar. (Mérieux NutriSciences, 2017)



**Figura 1-** Instalações da *Silliker Portugal, S.A.*, em Canelas

Em 2014 a *Silliker* apresenta-se como *Mérieux NutriSciences*, cuja missão passa por proteger a saúde dos consumidores ao oferecer uma gama de serviços analíticos (microbiológico, químico, sensorial) e de consultoria para a indústria no setor alimentar, nutrição, água e ambiente, farmacêutica e cosméticos. (Mérieux NutriSciences, 2017)

Atualmente, a empresa é constituída por cerca de 120 laboratórios acreditados, presentes em 26 países, que se regem pela norma NP EN ISO/IEC 17025.

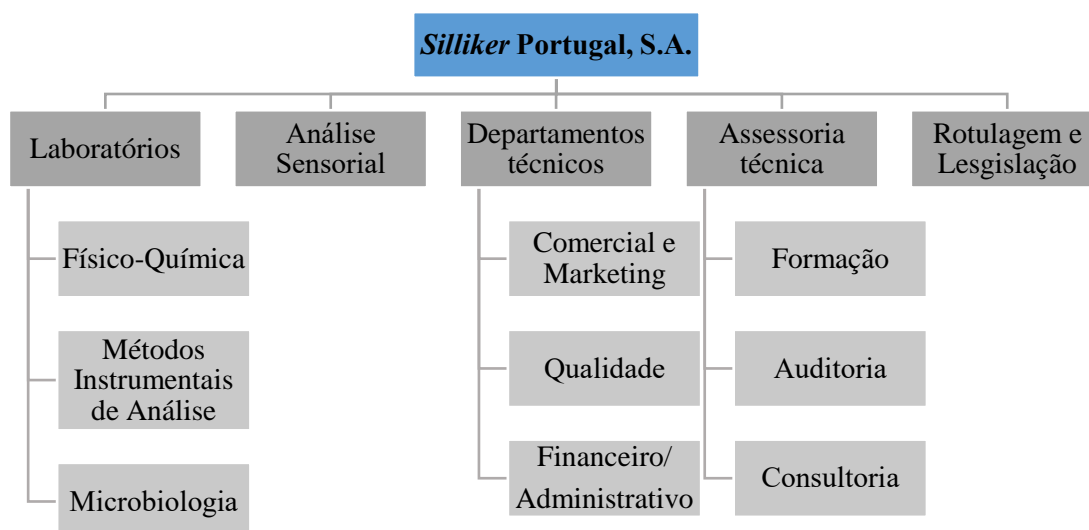


A norma ISO/IEC 17025 define os requisitos gerais necessários para o reconhecimento de competência para levar a cabo a realização de ensaios e calibrações e, desta forma, o laboratório adquirir acreditação pela entidade competente, (Braga, 2009) neste caso o IPAC.

O Sistema de Gestão de Qualidade da empresa engloba parâmetros como a realização de ensaios de comparação interlaboratorial, recurso a amostras diárias do controlo do processo, formações frequentes para os colaboradores, um serviço de excelência ao cliente, entre outros, que garantem a qualidade das suas operações e resultados precisos e exatos para os seus clientes. A empresa possui ainda um Manual da Qualidade próprio, como requisito da norma, que todos os colaboradores e estagiários tomam conhecimento aquando da sua entrada. Neste documento constam informações detalhadas de procedimentos e políticas do laboratório, da relação organizacional, responsabilidades e autoridade dos colaboradores e auditores internos, e ainda descrição dos recursos do laboratório.

De acordo com este Sistema de Qualidade implementado, a *Mérieux NutriSciences* está acreditada como Laboratório de Ensaios e presta serviços de controlo analítico com os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

A empresa é constituída por três laboratórios distintos: o de Físico-Química onde se praticam técnicas de Química Clássica, o de Métodos Instrumentais de Análise para técnicas de análise cromatográficas e espectrofotométricas e o de Microbiologia para estudo da presença de microrganismos (Figura 2).



**Figura 2-** Esquema representativo da organização estrutural da *Silliker Portugal, S.A.*

## **1.2. Objetivos do estágio**

O presente trabalho foi realizado em contexto do estágio curricular do mestrado de Biotecnologia, ramo alimentar, da Universidade de Aveiro no laboratório de Métodos Instrumentais de Análise (MIA) da empresa *Silliker Portugal, S.A.*, sediada em Canelas, Vila Nova de Gaia, sob orientação da Engenheira Laura Cristina de Oliveira Sousa, responsável técnica do laboratório de MIA.

O objetivo deste estágio consistiu na validação de um método analítico para determinação de teobromina em produtos alimentares à base de cacau e de uma ração por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os parâmetros estudados foram: sensibilidade, seletividade, linearidade, gama de trabalho, limite de quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermédia), veracidade e estimativa da incerteza.

Em paralelo, foram adquiridas competências ao nível do trabalho de rotina de um laboratório acreditado.

## **1.3. Importância da Segurança e Qualidade Alimentar**

Nas últimas décadas as cadeias de produção, distribuição e o consumo de alimentos tornaram-se complexas como resultado da globalização e, conseqüentemente, do crescimento exponencial da população e da escassez de alimentos. (Rounaq Nayak, 2019)

Na verdade, a globalização do mercado e o aumento da complexidade da cadeia de produção agravaram a ocorrência de fraudes alimentares, criando a necessidade de desenvolver abordagens caso a caso para a análise de produtos alimentares. (Mérieux NutriSciences, s.d.)

Uma fraude alimentar caracteriza-se pela produção e/ou comercialização deliberada de alimentos não conformes com o declarado no rótulo ou legislação, podendo afetar a saúde pública e tendo como objetivo único a obtenção de benefícios económicos. (Mérieux NutriSciences, s.d.; BRCGS, 2020)

Além disso, a cadeia de fornecimento de alimentos é uma estrutura composta por diversas etapas com interação entre si, o que torna mais suscetível a ocorrência de doença por intoxicação alimentar. (Rounaq Nayak, 2019)

A Segurança Alimentar passa por impedir a introdução, crescimento ou sobrevivência de qualquer perigo alimentar (agente físico, químico ou biológico) ao longo desta cadeia. (Gizaw, 2019)

Um dos desafios da indústria alimentar visa garantir a segurança dos produtos comercializados ao reduzir a exposição do consumidor ao risco de doença através de alimentos contaminados e inseguros.

Atualmente, também é crescente a preocupação por uma alimentação saudável. Os consumidores estão cada vez mais conscientes da proveniência dos alimentos que consomem e do impacto que a alimentação tem na manutenção da saúde e prevenção da doença. (Carvalho, 2020)

Por outro lado, derivado ao estilo de vida atual, a procura de produtos prontos a consumir tem vindo a aumentar. (Carvalho, 2020) Este tipo de produto tem um prazo de consumo mais alargado graças à investigação e desenvolvimento da Tecnologia Alimentar. Contudo, tal não implica uma desvalorização, ainda que inconsciente, de considerações de segurança alimentar ao longo da cadeia de fornecimento e das quais a indústria e o consumidor são responsáveis.

De facto, a indústria tem normas de controlo de qualidade e de segurança a cumprir, mas também o consumidor deve assegurar uma manipulação adequada. (Australian Institute of Food Safety, 2019) Estima-se que, na Europa, um terço dos casos de intoxicação alimentar ocorre devido a mau manuseamento por parte do consumidor. (Byrd-Bredbenner, Berning, Martin-Biggers, & Quick, 2013)

A nível industrial, a garantia da qualidade é obtida através da implementação e cumprimento de Sistemas de Qualidade adequados ao setor, como Códigos de Boas Práticas (GMP e GHP), HACCP, ISO, BRC. Estes sistemas diferem na área, tecnologia e estratégia seguidas e são ferramentas de correção para qualquer erro que surja passível de influenciar a segurança e qualidade do produto. (Gil, 2018)

A nível laboratorial, o Controlo de Qualidade (CQ) aparece como um conjunto de técnicas de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade e pode ser distinguido em interno ou externo. O CQ interno engloba ações cuja implementação depende unicamente do laboratório, com o fim de assegurar a monitorização contínua das operações e fornecimento de resultados confiáveis. O CQ externo depende de intervenções exteriores ao laboratório, como a participação em ensaios interlaboratoriais, e é um meio reconhecido para supervisionar o seu desempenho contra os seus próprios requisitos e os de laboratórios parceiros. (Eurachem, 2016; RELACRE, 1996)

A Qualidade Alimentar engloba todas as características dos produtos que fazem com que o consumidor fique satisfeito com o mesmo, nomeadamente sensoriais, mecânicas, funcionais e de segurança.

Assim, a análise de produtos alimentares passa por uma avaliação das suas propriedades nutricionais e de qualidade para ir de encontro às exigências do consumidor e para estar de acordo com a legislação vigente, contribuindo para a diminuição da ocorrência de fraude alimentar.

A União Europeia colocou em vigor o Regulamento (UE) n.º 1169/2011 para estabelecer os princípios, requisitos e responsabilidades gerais que regem a informação sobre os géneros alimentícios e sobre a rotulagem dos mesmos.

As propriedades dos produtos alimentares comercializados são analisadas através da realização de vários ensaios cujos métodos devem ser previamente validados.

A validação de um método torna-se num meio fundamental para assegurar o cumprimento da qualidade analítica. Os critérios seguidos são uniformizados e demonstram que o método de ensaio leva a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida, permitindo avaliar a competência do laboratório. (RELACRE, 2000; Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998)

#### **1.4. Controlo de Qualidade Interno da *Silliker***

De forma a assegurar a qualidade dos serviços analíticos prestados, a *Silliker* desenvolveu um procedimento relativo ao controlo de qualidade interno composto por ações preventivas cuja implementação depende unicamente do laboratório. (*Silliker Portugal S.A.*, 2019) O cumprimento dos critérios exigidos nesse guia, bem como a realização de auditorias internas, resulta numa diminuição significativa da ocorrência de erros e possibilita um maior rigor profissional.

##### **1.4.1. Amostras diárias do controlo do processo**

As amostras diárias do controlo do processo (DPCS – *Daily Process Control Samples*) são amostras internas com características bem definidas em homogeneidade e estabilidade, usadas para verificações de controlo diárias e para a construção de cartas de controlo. Em cada série de trabalho é realizada a análise de uma DPCS. Estas amostras são geralmente preparadas no *Food Science Center* (FSC) em grande quantidade, pois são utilizadas por todos os

laboratórios do grupo *Mérieux NutriSciences*. Podem também ser utilizados materiais de referência.

O FSC é um laboratório pertencente à *Mérieux NutriSciences* que presta serviços de investigação e desenvolvimento para a indústria alimentar.

Todos os resultados obtidos são introduzidos na plataforma ZETA SAFE, um programa informático para documentação e tratamento de dados registados em cartas de controlo. Tal permite a monitorização dos parâmetros de precisão, através da análise do desvio-padrão relativo, e exatidão, pelo fator de desempenho valor-Z, cumpridos por todos os laboratórios do grupo. Se o resultado da amostra DPCS se encontrar fora dos limites estabelecidos, então todos os resultados da série de trabalho ficam suspensos até a não conformidade ser tratada.

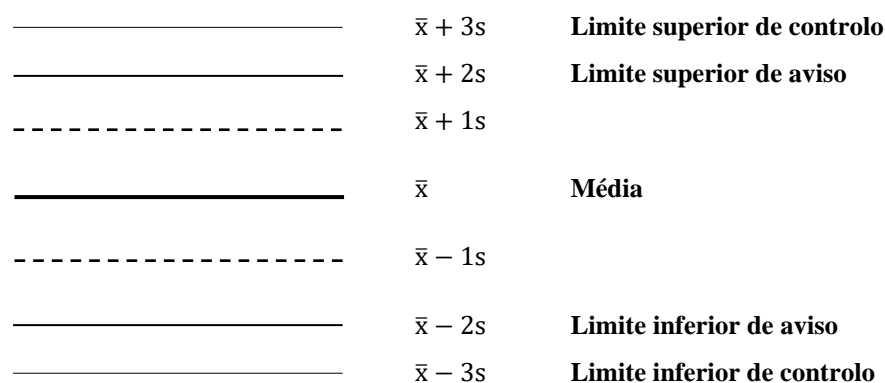
#### **1.4.2. Cartas de controlo**

De acordo com a RELACRE, existem três tipos de cartas de controlo (CC). As CC de média ou de indivíduos permitem acompanhar a variação de um parâmetro ao longo do tempo. As CC de amplitudes que permitem controlar a diferença de valores observada para ensaios repetidos sob a mesma matriz ou de materiais diferentes de uma gama de trabalho definida. As CC de somas cumulativas em que se representa a soma dos desvios observados em relação ao valor esperado. (RELACRE, 1996; RELACRE, 1998)

Na *Silliker* são utilizadas cartas de controlo de médias ou de indivíduos e cartas de controlo baseadas em valores fixos.

Nas cartas de controlo de médias ou de indivíduos a ocorrência de erros é aleatória, pelo que a distribuição dos pontos em torno do valor médio ( $\bar{x}$ ) segue a Lei Normal.

Na construção da carta, os limites são traçados de acordo com a média e desvio-padrão de, pelo menos, 20 pontos obtidos num período semelhante àquele que depois irão representar os dados. Contudo, de acordo com o procedimento global da empresa, podem ser definidos limites de controlo temporários com 7 pontos. Estas linhas de referência encontram-se representadas na figura abaixo (Figura 3).



**Figura 3** - Estrutura de uma carta de controlo de médias ou de indivíduos.

A *Silliker* considera como tendências sistemáticas representativas de sistemas fora de controlo as seguintes situações:

- Séries de 7 ou mais pontos consecutivos em movimento ascendente ou descendente;
- Conjunto de 8 ou mais pontos consecutivos acima ou abaixo da média definida.

As cartas de controlo baseadas em valores fixos são utilizadas para a verificação de parâmetros de equipamentos, como a temperatura em frigoríficos, banhos, estufas e muflas. Neste caso, a estrutura da CC é constituída por uma linha central definida pela temperatura alvo, baseada em literatura ou definido no próprio equipamento, uma linha superior e uma linha inferior, entre os quais os valores lidos devem estar situados.

Em ambos os casos, no eixo das abcissas deve marcar-se a referência temporal, como semana, e no eixo das ordenadas o parâmetro, como a temperatura em °C.

### 1.4.3. Amostras em duplicado

A análise de amostras em duplicado é feita diariamente e é da responsabilidade do analista que realiza o ensaio. A escolha das amostras é aleatória e compreende 5 % a 10 % do total de análises, isto é, a cada 5 ou 10 amostras de clientes é analisada uma em duplicado. Este parâmetro permite detetar erros aleatórios e controlar a repetibilidade dos ensaios. Os resultados dos clientes são introduzidos no programa informático interno que estima a diferença entre duplicados e determina se os valores são ou não aceites com base na variação permitida pelo procedimento.

A variação deve ser inferior ao limite de repetibilidade definido para o método. Caso tal valor não seja conhecido, então a variação entre duplicados não deve exceder 10 % do valor médio para valores  $\leq 1$  g/100 g ou 5 % do valor médio para valores  $> 1$  g/100 g.

#### **1.4.4. Amostras cegas**

As amostras cegas poderão ser excedentes variados de clientes, provenientes de ensaios de comparação interlaboratorial, DPCS ou materiais de referência. O uso destas amostras tem como objetivo avaliar os analistas em relação à qualificação e/ou manutenção de competências, pois não têm conhecimento de quando estão a analisar uma. A escolha da amostra, das análises e da periodicidade é da responsabilidade do pessoal técnico da qualidade. A avaliação do resultado é feita pela diferença entre o valor obtido e o valor aceite e comparado com a precisão intermédia, reprodutibilidade ou repetibilidade do método em questão.

#### **1.4.5. Ensaio de comparação interlaboratorial (EI)**

Os EI encontram-se sucintamente descritos no tópico 2.3.2. Parâmetros de avaliação direta.

A *Silliker* participa, no mínimo, em dois circuitos por ano para cada método acreditado. A realização de EI é um requisito da norma implementada e permite avaliar o desempenho dos laboratórios participantes através do fator de desempenho valor-Z e do enviesamento.

Estes ensaios permitem detetar erros sistemáticos, implementar ações corretivas e preventivas, demonstrar a competência técnica dos analistas e dos métodos e avaliar o desempenho de um método no momento da validação. Estas ações são levadas a cabo pelos responsáveis técnicos e pelo pessoal técnico da qualidade.

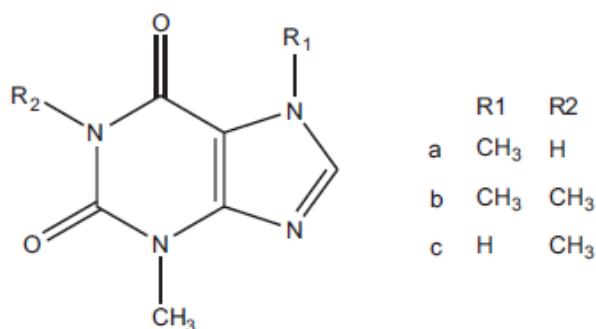
## **2. Revisão Bibliográfica**

---



## 2.1. Teobromina

A teobromina e os seus compostos relacionados (cafeína e teofilina) são alcaloides do grupo das xantinas (Figura 4) e metabolitos secundários que podem ser encontrados em plantas de zonas subtropicais e tropicais, nomeadamente *Coffea* sp. (cafeeiro), *Camellia sinensis* (chá), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Paullinia cupana* (guaraná) e *Theobroma cacao* (cacau). (Sena, Assis, & Branco, 2011)



**Figura 4-** Estrutura química das metilxantinas principais: teobromina (a), cafeína (b), teofilina (c). (Sena, Assis, & Branco, 2011)

A teobromina está sobretudo presente na casca das sementes do cacau, um subproduto do processamento do chocolate, e é uma das moléculas responsáveis pela adstringência e amargor característicos do fruto. (Efraim, Alves, & Jardim, 2011)

É esperado que um género alimentício tenha tanto mais teobromina quanto maior for o seu teor em cacau. Contudo, o teor deste alcaloide pode variar consoante determinados fatores, como a variabilidade genética, o tempo de colheita e o processamento. (Sena, Assis, & Branco, 2011; Dang & Nguyen, 2019; Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019)

A nível industrial, é comercializada como um pó branco pouco solúvel em etanol (500 mg/L) e em água à temperatura ambiente (330 mg/L a 25 °C), sendo mais solúvel em água quente. (Ferreira, 2013; PubChem, s.d.)

A teobromina produz efeitos farmacológicos vantajosos, como diurético, relaxante muscular, vasodilatador e atua pouco ao nível do sistema nervoso central (SNC). Contrariamente, a cafeína é um forte estimulante do SNC e aumenta a pressão sanguínea, semelhante à teofilina. (Sena, Assis, & Branco, 2011; Izawa, Amino, Yueda, & Kuroda, 2010; Evans & Evans, 2009; Martínez-Pinilla, Oñatibia-Astibia, & Franco, 2015; Dang & Nguyen, 2019)

A OMS reporta as doenças cardiovasculares (DCV) como a principal causa de morte global todos os anos. O risco de desenvolvimento de DCV é diretamente afetado pelo estilo de vida do indivíduo, pelo que se torna interessante desenvolver produtos alimentares com propriedades capazes de reduzir os fatores de risco. (Patel & Watson, 2018) No passado, a teobromina foi utilizada como fármaco para doenças coronárias por estimular os músculos cardíacos, relaxar os vasos sanguíneos e aumentar a micção. (PubChem, s.d.) O uso de diuréticos em pacientes com doenças cardíacas permite corrigir e manter o nível de fluidos equilibrado. (Son & Kwon, 2018)

Em indivíduos saudáveis, doses elevadas têm sido associadas a ritmo cardíaco acelerado, náuseas, perda de apetite, sudorese, tremores e dores de cabeça. (PubChem, s.d.) Por outro lado, os animais, em especial os cães e os gatos, podem facilmente sofrer envenenamento pela ingestão de produtos alimentares achocolatados consoante o teor de teobromina presente. A dose letal nos cães é de cerca de 250 mg/kg a 500 mg/kg de peso corporal e nos gatos 200 mg/kg de peso corporal. (Dolder, 2012)

O mecanismo de ação da teobromina relaciona-se com o bloqueio dos recetores de adenosina. A adenosina é uma purina presente nos tecidos dos mamíferos que, ao ligar-se aos seus quatro tipos de recetores ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ), regula várias funções fisiológicas importantes. (Nicola Simola, 2015)

Estes recetores estão presentes nos neurónios e a adenosina atua como um autocóide, o que leva à inibição de neurotransmissores no local pré-sináptico e aumento de noradrenalina ou angiotensina. (Drugbank, s.d.)

Atualmente, pensa-se que as metilxantinas atuam como antagonistas dos recetores de adenosina, o que promove a libertação de neurotransmissores e explica os seus efeitos estimulantes. Contudo, são necessários mais estudos para clarificar a diferença qualitativa dos efeitos psicoativos das metilxantinas. (PubChem, s.d.; Martínez-Pinilla, Oñatibia-Astibia, & Franco, 2015)

A principal fonte de exposição da teobromina ao humano dá-se através da dieta, nomeadamente do consumo de produtos de cacau, tornando relevante o desenvolvimento de métodos fiáveis para quantificação do teor em alimentos. (Sena, Assis, & Branco, 2011; Cova, Leta, Mariani, Pantoni, & Pomati, 2019; Dolder, 2012)

A análise do teor da teobromina em produtos alimentares à base de cacau é frequentemente feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O HPLC é um

método moderno, eficiente, sensível, específico e rápido. (Sena, Assis, & Branco, 2011; WHO/IARC, 1991)

Posto isto, o trabalho experimental a executar no âmbito deste estágio será seguido de acordo com a AOAC 980.14 e com vista ao desenvolvimento de um procedimento de análise interno para quantificação da teobromina.

O método 980.14 desenvolvido pela AOAC envolve a extração de gordura com éter de petróleo, extração da teobromina em banho a 100 °C e filtração do resíduo para quantificação por HPLC. (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990)

## **2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O método a validar no âmbito deste trabalho é por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tornando imprescindível um conhecimento prévio do processo cromatográfico para uma correta execução e manipulação no tratamento de dados.

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define cromatografia como um método físico de separação em que os componentes a separar são distribuídos em duas fases: a estacionária e a móvel. (McNaught & Wilkinson, 1997)

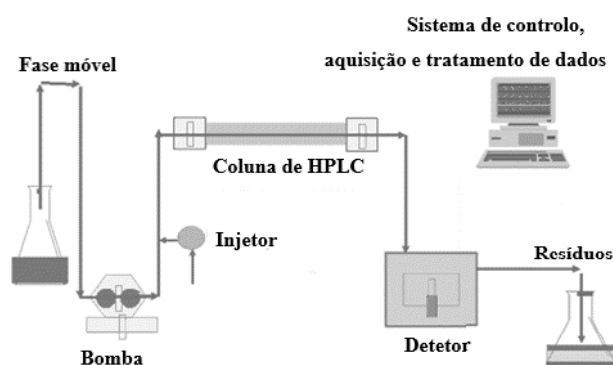
A afinidade para a fase estacionária varia consoante as moléculas presentes na amostra em análise. Se os analitos interagirem mais fortemente com a fase estacionária, então mover-se-ão mais lentamente ao longo da coluna do que aqueles com interação mais fraca. A presença de componentes diferentes permite que estes se separem ao longo da eluição na coluna.

O tipo de cromatografia é, geralmente, definido de acordo com o estado físico da fase móvel (líquido, gás, fluido supercrítico). (Instituto Internacional de Cromatografia, 2016)

Atualmente as técnicas de separação são muito usadas em Química Alimentar, nomeadamente a cromatografia líquida, pela sua praticidade, sensibilidade e eficiência, permitindo a deteção simultânea de vários analitos. (Skoog, Holler, & Crouch, 2007)

Na cromatografia líquida a fase móvel é um fluido que é eluído, numa direção definida, com os componentes da amostra pela fase estacionária, que é a coluna do sistema. (Instituto Internacional de Cromatografia, 2016)

Os principais componentes de um sistema de HPLC são o sistema de distribuição de fase móvel constituído pelo reservatório dos solventes e sistema de bombeamento, o injetor da amostra, a coluna cromatográfica, o detetor e o sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados, como se encontra esquematicamente representado na Figura 5.



**Figura 5** - Representação de um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Resolução. Adaptado de Grubert (2018).

O sistema pode também possuir uma pré-coluna para proteger a coluna principal de contaminações, um forno para controlar a temperatura da mesma coluna ou um sistema de degaseificação para remoção de gases dissolvidos na fase móvel. (Skoog, Holler, & Crouch, 2007; Knauer, s.d.)

A temperatura da coluna afeta parâmetros como a viscosidade e difusividade dos analitos na fase móvel, permitindo uma redução no tempo de análise sem perda de eficiência. (Lanças, 2012; Heidorn, 2016)

O sistema de bombeamento é essencial para fazer eluir os analitos pela fase móvel a partir do reservatório, através da coluna, a um fluxo específico e constante e a determinada pressão, permitindo atravessar a coluna continuamente.

A eluição dos compostos pode ser em modo isocrático, se a composição da fase móvel se mantiver constante ao longo do processo de separação, ou em modo gradiente, se a mesma for variada durante a análise. (Grubert, 2018)

A escolha das fases e do tipo de eluição é feita em função das amostras e analitos a quantificar, frequentemente com base no descrito em literatura.

O injetor deve introduzir a amostra na fase móvel em condições de reprodutibilidade e sem perda da pressão necessária, sendo relevante possuir um sistema de controle de temperatura para possibilitar a ocorrência de reações de derivatização após a injeção (Skoog, Holler, & Crouch, 2007).

A eficiência da coluna cromatográfica, responsável pela separação dos diferentes analitos, está diretamente relacionada com as suas características: diâmetro interno, comprimento, tipo e tamanho das partículas que constituem o seu material. (Knauer, s.d.)

O material de enchimento, constituído por partículas porosas, deve ser quimicamente inerte para as condições de pH e composição do eluente, bem como reproduzível entre lotes e fabricantes. (Weston & Brown, 1997)

A polaridade das fases permite distinguir o processo cromatográfico em fase normal ou fase reversa. Quando a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar, designa-se de cromatografia líquida de fase normal. Se a coluna tiver carácter apolar e a fase móvel polar, denomina-se de cromatografia líquida de fase reversa.

O detetor, associado a um dispositivo eletrónico, identifica alterações na composição do eluente e converte tal informação num sinal elétrico. (Böttcher, Margraf, & Monks) Existem diversos tipos, como o detetor de UV-Vis, fluorescência, condutividade, índice de refração e eletroquímico. No entanto, o mais comum é o detetor de UV-Vis devido à facilidade de uso e estabilidade. (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2013)

Apesar da variedade, os detetores devem ser sensíveis o suficiente para detetar os analitos de interesse, não sofrerem alterações por mudanças de temperatura ou da composição da fase móvel, reagirem rapidamente de modo a obter picos estreitos e não largos e serem de fácil manipulação, caso necessário. (Ferreira, 2013)

O sistema de controlo, aquisição e tratamento de dados permite controlar os módulos do sistema de HPLC, converter o sinal do detetor e tratar os dados recolhidos por algoritmos de integração.

De forma sucinta, a amostra é distribuída homogeneamente na fase móvel líquida e os analitos presentes são eluídos na coluna cromatográfica, onde se dá a interação dos analitos com a fase estacionária. Os componentes migram com diferentes velocidades e são detetados à saída da coluna. Nesta fase, os analitos passam pelo detetor que transmite um sinal para o computador e gera um gráfico de unidades de absorvência em função do tempo de retenção ( $t_r$ ), denominado cromatograma.

O  $t_r$  corresponde ao período decorrido entre a injeção da amostra em análise e o sinal máximo do composto captado pelo detetor.

A identificação do pico correspondente a cada analito é feita de acordo com o  $t_r$ , se necessário considerando um cromatograma da solução-padrão, e a quantificação através da área ou altura dos picos.

### **2.3. Validação de métodos em Análise Química**

Um método de ensaio é um procedimento técnico definido para a realização de um ensaio com o fim de determinar uma ou mais características de um produto.

Na sua execução ocorrem manipulações suscetíveis de acumularem erros sistemáticos e/ou aleatórios que podem alterar significativamente o valor do resultado obtido. (RELACRE, 2000) Desta forma, torna-se imprescindível que os laboratórios tenham meios e critérios objetivos para demonstrarem que os métodos internos de ensaio praticados levam a resultados confiáveis e adequados. Tal é feito através da validação dos métodos de ensaio.

A norma ISO/IEC 17025 define validação como a confirmação através da verificação e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são cumpridos. (Magnusson & Örnemark, 2014)

Para ensaios realizados de acordo com métodos não normalizados é necessário a validação do método através das características de desempenho frequentemente avaliadas, como seletividade, limiares analíticos, gama de trabalho, sensibilidade, veracidade, precisão robustez e incerteza. (Magnusson & Örnemark, 2014)

No caso de métodos normalizados é exigido a evidência de registos que confirmem a sua implementação em cumprimento com as características de desempenho do método, pelo que se trata de uma verificação. (Magnusson & Örnemark, 2014) Um método normalizado segue o indicado numa norma de ensaio ou documento normativo equivalente e está sujeito a uma atualização periódica. (RELACRE, 2000)

Aquando da validação de um método interno de ensaio, a descrição e caracterização do mesmo deve ser feita detalhadamente em documentos e para que qualquer pessoa com preparação adequada o possa executar. (RELACRE, 2000)

O laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas.

A validação de métodos internos deve ser adaptada a cada caso de acordo com o grau de exigibilidade e é progressivamente mais exigente e exaustiva para as situações indicadas (RELACRE, 2000; Instituto Português de Acreditação, 2010): método normalizado; uma modificação menor da técnica/equipamento/tipo de produto a ensaiar de acordo com a norma ou documento normativo que não levante dúvidas sobre a equivalência de resultados ou uma modificação maior que suscite dúvidas sobre o mesmo; método baseado em técnicas ou medição conhecidas cuja aplicação pretendida venha descrita em literatura científica sem a

existência de norma correspondente ou que não venha descrita em literatura científica; método baseado em técnicas ou medição inovadoras não descritas em literatura científica.

Os estudos de validação são realizados durante a implementação do ensaio ou sempre que ocorra uma alteração relevante do método de ensaio.

A validação do método é efetuada através do estudo de parâmetros de avaliação indireta, por evidência das suas características, e/ou direta, por comparação com referências aceites. (RELACRE, 2000) Contudo, os requisitos mínimos dependem do tipo de método em causa. Os critérios chave para a avaliação de um método analítico são: seletividade/especificidade, precisão (repetibilidade, reprodutibilidade, precisão intermédia), limiares analíticos (limite de deteção e limite de quantificação), sensibilidade, gama de trabalho, linearidade, robustez e veracidade/justeza. (Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998)

### **2.3.1. Parâmetros de avaliação indireta**

A avaliação indireta baseia-se na determinação e evidência dos respetivos parâmetros característicos. Neste tópico serão abordados alguns exemplos de parâmetros de avaliação indireta, como a especificidade/seletividade, quantificação, precisão e robustez.

#### **2.3.1.1. Especificidade e seletividade**

A especificidade é definida pela capacidade de um método detetar um ou mais analitos de interesse numa matriz complexa. (RELACRE, 2000) A seletividade relaciona-se com a capacidade de distinguir e quantificar as substâncias de interesse sem interferências. (Eurachem, 2016)

Estes dois conceitos relacionam-se dado envolverem o momento de deteção do analito.

De modo geral, a seletividade indica a capacidade de um método distinguir o composto em estudo de substâncias interferentes, com base na deteção de um sinal. O sinal é produzido pelas condições experimentais executadas a partir de uma amostra multicomponente. (Eurachem, 2016; RELACRE, 2000; Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998)

Um método diz-se específico quando tem uma seletividade perfeita, ou seja, garante que o valor do resultado do ensaio provém apenas do analito de interesse.

A utilização de amostras multicomponente deve ser feita na averiguação de possíveis interferências de outras substâncias através da realização de um ensaio de recuperação com várias amostras da mesma matriz, em duplicado e condições de repetibilidade.

A *Silliker* definiu uma taxa de recuperação aceitável para vários métodos, sendo a mais comum entre 80 % e 120 %. (Silliker Portugal S.A., 2019)

A seletividade pode também ser avaliada através da comparação de uma matriz isenta do analito e da mesma matriz fortificada com solução-padrão do analito de interesse. (Ribani, Bottoli, Collins, Jardim, & Melo, 2004)

No caso da validação de um método por HPLC, o estudo da seletividade pode passar pela avaliação da resolução dos picos do cromatograma, eficiência de separação e fator de assimetria, sendo necessário que o cromatograma apresente um pico distinto. (University of Tartu, 2016)

### **2.3.1.2. Quantificação**

Para interpretar os resultados obtidos do ensaio realizado, são estudados vários parâmetros intrinsecamente relacionados com a quantificação do analito: sensibilidade, curvas de calibração e limiares analíticos.

#### **2.3.1.2.1. Sensibilidade**

A sensibilidade de um método é expressa pelo acréscimo do valor lido pelo equipamento,  $\Delta L$ , sobre a variação da concentração,  $\Delta C$ , correspondente a esse acréscimo (RELACRE, 1996; RELACRE, 2000) como se apresenta na Equação 1:

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

**Equação 1**

Este parâmetro avalia a capacidade de um método ou equipamento distinguir pequenas diferenças na concentração de um analito e corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. (RELACRE, 2000)

Um método diz-se sensível quando pequenas variações nas concentrações originam grandes alterações nas respostas, possibilitando distinguir concentrações próximas.



### 2.3.1.2.2. Curvas de Calibração

A calibração é definida como um processo através do qual o sinal detetado por um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou quantidade de analito conhecida. (RELACRE, 2000)

As curvas de calibração são efetuadas sempre que se executa o método através da preparação de soluções-padrão em que a concentração do analito de interesse é conhecida. Estes padrões devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho e medidos sob as mesmas condições cromatográficas (composição da fase móvel, fluxo, volume de injeção, tempo de análise, comprimento de onda, temperatura) que as amostras. Não devem ser utilizados menos de cinco pontos de calibração, sendo o recomendado dez soluções-padrão. (RELACRE, 2000; Silliker Portugal S.A., 2019)

O branco de calibração, preparado com todos os reagentes e sem o analito em análise, é muitas vezes diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, quando aplicável. (RELACRE, 2000)

A curva de calibração representa a relação entre o sinal medido (eixo y – área do pico) e a concentração do analito nas soluções-padrão (eixo x).

A forma algébrica é uma reta ( $y = a + bx$ ), sendo os coeficientes calculados pelo método dos mínimos quadrados.

A aceitação ou não de uma curva de calibração determina-se através do valor do coeficiente de correlação, da gama de trabalho, da linearidade e do declive que deve estar dentro dos limites da carta de controlo.

#### **Coeficiente de correlação**

O coeficiente de correlação é um parâmetro adimensional que avalia uma possível associação linear entre duas variáveis. (Mukaka, 2012) A calibração analítica pode ser avaliada através do cálculo do mesmo através da seguinte equação (Equação 2) (RELACRE, 2000):

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \{\sum_{i=2}^N (y_i - \bar{y})^2\}]}}$$

**Equação 2**

O valor obtido pode tomar valores entre  $-1$  (declive negativo) e  $1$  (declive positivo), devendo o seu valor ser superior a  $0,995$ . (RELACRE, 2000; Siliker Portugal S.A., 2019) Um coeficiente de correlação igual a zero indica que não existe relação linear entre as duas variáveis, enquanto que igual a  $\pm 1$  indica uma relação linear perfeita. Quanto maior for o valor absoluto, mais forte será a relação entre as variáveis. Se o valor for positivo, então as variáveis estão diretamente relacionadas. Se o valor for negativo, as variáveis relacionam-se inversamente. (Mukaka, 2012)

### Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método corresponde ao intervalo de concentrações para o qual um método fornece resultados com uma incerteza aceitável.

Na validação de um método estuda-se o limite inferior desta gama, que corresponde ao limite de quantificação, e o limite superior que corresponde à concentração de analito a partir da qual a sensibilidade do método é afetada e deixa de ser constante.

Quando os métodos seguidos implicam a realização de curvas de calibração, a gama de trabalho é avaliada pelo teste da homogeneidade de variâncias.

No teste de homogeneidade de variâncias determinam-se as variâncias associadas ao primeiro ( $S^2_1$ ) e último padrão ( $S^2_{10}$ ), que são analisados em dez réplicas independentes, de acordo com a Equação 3. (RELACRE, 2000)

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

**Equação 3**

Onde  $\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$  para  $i = 1$  e  $i = 10$ ,  $i$  corresponde ao número do padrão (1 e 10),  $j$  ao número de repetições efetuadas para cada padrão (10),  $y_{i,j}$  o valor do sinal e  $n_i$  o número de réplicas (10).

Para analisar se as variâncias são significativamente diferentes, nos limites da gama de trabalho, é efetuado o cálculo do parâmetro PG através da Equação 4:

$$PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1} \quad (\mathbf{A}) \quad \text{ou} \quad PG = \frac{S^2_1}{S^2_{10}} \quad (\mathbf{B})$$

**Equação 4**

Em que se utiliza **(A)** quando  $S^2_{10} > S^2_1$  e **(B)** quando  $S^2_1 > S^2_{10}$ .

Para obter conclusões acerca dos valores calculados, o valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher-Snedecor para  $n - 1$  graus de liberdade, em que  $n = 10$ .

Se  $PG \leq F$ , as variâncias não são significativamente diferentes. Se  $PG > F$ , as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias permita obter  $PG \leq F$ .

### **Linearidade**

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade de este fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro da gama de trabalho e pode ser avaliada por testes estatísticos, pelo cálculo e análise do coeficiente de correlação e pela representação gráfica da função.

Pelo teste de Mandel avalia-se a função mais adequada para representar a calibração através do cálculo da diferença de variâncias (RELACRE, 2000) pela Equação 5:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2$$

**Equação 5**

Onde N é o número de padrões de calibração,  $S_{y/x}$  o desvio padrão residual da função linear e  $S_{y^2}$  o desvio padrão residual da função quadrática.

O valor teste, PG, é calculado através da Equação 6 e o valor é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Fisher-Snedecor.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

**Equação 6**

Se  $PG \leq F$ , a função de calibração é linear de primeira ordem.

Se  $PG > F$ , a função de calibração é linear de segunda ordem. Neste caso deve ser avaliada a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

#### **2.3.1.2.3. Limiares analíticos**

Os limiares analíticos compreendem o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ) que são importantes por permitirem traçar os limites possíveis de alcançar com o método.

### **Limite de deteção**

O LD corresponde ao teor mínimo medido a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, não implica que a amostra possa ser quantificada. (RELACRE, 2000; Eurachem, 2016) Expressa-se como a concentração de analito correspondente à soma do branco com 3,3 vezes desvios-padrão do branco, com base na análise de, pelo menos, 10 brancos (Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998) e é dada pela Equação 7:

$$LD = X_0 + 3,3 \times S_0$$

**Equação 7**

Onde  $X_0$  corresponde à média do teor medido de uma série de brancos e padrões vestígio, entre 10 e 20 ensaios, preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, e  $S_0$  o desvio padrão associado a  $X_0$ .

Se o método utilizar calibração linear, o cálculo do LD é feito pela Equação 8:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b}$$

**Equação 8**

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

### **Limite de quantificação**

O LQ corresponde à concentração mais baixa medida a partir do qual um analito pode ser quantificado com um nível de incerteza aceitável. (Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998; Eurachem, 2016)

Após determinado o limiar, deve ser averiguado se a precisão e exatidão são satisfatórias. O teste realiza-se em condições de precisão intermédia com o recurso a uma série de padrões cuja concentração é próxima ou igual ao LQ. (RELACRE, 2000) Este parâmetro é determinado pela Equação 9:

$$LQ = X_0 + 10 \times S_0$$

**Equação 9**

Onde  $X_0$  corresponde à média do teor medido de uma série de 10 a 20 ensaios preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e em que  $S_0$  o desvio-padrão associado a  $X_0$ .

Se o método utilizar calibração linear, então o LQ é obtido pela Equação 10:

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

**Equação 10**

Onde  $S_{y/x}$  é o desvio-padrão residual da curva de calibração e o  $b$  é o declive da mesma curva.

### **2.3.1.3. Precisão**

A precisão avalia a dispersão dos resultados através da repetibilidade e da reprodutibilidade e é obtida de ensaios independentes, repetidos sobre a mesma matriz, matrizes semelhantes ou padrões, sob as mesmas condições. (RELACRE, 2000)

A repetibilidade e a reprodutibilidade são expressas em termos de desvio-padrão e dependem da concentração do analito, sendo por isso determinados pela análise de, habitualmente, 10 replicados com diferentes concentrações dentro da gama de trabalho. (Zoonen, Klooster, Hoogerbrugge, Gort, & Wiel, 1998)

Estes dois parâmetros representam medidas extremas da variabilidade de um método de ensaio, pelo que existe uma medida de avaliação intermédia designada por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial.

#### **2.3.1.3.1. Repetibilidade**

A repetibilidade expressa a precisão de um método quando executado em condições idênticas, tais como analista, equipamento, reagentes e laboratório, sobre a mesma amostra e num curto período. É avaliada pela aproximação entre os resultados de medições sucessivas pelo que é expectável que represente a menor variação entre resultados. (Eurachem, 2016)

A determinação da repetibilidade pode ser levada a cabo por ensaios interlaboratoriais ou no próprio laboratório. Por ensaios interlaboratoriais, o número de ensaios para cada concentração é igual ou superior a 2. No próprio laboratório, são executadas 10 ou mais medições sobre a mesma amostra ou padrões em condições de repetibilidade. (RELACRE, 2000)

O limite da repetibilidade,  $r$ , é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados do ensaio sob as condições supramencionadas e com probabilidade de 95 %. (RELACRE, 2000)

Se a diferença de resultados for menor ou igual a  $r$ , os resultados são aceites (Equação 11). Caso a diferença seja superior, é feita uma análise crítica e, se necessário, os ensaios são repetidos.

Para um nível de confiança de 95 %, o limite da repetibilidade é calculado através do desvio-padrão da repetibilidade,  $S_{ri}$ , pela Equação 11:

$$r = 2,8 \times S_{ri}$$

**Equação 11**

O valor calculado para o limite da repetibilidade permite avaliar a aproximação dos resultados e assim determinar se a diferença de valores entre duplicados é significativa (Equação 12):

$$|X_i - X_{i-1}| \leq r$$

**Equação 12**

O coeficiente de variação da repetibilidade ( $CV_r$ ) expressa-se, em percentagem, através da Equação 13:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 13**

Onde  $CV_r$  é, em percentagem, igual ao desvio padrão de repetibilidade ( $S_{ri}$ ) a dividir pela média dos valores ( $\bar{x}$ ).

### Teste de Grubbs

Para verificação da existência de resultados afastados ou aberrantes deve ser feito o teste de Grubbs aos valores menor e maior do conjunto de dados considerados, através da aplicação da Equação 14.

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

**Equação 14**

Onde  $x_s$  corresponde ao valor suspeito,  $\bar{x}$  à média dos resultados e  $s$  ao desvio-padrão.

Para um dado número de observações,  $n$ , o valor do  $G_{Calculado}$  deve ser menor que o valor do  $G_{Tabelado}$  para um valor crítico de 5 % para que o valor suspeito,  $x_s$ , não seja considerado discrepante no conjunto de resultados a considerar e, portanto, seja aceite como correto.

Se o valor do  $G_{Calculado}$  for maior que o valor do  $G_{Tabelado}$  para um valor crítico de 5 % e menor que o valor crítico a 1 %, então o valor suspeito denomina-se de *straggler* e é considerado.

Se o valor do  $G_{Calculado}$  for superior ao  $G_{Tabelado}$  para um valor crítico de 1 %, então o valor testado é considerado um valor anómalo e deve ser eliminado. (Silliker Portugal, S.A., 2019)

## Teste de Cochran

O teste de Cochran é utilizado para estudar a homogeneidade de variâncias em conjuntos de resultados de diferentes amostras com o mesmo número de repetições (n), permitindo detetar a existência de variâncias aberrantes.

É comparado o valor de C calculado (Equação 15), obtido da razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias, com o valor crítico tabelado.

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

**Equação 15**

Sendo  $s_{max}^2$  a maior variância obtida nos ensaios e  $\sum s_i^2$  o somatório das variâncias.

Após o teste ser aplicado e se obter um valor de C calculado inferior ao C tabelado para uma significância de 5 %, é determinado o limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e coeficiente de variação médio relativo da gama de trabalho através da média dos respetivos parâmetros (limite da repetibilidade, limite da repetibilidade relativo e desvio-padrão relativo). (Silliker Portugal, S.A., 2020)

### 2.3.1.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método praticado em condições de ensaio diferentes, variando as condições de medição (laboratório, operador, equipamento, época) e mantendo o método e a amostra. (RELACRE, 2000)

A determinação é feita a partir de ensaios interlaboratoriais através da análise de uma série de amostras enviadas aos laboratórios participantes, pelo que é esperado uma maior variação dos resultados. (Eurachem, 2016)

O limite da reprodutibilidade, R, é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio sob as condições acima mencionadas e com probabilidade de 95 %. (RELACRE, 2000)

Para um nível de confiança de 95 %, o limite da reprodutibilidade é obtido através do desvio-padrão da reprodutibilidade, SR<sub>i</sub>, pela Equação 16:

$$R = 2,8 \times SR_i$$

**Equação 16**

O coeficiente de variação da reprodutibilidade ( $CV_R$ ) expressa-se, em percentagem, através da Equação 17:

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 17**

Onde  $CV_R$  é, em percentagem, igual ao desvio padrão de reprodutibilidade ( $S_{Ri}$ ) a dividir pela média dos valores ( $\bar{x}$ ).

### **2.3.1.3.3. Precisão intermédia**

A precisão intermédia reflete a precisão avaliada sobre uma amostra igual, idêntica ou padrões, seguindo o mesmo método de ensaio, no mesmo laboratório, apenas variando uma ou mais das condições definidas (analista, equipamento, época). (Eurachem, 2016)

Este parâmetro é reconhecido como o mais representativo da variabilidade de resultados intralaboratoriais e por isso de uso preferível. (RELACRE, 2000)

Na determinação da precisão intermédia efetuam-se  $n$  medições em duplicado, habitualmente  $\geq 6$ , a partir da mesma amostra e nas condições pré-definidas.

Se aplicável, pode ser executado para diferentes gamas de concentração.

O desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) é calculado a partir da Equação 18 no caso de as medições serem feitas em duplicado:

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

**Equação 18**

Onde  $t$  é o número de amostras ensaiadas,  $j$  o número da amostra (valor que pode ir até  $t$  amostras),  $y_{j1}$  o primeiro resultado obtido para a amostra  $j$  e  $y_{j2}$  o segundo resultado obtido para a amostra  $j$ .

O coeficiente de variação médio ( $CV_{pi}$ ) expressa-se, em percentagem, através da Equação 19:

$$CV_{pi} = \frac{S_i}{\bar{y}} \times 100$$

**Equação 19**

Onde  $CV_{pi}$  é, em percentagem, igual ao desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) a dividir pela média dos resultados das amostras ( $\bar{y}$ ).



A precisão intermédia de um método é ainda avaliada através do limite da precisão intermédia, em percentagem, como demonstrado na Equação 20:

$$\text{Limite da precisão intermédia} = \frac{S_i \times 2,8}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 20**

#### **2.3.1.4. Robustez**

A robustez de um método de ensaio fornece uma indicação da confiança deste durante a sua realização diária e avalia a capacidade do mesmo face a pequenas variações de parâmetros. (RELACRE, 2000; Eurachem, 2016) Um método diz-se robusto se mostrar-se insensível às tais pequenas variações.

Este parâmetro pode ser estudado através do teste de *Youden* que permite verificar a influência dos fatores nos resultados e indicar o tipo de influência (excesso ou defeito) de cada uma dessas variações. (RELACRE, 2000)

#### **2.3.2. Parâmetros de avaliação direta**

A avaliação direta é baseada na exatidão do método de ensaio e é feita habitualmente pelo uso de Materiais de Referência Certificados (MRC), por ensaios interlaboratoriais (EI) e por testes comparativos.

##### **2.3.2.1. Exatidão**

A exatidão de um método é indicada através dos parâmetros que combinam os erros aleatórios (precisão) e sistemáticos (veracidade/justeza). A qualidade de um resultado analítico pode ser avaliada com base nestes dois parâmetros e na incerteza. (Magnusson & Örnemark, 2014)

A exatidão é a concordância entre o valor obtido através do ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. (RELACRE, 1996) A veracidade ou justeza corresponde ao grau de concordância entre a média dum número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. (Filipe, Pellegrino, Baratto, Oliveira, & Mendoza, 2012)

O objetivo é analisar a proximidade do valor obtido pelo método de ensaio a validar ao valor de referência.

Este parâmetro pode ser estudado com o uso de materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais (EI) e/ou testes comparativos.

### **Materiais de Referência Certificados**

Um MRC é uma importante ferramenta de controlo externo de qualidade de uma análise química. Deve ser usado sempre que possível, pois permite avaliar o desempenho do laboratório. É definido como um material em que o valor de uma ou várias propriedades para cada parâmetro e incerteza associada foram certificados por um processo tecnicamente válido. O organismo fornecedor reconhecido e credível é responsável por acompanhar o material de um certificado ou outro documento. (RELACRE, 1996; RELACRE, 2000)

O valor obtido pelo método de ensaio é comparado com o valor certificado e determina-se o enviesamento (Equação 21) que permite avaliar a veracidade.

$$b (\%) = \frac{(\bar{X} - X_{\text{ref}})}{X_{\text{ref}}} \times 100$$

#### **Equação 21**

Onde  $\bar{X}$  representa a média dos valores obtidos de vários laboratórios para o MRC e  $X_{\text{ref}}$  o valor aceite como verdadeiro.

A avaliação dos resultados de um MRC pode ser feita pelos seguintes parâmetros:

- Erro relativo (% ER): expressa a componente de erros sistemáticos pelo que o seu grau de exigência deve ser definido pelo laboratório e deve assentar em dados bibliográficos (Equação 22).

$$ER (\%) = \frac{(X_{\text{lab}} - X_v)}{X_v} \times 100$$

#### **Equação 22**

Onde  $X_{\text{lab}}$  representa o valor médio obtido do MRC e  $X_v$  o valor aceite como verdadeiro.

- Teste de hipóteses (teste t): averigua a existência de erros sistemáticos associado ao protocolo seguido (Equação 23).

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}}$$

**Equação 23**

Onde N representa o número de amostras ensaiadas e o  $S_{X_{lab}}$  o desvio-padrão associado à média dos valores do laboratório ( $X_{lab}$ ).

· Fator de desempenho (valor-Z): avalia o desempenho do laboratório em satisfatório ( $Z \leq 2$ ), questionável ( $2 < |Z| < 3$ ) ou incorreto ( $Z > 3$ ) (Equação 24).

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$$

**Equação 24**

Onde S representa a unidade de desvio, como a incerteza do MRC.

· Erro normalizado (En): avalia o desempenho do laboratório caso a incerteza do resultado tenha sido calculada (Equação 25). Se  $-1 \leq En \leq 1$ , o resultado é satisfatório. Caso contrário, é considerado insatisfatório.

$$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$$

**Equação 25**

Onde  $U_{lab}$  representa a incerteza do laboratório e  $U_{ref}$  a incerteza do valor verdadeiro.

O laboratório deve estipular a periodicidade da análise do MRC de acordo com vários fatores, como a frequência e número de ensaios executados, o grau de conhecimento das amostras e o rigor exigido para os resultados.

No âmbito desta tese, os materiais utilizados foram adquiridos à LGC Standards (Milk Chocolate QCS 281) e à FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*) (Chocolate cake mix T20161).

### **Ensaios interlaboratoriais**

Os ensaios interlaboratoriais (EI) permitem avaliar o desempenho dos laboratórios nas mesmas condições ou condições semelhantes.

Os objetivos para a realização de EI podem passar por atribuir valores a materiais de referência, estudar e avaliar o desempenho de um método, do laboratório e/ou dos analistas.

Assim sendo, existem dois tipos praticáveis de acordo com os objetivos do laboratório:

- Ensaio Interlaboratorial de Aptidão: para avaliar o desempenho dos laboratórios intervenientes, como uma condição para acreditação. Deve estar associado um MRC e o método de ensaio pode ser escolhido pelos participantes. Este tipo de EI pode ser escolhido quando o laboratório pretende evidenciar a exatidão dos seus resultados.

- Ensaio Interlaboratorial de Normalização: para estudar as características de um método de análise, como a reprodutibilidade e repetibilidade. É obrigatória a utilização do método em causa. Este tipo de ensaio pode ser escolhido para demonstrar que o método tem uma precisão compatível com outros já implementados.

### **Testes comparativos**

Os resultados obtidos a partir do método interno a validar são comparados com os obtidos através de um método de referência para compreender a proximidade dos resultados entre ambos os métodos.

As mesmas amostras são analisadas em duplicado e em separado pelos dois métodos.

A análise de comparação entre os dois métodos pode ser feita por testes de hipóteses, como o teste t das médias ou o teste t das diferenças (amostras emparelhadas).

#### **2.3.2.2. Incerteza**

A incerteza de uma medição define-se como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando com base nas informações utilizadas. (Filipe, Pellegrino, Baratto, Oliveira, & Mendoza, 2012)

A quantificação da incerteza da medição pode ser feita seguindo uma abordagem “passo a passo” ou uma abordagem empírica.

A abordagem empírica recorre a parâmetros de desempenho global estimados no laboratório que combinam as duas principais componentes de incertezas – precisão e veracidade. A escolha de dados a utilizar é estipulado pelo laboratório, no entanto deve ser garantido que os dados foram obtidos a partir do manuseamento de amostras que representem todo o processo analítico e todos os pontos críticos do método de ensaio. (RELACRE, 2018)

Na *Silliker*, a componente da precisão recorre a dados dos DPCS e/ou duplicados, enquanto que a componente da veracidade utiliza resultados de ECI, MRC e/ou amostras fortificadas. (Silliker Portugal, S.A., 2019)

Os cálculos efetuados no estudo da incerteza devem ser considerados em termos relativos ou em termos absolutos. (RELACRE, 2018)

A incerteza associada à componente da precisão é calculada a partir do desvio-padrão ( $R_w$ ) das amostras de controlo (DPCS e duplicados) (RELACRE, 2018) de acordo com as equações seguintes (Equação 26 e Equação 27):

$$R_{w, \text{ relativo}} = \frac{R_w}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 26**

Onde  $R_w$  corresponde ao desvio-padrão da população e  $\bar{x}$  à média aritmética da mesma população.

$$u_{R_w \text{ relativo}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u(R_{w, \text{ relativo}}))^2}{n_{R_w}}}$$

**Equação 27**

Onde  $n_{R_w}$  corresponde ao número de amostras da população.

A estimativa da incerteza associada à componente da veracidade, frequentemente designada por enviesamento, é estudada através de ensaios interlaboratoriais e pode ser calculada pelas equações seguintes (Equação 28 e Equação 29) (International Organization for Standardization, 2012):

$$RMS_{\text{enviesamento, relativo}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias_{\text{relativo}, i})^2}{n_{PT}}}$$

**Equação 28**

Em que  $n_{PT}$  corresponde ao número de resultados utilizados.

$$u(C_{Ref})_{relativo} = 1,253 \times \frac{\bar{S}_{R,relativo}}{\sqrt{\bar{P}}}$$

**Equação 29**

Onde  $\bar{P}$  é a média das populações consideradas nos ensaios interlaboratoriais.

$$u(\text{enviesamento})_{relativo} = \sqrt{RMS^2_{\text{enviesamento,relativo}} + u(C_{ref})^2_{relativo}}$$

**Equação 30**

### **Incerteza padrão combinada**

As incertezas-padrão associadas aos erros aleatórios e aos erros sistemáticos ( $u_{Rw, relativo}$  e  $u_{\text{enviesamento, relativo}}$ , respetivamente) podem ser calculadas e consideradas como um valor combinado a partir da Equação 31:

$$u_{combinada} = \sqrt{\sum_{i=1}^n u_i^2} = \sqrt{u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{veracidade}}^2}$$

**Equação 31**

Onde n corresponde ao número de medições e  $u_i$  à incerteza da contribuição de cada medição.

### **Incerteza expandida de medição**

A incerteza expandida corresponde ao cálculo aproximado da incerteza-padrão combinada a partir do desvio-padrão da reprodutibilidade de um ensaio interlaboratorial e é obtida pela Equação 32:

$$u_{expandida} = k \times u_{combinada}$$

**Equação 32**

Onde k corresponde ao fator de expansão e é igual 2 quando se trata de uma distribuição normal e a incerteza padrão associada é considerada aceitável e com um elevado número de ensaios experimentais. Este valor corresponde a um nível de confiança de cerca de 95 %. (RELACRE, 2018; Magnusson, Näykki, Hovind, & Krysell, 2012)

## **3. Parte experimental**

---

### 3.1. Validação do método: ‘Determinação de teobromina’

A validação do método para determinação de teobromina em produtos de cacau foi seguida de acordo com o método AOAC 980.14 (1990) – ‘Determinação da teobromina em produtos de cacau por HPLC’, com algumas modificações. Foram analisadas soluções-padrão, materiais de referência, DPCS e amostras de clientes e foi desenvolvido um procedimento de análise interno.

A amostra é desengordurada com éter de petróleo e, após evaporação do solvente, levada a um banho a 100 °C durante 30 minutos. Após filtração, é separada por HPLC numa coluna de fase reversa C18 com detecção por UV ao comprimento de onda de 280 nm.

#### 3.1.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados devem ser de qualidade analítica e a água deve ser desionizada.

O padrão de teobromina foi adquirido com um grau de pureza  $\geq 99\%$  (T4500-25G, Sigma-Aldrich). A solução-mãe de calibração foi preparada para uma concentração de 500 mg/L. Pesou-se rigorosamente 0,1250 g do padrão para um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionou-se água e levou-se durante 30 minutos a um banho a 100 °C.

A solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, o volume foi completado e foram preparadas 5 soluções de calibração por diluição em água. As 4 soluções-padrão restantes foram preparadas a partir da solução de 10 mg/L por transferência de volumes conhecidos para balões volumétricos de modo às concentrações finais corresponderem a 2, 4, 6 e 8 mg/L (Tabela 1).

**Tabela 1** - Preparação das soluções de calibração por diluição da solução-mãe de teobromina.

Padrão	Ci (mg/L)	Vi (mL)	Vf (mL)	Cf (mg/L)
1	500	10	50	100
2		15	100	75
3		5	50	50
4		2,5	50	25
5		2	100	10
6	10	10	50	2
7		20	50	4
8		20	25	8
9		15	25	6



As amostras foram desengorduradas com éter de petróleo (Petroleum Spirit 40-60°C GPR RECTAPUR®)(VWR).

A fase móvel foi constituída por água e metanol com um grau de pureza  $\geq 99\%$  (VWR)(70/30; V/V) e desgaseificada num sistema de filtração a vácuo.

### **3.1.2. Material e equipamentos**

No procedimento experimental, além de material de uso corrente no laboratório, foi utilizada uma balança analítica (0,1 mg)(Mettler Toledo, AB265-S), uma balança de precisão (1 mg)(Mettler Toledo, XS603S), filtros de seringa de PVDF de 25 mm com 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (VWR), frascos para amostrador automático com tampa e septo de capacidade aproximada de 2 mL (frasco-ampola)(Phenomenex), um banho de água com agitação (Julabo, SW22) e uma centrífuga (Hettich, Rotina 380). O equipamento de HPLC utilizado foi um *Agilent Technologies 1200 series* com sistema automático de injeção e capacidade para diferentes volumes, uma bomba com capacidade de fluxo constante, uma coluna para HPLC (Spherisorb ODS2 5 $\mu\text{m}$ , Waters), de fase reversa (RP), C18 com poro de 5  $\mu\text{m}$  250 x 4,6 mm e um detetor de UV/VIS que permite leituras a 280 nm.

### **3.1.3. Preparação das amostras**

As amostras são preparadas de acordo com o definido no procedimento interno PAFQ.044 – ‘‘Métodos de preparação de amostras para análise’’. A preparação é independente do método de ensaio a executar.

De forma sucinta, as amostras são homogeneizadas com o auxílio de um dispersor (ultra-turrax ou bimby) e armazenadas em recipiente de plástico estéril. É exceção qualquer amostra líquida que, após correta homogeneização, é diretamente transferida para o recipiente. Os recipientes são identificados e datados.

### **3.1.4. Técnica experimental**

Na balança analítica as massas dos tubos de centrífuga são anotadas. As amostras homogeneizadas são pesadas nos respetivos tubos e a massa é registada. A massa de cada matriz é definida de acordo com o teor esperado de teobromina, *i.e.*, para amostras com teor de cacau

mais elevado são pesadas massas menores. Na tabela seguinte (Tabela 2) são representadas as massas da toma, com aproximação de 0,0001 g, consideradas no trabalho experimental.

**Tabela 2** - Massa da toma de cada matriz estudada, em gramas.

<b>Matriz</b>	<b>Massa (g)</b>
Cacau em pó	0,5000
Chocolate preto, suplemento alimentar, bolacha	1,0000
Amendoins com chocolate	1,5000
FAPAS – Chocolate cake mix T20161, creme para barrar de chocolate	2,0000
LGC – Milk chocolate QCS 281, chocolate de leite, cereais, barra de cereais	3,0000
Bebida de soja com chocolate, leite com chocolate, ração, chocolate branco	10,0000

Ao tubo é adicionado aproximadamente 30 mL de éter de petróleo e este é levado à centrífuga durante 15 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante é retirado e o restante solvente evaporado em estufa a 50 °C durante a noite. Os tubos são arrefecidos em exsiccador durante 1 hora e o seu peso é novamente anotado.

São pesados balões de 250 mL com 3 pérolas de vidro. O resíduo é transferido para o respetivo balão com a ajuda de 90 mL de água. O balão vai a um banho fervente com agitação durante 30 minutos. Após arrefecer, até cerca de 20 °C, é levado à balança de precisão onde é adicionada água até perfazer a massa aproximada do valor pretendido. O valor pretendido corresponde à soma da tara do balão, 3 pérolas de vidro, peso do resíduo e 100 g de água destilada. O valor real da massa é anotado e é calculado o volume final. A solução é filtrada com auxílio de seringa e filtro PVDF e transferida para frasco-ampola para injetar em HPLC.

### **3.1.5. Condições cromatográficas**

A tabela seguinte (Tabela 3) indica as condições cromatográficas definidas para a determinação do teor de teobromina em produtos à base de cacau.

**Tabela 3** - Condições cromatográficas para a determinação da teobromina.

<b>Condições cromatográficas</b>	
Composição da fase móvel	Mistura de MeOH:H <sub>2</sub> O (30:70 V/V)
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Tempo de análise	10 min
Comprimento de onda	280 nm
Temperatura	Ambiente

### 3.1.6. Matrizes

Para a validação do método foram estudadas quinze matrizes pertencentes a sete grupos alimentares distintos, como indicado na tabela abaixo (Tabela 4).

**Tabela 4** - Matrizes estudadas, e respetivo grupo, para validação do método AOAC 980.14.

<b>Grupo</b>	<b>Matrizes</b>
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate preto, chocolate de leite, chocolate branco, LGC – Milk chocolate QCS 281
Alimentos para animais	Ração para gato
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Bebida de soja com chocolate, suplemento em pó de chocolate
Cereais, leguminosas, pseudocereais e derivados	Bolacha, FAPAS – Chocolate cake mix T20161, cereais, barra de cereais de chocolate
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Amendoins com chocolate, cacau em pó
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	Creme para barrar de chocolate
Leite, produtos láteos e derivados	Leite com chocolate

## **4. Resultados e Discussão**

---

#### 4.1. Validação do método: ‘Determinação de teobromina’

Para a validação deste método foram utilizadas amostras analisadas no laboratório da *Silliker Portugal S.A.* e dados de ensaios interlaboratoriais.

##### 4.1.1. Quantificação

###### 4.1.1.1. Calibração e determinação do teor de teobromina

No método em estudo, a curva de calibração é traçada diariamente através da preparação e leitura de 9 padrões a partir de uma solução-mãe (500 mg/L).

A curva de calibração obtida representa a área lida, a um comprimento de onda de 280 nm, em função da concentração do analito. A partir da reta obtida e do sinal instrumental lido para cada amostra é possível determinar a concentração de teobromina em mg/kg.

Uma vez que a curva de calibração é traçada sempre que se realiza o método, a tabela abaixo (Tabela 5) mostra os dados da reta realizada a 30/01/2020.

**Tabela 5** – Concentração das soluções-padrão de teobromina, em mg/L, e respetivas áreas obtidas, em mAU.s, no ensaio realizado no dia 30/01/2020.

Padrão	Concentração (mg/L)	Área 208 nm (mAU.s)	
2	1,98	108,757	
4	3,97	213,969	
6	5,95	320,206	$y = 53,742x + 9,9444$
8	7,93	429,988	
10	9,91	537,924	
25	24,78	1358,118	$R^2 = 0,9999$
50	49,57	2712,010	
75	74,35	4020,775	
100	99,13	5305,013	

A reta de calibração ( $y = 53,742x + 9,9444$ ) é definida como aceitável, uma vez que cumpre os critérios de aceitação do laboratório. Apresenta um coeficiente de correlação elevado (superior a 0,995) e um declive dentro dos limites definidos na Carta de Controlo, como demonstrado na Figura 6 do tópico 4.1.1.3 Linearidade. (*Silliker Portugal S.A.*, 2019) A gama de trabalho e a linearidade devem também ser analisadas.

Para validação da curva de calibração diária são analisados o padrão mais baixo e o padrão mais alto no início e no fim de cada análise cromatográfica.

Uma vez que pode ocorrer perda de sensibilidade ao longo de uma série de trabalho (RELACRE, 2012), entre cada 10 amostras é também lido um padrão para avaliar a estabilidade do equipamento e assim averiguar a validade da curva de calibração durante a análise de todas as amostras. A escolha do padrão lido é aleatória. (Silliker Portugal S.A., 2019)

O laboratório estabeleceu que os valores obtidos são considerados aceitáveis se o erro relativo (Equação 22) for igual ou inferior a 10 %, como é mostrado na tabela abaixo (Tabela 6) a título de exemplo.

**Tabela 6** – Erro relativo, em percentagem, dos padrões lidos na análise do dia 30/01/2020 para validação e avaliação da estabilidade do equipamento ao longo das leituras.

<b>Erro relativo dos padrões de controlo</b>					
<b>Leitura</b>	<b>Conc. Ref. (mg/L)</b>	<b>Área 208 nm (mAU.s)</b>	<b>Conc. Obtida (mg/L)</b>	<b>Erro relativo (%)</b>	<b>Classificação</b>
Início	1,98	110,535	1,87	5,79	Aceitável
	99,13	5300,114	98,44	0,70	Aceitável
Entre amostras	7,93	400,927	7,28	9,00	Aceitável
	24,78	1272,527	23,49	5,48	Aceitável
Fim	1,98	107,232	1,81	9,38	Aceitável
	99,13	5300,967	98,45	0,69	Aceitável

Posteriormente, a concentração de teobromina nas amostras é expressa em mg/kg e obtida a partir da Equação 33:

$$C = \frac{X \times Vf \times fd}{m}$$

**Equação 33**

Onde X corresponde à concentração obtida da interpolação da área lida na equação da reta de calibração (mg/L), Vf ao volume final da amostra (mL), fd ao fator de diluição e m à massa da toma (g).

#### **4.1.1.2. Sensibilidade**

Uma vez que a curva de calibração estabelecida é representada por uma reta, então a sensibilidade deverá ser constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive.

Na tabela abaixo (Tabela 7) estão representadas todas as equações das retas de calibração traçadas durante o período estudado.

**Tabela 7** - Equações das retas de calibração no período estudado.

<b>Data</b>	<b>Equação da reta de calibração</b>
17/01/2020	$y = 55,214x - 0,2068$
27/01/2020	$y = 53,708x + 9,498$
30/01/2020	$y = 53,742x + 9,9444$
07/02/2020	$y = 55,25x + 7,6405$
13/02/2020	$y = 46,215x + 3,3144$
19/02/2020	$y = 77,123x + 8,7083$
21/02/2020	$y = 55,405x + 0,1903$
10/03/2020	$y = 55,092x + 8,6428$
11/03/2020	$y = 54,838x + 0,2676$

Por observação da tabela, os declives mantiveram-se constantes, com exceção dos dias 13/02/2020 e 19/02/2020. Foi feito um teste de Grubbs (Equação 14)(Tabela 8) para rejeição de valores aberrantes. Considerou-se uma população igual a 9 e um grau de confiança de 99 %.

**Tabela 8** – Teste de Grubbs para rejeição de valores aberrantes dos declives das retas de calibração.

<b>Data</b>	<b>Valor suspeito (xs)</b>	<b>Valor médio (<math>\bar{x}</math>)</b>	<b>Desvio padrão (s)</b>	<b>G calculado</b>	<b>G tabelado</b>
13/02/2020	46,215	56,287	8,331	1,209	2,323
19/02/2020	77,123			2,501	

Através da tabela 11, conclui-se que dos dois valores suspeitos, apenas o declive de 77,123 deveria ser desprezado devido ao G calculado ser superior ao G tabelado.

Uma vez que os restantes critérios de controlo de qualidade foram aceitáveis, o valor foi considerado.

Adicionalmente, foi realizado um teste de Tukey para comparação múltipla dos 9 declives, com 9 pontos cada, e para um grau de confiança de 95 %.

O desvio-padrão do declive ( $s_b$ ) foi obtido através do desvio-padrão residual ( $s_{y/x}$ ), de acordo com as equações seguintes (Equação 34 e Equação 35) (Miller & Miller, 2010):

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

**Equação 34**

Onde  $n$  corresponde ao número de pontos,  $y_i$  ao valor lido pelo equipamento e  $\hat{y}_i$  ao valor esperado, sendo obtido através da reta.

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

**Equação 35**

Em que  $x_i$  corresponde aos valores do eixo  $x$  e  $\bar{x}$  à média desses valores.

Em seguida, calculou-se o Erro Quadrático Médio (MSE – *Mean Squared Error*) e a Diferença Honestamente Significativa (HSD – *Honest Significant Difference*) (Equação 36 e Equação 37):

$$MSE = \frac{\sum [(N_a - 1) \times s_{b_a}^2]}{\sum (N - 1)_a}$$

**Equação 36**

Onde  $N_a$  corresponde ao número de declives ( $N_a = 9$ ),  $s_{b_a}^2$  ao desvio-padrão do declive  $a$  ( $1 \leq a \leq 9$ ),  $N$  ao número de pontos do declive  $a$  ( $N = 9$ ).

$$HSD = Q \times \sqrt{\frac{MSE}{N}}$$

**Equação 37**

Em que  $N$  corresponde ao número de pontos do declive e  $Q$  ao valor tabelado considerando o grau de confiança, o número de declives e os graus de liberdade totais.

Os valores calculados encontram-se abaixo na Tabela 9.

**Tabela 9** - Valores considerados no teste de Tukey para comparação múltipla dos declives.

<b>n</b>	<b>Declive</b>	<b>Desvio-padrão (<math>s_b</math>)</b>	<b>Variância (<math>s_b^2</math>)</b>	<b>MSE</b>	<b>HSD</b>
<b>1</b>	55,214	0,143	0,020		
<b>2</b>	53,708	0,068	0,005		
<b>3</b>	53,742	0,216	0,047		
<b>4</b>	55,250	0,103	0,011		
<b>5</b>	46,215	0,272	0,074	0,0278	0,2516
<b>6</b>	77,123	0,215	0,046		
<b>7</b>	55,405	0,123	0,015		
<b>8</b>	55,092	0,145	0,021		
<b>9</b>	54,838	0,109	0,012		



Após cálculo dos parâmetros MSE e HSD, com os declives ordenados por ordem crescente, a variação entre declives ( $\Delta$  Declive) foi calculada e o valor obtido foi comparado com o HSD. Na tabela abaixo (Tabela 10) estão indicadas a vermelho as diferenças para a qual se observa a condição  $x_i - x_j > \text{HSD}$ , permitindo inferir que existem declives significativamente diferentes entre si.

**Tabela 10** - Comparação múltipla dos declives.

<b>n</b>	<b>Declive</b>	<b><math>\Delta</math> Declive</b>
<b>5</b>	46,215	
		7,493
<b>2</b>	53,708	
		0,034
<b>3</b>	53,742	
		1,096
<b>9</b>	54,838	
		0,254
<b>8</b>	55,092	
		0,122
<b>1</b>	55,214	0,158
		0,036
<b>4</b>	55,250	
		0,155
<b>7</b>	55,405	
		21,718
<b>6</b>	77,123	

#### 4.1.1.3. Linearidade

No laboratório da *Silliker*, a estabilidade dos declives é avaliada através de uma carta de controlo. O objetivo é monitorizar os resultados obtidos, verificar se estes se encontram dentro ou fora do intervalo definido e facilmente observar flutuações naturais do valor medido.

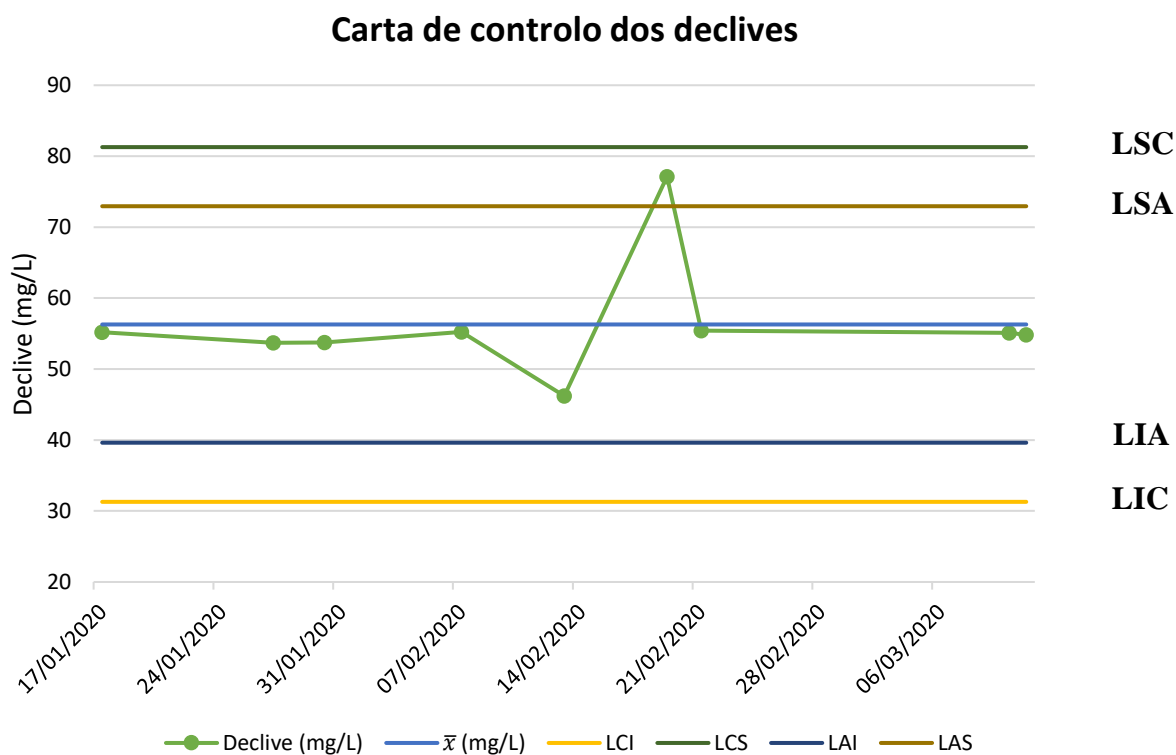
Os valores obtidos para os parâmetros usados na representação da carta de controlo estão expostos na tabela abaixo (Tabela 11).

**Tabela 11** - Valores das linhas central (média), limites superior e inferior de controle (LSC e LIC) e limites superior e inferior de aviso (LSA e LIA) da carta de controlo dos declives da reta de calibração.

Média	Desvio padrão	LSC	LSA	LIA	LIC
56,287	8,331	81,280	72,949	39,625	31,294

Por observação da carta de controlo (Figura 6), pode concluir-se que os valores registados diariamente estão próximos da linha central, com exceção de uma situação em que o declive está próximo do limite de controlo superior.

No entanto, como se encontra dentro dos limites de controlo estabelecidos e foi uma ocorrência única, não representa uma situação fora de controlo.



**Figura 6** - Carta de controlo dos declives no período estudado.

#### 4.1.1.4. Limite de Quantificação (LQ)

Na *Silliker*, a validação do limite de quantificação pode ser feita experimentalmente através de ensaios de recuperação ou a partir de resultados de amostras de clientes e/ou materiais de referência. O laboratório é responsável por definir um limite aceitável, em termos de exatidão e precisão para cada método.

O LQ foi validado experimentalmente através de ensaios de recuperação com a matriz que se esperaria ter menor teor do analito de interesse (Tabela 4), o chocolate branco. Inicialmente, foram analisadas duas amostras de chocolate branco. Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

**Tabela 12** - Concentração de teobromina, em mg/kg, em 2 amostras de chocolate branco, média e desvio-padrão.

Amostra	C <sub>amostra</sub> (mg/kg)	Média	Desvio-padrão
A	13,81	14,27	0,65
B	14,73		

Posteriormente, foram analisadas 8 amostras de chocolate branco fortificadas com uma concentração equivalente à do padrão mais baixo (2 mg/L) e em condições de repetibilidade (Tabela 13).

**Tabela 13** - Valor de recuperação média obtida para a fortificação de chocolate branco com o padrão 2 mg/L e respectivos parâmetros (média e desvio-padrão).

Amostra	C <sub>fortificada</sub> (mg/kg)	Média	Desvio-padrão	C <sub>contaminação</sub> (mg/kg)	Média	Desvio-padrão	Recuperação média (%)
C	37,80	37,01	2,48	24,81	24,64	0,24	<b>92,31</b>
D	34,03			24,61			
E	35,84			24,64			
F	35,73			24,56			
G	34,83			24,16			
H	37,24			24,73			
I	41,68			24,98			
J	38,98			24,62			

Os valores obtidos foram comparados com a média dos valores lidos em amostras de chocolate branco sem contaminação e a percentagem de recuperação foi calculada a partir da Equação 38:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{fo} - C_a}{C_c} \times 100$$

**Equação 38**

Em que  $C_{fo}$  representa a concentração de analito na amostra fortificada (concentração real),  $C_a$  a concentração de analito na amostra não contaminada e  $C_c$  a concentração da contaminação (concentração teórica). Todas as concentrações foram consideradas em mg/kg.

A concentração da amostra ( $C_a$ ) representa a média obtida da análise de 2 amostras de chocolate branco sem contaminação (14,27 mg/kg).

A concentração fortificada (ou real) ( $C_{fo}$ ) foi calculada a partir do sinal instrumental lido no equipamento para as 8 amostras com padrão. Ambos os resultados ( $C_a$  e  $C_{fo}$ ) foram obtidos através de uma equação da reta de calibração e da Equação 33. A contaminação foi feita com 0,5 mL de uma solução-mãe a 496,7 mg/L, tendo sido a concentração de adição 2,4835 mg/L. A concentração da contaminação (teórica) ( $C_c$ ) foi obtida pela aplicação direta da Equação 33, considerando  $X$  como a concentração de adição.

A análise dos resultados obtidos (Tabela 13) permite afirmar que a recuperação média (92 %) foi satisfatória de acordo com o critério do laboratório.

O limite de quantificação definido pelo laboratório, igual a 20 mg/kg, é adequado ao método em estudo.

#### **4.1.1.5. Gama de trabalho**

Na validação de métodos, o laboratório de MIA define a gama de trabalho de um método de ensaio a partir dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade, ou seja, o limite inferior corresponde à matriz com menor teor de analito e o limite superior à matriz com maior teor.

Adicionalmente, foi realizado um teste de homogeneidade de variâncias (teste F de Fisher-Snedecor para 95 % de probabilidade) através da análise de dez réplicas independentes, no mesmo dia, do padrão de menor concentração e do padrão de maior concentração.

Os resultados obtidos apresentam-se na tabela abaixo (Tabela 14).

**Tabela 14** - Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias para a gama de trabalho.

	<b>Área 208 nm (mAU.s)</b>	
	<b>Padrão menor (2 mg/L)</b>	<b>Padrão maior (100 mg/L)</b>
<b>n = 10</b>	108,948	5404,505
	109,196	5402,167
	109,144	5405,010
	109,091	5414,223
	109,265	5414,768
	109,190	5406,648
	108,736	5404,274
	109,098	5401,552
	109,951	5404,062
	109,724	5411,738
<b>Média</b>	109,234	5406,895
<b>Desvio-padrão</b>	0,355	4,879
<b>Variância</b>	0,126	23,807
<b>PG calculado</b>	188,71	

Uma vez que o valor PG calculado (188,71) é superior ao valor F tabelado (3,18), pode afirmar-se que as diferenças de variâncias são significativas e, portanto, a gama de trabalho encontra-se mal ajustada.

Ainda assim, a gama de trabalho geral para o método em estudo ficou definida de 20 mg/kg a 20000 mg/kg, de acordo com o critério seguido pelo laboratório.

#### **4.1.2. Especificidade e seletividade**

Para avaliar a seletividade do método executou-se um ensaio de recuperação com a matriz ração para gato em duplicado e em condições de repetibilidade.

Primeiramente foram analisadas duas amostras de ração para gato em que a concentração obtida para ambas foi 0 mg/kg.

Seguidamente, foram analisadas oito amostras fortificadas com 15 mL de um padrão de 75 mg/L, a partir de uma solução-mãe a 495,87 mg/L, tendo sido a concentração de adição 74,38 mg/L.

A taxa de recuperação foi calculada a partir da Equação 38 e os resultados obtidos estão expostos na tabela abaixo (Tabela 15).

**Tabela 15** - Valor de recuperação média obtida para a fortificação da matriz “ração para gato” com solução-padrão para uma concentração de 75 mg/L e respetivos parâmetros (média e desvio-padrão).

<b>Amostra</b>	<b>C<sub>fortificada</sub> (mg/kg)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio- padrão</b>	<b>C<sub>contaminação</sub> (mg/kg)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio- padrão</b>	<b>Recuperação média (%)</b>
<b>C</b>	638,99			740,34			
<b>D</b>	633,27			743,07			
<b>E</b>	633,63			738,46			
<b>F</b>	623,19	633,92	14,64	739,61	739,27	4,25	85,75
<b>G</b>	613,39			738,45			
<b>H</b>	653,54			729,69			
<b>I</b>	653,86			742,09			
<b>J</b>	621,50			742,43			

A concentração da amostra representa a média obtida da análise de duas amostras de ração sem contaminação (0 mg/kg).

A concentração fortificada (ou real) foi calculada a partir do sinal instrumental lido no equipamento para as 8 amostras com padrão. Estes resultados foram obtidos através de uma equação da reta de calibração e da Equação 33.

A concentração da contaminação (ou teórica) foi obtida pela aplicação direta da Equação 33, considerando X como a concentração de adição.

A análise dos resultados obtidos (Tabela 15) permite afirmar que a recuperação média ( $\approx 86\%$ ) foi satisfatória devido a cumprir o requisito do laboratório ( $> 80\%$ ) e, portanto, o método demonstra ser específico e aplicável para o analito em estudo.

#### **4.1.3. Precisão**

Para a determinação da precisão do método AOAC 980.14 – “Determinação da teobromina” foram levados a cabo estudos de repetibilidade e de precisão intermédia através da análise de amostras de controlo e amostras do laboratório no mesmo dia e em dias diferentes, de acordo com o definido.

##### **4.1.3.1. Repetibilidade**

Para o estudo da repetibilidade foram efetuados 8 ensaios para 15 matrizes, inseridas em 7 grupos alimentares (Tabela 4).

Os ensaios foram realizados pelo mesmo analista, no mesmo laboratório e equipamento, no mesmo dia e num curto espaço de tempo.

Os parâmetros estudados foram a média, o desvio-padrão e desvio-padrão relativo, o limite da repetibilidade, limite da repetibilidade relativo e o coeficiente de variação da repetibilidade.

O teste de Cochran foi feito para estudar a homogeneidade de variâncias nos conjuntos de resultados de diferentes amostras e assim detetar a existência de variâncias aberrantes.

A realização do teste de Cochran permitiu dividir os resultados obtidos em três gamas de trabalho distintas ( $C_{\text{teobromina}} < 500$  mg/kg;  $\geq 500$  e  $< 2000$  mg/kg;  $\geq 2000$  mg/kg), como é exposto nas tabelas apresentadas.

O teste de Grubbs foi realizado para verificar a presença de valores discrepantes e considerar o conjunto de valores como aceitável ou não aceitável.

Adicionalmente, foi aplicada a Equação 12 ( $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ ) para avaliar a proximidade dos resultados e determinar se a diferença era significativa, como é demonstrado para a matriz chocolate de leite, a título de exemplo (Tabela 22).

As tabelas 16, 17, 18 e 19 são referentes às matrizes cujo teor de teobromina é inferior a 500 mg/kg.

As tabelas 20, 21, 22 e 23 são referentes às matrizes cujo teor de teobromina se encontra entre 500 e inferior a 2000 mg/kg.

As tabelas 24, 25 e 26 são referentes às matrizes cujo teor de teobromina é igual ou superior a 2000 mg/kg.

**Tabela 16** – Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg.

<b>Teste da repetibilidade</b>															
<b>Matriz</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>S<sub>ri</sub></b>	<b>S<sub>ri</sub> relativo (%)</b>	<b>r</b>	<b>r relativo (%)</b>	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>
	<b>mg/kg</b>														
Chocolate branco	37,78	34,03	35,84	35,73	34,83	37,24	41,68	38,98	37,01	6,14	2,48	6,70	6,94	18,75	6,70
Cereais	291,89	289,68	294,77	290,79	298,54	294,46	294,10	291,20	293,18	8,18	2,86	0,98	8,01	2,73	0,98
Leite com chocolate	310,42	302,91	302,61	303,40	293,43	298,15	304,81	302,66	302,30	24,29	4,93	1,63	13,80	4,56	1,63

**Tabela 17** - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade da matriz eliminada.

<b>Matrizes eliminadas (após execução do teste de Cochran)</b>															
<b>Matriz</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>S<sub>ri</sub></b>	<b>S<sub>ri</sub> relativo (%)</b>	<b>r</b>	<b>r relativo (%)</b>	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>
	<b>mg/kg</b>														
Bebida de soja de chocolate	349,02	337,87	338,26	327,21	318,56	310,09	309,86	289,56	322,55	374,89	19,36	6,00	54,21	16,81	6,00



A execução do teste de Cochran permitiu avaliar a maior variância obtida nos ensaios, neste caso correspondente à “bebida de soja de chocolate” (374,89) e, por comparação ao valor crítico tabelado com 95 % de confiança, considerar este valor como discrepante e eliminar a matriz.

Embora uma incorreta execução experimental, nomeadamente homogeneização da amostra, possa ter ocorrido e influenciado o resultado, tal não parece suficiente para justificar a rejeição da matriz. Por outro lado, a natureza das amostras em estudo é variada, o que se reflete em diferentes teores de teobromina. A matriz “bebida de soja de chocolate” é rejeitada, pois apresenta um teor distinto quando comparada com as restantes amostras em estudo.

**Tabela 18** - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg, após eliminação da matriz “bebida de soja de chocolate”.

<b>Teste de Cochran</b>			
<b>C calculado</b>	0,629	<b>Valor do limite da repetibilidade</b>	9,58
<b>Valor crítico tabelado (5%)</b>	0,653	<b>Valor do limite da repetibilidade relativo</b>	8,68
<b>Conclusão</b>	Aceite	<b>Coefficiente de variação médio relativo</b>	3,10

**Tabela 19** - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg.

<b>Matriz</b>	<b>Teste de Grubbs</b>							
	<b>População</b>	<b>Valor crítico 1%</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Gp Valor mínimo</b>	<b>Teste ao valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Gp Valor máximo</b>	<b>Teste ao valor máximo</b>
Chocolate branco	8	2,274	34,029	1,204	Aceitável	41,681	1,883	Aceitável
Cereais	8	2,274	289,685	1,222	Aceitável	298,540	1,875	Aceitável
Leite com chocolate	8	2,274	293,428	1,800	Aceitável	310,421	1,648	Aceitável

**Tabela 20** - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg.

<b>Teste da repetibilidade</b>															
<b>Matriz</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>S<sub>ri</sub></b>	<b>S<sub>ri</sub> relativo (%)</b>	<b>r</b>	<b>r relativo (%)</b>	<b>CV<sub>r</sub> (%)</b>
	<b>mg/kg</b>														
Chocolate de leite	1622,74	1694,72	1706,57	1704,57	1701,43	1634,68	1641,68	1672,61	1672,38	1196,39	34,59	2,07	96,85	5,79	2,07
LGC Milk Chocolate QCS 281	1204,39	1204,51	1223,57	1217,18	1230,88	1215,86	1244,17	1242,57	1222,89	238,08	15,43	1,26	43,20	3,53	1,26
Suplemento em pó com chocolate	1635,19	1685,86	1765,77	1646,31	1721,24	1724,63	1725,59	1726,66	1703,91	1987,26	44,58	2,62	124,82	7,33	2,62
Ração	638,99	633,27	633,63	623,19	613,39	653,54	653,86	621,50	633,92	214,23	14,64	2,31	40,98	6,46	2,31
Bolacha	1158,46	1174,76	1162,96	1152,55	1165,49	1179,19	1176,64	1169,57	1167,46	86,72	9,31	0,80	26,07	2,23	0,80
Barra de cereais	697,52	735,17	679,97	695,69	751,43	767,53	663,70	766,38	719,67	1642,15	40,55	5,63	113,47	15,77	5,63
Amendoins com chocolate	1698,11	1696,93	1741,70	1715,08	1724,03	1759,18	1724,81	1782,69	1730,32	879,94	29,66	1,71	83,06	4,80	1,71
Creme para barrar de chocolate	1538,56	1489,68	1509,95	1529,65	1493,29	1475,83	1475,85	1544,31	1507,14	762,87	27,62	1,83	77,33	5,13	1,83

**Tabela 21** - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg.

<b>Teste de Cochran</b>			
<b>C calculado</b>	0,284	<b>Valor do limite da repetibilidade</b>	75,72
<b>Valor crítico tabelado (5%)</b>	0,3195	<b>Valor do limite da repetibilidade relativo</b>	6,38
<b>Conclusão</b>	Aceite	<b>Coefficiente de variação médio relativo</b>	2,28

Considerando os resultados do estudo da repetibilidade da matriz chocolate de leite, é possível observar que as diferenças entre os valores obtidos são inferiores ao valor obtido do limite da repetibilidade ( $r = 96,85$ ), confirmando a aceitabilidade dos dados exibidos.

**Tabela 22** - Valores obtidos para o estudo da repetibilidade na amostra chocolate de leite.

<b>Matriz</b>	<b>E<sub>1</sub></b>	<b>E<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>3</sub></b>	<b>E<sub>4</sub></b>	<b>E<sub>5</sub></b>	<b>E<sub>6</sub></b>	<b>E<sub>7</sub></b>	<b>E<sub>8</sub></b>	<b>r</b>
<b>Chocolate de leite</b>	1622,74	1694,72	1706,57	1704,57	1701,43	1634,68	1641,68	1672,61	96,85
<b>E<sub>2</sub>-E<sub>1</sub></b>	<b>E<sub>3</sub>-E<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>4</sub>-E<sub>3</sub></b>	<b>E<sub>5</sub>-E<sub>4</sub></b>	<b>E<sub>6</sub>-E<sub>5</sub></b>	<b>E<sub>7</sub>-E<sub>6</sub></b>	<b>E<sub>8</sub>-E<sub>7</sub></b>	<b>Conclusão</b>		
71,97	11,85	2,01	3,14	66,74	7,00	30,93	Aceitável		

**Tabela 23** - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina entre 500 e 2000 mg/kg.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Chocolate de leite	8	2,274	1622,745	1,435	Aceitável	1706,572	0,989	Aceitável
LGC Milk Chocolate QCS 281	8	2,274	1204,394	1,199	Aceitável	1244,174	1,379	Aceitável
Suplemento em pó com chocolate	8	2,274	1635,190	1,541	Aceitável	1765,772	1,388	Aceitável
Ração	8	2,274	613,390	1,403	Aceitável	653,864	1,363	Aceitável
Bolacha	8	2,274	1152,551	1,600	Aceitável	1179,193	1,260	Aceitável
Barra de cereais	8	2,274	663,705	1,381	Aceitável	767,528	1,181	Aceitável
Amendoins com chocolate	8	2,274	1669,929	1,126	Aceitável	1782,688	1,766	Aceitável
Creme para barrar de chocolate	8	2,274	1475,829	1,134	Aceitável	1544,314	1,346	Aceitável

**Tabela 24** - Resultados obtidos para o teste da repetibilidade em amostras com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg

<b>Teste da repetibilidade</b>															
<b>Matriz</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>S<sub>ri</sub></b>	<b>S<sub>ri</sub></b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>CV<sub>r</sub></b>
	<b>mg/kg</b>											<b>relativo (%)</b>		<b>relativo (%)</b>	
Chocolate preto	7590,91	7521,64	7523,25	7553,67	7515,75	7564,92	7585,48	7642,80	7562,30	1894,58	43,53	0,58	121,87	1,61	0,58
FAPAS T20161 Chocolate cake mix	2153,45	2166,84	2062,45	2044,17	2066,47	2188,92	2019,65	205,99	2094,62	4161,89	64,51	3,08	180,64	8,62	3,08
Cacau em pó	18598,54	18576,21	18556,20	18537,78	18457,97	18368,56	18446,80	18547,34	18511,18	6174,10	78,58	0,42	220,01	1,19	0,42

**Tabela 25** - Resultados obtidos para o teste de Cochran para a gama com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg.

<b>Teste de Cochran</b>			
<b>C calculado</b>	0,505	<b>Valor do limite da repetibilidade</b>	174,17
<b>Valor crítico tabelado (5%)</b>	0,653	<b>Valor do limite da repetibilidade relativo</b>	3,81
<b>Conclusão</b>	Aceite	<b>Coefficiente de variação médio relativo</b>	1,36

**Tabela 26** - Resultados obtidos para o teste de Grubbs em amostras com teor de teobromina superior a 2000 mg/kg.

<b>Matriz</b>	<b>Teste de Grubbs</b>							
	<b>População</b>	<b>Valor crítico 1%</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Gp Valor mínimo</b>	<b>Teste ao valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	<b>Gp Valor máximo</b>	<b>Teste ao valor máximo</b>
Chocolate preto	8	2,274	7515,753	1,069	Aceitável	7642,798	1,849	Aceitável
FAPAS T20161								
Chocolate cake mix	8	2,274	2019,649	1,162	Aceitável	2188,916	1,462	Aceitável
Cacau em pó	8	2,274	18368,564	1,815	Aceitável	18598,543	1,112	Aceitável

#### 4.1.3.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia (PI) foi estudada através da análise de 299 duplicados de amostras pertencentes a todos os grupos alimentares a validar.

Tal como foi feito no estudo da repetibilidade, os resultados obtidos foram divididos pelas três gamas de trabalho definidas.

Os valores considerados no estudo da PI são, na sua maioria, provenientes do arquivo da empresa, pois não houve possibilidade de finalizar o estudo da PI em todas as matrizes definidas no plano de validação.

No tratamento dos resultados foi calculado o desvio-padrão da precisão intermédia (Equação 18), o coeficiente de variação médio (Equação 19) e o limite da precisão intermédia (Equação 20), como se observa na tabela seguinte (Tabela 27).

**Tabela 27** – Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia para o método de determinação de teobromina (AOAC 980.14).

<b>Gama</b>	<b>&lt; 500 mg/kg</b>	<b>500 a 2000 mg/kg</b>	<b>≥ 2000 mg/kg</b>
<b>População (n)</b>	50	159	90
<b>Si (mg/kg)</b>	1,92	15,03	44,32
<b>CVpi (%)</b>	0,75	1,17	0,77
<b>Limite da PI (%)</b>	2,09	3,28	2,16

O limite da PI definido pelo laboratório como aceitável é igual ou inferior a 10 %, o que é verificado nos resultados obtidos para as três gamas de trabalho definidas.

Os valores obtidos para o coeficiente de variação da PI têm valores baixos, sendo o mais elevado igual a 1,17 %.

As medições efetuadas em condições de precisão intermédia juntamente com os resultados dos parâmetros respetivos permitem afirmar que o método é preciso e adequado ao seu propósito.

#### 4.1.4. Veracidade

Para a validação deste método, a veracidade foi demonstrada através da comparação de resultados obtidos por vários laboratórios na análise de materiais de referência certificados (MRC). Estes ensaios interlaboratoriais têm como objetivo avaliar o desempenho dos laboratórios em condições equivalentes.



Foram considerados resultados de seis amostras de circuitos das empresas LGC e FAPAS. Na tabela seguinte (Tabela 28) apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial, o número de laboratórios participantes, o desvio-padrão, o valor-Z (Equação 24) e o enviesamento (Equação 21).

**Tabela 28** - Resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais com amostras de circuito.

<b>Data</b>	<b>Circuito</b>	<b>Matriz</b>	<b>X<sub>lab</sub></b> <b>(mg/kg)</b>	<b>X<sub>ref</sub></b> <b>(mg/kg)</b>	<b>Nº lab</b> <b>participantes</b>	<b>S<sub>R</sub></b> <b>(mg/kg)</b>	<b>Valor-</b> <b>Z</b>	<b>Enviesamento</b> <b>(%)</b>	<b>Avaliação</b>
Jul/16	FAPAS	Chocolate cake mix	1910	1775	38	92,1	1,47	8	Aceitável
Jul/16	FAPAS	Chocolate cake mix	1920	1775	38	92,1	1,57	8	Aceitável
Jan/17	FAPAS	Chocolate cake mix	1270	1203	38	66,2	1,01	6	Aceitável
Jul/17	FAPAS	Chocolate cake mix	1230	1203	38	66,2	0,41	2	Aceitável
Set/17	LGC	Milk chocolate	1800	1600	9	140,0	1,16	13	Aceitável
Set/17	LGC	Milk chocolate	1700	1600	9	140,0	0,58	6	Aceitável
Jun/18	LGC	Dark chocolate	5700	7100	9	1630,0	-0,79	20	Aceitável
Jun/18	LGC	Dark chocolate	5600	7100	9	1630,0	-0,85	21	Aceitável
Out/18	LGC	Cocoa powder	17300	18300	9	2000,0	-0,50	5	Aceitável
Out/18	LGC	Cocoa powder	17500	18300	9	2000,0	-0,40	4	Aceitável
Jul/19	FAPAS	Chocolate cake mix	2050	2154	37	108,5	-0,96	5	Aceitável
Jul/19	FAPAS	Chocolate cake mix	2010	2154	37	108,5	-1,33	7	Aceitável
Set/19	LGC	Milk chocolate	1200	1200	10	100,0	0	0	Aceitável
Set/19	LGC	Milk chocolate	1100	1200	10	100,0	-1,0	8	Aceitável

Apesar de dois valores de enviesamento se apresentarem elevados, os valores expostos consideram-se satisfatórios, pois o fator de desempenho valor-Z é igual ou inferior a 2 para todos os casos.

De acordo com estes dados, o método pode ser considerado como justo.

Ainda, foram estudadas duas amostras de circuito (LGC e FAPAS) cujos resultados se apresentam na tabela abaixo (Tabela 29).

**Tabela 29** - Resultados obtidos nas matrizes certificadas analisadas pelo método em equipamento

<b>Data</b>	<b>Circuito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Valor medido</b>	<b>Valor certificado (mg/kg)</b>	<b>Limite inferior</b>	<b>Limite superior</b>	<b>Avaliação</b>
Jan/20	FAPAS	Chocolate cake mix	2094	2154	1937	2371	Aceitável
Fev/20	LGC	Milk chocolate	1222	1200	1100	1400	Aceitável

O valor certificado e os limites inferior e superior vêm detalhados no certificado de cada MRC. Os resultados obtidos com os ensaios realizados durante a validação do método consideram-se aceitáveis, pois encontram-se dentro dos limites superior e inferior definidos.

Com base nos ensaios expostos, os resultados obtidos permitem demonstrar que os valores de veracidade cumprem com os critérios estabelecidos para as matrizes analisadas.

#### **4.1.5. Estimativa da incerteza**

A estimativa da incerteza associada a cada gama de trabalho para o método de determinação da teobromina foi calculada através do estudo de duplicados da precisão intermédia e de DPCS (componente da precisão) e ensaios interlaboratoriais e de recuperação (componente da veracidade).

A Tabela 30 apresenta os valores das incertezas considerados para a gama menor, em que a concentração de teobromina é inferior a 500 mg/kg.

Para a componente da precisão consideraram-se os valores dos duplicados estudados na precisão intermédia e para a componente da veracidade um ensaio de recuperação.

**Tabela 30** – Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina inferior a 500 mg/kg.

<b>U</b> (precisão) relativa	<b>U</b> (veracidade) relativa	<b>U</b> combinada	<b>U</b> expandida
0,744	8,458	8,49	<b>17,0</b>

A Tabela 31 apresenta os valores considerados na estimativa da incerteza para a gama intermédia, em que a concentração de teobromina é maior ou igual a 500 mg/kg e menor que 2000 mg/kg. Considerou-se os resultados dos duplicados do estudo da precisão intermédia e da participação em oito ensaios interlaboratoriais.

**Tabela 31** - Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina maior ou igual a 500 mg/kg e menor que 2000 mg/kg.

<b>U</b> (precisão) relativa	<b>U</b> (veracidade) relativa	<b>U</b> combinada	<b>U</b> expandida
1,172	7,507	7,60	<b>15,2</b>

A Tabela 32 apresenta os valores considerados na estimativa da incerteza para a gama maior, em que a concentração de teobromina é igual ou superior a 2000 mg/kg. Para a componente da precisão foram considerados resultados dos duplicados do estudo da precisão intermédia e de DPCS. Já para a incerteza associada à veracidade consideraram-se quatro ensaios interlaboratoriais.

**Tabela 32** - Valores considerados no cálculo da incerteza associada a amostras com teor de teobromina igual ou superior a 2000 mg/kg.

<b>U</b> (precisão)relativa,c	<b>U</b> (veracidade) relativa	<b>U</b> combinada	<b>U</b> expandida
3,641	5,796	6,80	<b>13,6</b>

As incertezas associadas à componente da precisão e à componente da veracidade demonstram ser aceitáveis, uma vez que são inferiores ao critério de aceitação definido pelo laboratório (10%).

A partir destas, foram calculadas as incertezas combinadas e, por multiplicação pelo fator de expansão ( $k=2$ ), as expandidas.

Por observação das tabelas, pode afirmar-se que as incertezas obtidas (17 %; 15,2 %; 13,6 %) são aceitáveis, pois cada uma das componentes consideradas é relativamente baixa e cumprem com o critério estabelecido pelo laboratório (< 20 %).

## **5. Conclusões e Perspetivas futuras**

---

A Segurança Alimentar compreende um conjunto de normas ao longo de toda a cadeia de fornecimento de produtos alimentares que garantem a confiança do consumo dos mesmos. Devido à globalização, a ocorrência de fraude alimentar agravou-se, pondo em causa a saúde pública e levando à necessidade do desenvolvimento de abordagens caso a caso para a análise de alimentos. Assim, tornou-se fundamental a validação de métodos analíticos na indústria alimentar para que os resultados produzidos fossem fiáveis.

O presente trabalho permitiu a validação de um método implementado na *Silliker* Portugal para a determinação do teor de teobromina em catorze amostras à base de cacau e uma ração animal, tendo como base o método 980.14 publicado pela AOAC.

A sensibilidade foi estudada através do declive das retas de calibração.

Através de uma carta de controlo de declives, a linearidade do método foi monitorizada, observando-se uma situação atípica, em que se concluiu não estar fora de controlo.

O limite de quantificação definido anteriormente pelo laboratório (20 mg/kg) foi validado experimentalmente através de um ensaio de recuperação satisfatório (92 %).

A gama de trabalho não foi validada através de um teste de homogeneidade de variâncias. Contudo, segundo o critério seguido no laboratório, a gama de trabalho geral define-se a partir dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade (20 mg/kg a 20000 mg/kg).

Através de um ensaio de recuperação ( $\approx 86\%$ ) numa matriz de ração animal, o método demonstrou ser específico, pois cumpriu o requisito do laboratório ( $> 80\%$ ).

A precisão foi estudada através da repetibilidade e precisão intermédia. Para estes parâmetros e estimativa da incerteza, os resultados foram divididos em três gamas de concentração:  $< 500$  mg/kg,  $500 \leq T < 2000$  mg kg,  $\geq 2000$  mg/kg.

Para a gama menor, no estudo da repetibilidade, a matriz bebida de soja de chocolate foi eliminada, calculando-se um limite de repetibilidade de 9,58 mg/kg. Isto significa que a diferença entre dois duplicados não deve ultrapassar este valor. Para a gama intermédia, o valor foi de 75,72 mg/kg e para a gama superior de 174,17 mg/kg.

Os limites da precisão intermédia obtidos (2,09 %, 3,28 %, 2,16 %) para as três gamas foram aceitáveis, pois cumpriram o critério do laboratório ( $\leq 10\%$ ).

A veracidade do método foi demonstrada através de resultados de circuitos, nomeadamente pelo cálculo do fator de desempenho valor-z e enviesamento. Ainda, duas amostras de circuito LGC e FAPAS, foram estudadas em condições de repetibilidade, estando os resultados obtidos dentro dos limites definidos em certificado pelo fabricante.

A estimativa da incerteza para as três gamas de trabalho foi calculada através do estudo de duplicados, DPCS, EI e ensaios de recuperação. Para a gama menor foi de 17 %, gama intermédia 15,2 % e gama maior 13,6 %. Os valores obtidos são aceitáveis, pois as componentes isoladas consideradas ( $u_{\text{precisão}}$  e  $u_{\text{veracidade}}$ ) são relativamente baixas.

Finalmente, os parâmetros de controlo de qualidade interno foram cumpridos e todos classificados como aceitáveis.

Através dos resultados obtidos para os vários parâmetros em estudo é possível afirmar que o método é adequado para o seu propósito e que produz resultados fiáveis e precisos.

A nível de perspectivas futuras, sugere-se que o laboratório cumpra com o controlo da execução do método, como descrito nas normas de qualidade internas, de modo a garantir que as condições validadas se mantêm e ainda considerar a validação de outras matrizes mais desafiantes, como o iogurte.

A realização do estágio em ambiente empresarial permitiu a aquisição de novos conhecimentos e desenvolvimento de competências, além de ter sido uma experiência enriquecedora a nível pessoal e profissional.

## **6. Referências bibliográficas**

---

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official Methods of Analysis (Cacao Bean and Its Products)* (15 ed.). Virginia, Estados Unidos da América: AOAC International.
- Australian Institute of Food Safety. (19 de Agosto de 2019). *What is Food Safety?* (Australian Institute of Food Safety) Obtido em 16 de Outubro de 2019, de <https://www.foodsafety.com.au/resources/articles/what-is-food-safety>
- Böttcher, J., Margraf, M., & Monks, K. (s.d.). *HPLC Basics – principles and parameters*. Obtido em 04 de Janeiro de 2020, de [www.knauer.net/en/hplc-basics-principles-and-parameters/a24652](http://www.knauer.net/en/hplc-basics-principles-and-parameters/a24652)
- Braga, L. (2009). *Dissertação de Mestrado: "Aplicação prática da Norma NP EN ISO/IEC 17025: Apresentação de dois casos de estudo"*. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa.
- BRCGS. (2020). Webinar: The threat of food fraud, substitution and protecting the integrity of product claims (such as Free From) during COVID-19. Reino Unido: British Retail Consortium Global Standards (BRCGS).
- Byrd-Bredbenner, C., Berning, J., Martin-Biggers, J., & Quick, V. (2013). Food Safety in Home Kitchens: A Synthesis of the Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 4060-4085. doi:10.3390/ijerph10094060
- Carvalho, T. (27 de Maio de 2020). Webinar on Food Trends. Tecmaia – Parque de Ciência e Tecnologia da Maia, Porto, Portugal: Portugal Foods.
- Chhabra, N. (s.d.). *Theory notes – Chromatography, Biochemistry for medics*. Obtido em 25 de Novembro de 2019, de <http://www.namrata.co/fcategory/biochemical-techniques/theory-notesbiochemical-techniques/>
- Cova, I., Leta, V., Mariani, C., Pantoni, L., & Pomati, S. (2019). Exploring cocoa properties: is theobromine a cognitive modulator? *Psychopharmacology*, 236, 561–572. doi:10.1007/s00213-019-5172-0
- Dang, Y. K., & Nguyen, H. V. (2019). Effects of Maturity at Harvest and Fermentation Conditions on Bioactive Compounds of Cocoa Beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74, 54–60. doi:10.1007/s11130-018-0700-3



- Dolder, L. K. (2012). *Methylxanthines: Caffeine, Theobromine, Theophylline* (3ª ed.). Estados Unidos da América: Elsevier.
- Drugbank. (s.d.). *Theobromine*. Obtido em 05 de Agosto de 2020, de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01412>
- Efraim, P., Alves, A. B., & Jardim, D. C. (2011). Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Braz. J. Food Technol., Campinas*, 14(3), 181-201. doi:10.4260/BJFT2011140300023
- Eurachem. (2016). *Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation* (3ª ed.). (V. Barwick, Ed.) Reino Unido: LGC Standards. Obtido em 28 de Maio de 2020, de [www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem\\_CITAC\\_QAC\\_2016\\_EN.pdf](http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Eurachem_CITAC_QAC_2016_EN.pdf)
- Evans, W. C., & Evans, D. (2009). Em *Trease and Evans' Pharmacognosy* (pp. 353-415). Reino Unido: W.B. Saunders. doi:10.1016/B978-0-7020-2933-2.00026-5
- Ferreira, A. S. (2013). *Dissertação de Mestrado: Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)*. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa.
- Filipe, E., Pellegrino, O., Baratto, A. C., Oliveira, S. P., & Mendoza, V. M. (2012). *Vocabulário Internacional de Metrologia – Conceitos fundamentais e gerais e termos associados*. Caparica: Instituto Português da Qualidade. Obtido de [www1.ipq.pt/PT/Metrologia/Documents/VIM\\_IPQ\\_INMETRO\\_2012.pdf](http://www1.ipq.pt/PT/Metrologia/Documents/VIM_IPQ_INMETRO_2012.pdf)
- Gil, A. (2018). UC Segurança e Qualidade Alimentar: Aula 5 - Sistemas de Qualidade Alimentar. Aveiro: Universidade de Aveiro.
- Gizaw, Z. (2019). Public health risks related to food safety issues in the food market: a systematic literature review. *Gizaw Environmental Health and Preventive Medicine*, 24(68), 1-21. doi:10.1186/s12199-019-0825-5

- Grubert, L. C. (12 de Julho de 2018). *O que é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência?* Obtido em 25 de Novembro de 2019, de Freitag Laboratórios: <https://freitag.com.br/blog/o-que-e-a-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia/>
- Heidorn, M. (2016). *The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography*. Alemanha: Thermo Fisher Scientific Inc. Obtido em 06 de Agosto de 2020, de [tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/WP-71499-LC-Temperature-Column-Thermostatting-WP71499-EN.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/WP-71499-LC-Temperature-Column-Thermostatting-WP71499-EN.pdf)
- Instituto Internacional de Cromatografia. (2016). Glossário de Termos Cromatográficos. *Scientia Chromatographica*, 8(4), 257-267. doi:10.4322/sc.2016.037
- Instituto Português de Acreditação. (2010). *Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*. Caparica: Instituto Português de Acreditação.
- International Organization for Standardization. (2012). *ISO 11352. Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data*. Reino Unido: British Standards Institution (BSI).
- Izawa, K., Amino, Y., Yueda, M. K., & Kuroda, M. (2010). Human–Environment Interactions – Taste. *Comprehensive Natural Products II*, 631–671. doi:10.1016/b978-008045382-8.00108-8
- Knauer. (s.d.). *HPLC Basics – Principles and parameters*. (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH) Obtido em 18 de Maio de 2020, de [www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics---principles-and-parameters?fbclid=IwAR0W6s91H49Lb3snL7jp0BMLCwhbeVQLP8Sv8eL7N29S9N0IQ237LEdnVEI](http://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics---principles-and-parameters?fbclid=IwAR0W6s91H49Lb3snL7jp0BMLCwhbeVQLP8Sv8eL7N29S9N0IQ237LEdnVEI)
- Knauer. (s.d.). *Why do I need a precolumn?* (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH) Obtido em 17 de Maio de 2020, de [www.knauer.net/en/why-do-i-need-a-precolumn/f19609](http://www.knauer.net/en/why-do-i-need-a-precolumn/f19609)

- Lanças, F. M. (2012). Efeitos de temperatura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). *Scientia Chromatographica*, 4(1), 13-19. doi:10.4322/sc.2012.002.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2ª ed.). Reino Unido: Eurachem. Obtido de Eurachem Guide: [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf)
- Magnusson, B., Näykki, T., Hovind, H., & Krysell, M. (2012). *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories* (3.1 ed.). Noruega: Nordtest TR 537.
- Martínez-Pinilla, E., Oñatibia-Astibia, A., & Franco, R. (2015). The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Frontiers in Pharmacology*, 6(30), 1-6. doi:10.3389/fphar.2015.00030.
- McNaught, D. A., & Wilkinson, A. (1997). *Compendium of Chemical Terminology* (2ª ed.). Nova Jérсия, Estados Unidos da América: Wiley.
- Mérieux NutriSciences. (2017). *Silliker Portugal*, S.A. (Silliker Portugal, S.A.) Obtido em 23 de Outubro de 2019, de Mérieux NutriSciences, Portugal: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal>
- Mérieux NutriSciences. (s.d.). *Métodos analíticos para o combate à fraude alimentar*. (Mérieux NutriSciences) Obtido em 05 de Maio de 2020, de <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar/o-que-e-fraude-alimentar/metodos-analiticos-para-o-combate-a-fraude-alimentar>
- Mérieux NutriSciences. (s.d.). *O que é fraude alimentar?* (Mérieux NutriSciences) Obtido em 05 de Maio de 2020, de <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/qualidade-e-seguranca-alimentar/o-que-e-fraude-alimentar>
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (6ª ed.). Reino Unido: Pearson.

- Mukaka, M. M. (2012). Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24(3), 69-71. Obtido em 09 de Agosto de 2020, de [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/pdf/MMJ2403-0069.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/pdf/MMJ2403-0069.pdf)
- Nicola Simola, J. W. (2015). *The Adenosinergic System "Adenosine A2A Receptors: Localization and Function"* (Vol. 10). Suíça: Springer. doi:10.1007/978-3-319-20273-0\_1
- Patel, K., & Watson, R. R. (2018). Chocolate and Its Component's Effect on Cardiovascular Disease. Em *Social, Population, and Family Effects on the Heart and Arteries* (pp. 255-266). Elsevier.
- PubChem. (s.d.). *National Center for Biotechnology Information. Compound Theobromine*. Obtido em 03 de Janeiro de 2020, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theobromine>
- RELACRE. (1996). *Guia RELACRE 3. Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. Lisboa: RELACRE.
- RELACRE. (1998). *Guia RELACRE 9. Alguns exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química*. Lisboa: RELACRE.
- RELACRE. (2000). *Guia RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Lisboa: RELACRE.
- RELACRE. (2012). *Recomendação para o Controlo de Qualidade Interno Mínimo a utilizar em rotina pelos Laboratórios de Ensaio para Análise Química de Águas*. Lisboa: RELACRE.
- RELACRE. (2018). *Guia RELACRE 31 - Quantificação de incerteza de medição em ensaios químicos*. Lisboa: RELACRE.
- Ribani, M., Bottoli, C. B., Collins, C. H., Jardim, I. C., & Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780. doi:10.1590/S0100-40422004000500017

- Rounaq Nayak, P. W. (2019). Global food safety as a complex adaptive system: Key concepts and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 409-425. doi:10.1016/j.tifs.2019.07.040
- Sena, A. R., Assis, S. A., & Branco, A. (2011). Analysis of Theobromine and Related Compounds by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: An Update (1992–2011). *Food Technol. Biotechnol*, 49(4), 413–423.
- Silliker Portugal S.A. (2019). *Procedimento relativo ao controlo da qualidade (PCQ)*. Vila Nova de Gaia.
- Silliker Portugal, S.A. (2019). *Validação de métodos em análise química*. Canelas, Vila Nova de Gaia: Mérieux NutriSciences.
- Silliker Portugal, S.A. (2020). *IQ.22.0 Estudo da repetibilidade*. Canelas, Vila Nova de Gaia: Silliker Portugal, S.A.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis* (6<sup>a</sup> ed.). Califórnia: Thomson Brooks/Cole.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9 ed.). Nova Jérсия, Estados Unidos da América: Wiley.
- Son, Y.-J., & Kwon, B. E. (21 de Março de 2018). Overactive Bladder is a Distress Symptom in Heart Failure. *Int Neurourol J*, 22, 77-82. doi:10.5213/inj.1836120.060
- Univesity of Tartu. (02 de Novembro de 2016). *Selectivity: LC selectivity*. (University of Tartu) Obtido em 02 de Abril de 2020, de [https://sisu.ut.ee/lcms\\_method\\_validation/21-LC-selectivity](https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/21-LC-selectivity)
- Weston, A., & Brown, P. R. (1997). *HPLC and CE Principles and practice*. Londres: Academic Press.
- WHO/IARC. (1991). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal* (Vol. 51). França: IARC.

Zoonen, P. V., Klooster, H. A., Hoogerbrugge, R., Gort, S. M., & Wiel, H. V. (1998).  
Validation of Analytical Methods and Laboratory Procedures for Chemical  
Measurements. *Arh hig rada toksikol*, 49, 355-370.