



Implementação do método de análise de adoçantes não calóricos em matrizes alimentares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV)

RUI ALEXANDRE SILVA FERREIRA

julho de 2025

Implementação do método de análise de adoçantes não calóricos em matrizes alimentares por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV)

Rui Alexandre Silva Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química,
Área de Especialização em Qualidade

Orientador ISEP: Maria Teresa Oliva Teles

Orientador Silliker: Laura Sousa

Júri

Presidente:

Maria Paula Carvalho Neto Pimenta, Professor Adjunto, ISEP

Vogais:

Hendrikus Petrus Antonius Nouws, Professor Coordenador, ISEP

Maria Teresa Pereira de Oliva Teles Moreira, Professor Adjunto, ISEP

Porto, julho 2025

Resumo

Este trabalho foi elaborado na Silliker Portugal, S.A. com o objetivo de implementar e validar um novo método para a determinação de acesulfame K, aspartame e sacarina, em matrizes alimentares utilizando HPLC-UV. Para o estudo foram ensaiadas várias matrizes, vinho, gelatina, adoçante em pó e líquido de stevia, barra energética, iogurte, leite e ice tea.

Para a validação da metodologia foram estudados a precisão, exatidão, justeza e linearidade. Para o estudo da precisão determinaram-se limites de repetibilidade abaixo dos 14% e limites de precisão intermédia inferiores a 10%. Para a exatidão foi utilizado um material de referência FAPAS e todos os ensaios realizados apresentaram um z-score inferior a 2. Quanto à justeza, efetuaram-se ensaios de recuperação cujos resultados se situaram entre 80% e 120%. Confirmou-se também que existe linearidade entre 2 e 100 mg/l. Após a análise destes resultados concluiu-se que o método cumpre com os requisitos necessários de precisão e de exatidão.

Paralelamente foi também efetuado um estudo sobre os efeitos da refrigeração ao longo do tempo, na leitura dos padrões analíticos, e concluiu-se que para a sacarina e aspartame existe estabilidade das soluções, enquanto que para o acesulfame o mesmo estudo foi inconclusivo.

Palavras-chave: Segurança Alimentar, Adoçantes, Implementação de método de análise, Validação de método de análise, HPLC

Abstract

This work was developed at Silliker Portugal, S.A with the objective of implementing and validating a new method for the determination of acesulfame K, aspartame and saccharin, in multiple matrices using HPLC-UV. For the study, several matrices were evaluated: wine, gelatin, powdered and liquid stevia sweetener, energy bar, yogurt, milk and iced tea.

To validate the methodology, precision, accuracy, fairness, and linearity were studied. For the precision study, repeatability limits of less than 14% and intermediate precision limits of less than 10% were determined. For accuracy, a FAPAS reference material was used, and all assays performed presented a z-score below 2. For fairness, recovery tests were performed, with results ranging from 80 % to 120%. Linearity was also observed between 2 and 100 mg/L. After analyzing these results, it was concluded that the method meets the necessary precision and accuracy requirements.

At the same time, a study was also carried out on the effects of refrigeration over time, on the reading of analytical standards, and it was concluded that for saccharin and aspartame there is stability in the solutions, while for acesulfame the same study was inconclusive.

Keywords: Food Safety, Sweeteners, Analysis Method Implementation, Analysis Method Validation, HPLC

Agradecimentos

A toda a equipa da Silliker Portugal, que me acolheu de braços abertos do primeiro ao último dia.

Ao Pedro Machado que me abriu as portas da Silliker e que me deu esta oportunidade de estágio.

À minha orientadora do Isep, Professora Maria Teresa Oliva Teles, pela disponibilidade para esclarecer todas as dúvidas, pelas palavras de incentivo que me fizeram superar o stress e ansiedade para conseguir terminar o meu trabalho e a acima de tudo por aturar-me.

À minha orientadora da Silliker, Laura Sousa, pela disponibilidade sempre que havia um problema, por ensinar-me todos os truques que se podiam fazer, por me acalmar sempre que punha a carroça à frente dos bois e pelos momentos em que ensinávamos um ou outro nos pequenos projetos à parte do tema de estágio.

À Joana Rangel que esteve encarregue de mim no laboratório e me ensinou a ser um engenheiro num laboratório, por me encorajar e ajudar a aprender sempre ao máximo com o maior número de métodos e formação possível, pela atenção e por me ouvir quando me sentia mal ou quando as coisas não corriam bem.

Aos meus colegas de laboratório: Jeff, Isabel, Olga, Raul, Debora, Inês, Andreia e Priscilla por me acolherem e deixarem-me fazer parte daquele que era o vosso mundo, pela boa disposição, pelos sorrisos, pelas brincadeiras. Não posso esquecer quem me ajudou e forneceu as minhas ferramentas para o tratamento estatístico do trabalho, Rita, muito obrigado.

À minha família, que amo mais que tudo, que me conhecem melhor que ninguém, por terem feito de mim aquilo que sou hoje, por me mostrarem que existe sempre forma de seguir em frente. Ao meu pai que mesmo sempre cansado dava sempre o ouvido para tudo o que tivesse a dizer. À minha mãe, que embora andemos às cabeçadas de vezes em quando, não existe ninguém que se preocupe mais e esteja sempre disposta a ajudar no que pode. À minha irmãzinha, a minha mini (17 anos na altura em que escrevo isto, mas vai ser mini até eu morrer), que embora ela não entendesse nada do que eu dizia sobre o meu trabalho, ouvia-me, desde que eu ouvisse o que era dela, mas irmãos são assim.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Introdução da empresa	1
1.2. Objetivo do estágio	2
1.3. Organização do relatório de estágio	2
2. Estado de arte	3
2.1. Indústria de produtos alimentares. O controlo de qualidade	3
2.2. Adoçantes	5
2.2.1. Adoçantes artificiais	5
2.3. Determinação de adoçantes	10
2.4. Validação de um método analítico	11
2.4.1. Avaliação indireta	12
2.4.2. Avaliação direta	17
3. Parte Experimental	21
3.1. Materiais e Reagentes	21
3.2. Amostras	21
3.3. Material de referência	22
3.4. Preparação de soluções	22
3.5. Análise cromatográfica	23
4. Resultados e discussão	25
4.1. Estudo da linearidade	25
4.2. Resultados de ensaios	27
4.3. Justeza	35
4.4. Teste de repetibilidade	38
4.5. Teste de precisão intermédia	40
4.6. Análise da Exatidão	41
4.7. Teste de alteração de sensibilidade após refrigeração	42
5. Conclusões	47
6. Referências Bibliográficas	49
Anexos	51
Anexo A: Declaração de Integridade	51
Anexo B: Dados experimentais obtidos não apresentados	51
Anexo C: Exemplos de cálculo para os valores apresentados no corpo principal do trabalho	69

Lista de Figuras

Figura 1.1: Instalações da Silliker Portugal S.A. em 2025.....	1
Figura 2.1: Estrutura da Sacarina.....	6
Figura 2.2: Estrutura do Ciclamato de sódio.....	7
Figura 2.3: Estrutura do Aspartame.....	8
Figura 2.4: Estrutura do Acessulfame K.....	9
Figura 2.5: Estrutura da Sucralose.....	10
Figura 4.1: Exemplo de uma calibração curvilínea (reta 6 do aspartame).....	26
Figura 4.2: Exemplo de uma calibração linear (reta 7 do aspartame).....	27
Figura 4.3: Exemplo de um cromatograma de padrão de calibração de 50 mg/l.....	28
Figura 4.4: Exemplo de um cromatograma de um ensaio de vinho.....	29
Figura 4.5: Exemplo de um cromatograma de um ensaio do material de referência.....	29
Figura 4.6: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao ice tea.....	30
Figura 4.7: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao leite.....	30
Figura 4.8: Exemplo de um cromatograma de um ensaio à barra energética.....	31
Figura 4.9: Exemplo de um cromatograma de um ensaio à gelatina.....	31
Figura 4.10: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao adoçante em pó.....	32
Figura 4.11: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao adoçante líquido.....	32
Figura 4.12: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao iogurte.....	33
Figura 4.13: Exemplo de um cromatograma de uma análise ao vinho branco.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Quantidades das tomas iniciais das amostras, Volume final, Volume de solução fortificante usada e método de preparação usado.....	23
Tabela 4.1: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação para as retas de calibração do acessulfame.....	25
Tabela 4.2: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação para as retas de calibração do aspartame.....	25
Tabela 4.3: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação para as retas de calibração da sacarina.....	26
Tabela 4.4: Resultados obtidos em mg/L para Acessulfame K, para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra).....	33
Tabela 4.5: Resultados obtidos em mg/L para Aspartame para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra).....	34
Tabela 4.6: Resultados obtidos em mg/L para Sacarina para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra).....	34
Tabela 4.7: Números de duplicados para todas as matrizes e material de referência para o composto Acessulfame K, Aspartame e Sacarina.....	35
Tabela 4.8: Taxas de recuperação % das matrizes e taxas de recuperação médias para o acessulfame K, aspartame e sacarina do estudo da repetibilidade.....	36
Tabela 4.9: Taxas de recuperação médias para os ensaios de precisão intermédia e Taxas de recuperação médias para os adoçantes.....	38
Tabela 4.10: Coeficiente de variação relativo % e o limite de repetibilidade relativos % para cada matriz em cada adoçante e o seu valor médio para cada adoçante.....	39
Tabela 4.11: Desvio padrão da precisão intermédia relativa % e o limite da precisão intermédia relativa % para cada matriz em cada adoçante e média destes parâmetros para cada um dos adoçantes.....	40
Tabela 4.12: Valores de coeficiente de variação relativo % e limite de repetibilidade relativo % para cada adoçante no material de referência.....	41
Tabela 4.13: coeficiente de variação relativo % médio e o limite da precisão intermédia relativa % para cada adoçante do material de referência.....	41
Tabela 4.14: Z-score do teste de repetibilidade e Z-score médio do teste de precisão intermédia para cada adoçante do material de referência.....	42

Tabela 4.15: Valores das retas de calibração das sequências A1 e A2, variação e a variação relativa % entre as áreas para cada adoçante.....	43
Tabela 4.16: Valores das retas de calibração das sequências B1 e B2, variação e a variação relativa % entre as áreas para cada adoçante.....	44
Tabela 4.17: Constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências A1 e A2, variação e a variação relativa entre as constantes para cada um dos adoçantes.....	45
Tabela 4.18 Constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências B1 e B2, variação e a variação relativa entre as constantes para cada um dos adoçantes.....	45
Tabela B.1: Data de efetuação do ensaio, Tipo de matriz do ensaio, Massa ou volume medido, Área e concentração de cada ensaio para cada adoçante.....	52
Tabela B.2: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR%, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio do acessulfame.....	59
Tabela B.3: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR%, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio do aspartame.....	61
Tabela B.4: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR%, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio da sacarina.....	63
Tabela B.5: Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, para os ensaios do teste de recuperação para cada adoçante.....	65
Tabela B.6: Data de efetuação do ensaio, Área e concentração de cada ensaio para cada adoçante nos ensaios ao material de referência FAPAS T03190QC.....	66
Tabela B.7: Média dos ensaios em duplicado, e desvio padrão da precisão intermédia para cada matriz e adoçante.....	67
Tabela B.8: Média dos ensaios em duplicado, e desvio padrão da precisão intermédia para o material de referência para cada adoçante.....	67
Tabela B.9: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorbâncias usadas para construção das retas de calibração do acessulfame.....	68

Tabela B.10: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorvâncias usadas para construção das retas de calibração do aspartame.....	69
Tabela B.11: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorvâncias usadas para construção das retas de calibração da sacarina.....	69

Acrónimos, Siglas e Símbolos

Lista de Acrónimos, Siglas e Símbolos

Aces	Acessulfame K
Asp	Aspartame
C.	Concentração
Cf	Concentração final
Ci	Concentração inicial da solução fortificante
CVRM	Coefficiente de Variação Relativo médio
DAD	Detetor Espectrofotométrico de Arranjo Linear de Díodos, do inglês - <i>Diode array Detector</i>
EUA	Estados Unidos da América, do inglês - <i>United States of America</i>
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês - <i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês - <i>High-performance Liquid chromatography</i>
ISO	Organização internacional de normalização, do inglês - <i>International Organization for Standardization</i>
JECFA	Comitê Conjunto de Peritos da Organização para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial da Saúde sobre Aditivos Alimentares, do inglês - <i>Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives</i>
L.D.	Limite de Detecção
L.Q.	Limite de Quantificação
LPIR	Limite da precisão intermédia relativo
LAB	Laboratório de controlo de qualidade alimentar
Mi	Massa inicial
MIA	Laboratório de Métodos instrumentais de análise

MS	Espetrómetro de massa
NCI	Instituto nacional de cancro, do inglês - <i>Nacional Cancer Institute</i>
NP	Norma Portuguesas
OMS	Organização Mundial de Saúde, do inglês - <i>World Health Organization</i>
RID	Detetor de índice de refração, do inglês - <i>refraction index detector</i>
Sac	Sacarina
UV	Ultravisível
Vf	Volume final
Vi	Volume de solução fortificante usada
VIS	Vísível

1. Introdução

Este estágio curricular foi desenvolvido no âmbito da disciplina Dissertação/Estágio do Mestrado em Engenharia Química, na área da qualidade, decorreu entre 13 de março e 17 de junho de 2025, e foi realizado na empresa Silliker Portugal, S.A. passa-se agora à apresentação da empresa e da sua história.

1.1. Introdução da empresa

A Silliker Portugal, S.A. é uma empresa independente de prestação de serviços que se encontra intimamente ligada aos vários ramos do setor agroalimentar. Ela surge em julho de 1992 em Vila Nova de Gaia com a empresa EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., como resposta às necessidades do mercado no setor agroalimentar. Em 1993 é integrada no Sistema Português da Qualidade através da acreditação ISO/IEC 17025 do seu laboratório.

Como consequência do seu forte crescimento, em março de 2005 a EGI passou a dispor de novas instalações (Fig.1.1), estruturadas numa perspetiva de desenvolvimento futuro, projetadas de raiz para albergar os seus laboratórios e todos os serviços.

Em março 2008, a multinacional norte-americana Silliker adquire a empresa, dando origem à Silliker Portugal, S.A. passando a integrar um dos maiores grupos mundiais de prestação de serviços da área da qualidade e segurança alimentar.

Em 2014 o Instituto Mérieux, adquiriu o grupo Silliker, o qual passou a denominar-se Mérieux NutriSciences, contando atualmente com mais de uma centena de laboratórios acreditados distribuídos pelos 5 continentes.



Figura 1.1: Instalações da Silliker Portugal S.A. em 2025

Em termos de dimensão, a Silliker Portugal tem mais de 100 colaboradores e é um dos maiores laboratórios na sua área de atuação em Portugal, procurando sempre ir de encontro às necessidades do mercado e do consumidor para além das componentes de sustentabilidade, bem-estar de trabalho/pessoal. O compromisso do grupo: “Better Food, Better Health, Better World!” mantém-se sempre em primeiro plano, na prestação dos seus serviços e no ambiente de trabalho no interior da empresa.

Em termos laboratoriais a Silliker Portugal S.A. está subdividida em 3 laboratórios, designados por Físico-química, Microbiologia e Métodos Instrumental Analíticos (MIA). Nestes laboratórios são realizados diariamente multitudes de testes para determinações de conteúdos nutricionais, a contaminantes como *E.Coli*, metais pesados e toxinas. Os métodos aplicados são realizados de conforme os métodos oficiais das normas portuguesas (NP) ou adaptados das normas publicadas por entidades como a Organização internacional de normalização (ISO). Adicionalmente o laboratório realiza ensaios segundo métodos desenvolvidos e validados internamente.

1.2. Objetivo do estágio

O objetivo do estágio foi a implementação de um método para a determinação simultânea do acesulfame de potássio, sacarina e aspartame em matrizes alimentares, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês HPLC) e deteção por espectrometria do ultravioleta (UV). Pretendeu-se estudar os seguintes parâmetros estatísticos e de validação: linearidade das retas de calibração, gama de trabalho, repetibilidade, precisão intermédia e exatidão.

1.3. Organização do relatório de estágio

O relatório de estágio está dividida em vários capítulos, sendo eles:

O capítulo 2, o estado de arte, onde se expõe todo o conteúdo teórico necessário para a compreensão do trabalho. O capítulo 3, a parte experimental, onde se exemplifica as preparação das soluções utilizadas e o procedimento que se seguiu para a preparação da sequência no equipamento. O capítulo 4, os resultados e discussão, onde são apresentados os resultados obtidos e a avaliação dos mesmos. O capítulo 5, as conclusões, onde se demonstram as conclusões principais do trabalho. O capítulo 6, referencias bibliográficas, onde apresentam todas as fontes utilizadas no trabalho. Por fim os Anexos A, B e C onde se encontra a declaração de integridade e todos os dados obtidos, mas não apresentados no corpo do trabalho, assim como os exemplos de cálculo para obtenção dos resultados, respetivamente.

2. Estado de arte

2.1. Indústria de produtos alimentares. O controlo de qualidade

Os produtos alimentares são considerados como substâncias processadas, semiprocessadas ou no estado natural que se possam consumir. Também estão incluídas bebidas, pastilha elástica e as restantes substâncias utilizadas na sua elaboração, preparo ou tratamento (GVS, 2020). Todos os produtos mencionados, de uma forma ou outra, têm de passar por um controlo de qualidade para assegurar um certo nível de segurança e qualidade. Adicionalmente devido a: constantes mudanças de estilo de vida, diferentes hábitos alimentares, incremento de trocas comerciais, crescente produção em massa dos bens alimentares e a procura dos alimentos sazonais, a indústria alimentar, tornou-se cada vez mais sensível à qualidade e segurança dos alimentos produzidos.

Nas últimas duas décadas a Qualidade tornou-se um termo comum no nosso dia a dia. Alude-se a “qualidade” em termos de um produto, serviço, ensino, vida, etc. Os consumidores, tornaram-se cada vez mais sensíveis e mais exigentes o que tem levado a um aumento controlo da qualidade nos produtos e serviços, mas a “Qualidade” é um conceito subjetivo onde uma característica comum pode ser salientada: não existe nenhuma medida única (unidade de medida) para comparar produtos, serviços ou pessoas entre si.

Reconhecendo que o conceito de qualidade é uma componente subjetiva, por vezes difícil de medir com precisão, do ponto de vista do controlo de qualidade, a qualidade tem de ser objetivada e quantificada de forma a ser mensurável. O processo de gestão da qualidade, deve começar por definir ou especificar o âmbito em três vertentes fundamentais: Conceção, Fabrico ou Prestação de Serviço e Uso (Pires, 2007).

A qualidade de conceção deve ser a medida em que o projeto incorpora as necessidades e expectativas do consumidor, quer em termos funcionais ou técnicos. A qualidade de fabrico ou prestação de serviço deve ser a medida em que o produto ou serviço esteja de acordo com especificações pré-definidas, sejam elas internas ou legais. A qualidade de uso deve ser a medida em que o produto desempenha as tarefas ou preste os serviços que o consumidor espera dele.

Numa abordagem global, garantir a qualidade corresponde à cultura onde todos os intervenientes empenham-se para conseguir, através da excelência no seu trabalho, a obtenção de melhores resultados. Portanto, empresas que procuram manter-se relevantes no mercado, especialmente no ramo alimentar, devem ter como uma das suas prioridades o controlo de qualidade dos seus produtos, uma vez que este é de extrema importância para garantir a segurança dos consumidores.

Devido à importância de fornecer alimentos com a segurança necessária, as empresas

de produtos alimentares procuram uma entidade que realize análises precisas e seguras dos seus produtos, a fim de auxiliar na melhoria da qualidade dos produtos. Para conseguir tudo isto, as empresas recorrem aos laboratórios de controlo de qualidade alimentar (LABs) para assegurar a qualidade e a segurança dos alimentos, prevenindo situações nefastas à saúde pública e aos direitos do consumidor.

Nos LABs é efetuado o controlo de qualidade analítico, definido como um conjunto de atividades, técnicas e de procedimentos, cujo objetivo é garantir que todos os requisitos de qualidade sejam cumpridos, de forma a garantir que os resultados das análises laboratoriais sejam adequados e de confiança, levando à satisfação dos clientes (ASEA, 2017).

Uma das características mais desejáveis num LAB é a variedade e idealidade de serviços oferecidos. O LAB de forma a ser competitivo no mercado e conseguir satisfazer: as necessidades legais e individuais das várias empresas do ramo alimentar, deve disponibilizar não só análises microbiológicas (presença de *Coliformes* a 35 °C e 45 °C, *Salmonella spp.*, etc.), como também físico-químicas (proteína, gordura, cálcio, humidade, entre outras).

Além desses aspetos, o LAB deve possuir infraestrutura e tecnologia capazes de realizar a análise dos produtos com a precisão e exatidão e no tempo necessários para atendimento dos seus clientes. Estas características tornam um LAB adequado para atender as diversas empresas no ramo alimentar (GMO, 2000).

De forma geral o controlo de qualidade alimentar num LAB envolve 3 vertentes: análises físico-químicas, análises microbiológicas e análise sensorial.

As análises físico-químicas permitem a determinação das características nutricionais de um produto, uma característica que se torna cada vez mais relevante com o passar dos anos, devido aos consumidores tornarem-se cada vez mais cautelosos sobre o que entra na sua dieta. Determinando com detalhe as características de cada produto, possibilita-se uma vantagem em termos de marketing para as empresas de produtos mais saudáveis, garantindo que o consumidor consegue obter a sua dieta ideal ou, pelo menos, estar mais ciente dos efeitos da sua dieta no seu corpo. As análises físico-químicas também permitem detetar um variado número de contaminantes como fertilizantes, antibióticos, metais pesados e inseticidas e aditivos com cafeína, taurina e adoçantes artificiais e naturais. Através destas análises é possível prevenir danos à saúde pública. Com sucessivas análises aos locais de origem dos produtos também torna-se possível detetar fontes de contaminação, tais como despejos ilegais em fontes de irrigação, escoamento de água de minas e uso excessivo de fertilizantes e inseticidas em certos campos.

As análises microbiológicas são igualmente importantes, visto que os alimentos possuem uma população variada de microrganismos, que podem ser introduzidos na cadeia produtiva dos alimentos em diferentes etapas do processo, ou simplesmente fazerem parte da sua microflora natural.

Atualmente, o controlo sensorial é um instrumento essencial para o controlo de toda a produção da indústria alimentar. Se um produto não for apelativo em aparência e sabor, não irá vender da forma desejada. Assim, apesar das análises físico-químicas e microbiológicas serem importantes para a proteção da saúde pública, é essencial o controlo sensorial. A análise sensorial, utilizando os sentidos como ferramenta de trabalho, atribui uma importância significativa ao conceito de qualidade alimentar, trabalhando para que o resultado seja sempre a obtenção de produtos alimentares agradáveis ao seu consumidor, ou seja, que satisfaçam as suas necessidades (Carmo, 2018).

2.2. Adoçantes

Açúcares e alimentos doces sempre estiveram na dieta do ser humano, sendo o mel provavelmente o mais antigo adoçante, utilizado pelos antigos egípcios, por volta de 2100 A.C. Apenas no século XVIII, com os avanços em tecnologia, a sacarose, extraída da cana-de-açúcar e da beterraba, passou a ser o principal agente adoçante utilizado. Atualmente, com a maior disponibilidade e preços mais acessíveis, o consumo de açúcar tem passado os valores recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que contribui para um aumento de casos de obesidade, diabetes, problemas dentários, e outros problemas de saúde. Neste contexto, houve o surgimento dos adoçantes não nutritivos, capazes de adoçar sem contribuir com calorias e aumento da taxa glicémica no organismo (Carvalhais Noronha, 2019).

Os adoçantes existentes no mercado são muito utilizados pela indústria alimentar, uma vez que o poder adoçante destes aditivos chega a ser centenas de vezes maiores que o da sacarose, necessitando de quantidades mínimas para se ter uma doçura equivalente a níveis elevados de açúcar. Além disso, não são ou são pouco metabolizados pelo organismo humano, de forma que a contribuição energética destes produtos é praticamente nula (Carvalhais Noronha, 2019).

Os adoçantes foram regulados pela primeira vez a nível europeu na década de 1990 com a entrada em vigor da Diretiva 94/35/CE do Parlamento Europeu e do Conselho relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentícios, também conhecida como “Diretiva dos Edulcorantes”. Mais recentemente, estas entidades adotaram um regulamento quadro, o Regulamento (CE) n.º 1333/2008, para consolidar todas as autorizações atuais para os aditivos alimentares, incluindo os edulcorantes num único texto legal (ISA 1999).

Com este uso crescente de adoçantes artificiais, não só em alimentos processados, mas também na forma de adoçante de mesa, métodos eficazes para o controlo de qualidade dos produtos que os contêm têm de ser desenvolvidos.

2.2.1. Adoçantes artificiais

Adoçantes artificiais são aditivos alimentares encontrados numa grande variedade de alimentos e bebidas comercializados como: doces, pães, sumos, gelados, geleias, pastilhas-elásticas, refrigerantes, produtos lácteos e dezenas de outros alimentos e bebidas. Dos

adoçantes artificiais existentes, os mais consumidos são: a sacarina, o ciclamato de sódio, o aspartame, o acesulfame de potássio e a sucralose (Ribeiro, T. R. *et al.*, 2020).

Sacarina

O primeiro adoçante artificial descoberto foi a sacarina (fig. 2.1). A sua descoberta ocorreu em 1879, enquanto o químico russo Constantin Fahlberg e o químico estadunidense Ira Remsen estudavam os mecanismos de oxidação da substância o-toluenosulfonamida, no laboratório da Universidade Johns Hopkins. Num certo dia, uma substância sujou-lhe acidentalmente o dedo, ao provar, ele constatou que ela tinha sabor doce. Baseado nas suas observações e no seu conhecimento das pesquisas realizadas, o cientista constatou a existência de sacarina. Apresentando o nome químico 1,1-dioxo-1,2-benzotiazol-3-ona, a substância sacarina é um derivado sulfonamídico do tolueno (Ribeiro, T. R. *et al.*, 2020).

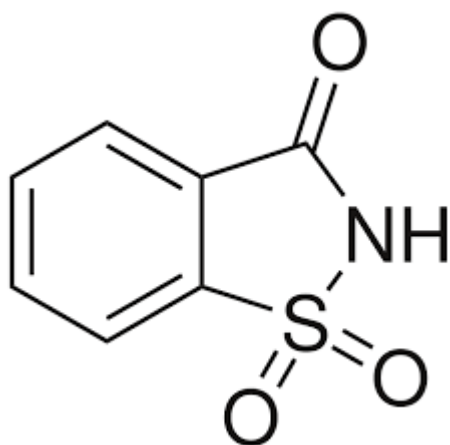


Figura 2.1: Estrutura da Sacarina (Contribuidores da Wikipédia, 2022b)

A sacarina é 300 vezes mais doce que a sacarose e apresenta 0 kcal, considerando a ingestão de 16 mg da substância. Ela não é absorvida ou metabolizada no trato gastrointestinal, sendo excretada pelos rins, o que não afeta os níveis de insulina no sangue. No entanto, por volta da década de 60, estudos envolvendo ratos levaram a crer que este composto, em altas concentrações, poderia estar a induzir cancro da bexiga nos animais. Estes resultados levaram o Canadá, em 1970, a limitar o seu uso apenas como adoçante de mesa e, em 1981, os Estados Unidos da América (EUA) obrigaram as empresas a colocar nos rótulos dos produtos que continham sacarina uma advertência ao fato do composto ser um possível carcinogénico. Posteriormente, foi mostrado que o mecanismo de desenvolvimento deste tipo de cancro em roedores, envolvendo a sacarina, não pode ser aplicado aos humanos, partindo da ideia de que as características morfofisiológicas das espécies são diferentes, o que fez com que a molécula deixasse de ser considerada cancerígena (Carvalhais Noronha, 2019).

A sacarina foi avaliada pelas autoridades de segurança independentes do *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) (1993) e pelo Comité Científico de Alimentos (SCF) da Comissão Europeia (1995) – atualmente Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA). Atualmente a ingestão diária aceitável estabelecida tanto pelo JECFA quanto pelo SCF é de 5 mg/kg de peso corporal (ISA 1999).

Ciclamato de sódio

Em 1937, na Universidade de Illinois, Michael Svaeda trabalhava na síntese de medicamentos com atividade antitérmica. Enquanto executava o procedimento, o pesquisador fumava um cigarro e pousou-o por um instante. Ao entrar em contacto com o cigarro novamente, ele descobriu o sabor doce do ciclamato (Fig. 2.2). Ao realizar essa incrível descoberta, Svaeda acabou por patentear o produto químico para uso como adoçante.

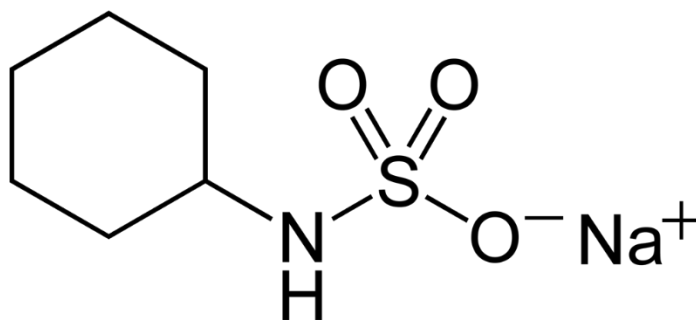


Figura 2.2: Estrutura do Ciclamato de sódio (Contribuidores da Wikipédia, 2007).

O uso do ciclamato em produtos alimentares começou em 1950, porém receosos de que um possível produto metabólico, a ciclohexilamina, pudesse ser um possível indutor de cancro de bexiga, a *Food and Drug Administration* (FDA) banuiu o uso nos EUA no início dos anos 70, após alguns trabalhos realizados com ratos. Estudos posteriores com humanos mostraram, no entanto, que poucos indivíduos são capazes de metabolizar o ciclamato, e que não foi observado o potencial carcinogénico apresentado em animais. Foi então revogada a suspensão pelo FDA nos EUA, e seu uso já é aprovado em mais de 50 países.

O ciclamato foi avaliado por especialistas científicos do JECFA (1982) e pelo SCF da Comissão Europeia (2000) – atualmente EFSA. Atualmente a ingestão diária aceitável para o ciclamato é 11 mg/kg de peso corporal pelo JECFA e 7 mg/kg de peso corporal pelo SCF (ISA 1999).

Aspartame

O adoçante aspartame (Fig. 2.3) foi descoberto em 1965. A sua descoberta ocorreu acidentalmente pelo químico Jim Schlatter, da empresa farmacêutica G.D. Searle, que pesquisava novas alternativas para o tratamento da úlcera gástrica, baseando-se na síntese de quatro aminoácidos diferentes, incluindo a fenilalanina e o aspartato. Enquanto Schlatter aquecia a mistura num frasco, algumas gotas saltaram-lhe para o dedo e, ao provar, ele constatou que ela tinha sabor doce. Primeiramente, pensou que se tratava de um pouco de açúcar do pequeno-almoço. No entanto, as suas mãos estavam limpas quando entrou no laboratório e então, o cientista concluiu que o sabor só poderia ser proveniente do frasco utilizado na experiência.

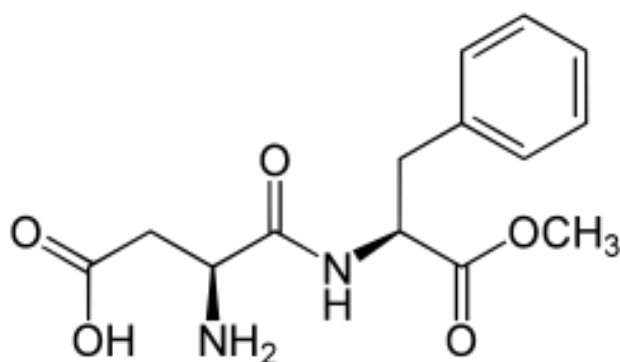


Figura 2.3: Estrutura do Aspartame (Contribuidores da Wikipédia, 2022a)

Como as substâncias não eram consideradas tóxicas, ele provou a mistura e reconheceu o sabor doce que era o mesmo que havia sentido nas suas mãos. Schlatter iniciou os seus estudos e finalmente descobriu que a substância se tratava do aspartame. O aspartame, denominado quimicamente como o éster 1-metílico da N-(L- α -aspartil)-fenilalanina (Ribeiro, T. R. et al., 2020).

Semelhante ao ciclamato e a sacarina, o aspartame foi alvo de estudos para verificar uma possível atividade carcinogénica. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que esse edulcorante não estava relacionado ao aparecimento de tumores. Contudo, estudos posteriores, mostraram alterações no comportamento dos animais quando foram administradas doses diárias normais de aspartame. Em outros estudos, foram já também observados efeitos adversos como danos em nervos, nefrotoxicidade em fetos, diabetes tipo 2, entre outros, todos também em modelos animais (ratos) (Carvalhais Noronha, 2019).

O que se sabe ao certo sobre as consequências da ingestão desse edulcorante está relacionado aos seus metabólitos. O aspartame é um metil éster formado por dois aminoácidos, o ácido aspártico e a fenilalanina. Uma pequena percentagem da população não consegue metabolizar este último aminoácido, devido a uma condição genética denominada fenilcetonúria. Portanto, estes indivíduos não devem consumir produtos que contenham este adoçante, o que obrigou as empresas alimentares a adicionarem um aviso no rótulo de alimentos quando esse estiver presente.

Em 2023, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) reveriu o aspartame e, citando "evidências limitadas" de carcinogenicidade em humanos, classificou-o como possivelmente carcinogénico para humanos (Grupo 2B). As conclusões da IARC foram examinadas pelo JECFA na sua avaliação do aspartame em 2023, mas o JECFA não encontrou nenhuma preocupação para a saúde humana.

O aspartame foi avaliado por especialistas independentes do JECFA (2023) e pela EFSA da união Europeia em dezembro de 2013. Atualmente considera-se, por ambas entidades, a ingestão diária aceitável para o aspartame 40 mg/kg de peso corporal (ISA 1999).

Acessulfame de potássio

O acessulfame de potássio ou acessulfame K (Fig. 2.4) foi descoberto em 1967 por Karl Clauss e H. Jensen, na indústria química alemã Hoechst AG, em Frankfurt. O objetivo dos investigadores era produzir um novo composto com um novo sistema de anéis aromáticos. Para

tal, eles fizeram reagir isocianato-2-butenos com ácido 4-(fluorossulfonil) benzoico e o composto formado foi acidentalmente derramado no dedo de Clauss. Ele então provou a substância, verificando a presença de um sabor doce. Conseqüentemente, ele iniciou os seus estudos e descobriu que a substância se tratava do acessulfame-K com o nome químico 6-metil-1,2,3-oxatiazina-4(3H)-ona-2,2,dióxido.

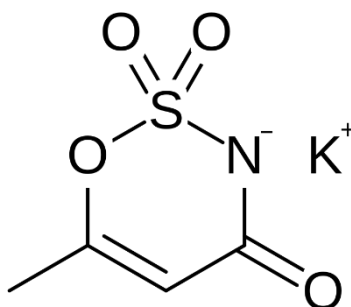


Figura 2.4: Estrutura do Acessulfame K (Contribuidores da Wikipédia, 2006)

Em 2009 o National Cancer Institute (NCI) dos EUA fez uma declaração afirmando que o acessulfame-K não apresenta genotoxicidade. Mesmo este edulcorante sendo eliminado praticamente inalterado, algumas quebras podem ocorrer, tendo como um possível produto a acetoamida, tóxica para o ser humano em altas concentrações. Contudo, as quantidades de acessulfame normalmente ingeridas são muito pequenas, portanto o risco é negligenciável.

O acessulfame-K foi avaliado por diversos organismos independentes, incluindo o SCF da Comissão Europeia – atualmente EFSA em 2000, e o pela JECFA em 1990. Atualmente a ingestão diária aceitável para o acessulfame-K é de 9 mg/kg de peso corporal segundo o SCF e 15 mg/kg de peso corporal pelo JECFA (ISA 1999).

Sucralose

Em 1976, a sucralose (Fig. 2.5) foi descoberta por cientistas da Tale & Lyle em colaboração com investigadores do Queen Elizabeth College, na Universidade de Londres. Com o intuito de se utilizar a sacarose na produção de intermediários químicos, bem como de se aplicar os seus derivados sintéticos industrialmente. Ao testar as substâncias, os investigadores observaram que a cloração da sacarose promoveu aumento na intensidade da doçura, sem comprometer a qualidade do sabor.

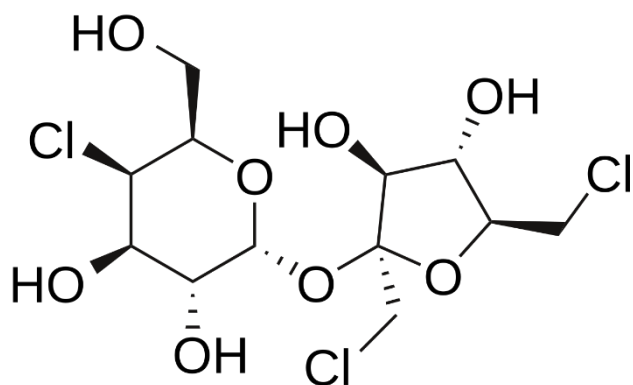


Figura 2.5: Estrutura da Sucralose (Contribuidores da Wikipédia, 2010)

A sucralose, também conhecida como 4,1,6-triclorosucralose, é um dissacarídeo substituído e estudos toxicológicos, tanto em animais como em humanos, não foram encontrados efeitos genotóxicos ou cancerígenos causados pela sucralose, ou possíveis produtos metabólicos, no organismo. Também não se associou nenhum outro dano colateral relacionado ao uso deste aditivo.

Mesmo sendo derivada da sacarose, a sucralose não provoca um aumento da taxa glicêmica no organismo, sendo cerca de 85% excretada intacta nas fezes, enquanto os outros 15% absorvidos sofrem pequenas reações no organismo, sendo eliminados, posteriormente, na urina.

A sucralose foi avaliada por especialistas independentes da JECFA em 1990 e pela SCF da Comissão Europeia em 2000 – atualmente a EFSA. Atualmente considera-se que a ingestão diária aceitável para a sucralose estabelecida por ambas organizações é de 15 mg/kg de peso corporal (ISA 1999).

Dos 5 adoçante apresentados, 3 deles são alvo de estudo neste trabalho, sendo eles o acessulfame K, aspartame e sacarina.

2.3. Determinação de adoçantes

O consumidor tem à sua disposição uma enorme variedade de alimentos contendo adoçantes artificiais, além de bebidas e suplementos alimentares. As diferenças físico-químicas, eletroquímicas e espectrais dos edulcorantes são significativas, e com isso a determinação simultânea dessas substâncias encontra-se limitada pela capacidade dos métodos mais usuais em separação e detecção.

Os adoçantes artificiais também apresentam poder adoçante intensos e, por isso, encontram-se com baixas concentrações nos alimentos. Portanto, a sensibilidade do método precisa ser alta. Neste contexto, a técnica de HPLC destaca-se devido à sensibilidade, precisão e fácil preparação da amostra.

Um equipamento de HPLC é constituído por diversos componentes, muitas vezes distribuídos por módulos. Inicialmente tem-se o reservatório de eluentes, onde são colocados os solventes ou soluções que servem de fase móvel. Os eluentes são bombeados por uma

bomba capaz de manter um fluxo contínuo, usualmente entre 0,1 e 10 ml/min e em trabalho simultâneo com a bomba, tem-se o injetor onde se faz a introdução da amostra na fase móvel.

Seguidamente, a fase móvel e a amostra são bombeadas para a coluna cromatográfica responsável pela separação dos compostos e por vezes, uma pré-coluna, significativamente mais curta, é colocada imediatamente antes da coluna analítica. A pré-coluna possui a mesma fase estacionária da coluna de forma a protegê-la de eventuais impurezas que a possam entupir ou interagir irreversivelmente. Tradicionalmente as colunas são empacotadas com partículas esféricas porosas de sílica, com 3–10 µm de diâmetro, onde as partículas servem como suporte à fase estacionária, que está habitualmente ligada covalentemente. As propriedades da fase estacionária dependem do grupo funcional ligado à sílica: se for um grupo funcional polar, então a fase estacionária torna-se polar.

Por fim, após os compostos serem separados, eles passam pelo detetor que produz um sinal de absorvância em função do tempo. Existem vários tipos de detetor que atuam de diferentes formas, desde espectrofotômetros de ultravioleta e/ou visível até espectrofotômetros de arranjo linear de díodos (do inglês - *Diode array Detector* (DAD) utilizado neste trabalho (Rodrigues Lopes, P. F 2022).

2.4. Validação de um método analítico

Uma vez que se pretende implementar um novo método, um dos objetivos deste trabalho é a validação do método. A validação de um método analítico é para garantir que as medições futuras em análises de rotina são próximas o suficiente dos verdadeiros valores dos analitos nas amostras (González, 2007).

Dos métodos que podem ser validados, destacam-se os métodos normalizados e os internos. Os métodos normalizados, como o nome sugere, seguem as diretrizes estabelecidas por uma norma. Já os métodos internos são aqueles que originam de um método normalizado, aceite nacional ou internacionalmente, mas apresentam modificações relativamente à versão normalizada, não sendo seguidos de forma integral (Relacre, 2000).

Sempre que uma empresa pretenda implementar um novo método, seja ele interno ou normalizado, é necessária uma validação do método para um vasto espectro de matrizes, de forma a conseguir elaborar um relatório de validação do método e perceber se este está apto a ser utilizado para o fim pretendido (Relacre, 2000). Os parâmetros mínimos que devem ser estudados aquando da validação de métodos analíticos são:

- Gama de trabalho e/ou linearidade;
- Limiares analíticos (deteção e quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;
- Exatidão.

2.4.1. Avaliação indireta

Este tipo de validação é efetuada por determinação e evidência dos seus parâmetros característicos.

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

Um método é considerado específico quando é possível discriminar o analito das restantes substâncias presentes na amostra, ou seja, quando o sinal ou grandeza medida é garantidamente proveniente apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa (multi componente) (Relacre, 2000).

No intuito de avaliar as interferências de outras substâncias na amostra deve ser realizado um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.

Um método analítico pode ser considerado aplicável quando, na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação se encontram num intervalo de 80% a 120% de recuperação.

Quantificação

Outro componente importante para a avaliação indireta é a quantificação dos componentes em estudo. Para interpretar as informações veiculadas pelos estudos e ensaios efetuados, o analista apoia-se no cálculo de vários parâmetros, entre os quais se destacam, as curvas de calibração, os Limiares analíticos do método de ensaio e Sensibilidade.

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida por outras palavras uma reta de calibração.

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = a + bx \quad (2.1)$$

Em que a representa a ordenada na origem e b o declive da reta.

O cálculo do coeficiente de correlação, (r) pode ser usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração e geralmente, deve ter valor um superior a 0,995.

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações em que o método permite determinar de forma precisa e exata. Quando se utiliza uma metodologia que envolve traçar uma curva de calibração e seguindo com a norma ISO 8466-1 2021 “Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods”, são recomendados dez pontos de calibração. Não devendo ser usados menos de cinco, distribuídos de igual forma na gama de concentrações, nesta situação a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias.

A linearidade corresponde à capacidade da técnica de medição usada pelo método em obter resultados lineares e proporcionais à concentração do analito, numa determinada gama de trabalho. (Costa Santos, 2022).

Quando uma é feita reta de calibração feita torna-se necessário determinar os limiares analíticos do método de ensaio conhecidos como o Limite de Detecção (L.D.) e o Limite de quantificação (L.Q.)

O limite de detecção é considerado o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à quantidade mais pequena de analito que pode ser detetado numa amostra, mas não quantificado.

Uma leitura inferior ao limite de detecção não implica a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que a concentração do analito será inferior a um certo valor.

Para se obter o limite de detecção utilizar-se-á a seguinte equação:

$$L. D = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.2)$$

em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração obtido com o método dos mínimos quadrados.

- b é o declive da mesma.

O limite de quantificação corresponde ao menor valor de analito medido a partir do qual é possível a sua quantificação, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco).

Para se obter o limite de quantificação utilizar-se-á a seguinte equação:

$$L. Q = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.3)$$

em que:

- $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração obtido com o método dos mínimos quadrados.

- b é o declive da mesma.

O último para parâmetro relativo à quantificação é a sensibilidade que pode ser definida como o quociente entre a variação do valor lido (ΔL) e a variação da concentração (ΔC) correspondente aquela variação.

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (2.4)$$

Esta característica avalia a capacidade de um método ou equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito.

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta de calibração.

Precisão

Com a quantificação abordada passa-se a outro parâmetro importante para a avaliação indireta, a precisão.

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

Existem dois parâmetros para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade interlaboratorial.

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é; mesmo Laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo.

O limite de repetibilidade (r) é o valor do qual a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio se deve situar abaixo, com uma probabilidade específica de 95%, nas condições mencionadas acima.

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio Laboratório, efetuam-se uma série de medições ($n \geq 7$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método.

Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo:

$$r = 2,8 \times S_{ri} \quad (2.5)$$

sendo:

S_{ri} – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados;

Adicionalmente calcula-se o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), para cada nível de concentrações, dado pela seguinte equação:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \quad (2.6)$$

sendo:

S_{ri} – desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados;

\bar{x} – média dos resultados considerados

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como:

- diferentes laboratórios;
- diferentes operadores;
- diferentes equipamentos;
- e/ou épocas diferentes;

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor do qual a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio se deve situar abaixo, com uma probabilidade específica de 95%, nas condições mencionadas acima.

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas e com ou sem verificação da calibração.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se “n” medições sobre a amostra em condições pré-definidas. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outras gamas de concentração.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem alguns métodos para determinação e controlo deste parâmetro, nomeadamente via Cartas de Controlo de Amplitudes ou através da equação seguinte (Relacre, 2000):

$$Si_{() } = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (2.7)$$

Sendo:

$Si_{() }$ - desvio padrão de precisão intermédia (onde os símbolos relativos às condições intermédias de precisão podem aparecer entre parêntesis, Ex: $Si_{(T.O.)}$ significa tempo e Operadores diferentes);

t - número de amostras ensaiadas;

n - número ensaios efetuados por amostra;

j - número da amostra (que vai de 1 a t amostras);

k - número do resultado obtido para a amostra j (que vai de 1 a n);

y_{jk} – resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t;

\bar{y}_j – representa a média aritmética dos resultados da amostra j de 1 a t;

Com a equação 2.7 a determinação da precisão intermédia é feita através da recolha de t valores de “n” ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermédia é baseada na dispersão entre ensaios. É recomendado que o valor de “t(n-1)” seja, pelo menos, igual a 15 (Relacre, 2000).

Quando n = 2, esta última equação toma a forma:

$$S_{i_0} = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (2.8)$$

Sendo:

y_{j1} – primeiro resultado obtido para a amostra j ;

y_{j2} - segundo resultado obtido para a amostra j .

Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado, aumentando a confiança relativamente à sua precisão.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de YOUNDEN. Trata-se de um teste simples, que permite não só avaliar a robustez do método, como também seriar a influência de cada uma das variações nos resultados, indicando qual o tipo de influência (por excesso ou por defeito) de cada uma dessas variações.

Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios em replicado sobre uma amostra, realizados segundo um plano de controlo dos parâmetros cujos efeitos de flutuação pretendem-se quantificar, até um máximo de sete parâmetros, que possam influenciar o método. Assim, é avaliado o efeito de cada fator em estudo, poe meio de uma análise dos resultados experimentais (Relacre, 2000).

Neste trabalho não foi avaliada esta vertente.

2.4.2. Avaliação direta

Este tipo de avaliação visa essencialmente conhecer a exatidão dos métodos de ensaio. A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de uma metodologia são os seguintes:

- Materiais de Referência Certificados;
- Ensaio Interlaboratoriais;
- Testes comparativos.

Um Material de Referência Certificado (MRC) é, por definição, “um material de referência acompanhado duma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos” (IPQ, 2025).

Os MRC são utilizados para avaliar o desempenho do Laboratório. O valor obtido na análise de um MRC é comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e exatidão da análise. Se o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o Laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las.

Para a avaliação dos resultados obtidos da análise de um MRC existem alguns processos que podem ser utilizados:

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses (teste t);
- Facto de desempenho Z (“Z-score”);
- Erro normalizado.

Erro Relativo

Uma forma de avaliar a exatidão de um método de ensaio é através do cálculo do *erro relativo* (Er), expresso em percentagem (%). O **erro relativo** exprime a componente de erros sistemáticos. Cabe ao Laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo. Este é calculado pela expressão:

$$Er = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad (2.9)$$

em que:

X_{lab} - valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v - valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC.

Teste de hipótese (teste t)

O Laboratório poderá também averiguar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada, através de um teste de hipótese:

teste t

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}} \quad (2.10)$$

sendo:

X_{lab} - média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC;

N - número de amostras ensaiadas;

$S_{X_{lab}}$ - o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório.

Em seguida o valor **t** (em módulo) é comparado com o valor crítico t tabelado e toma-se como critério de aceitação:

- Se $|t| \leq t$ tabelado, **não ficou** estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é satisfatório;
- Se $|t| > t$ tabelado, **ficou** estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos e logo o ensaio é **não** satisfatório.

Fator de desempenho Z (“Z-score”)

Outra forma de avaliar o desempenho do Laboratório na análise de um MRC é o cálculo do fator de desempenho Z:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (2.11)$$

sendo:

X_{lab} - valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v - valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC.

S - unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.

A avaliação poderá ser feita de acordo com seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$: Satisfatório;

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável;

$|Z| > 3$: Incorreto.

Testes interlaboratoriais

Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, refere-se, entre outros:

- Ensaio interlaboratorial de aptidão destinado a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório.

- Ensaio interlaboratorial de normalização destinado a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade. A sua realização é condição de acesso à utilização exclusiva do método em causa.

Estes ensaios podem ser utilizados para avaliação de parâmetros característicos, como a repetibilidade e a reprodutibilidade, permitindo demonstrar, em simultâneo, que a sua precisão é compatível com a de outros laboratórios.

Para estes ensaios também podem ser realizados o cálculo do erro normalizado, e a avaliação do desempenho, através do cálculo do “Z-score” de acordo com:

$$Z = \frac{(X_{labTI} - X_{vTI})}{STI} \quad (2.12)$$

em que:

X_{labTI} – valor experimental obtido pelo laboratório

X_{vTI} – valor aceite como verdadeiro, ou seja, o estabelecido para o ensaio interlaboratorial

S_{TI} – unidade de desvio

Posteriormente, é feita a avaliação do valor obtido com os critérios mencionados anteriormente.

Testes comparativos

Outro contributo importante na validação de um método interno de ensaio consiste na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método tomado como referência. O objetivo principal deste tipo de ensaio comparativo é o de estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, de avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência (Relacre, 2000).

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, nomeadamente:

- Teste de hipótese: teste t das médias;
- Teste de hipótese: teste t das diferenças (amostras emparelhadas);

3. Parte Experimental

Este procedimento foi baseado na norma EN 12856:1999 “Determinação de acessulfame de potássio, aspartame e sacarina” por HPLC.

3.1. Materiais e Reagentes

- HPLC da marca Agilent e modelo de série 1260 Infinity II, constituído por um desgaseificador, bomba quaternária, injetor, forno e um detetor espectralfotométrico de arranjo linear de díodos (DAD)
- Coluna cromatográfica da Fortis Technologies Ltd. modelo: F18-040905, C18 de 5 μm , 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno
- Banho de ultrassons da marca VWR, modelo USC 500 T
- Água Ultrapura Tipo 1, obtida num sistema de purificação manufaturado pela a empresa ATS-António Júlio Teixeira de Sousa (Ermesinde)
- Acetonitrilo, para HPLC, fornecido pela VWR
- Ácido fosfórico, ρ_{20} (H_3PO_4) = 1,71 g/ml, w (H_3PO_4) = 85%, fornecido pela Sigma-Aldrich
- Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) $\geq 99,0\%$, fornecido pela VWR
- Sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) $\geq 99,0\%$, fornecido pela VWR
- Hexacianoferrato de potássio (II) trihidratado ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) $\geq 99,0\%$, VWR
- Material de referência Fapas T03190QC, Acessulfame K $43,1 \pm 7,8$ mg/l; Aspartame 349 ± 46 mg/l; Sacarina 144 ± 22 mg/l
- Acessulfame K ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNO}_4\text{S}$) $\geq 99,0\%$, fornecido pela Sigma-Aldrich
- Aspartame ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$) 98%, fornecido pela Alfa Aesar
- Sacarina de sódio monoidratada ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) $\geq 99,0\%$, fornecido pela Sigma-Aldrich
- Papel de filtro qualitativo, de 150 mm, retenção de partículas de 5-13 μm , VWR European Car. No. 516-0817

3.2. Amostras

As amostras estudadas neste trabalho foram o vinho branco, ice tea, leite meio-gordo, iogurte líquido, gelatina de sobremesa, barra energética e adoçante em pó e líquido à base de glicosídeos de esteviol (stevia). Para facilitar o estudo, selecionaram-se apenas matrizes que não continham os adoçantes em estudo. As amostras foram selecionadas das famílias de produtos, com possibilidades de serem requeridas análises de adoçantes artificiais ao laboratório. A gelatina e os adoçantes representam a família dos açúcares, produtos açucarados e derivados. A barra energética representa a família de alimentos dietéticos, suplementos alimentares e produtos de alimentação especial. O vinho branco representa a família de bebidas alcoólicas. O

Ice tea representa a família de café, chá, infusões e derivados. O iogurte e o leite representam a família de leite, produtos lácticos e derivados.

A denominação de cada uma das amostras será a seguinte ao longo do restante do trabalho para simplicidade: gelatina de sobremesa será gelatina, adoçante em pó e líquido à base de glicosídeos de esteviol (stevia) serão adoçante em pó e adoçante líquido respectivamente, barra energética será barra, vinho branco será vinho, o leite meio-gordo será leite, o iogurte líquido será iogurte e o ice tea manter-se-á ice tea.

3.3. Material de referência

O Material de referência utilizado ao longo deste trabalho é o T03190 QC da Fapas que contém todos os adoçantes em estudo em quantidades conhecidas. Este servirá para o estudo da exatidão assim como para estudo de uma das famílias de produtos não abordada nas amostras. A família de bebidas não alcoólicas será estudada a através deste material de referência que é um soft drink (uma bebida semelhante a uma cola ou uma Fanta). Para simplicidade, a T03190 QC será referida como fapas no restante corpo do trabalho.

3.4. Preparação de soluções

As soluções preparadas foram as seguintes:

Solução de Carrez I em que se pesou e dissolveu-se de 53 g de hexacianoferrato de potássio (II) trihidratado em 500 ml água. Solução de Carrez II em se pesou e dissolveu-se de 108 g sulfato de zinco heptahidratado em 500 ml de água. Estas soluções são utilizadas para precipitar proteínas, gorduras e compostos redox que possam interferir na análise das amostras.

Uma solução aquosa de dihidrogenofosfato de potássio 1,7 g/l.

As análises cromatográficas foram realizadas com eluição isocrática, com a fase móvel colocada num único frasco. O eluente foi preparado num gobelet por mistura de A ml da solução de dihidrogefosfato de sódio 1,7 g/l e B ml de acetonitrilo (medidos em proveta) para um recipiente shot e ajustou-se o pH a 3,5 com ácido fosfórico concentrado (proporções dos compostos constituintes da fase móvel são confidenciais). Desgaseificou-se a fase móvel num banho ultrassons por 15 min.

A solução de limpeza da coluna foi obtida por mistura de acetonitrilo e água em proporções de 6:4 respectivamente.

Uma solução padrão stock de 500,0 mg/l, dos 3 adoçantes em estudo. Pesou-se rigorosamente 0,125 g de acessulfame de potássio, de aspartame e de sacarina para um balão volumétrico de 250,0 ml, dissolveu-se com água. Utilizou-se o banho de ultrassons quando existia dificuldade em dissolver o aspartame, tendo sempre o cuidado de não deixar a solução aquecer demais para evitar degradação do aspartame. Completou-se o volume com água. Esta solução serviu para a preparação das soluções padrão de calibração e para fazer o spike das amostras em estudo.

Prepararam-se soluções aquosas padrão, para efetuar-se a curva de calibração, por diluição rigorosa da solução stock, com as seguintes concentrações: 100,0 mg/l, 75,00 mg/l, 50,00 mg/L, 25,00 mg/l, 10,00 mg/l, 5,00 mg/l, 2,00 mg/l.

Para a preparação da solução de referência, mediu-se rigorosamente 1,0 ml do material fapas para um balão de 10,00 ml e completou-se o volume com água.

As soluções amostras das diferentes matrizes foram preparadas de forma rigorosa em balões volumétricos e usando água como solvente. Na Tabela 3.1 indica-se a toma ou massa inicial, volume do balão volumétrico usado, o volume de solução fortificante (solução stock de 500,0 mg/l), e se as soluções Carrez são adicionadas.

Tabela 3.1: quantidades das tomas iniciais das amostras, Volume final, Volume de solução fortificante usada e método de preparação usado.

Matriz	Toma inicial (massa, g ou volume, ml)	Volume balão volumétrico (ml)	Método de preparação*	Volume de padrão misto (500 g/l) adicionado (solução fortificante, ml)
Adoçante líquido	10	100,0	1	4,00
Adoçante pó	0,10	100,0	1	4,00
Barra energética	1,0	100,0	2	20,00
Gelatina	10	100,0	2	0,400
Ice tea	10	50,00	1	0,400
logurte	2,0	100,0	2	20,00
Leite	2,0	100,0	2	20,00
Vinho	10	50,0	1	3,00

* Método 1: sem adição de Carrez (I ou II); Método 2: adição de 2 ml Carrez I e 2 ml de Carrez II

Se as soluções Carrez foram adicionadas, as soluções são filtradas antes de serem transferidos para vials.

3.5. Análise cromatográfica

1. Com o topo da coluna desconectada do sistema cromatográfico, fez-se a limpeza com a solução, acetonitrilo-água 6:4, a um caudal de 5,00 ml/min e durante 10 min. Depois fez-se a limpeza da coluna, com a mesma solução, a um caudal de 1,00 ml/min, durante 45 min, a 35°C.
2. Fez-se o condicionamento da coluna com a solução de fase móvel a um caudal de 1,00 ml/min, durante uma hora, a 35°C.
3. Fez-se a leitura da sequência programada de soluções a analisar, a 35 °C e a quantificação foi realizada ao comprimento de onda A, (valor confidencial da empresa), para os três adoçantes estudados. O volume de solução era de 1 µl. O

tempo de análise era de 14 min. A sequência era sempre programada na seguinte ordem de análise das soluções:

- a. Dois brancos, consecutivos;
 - b. Soluções padrões de calibração de concentrações ascendente (P1 a P7).
 - c. Um Branco.
 - d. Ler o Solução padrão PC1 (concentração mais baixo, a solução P1 colocada num vial diferente)
 - e. Ler o Solução padrão PC7 (concentração mais alta, a solução P7 colocada num vial diferente).
 - f. Ler 10 amostras.
 - g. Ler uma Solução padrão de check standart (novo vial com a solução de concentração intermédia (PC4))
 - h. Repetir pontos f. e g. e concluir com a solução PC1, seguida da PC7
4. Fez-se a limpeza da coluna, com a solução de limpeza, com um caudal de 1,00 ml/min durante 45 min a 35°C.

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo da linearidade

Iniciou-se o processo de implementação e validação do método interno de determinação dos adoçantes da Silliker Portugal S.A. – Mérieux NutriSciences com o estudo da linearidade do método para o acessulfame K, o aspartame e a sacarina.

Foi estudada a gama de trabalho de 2 mg/l a 100 mg/l para os 3 adoçantes sendo que as retas foram formadas com 6 ou 7 pontos

Dito isto apresentam-se nas seguintes tabelas os valores dos declives, ordenadas na origem, coeficientes de correlação e limites de deteção e quantificação das retas usadas e número da reta (retas com o mesmo número foram feitas no mesmo dia).

Tabela 4.1: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de deteção e quantificação para as retas de calibração do acessulfame

Adoçante	Nº de reta	Declive	Ordenada na origem	coeficiente de correlação	L.D (mg/l)	L.Q (mg/l)
Acessulfame	1	7,716	-9,629	0,99891	6,82	8,84
	2	7,348	-0,803	0,99997	1,08	1,46
	3	7,324	-0,383	0,99997	1,14	1,56
	4	7,002	-0,854	0,99992	1,70	2,43
	5	7,434	-1,889	0,99994	1,50	2,01
	6	7,532	0,613	0,99998	0,80	1,07
	7	7,330	-0,560	0,99997	1,01	1,37
	8	7,289	2,728	0,99991	1,86	2,55
	9	7,019	3,882	0,99992	1,78	2,53
	10	6,660	-1,680	0,99988	2,13	3,20

Tabela 4.2: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de deteção e quantificação para as retas de calibração do aspartame

Adoçante	Nº de reta	Declive	Ordenada na origem	coeficiente de correlação	L.D (mg/l)	L.Q (mg/l)
Aspartame	1	24,51	-28,86	0,99647	11,9	35,9
	2	26,19	-30,96	0,99984	2,52	7,65
	3	21,07	-125,0	0,99595	12,6	38,3
	4	25,29	-121,53	0,99799	8,88	26,9
	5	28,54	-7,958	0,99995	1,37	4,15
	6	25,22	-96,901	0,99636	12,5	37,9
	7	27,75	-11,513	0,99999	0,65	1,97
	8	26,92	-9,219	0,99993	1,68	5,09
	9	27,33	-2,562	0,99998	0,80	2,43
	10	25,39	-66,81	0,99912	5,66	17,1

Tabela 4.3: Número de reta, declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação, limites de detecção e quantificação para as retas de calibração da sacarina

Adoçante	Nº de reta	Declive	Ordenada na origem	coeficiente de correlação	L.D (mg/l)	L.Q (mg/l)
Sacarina	1	97,31	-34,15	0,99869	6,27	19,0
	2	94,01	103,22	0,99942	4,23	12,8
	3	94,23	102,46	0,99953	3,82	11,6
	4	92,17	85,78	0,99934	4,14	12,6
	5	103,2	16,76	0,99995	1,25	3,77
	6	103,9	10,60	0,99998	0,68	2,07
	7	96,53	64,03	0,99975	2,71	8,20
	8	95,71	72,17	0,99967	3,09	9,37
	9	95,75	73,91	0,99962	3,30	10,0
	10	94,84	55,33	0,99978	2,53	7,67

Como se pode verificar todas as retas possuem um coeficiente de correlação superior a 0,995, no entanto, em vários casos o valor de ordenada na origem desviou-se muito de zero, o que por sua vez deu origem a limites de detecção e quantificação acima do desejado. O caso mais evidente disto é no aspartame onde vários L.Q forma superiores a 25 mg/l, isto aconteceu quando calibração efetuada não era uma reta, mas sim uma curva conforme exemplificado na seguinte figura 4.1.

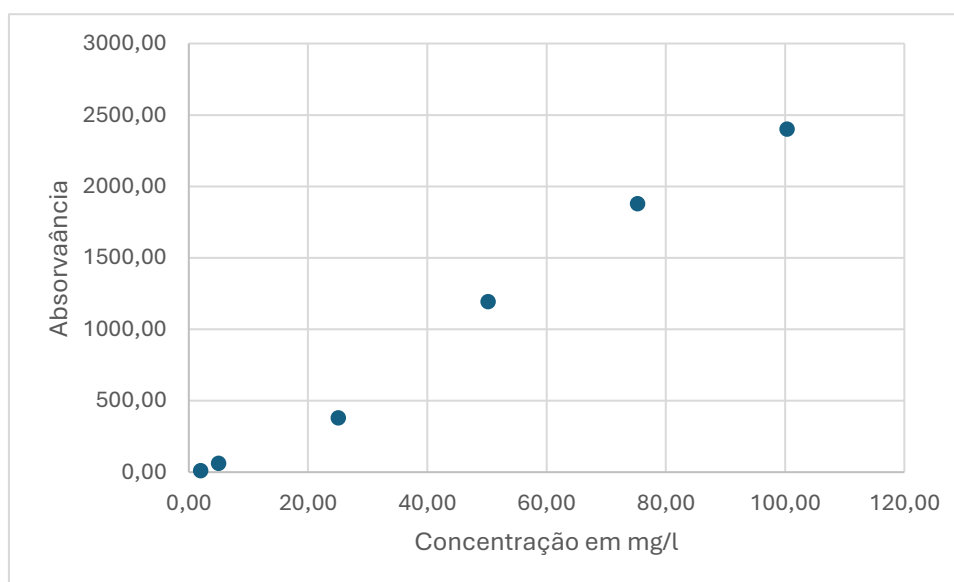


Figura 4.1: Exemplo de uma calibração curvilínea (reta 6 do aspartame)

As restantes calibrações eram lineares, como a exemplifica a seguinte figura 4.2.

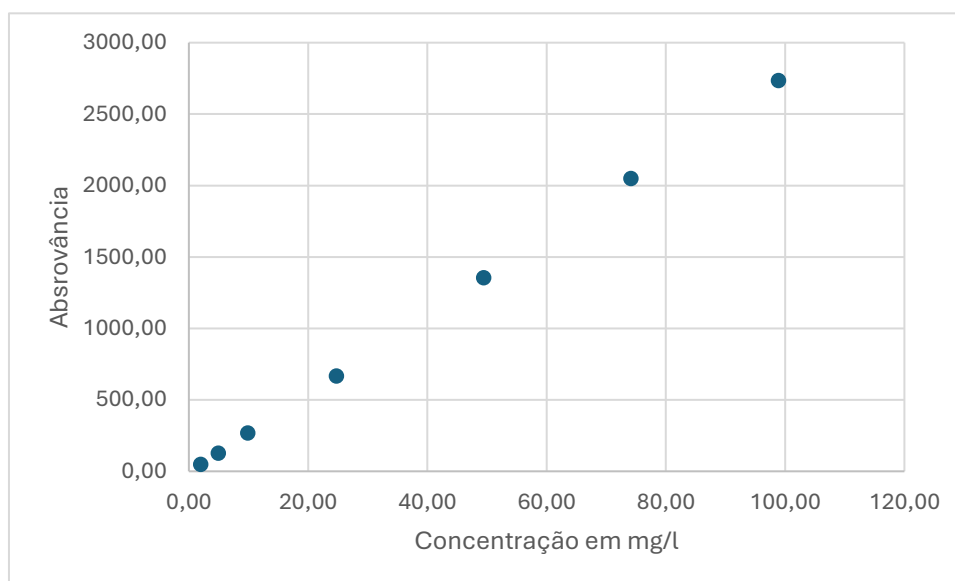


Figura 4.2: Exemplo de uma calibração linear (reta 7 do aspartame)

A causa provável destes ajustes curvilíneos terá sido por erro do analisa, visto que ao longo do tempo existiu uma tendência geral dos valores do L.Q diminuírem e do coeficiente de correlação aumentar. Portanto, todas retas em que se verificou um valor anormal do L.D e L.Q não devem ser consideradas para o estudo deste trabalho.

Dito isto, uma vez que se verifica linearidade para os 3 adoçantes em várias retas, mesmo removendo as retas mal ajustadas, pode-se confirmar que existe linearidade entre 2 mg/l e 100 mg/l. No entanto, devido ao número elevado de L.Q superiores a 2 mg/l (concentração do padrão de calibração mais baixo) como desejado, para confirmar se um L.Q com este valor é realista, mais ensaios para estudo da linearidade devem ser efetuados, especialmente no caso do aspartame e da sacarina.

4.2. Resultados

Após o estudo da linearidade efetua-se a determinação de acessulfame K, aspartame e sacarina nas diversas amostras fortificadas, assim como ao material de referência FAPAS, que foram mencionados anteriormente.

Para todas as matrizes efetuou-se um branco para detetar possíveis picos que interferissem na análise e em todos os casos, exceto um, não se detetou nenhum pico que coincidissem com os tempos de retenção dos analitos em estudo. A única exceção foi na matriz de barra energética em se verificou um pico com o tempo de retenção da sacarina. Em todos os ensaios a área deste pico era sempre inferior ao limite de deteção calculado para as curvas de calibração, portanto não se considerou que existisse influência de nenhum interferente nas análises à barra energética.

Com a confirmação de que as matrizes não continham picos interferentes, passou-se à preparação das amostras fortificadas. As amostras foram fortificadas, de igual forma ao que foi

descrito no capítulo 3.4. Preparou-se um padrão misto dos três adoçantes com concentração de 500 mg/l, e a cada uma das amostras foi adicionado o volume de padrão misto como indicado na tabela 3.1.

Com as amostras preparadas passou-se à análise no HPLC-UV, onde todos os cromatogramas obtidos tiveram os seus picos integrados.

Como demonstração de como foi feita a integração dos padrões, de cada uma das matrizes e do material de referência apresentam-se as seguintes figuras.

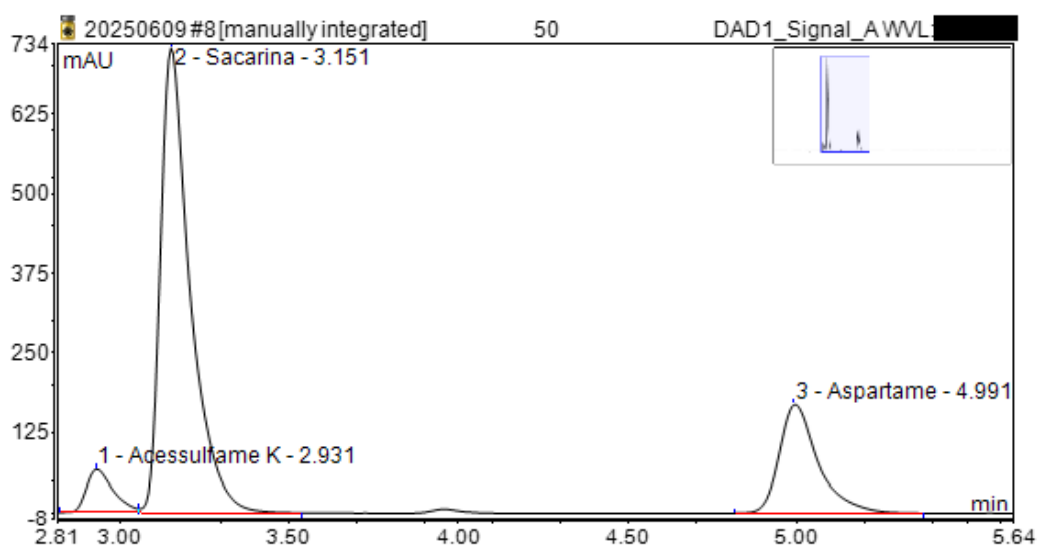


Figura 4.3: Exemplo de um cromatograma de padrão de calibração de 50 mg/l

A figura 4.3 demonstra um cromatograma de uma solução padrão preparada. O pico do acessulfame surge em primeiro lugar com um tempo de 2,93 min seguido do pico da sacarina aos 3,15 min e por fim aos 4,99 min o pico do aspartame. Como se pode ver na figura, os picos da sacarina e acessulfame não se separavam completamente, neste caso a função splitpeak era usada para separar a área dos picos após integração (a função splitpeak permitia separar as áreas dos picos, ao selecionar manualmente os tempos em que os picos começam e terminam).

Na seguinte figura 4.4 pode-se verificar que, ao contrário do que acontecia na integração dos picos do padrão, existia um pico de uma substância desconhecida (interferente) que coincidia em parte com o tempo de retenção do aspartame. Nestes casos o procedimento que se fazia para separar os picos, é o mesmo para separar os picos da sacarina e do acessulfame, integrava-se toda a área dos picos envolventes e separava-se ao selecionar o tempo em que eles se tornam distintos. Também se pode ver na figura que um pico antecedia

o acessulfame e que este também não se separava completamente, mas tal como se tinha feito anteriormente utilizou-se a ferramenta splitpeak para separar as áreas dos picos.

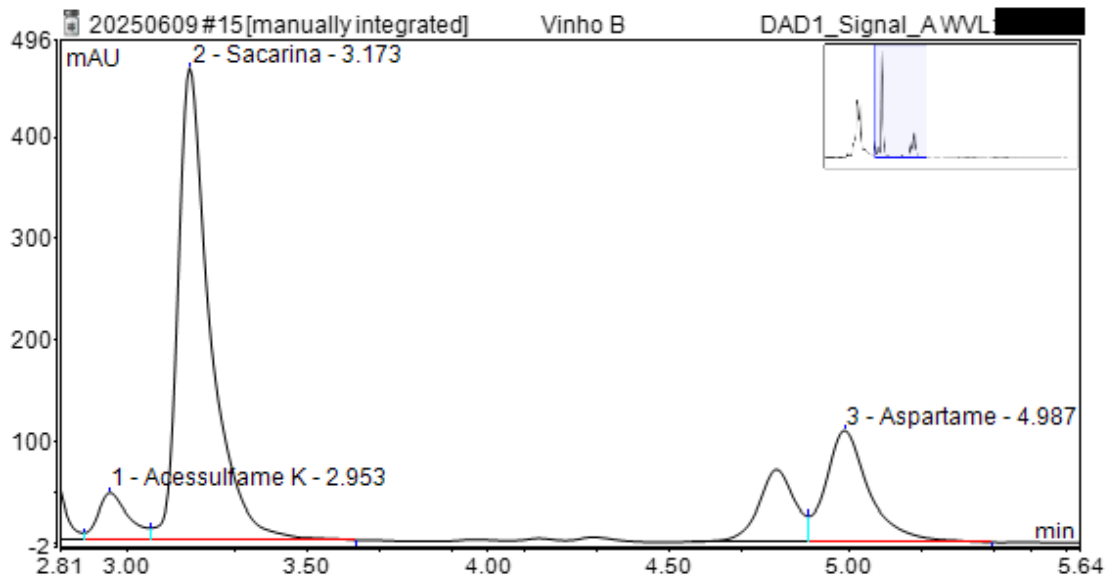


Figura 4.4: Exemplo de um cromatograma de um ensaio de vinho

Com está exemplificado na figura 4.5 nos cromatogramas da FAPAS existiam outros picos que, por vezes não separavam completamente do pico do acessulfame, mas com o auxílio da ferramenta mencionada anteriormente efetuava-se a separação dos picos.

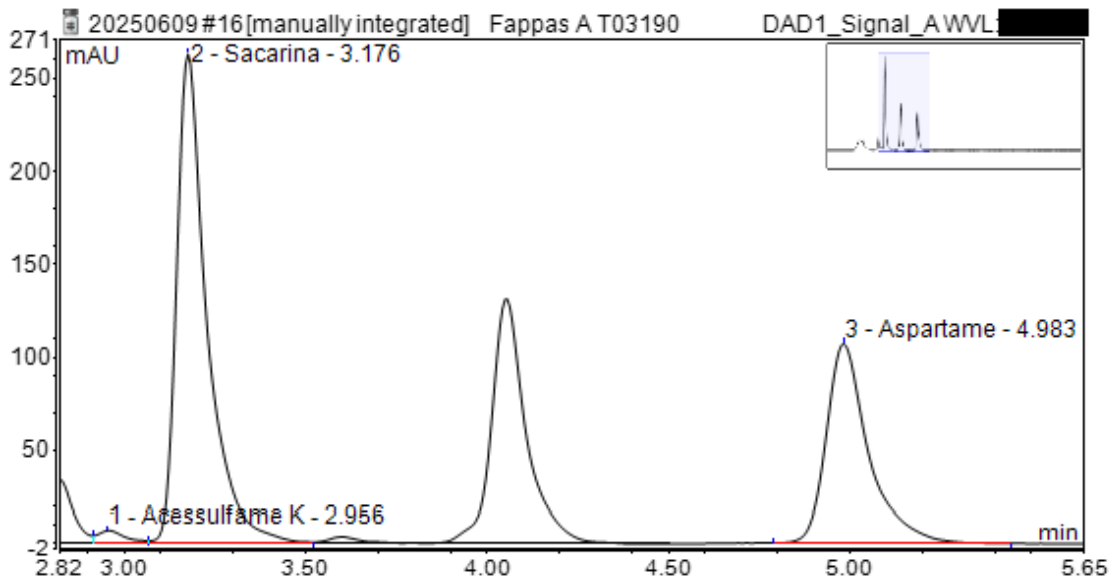


Figura 4.5: Exemplo de um cromatograma de um ensaio do material de referência

Uma situação semelhante acontecia nas restantes matrizes e o método utilizado era sempre o mesmo, com o auxílio da ferramenta separavam-se os picos. Dito isto, nas seguintes figuras apresentam-se os cromatogramas das restantes matrizes.

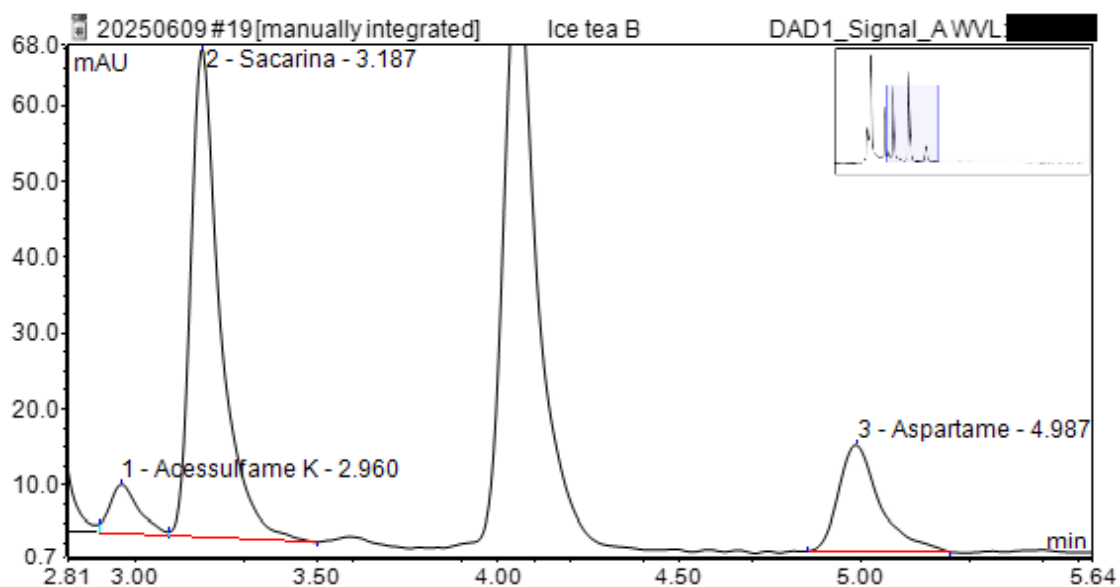


Figura 4.6: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao ice tea

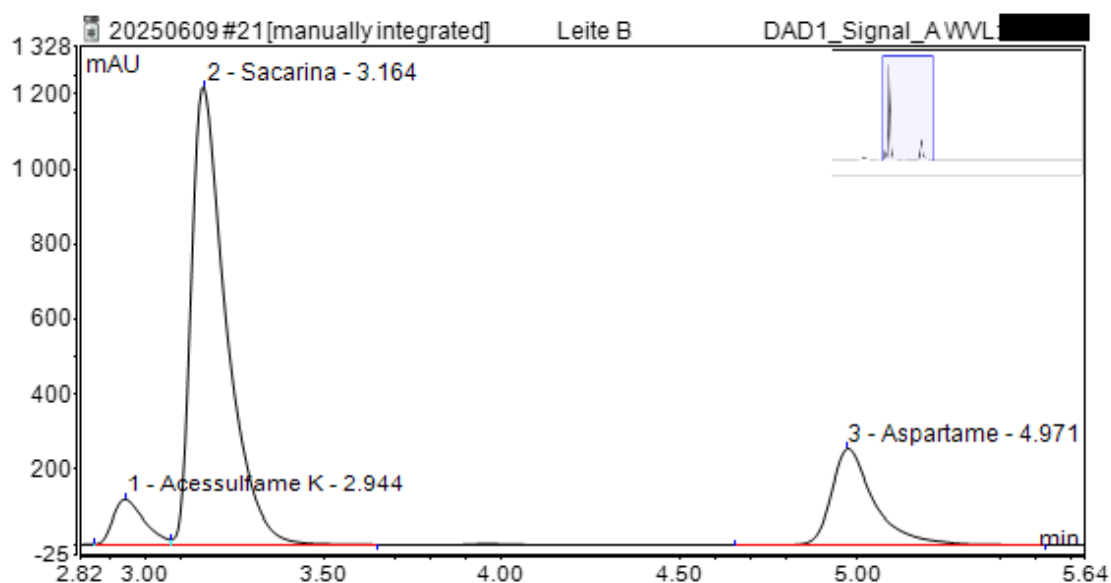


Figura 4.7: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao leite

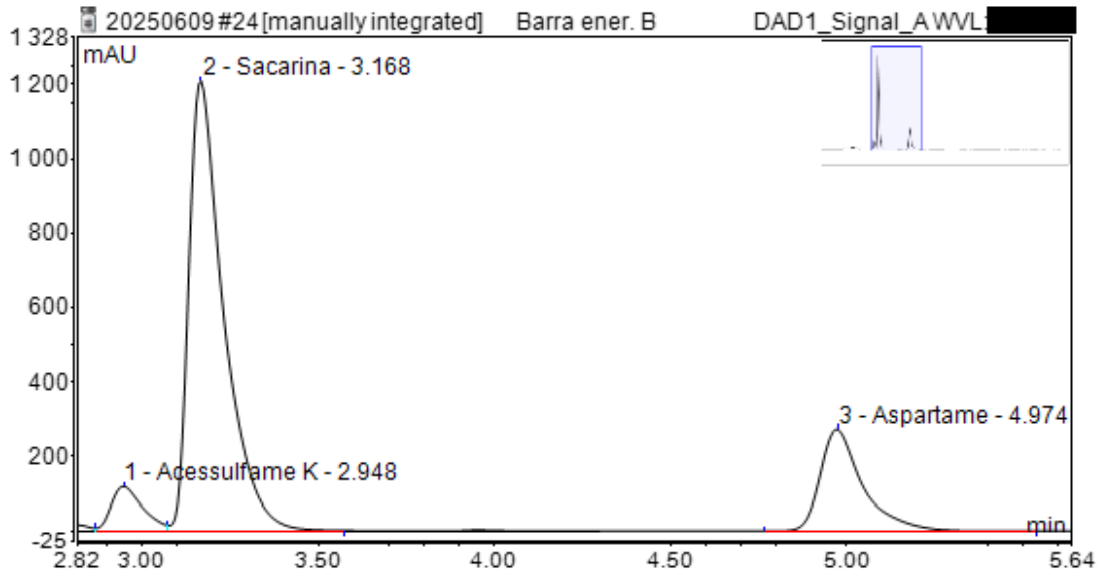


Figura 4.8: Exemplo de um cromatograma de um ensaio à barra energética

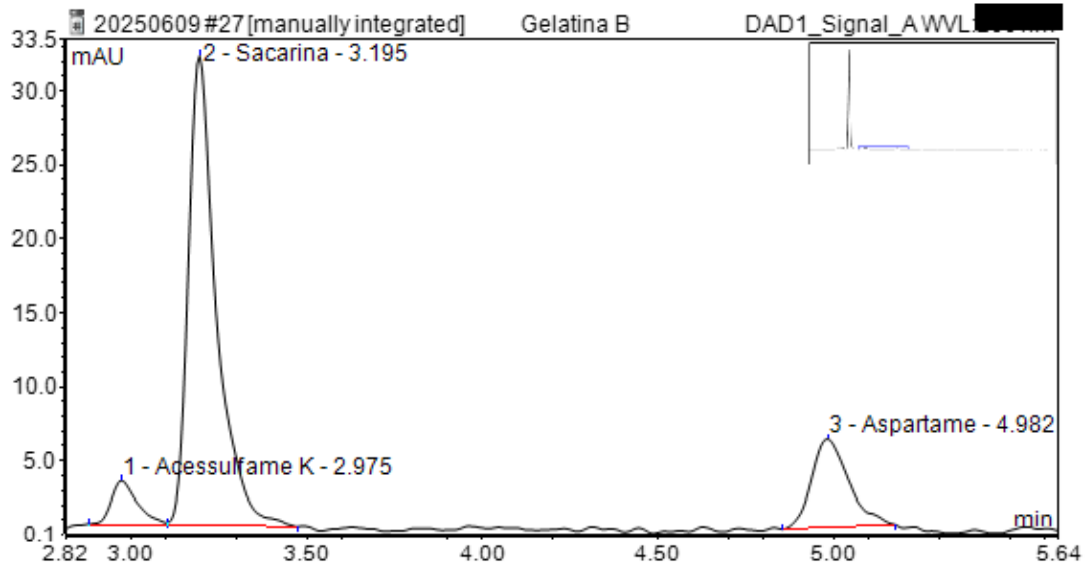


Figura 4.9: Exemplo de um cromatograma de um ensaio à gelatina

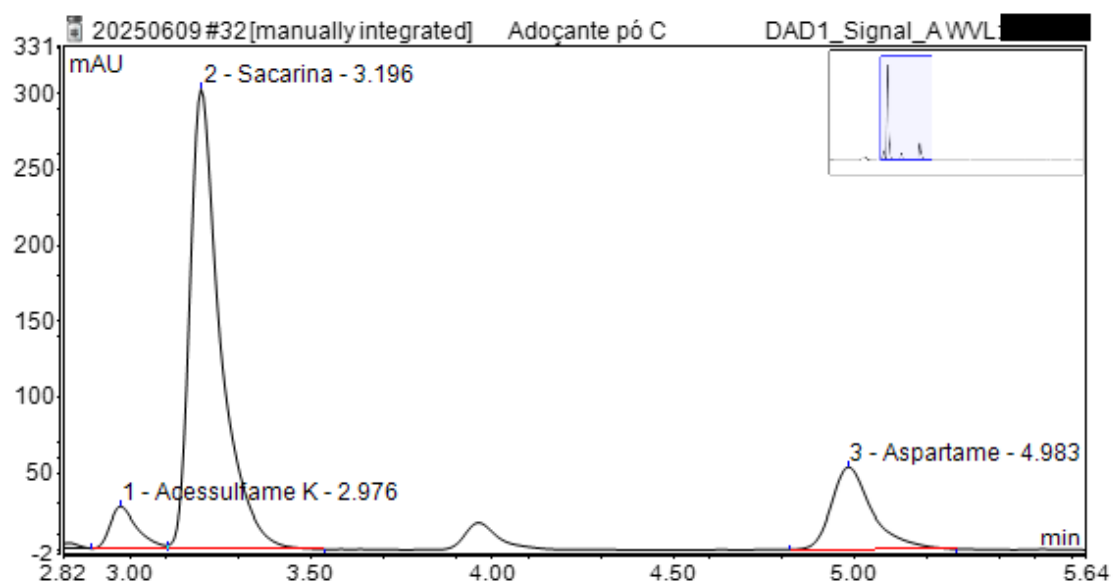


Figura 4.10: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao adoçante em pó

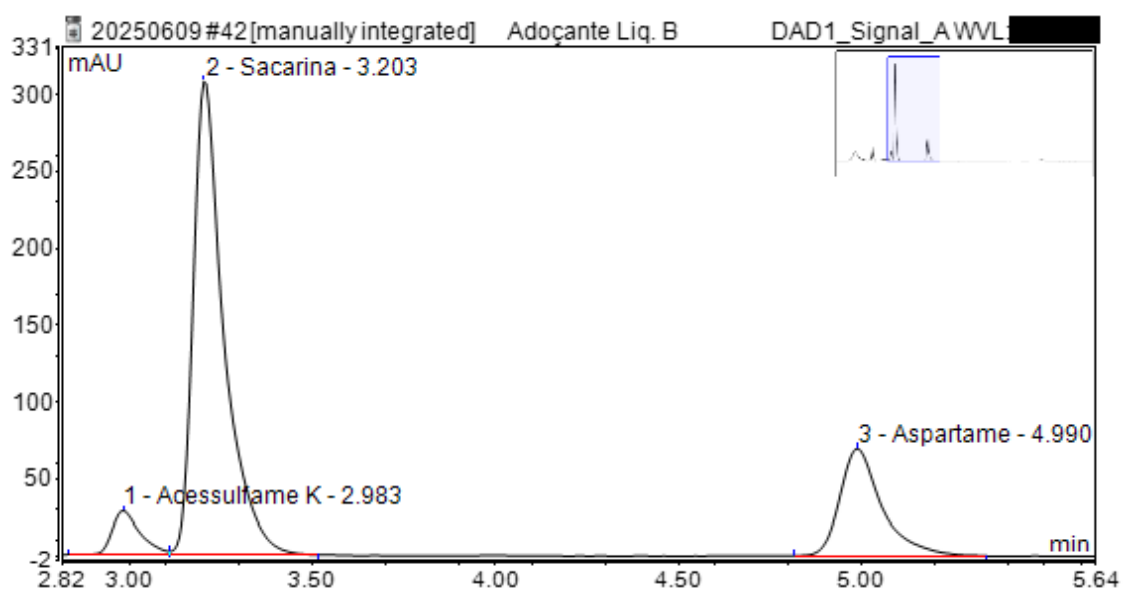


Figura 4.11: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao adoçante líquido

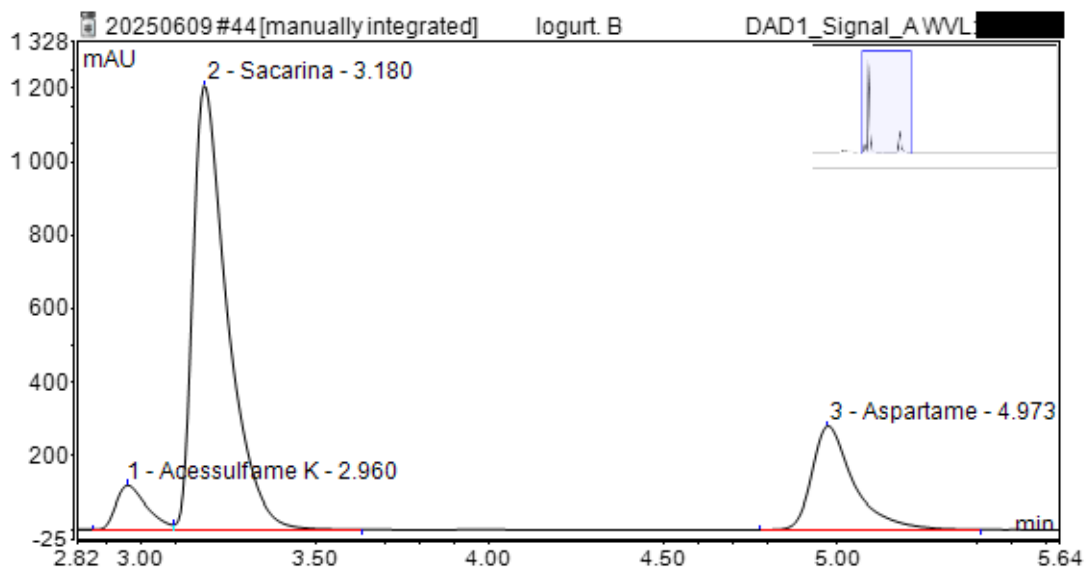


Figura 4.12: Exemplo de um cromatograma de um ensaio ao iogurte

Com as áreas dos picos determinados procedeu-se à obtenção dos resultados das análises. Apresentam-se nas seguintes tabelas, os valores dos resultados de todos os ensaios efetuados às amostras de matrizes fortificadas, considerados para os estudos deste trabalho. O estudo da justeza, da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão foram feitos com os valores apresentados nas tabelas seguintes.

Na seguinte tabela 4.4 apresentam-se os resultados dos ensaios com 7 ou mais replicas para cada uma das matrizes e material de referência para o composto Acesulfame K

Tabela 4.4: Resultados obtidos em mg/L para Acesulfame K, para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra)

Matriz	Nº de Ensaio (ensaios em mg/l)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
adoçante liquido	18,19	18,21	18,48	18,25	18,48	18,13	18,51	18,26	18,51	18,40
adoçante pó	20,40	20,29	20,59	19,61	20,11	20,82	20,31	20,40	20,40	20,54
barra	96,60	96,16	96,42	95,30	92,29	96,03	96,26	93,46	95,77	
fapas	35,66	35,85	35,78	35,65	35,80	35,83	35,75	35,67		
gelatina	2,11	2,10	2,17	1,98	2,22	2,13	2,05	2,01		
ice tea	3,83	3,73	3,67	3,53	3,55	3,58	3,62	3,53	3,52	3,87
iogurte	98,05	97,83	97,69	98,90	98,50	97,96	96,65	96,66	97,24	97,97
leite	96,36	97,20	95,94	96,76	96,96	97,13	96,11			
vinho	36,10	35,89	39,66	34,80	34,36	36,06	36,48			

Na seguinte tabela 4.5 apresentam-se os resultados dos ensaios com 7 ou mais replicas para cada uma das matrizes e material de referência para o composto Aspartame

Tabela 4.5: Resultados obtidos em mg/L para Aspartame para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra)

Matriz	Nº de Ensaio (ensaios em mg/l)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
adoçante liquido	24,72	24,77	24,76	24,65	24,48	24,54	24,43	24,71	24,68	
adoçante pó	17,37	15,66	16,38	16,13	17,44	16,92	15,92	16,73	16,37	
barra	111,29	111,14	110,76	110,24	110,48	108,30	110,76	110,53	112,00	
fapas	341,53	361,59	336,58	317,32	352,83	358,49	342,72			
gelatina	2,35	2,29	2,36	2,36	2,36	2,39	2,39	2,37	2,39	2,35
ice tea	4,33	4,23	4,65	4,58	4,47	4,64	4,65			
iogurte	85,20	84,05	85,76	85,09	85,16	85,37	84,26	84,88	85,20	84,35
leite	85,73	86,45	85,12	85,39	85,11	84,76	85,60			
vinho	32,91	35,87	31,34	34,72	32,87	33,15	33,89			

Na seguinte tabela 4.6 apresentam-se os resultados dos ensaios com 7 ou mais replicas para cada uma das matrizes e material de referência para o composto Sacarina

Tabela 4.6: Resultados obtidos em mg/L para Sacarina para as matrizes e material de referência em estudo (7 ou mais replicas para cada amostra)

Matriz	Nº de Ensaio (ensaios em mg/l)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
adoçante liquido	17,48	17,45	17,46	17,38	17,47	17,45	17,43	17,31	17,42	17,51
adoçante pó	17,21	17,28	17,44	17,08	17,12	17,46	17,14	17,20	17,33	17,23
barra	83,56	83,27	83,43	83,18	82,87	82,95	83,43	83,11	80,54	81,44
fapas	153,00	154,25	163,10	152,46	147,86	158,83	162,29	155,21		
gelatina	2,05	2,14	2,07	2,05	2,08	2,06	2,09	2,06	2,06	2,13
ice tea	3,70	3,72	3,66	3,61	3,60	3,82	3,74	3,62	3,62	3,68
iogurte	82,68	82,66	82,82	82,54	82,59	83,12	81,76	82,00	82,65	82,60
leite	83,21	83,36	82,39	82,85	83,09	82,91	82,79			
vinho	27,40	30,72	29,79	29,57	27,21	27,35	28,07			

Por simplicidade não serão apresentados todos os valores dos ensaios considerados para o estudo da precisão intermédia, serão apenas apresentados o número de ensaios em duplicado considerados, os valores das absorvâncias e das concentrações de todos os ensaios encontram-se no Anexo A.2. Na seguinte tabela 4.7 apresenta-se o número de ensaios em duplicado para as diferentes matrizes e material de referência para o composto todos os adoçantes em estudo.

Tabela 4.7: Números de duplicados para todas as matrizes e material de referência para o composto Acessulfame K, Aspartame e Sacarina

Matriz	Nº de Ensaios		
	Acessulfame	Aspartame	Sacarina
adoçante líquido	7	6	7
adoçante pó	8	7	8
barra	7	6	7
fapas	6	6	7
gelatina	8	6	8
ice tea	8	6	8
iogurte	6	6	6
leite	9	6	9
vinho	6	6	8

4.3. Justeza

Para o estudo da justeza foram estudadas as taxas de recuperação das matrizes dos ensaios de estudo da repetibilidade e precisão intermédia. Considerou-se a justeza aceitável quando os ensaios tinham recuperação entre 80% e 120%.

No estudo da justeza dos ensaios de repetibilidade calculou-se: o valor de taxa de recuperação dos valores médio de cada matriz para cada adoçante, calculou-se adicionalmente o valor médio das taxas de recuperação para cada um dos adoçantes, compilou-se estes valores na seguinte tabela 4.8.

Tabela 4.8: Taxas de recuperação % das matrizes e taxas de recuperação médias para o acessulfame K, aspartame e sacarina do estudo da repetibilidade

Adoçante	matriz	taxa recuperação	média
Acessulfame K	adoçante líquido	91,4%	98,1%
	adoçante pó	100,2%	
	barra energética	94,1%	
	gelatina	103,2%	
	ice tea	89,7%	
	iogurte	94,8%	
	leite	94,2%	
	vinho	117,6%	
Aspartame	adoçante líquido	119,9%	103,4%
	adoçante pó	83,7%	
	barra	112,4%	
	gelatina	116,3%	
	ice tea	110,9%	
	iogurte	84,6%	
	leite	86,4%	
	vinho	113,0%	
Sacarina	adoçante líquido	100,7%	98,9%
	adoçante pó	98,2%	
	barra	94,6%	
	gelatina	118,3%	
	ice tea	104,7%	
	iogurte	82,3%	
	leite	96,4%	
	vinho	96,3%	

Como se pode verificar, as médias das taxas de recuperação para todos os adoçantes ficam próximas de 100%, um desvio de menos de 5%, mas ao analisar os valores individuais para cada teste de repetibilidade verificam-se vários valores próximos dos limiares.

Para valores próximos do limite superior teve-se o teste do vinho ao acessulfame K e aspartame, da gelatina ao aspartame e sacarina e o mais agravante de todos foi o teste do adoçante líquido ao aspartame.

O resultado do teste do vinho ao aspartame pode ter sido devido à proximidade do pico do aspartame a outro pico nesta matriz. A matriz de vinho branco continha um pico na

proximidade do pico do aspartame como exemplificado na seguinte figura 4.11, sendo este, um composto desconhecido.

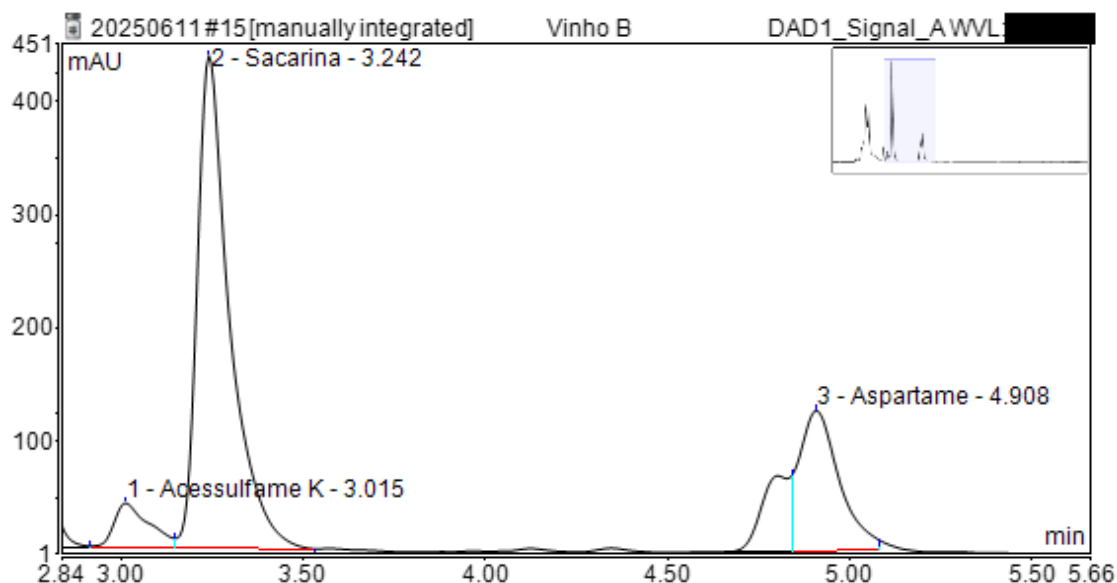


Figura 4.13: Exemplo de um cromatograma de uma análise ao vinho branco

A proximidade destes dois picos poderá ter artificialmente aumentado os valores deste ensaio levando à elevada taxa de recuperação. O mesmo aconteceu no caso do acesulfame em que o tempo de retenção do acesulfame é próximo de outro composto. Portanto, devido a estes problemas é importante considerar alterar parâmetros de análise e/ou preparação das amostras para este tipo de matriz.

No caso da gelatina para além dos picos dos adoçantes não existiam outros picos relevantes durante a sua análise que pudessem interferir, como no caso anterior, mas o simples facto das amostras da gelatina estarem muito próximas do limite inferior da gama de trabalho pode explicar este efeito, uma vez que a baixas concentrações um desvio nominal pequeno pode representar um desvio relativo elevado.

No caso do adoçante líquido, as concentrações encontravam-se perto do centro da gama de trabalho e não existiam interferentes na sua análise, uma vez que é uma matriz pouco complexa (sendo próximo de 100% glicosídeos de esteviol), portanto as explicações possíveis para este caso passam a ser apenas erro por parte do analista na preparação das amostras.

Para valores próximos do limite inferior da taxa de recuperação, tiveram-se os ensaios do iogurte ao aspartame e à sacarina, do leite ao aspartame e o adoçante em pó ao aspartame.

Nestes casos não existiam interferentes na leitura dos cromatogramas, mas existiam variações na complexidade das matrizes, no caso do leite e iogurte. Sendo o leite e iogurtes ambos lacticínios, é possível que as acidez destes compostos degradassem os adoçantes. Este problema de recuperações mais baixas na matriz do leite e iogurte foi recorrente ao longo do trabalho e o mais certo é estar ligado às características das matrizes. No caso do adoçante em pó semelhante ao adoçante líquido a causa mais certa deverá ter sido erro por parte do analista.

Passado a agora para a análise das taxas de recuperação médias dos ensaios de precisão intermédia, que se encontram representadas na seguinte tabela 4.9.

Tabela 4.9: Taxas de recuperação médias para os ensaios de precisão intermédia e Taxas de recuperação médias para os adoçantes

Adoçante	matriz	taxa recuperação	média
Acessulfame	adoçante líquido	98,9%	99,9%
	adoçante pó	103,3%	
	barra energética	94,7%	
	gelatina	102,8%	
	ice tea	91,9%	
	iogurte	98,2%	
	leite	97,2%	
	vinho	112,0%	
Aspartame	adoçante líquido	108,3%	100,2%
	adoçante pó	91,0%	
	barra	92,4%	
	gelatina	102,8%	
	ice tea	109,5%	
	iogurte	90,9%	
	leite	92,3%	
	vinho	114,7%	
Sacarina	adoçante líquido	98,8%	97,2%
	adoçante pó	99,0%	
	barra	93,5%	
	gelatina	98,1%	
	ice tea	97,3%	
	iogurte	93,5%	
	leite	95,0%	
	vinho	102,4%	

Como se pôde verificar as taxas de recuperação para os ensaios de precisão intermédia eram ainda mais próximas de 100%, o que era esperado estatisticamente onde com um elevado número de resultados a distribuição de valores aproxima-se de uma distribuição normal. Dito isto ainda foi possível identificar as tendências identificadas para o vinho, leite e iogurte.

4.4. Teste de repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade foram realizadas 10 análises a cada uma das matrizes em estudo, onde com pelo menos 7 dos 10 ensaios tinham-se de obter um desvio padrão inferior a 5%. Cada estudo de repetibilidade era feito na sua íntegra no mesmo dia, na sequência de leitura eram todos lidos um após o outro sem interrupção entre eles, cada ensaio era uma amostra preparada individualmente, e todas as preparações eram feitas sempre com a mesma

amostra inicial, adicionalmente fez-se um branco da solução da matriz para identificar quais queres picos que possam interferir na leitura.

Consideravam-se os ensaios obtidos como aceitáveis para o estudo da repetibilidade de uma matriz quando a média dos ensaios tinham recuperação entre 80% e 120%, e o coeficiente de variação < 5%.

Para o estudo da repetibilidade calculou-se a média dos ensaios e o coeficiente de variação, como foi mencionado anteriormente, o limite de repetibilidade, o limite de repetibilidade relativo. Por fim fez-se a média dos resultados obtidos para as matrizes para se obter os coeficientes de variação relativo, os limites de repetibilidade relativo para o método de cada um dos adoçantes estudados, estes valores encontram-se representados na seguinte tabela 4.10.

Tabela 4.10: Coeficiente de variação relativo e o limite de repetibilidade relativos para cada matriz em cada adoçante e o seu valor médio para cada adoçante

Adoçante	matriz	CVR	média CVR	LRR	média LRR
Acessulfame	adoçante líquido	0,81%	2,16%	2,27%	6,05%
	adoçante pó	1,58%		4,42%	
	barra	1,56%		4,38%	
	gelatina	3,81%		10,66%	
	ice tea	3,53%		9,88%	
	iogurte	0,74%		2,07%	
	leite	0,52%		1,47%	
	vinho	4,72%		13,22%	
Aspartame	adoçante líquido	0,50%	1,99%	1,39%	5,56%
	adoçante pó	3,74%		10,48%	
	barra	0,92%		2,57%	
	gelatina	1,33%		3,72%	
	ice tea	3,76%		10,54%	
	iogurte	0,64%		1,79%	
	leite	0,64%		1,80%	
	vinho	4,35%		12,18%	
Sacarina	adoçante líquido	0,33%	1,44%	0,91%	4,02%
	adoçante pó	0,74%		2,08%	
	barra	1,19%		3,35%	
	gelatina	1,48%		4,14%	
	ice tea	1,93%		5,40%	
	iogurte	0,47%		1,32%	
	leite	0,38%		1,07%	
	vinho	4,96%		13,89%	

Como se pôde verificar, todos os coeficientes de variação relativos eram inferiores a 5% e em média os limites de repetibilidade para o método são 6,05%, 5,56% e 4,02% para o Acessulfame, Aspartame e Sacarina respetivamente. Observou-se também que existiu uma grande dispersão de valores dos resultados obtidos de ambos os parâmetros, destacando-se as

matrizes de gelatina, ice tea e vinho. A explicação para os valores da gelatina e ice tea terem sido relativamente altos é simples, uma vez que as concentrações dos analitos eram muito próximas do limite inferior da gama de trabalho, qualquer pequena variação nominal entre valores tornava-se mais relevante em termos relativos. O vinho, semelhante quando se analisou as taxas de recuperação, deveria ter tido este valor elevado devido à proximidade e quase sobreposição dos picos dos analitos, com o pico do outro composto não identificado presente no vinho.

4.5. Teste de precisão intermédia

Para o estudo da precisão intermédia foram feitas pelo menos 2 análises, em que ambas foram lidas no mesmo dia e seguidas uma pela outra na sequência. Cada ensaio era uma amostra preparada individualmente e ambas as preparações de duplicado eram feitas sempre com a mesma amostra inicial. Considerou-se necessário um mínimo de 6 ensaios de duplicados feitos em dias diferentes com cada uma das matrizes em estudo.

Considerou-se um duplicado aceitável para o estudo da precisão intermédia quando a média dos duplicados tinha recuperação entre 80% e 120 e coeficiente de variação <5%.

Para o teste da precisão intermédia calculou-se o coeficiente de variação médio dos duplicados, o Coeficiente de variação relativa média (CVRM) e o limite da precisão intermédia relativo (LPIR) para cada matriz em cada adoçante e média destes parâmetros para cada um dos adoçantes e na seguinte tabela 4.11 apresentam-se estes valores.

Tabela 4.11: Desvio padrão da precisão intermédia relativa e o limite da precisão intermédia relativa para cada matriz em cada adoçante e média destes parâmetros para cada um dos adoçantes

Adoçante	matriz	CVRM	CVRM médio	LPIR	LPIR médio
Acessulfame	adoçante líquido	2,60%	1,86%	7,27%	5,2%
	adoçante pó	0,72%		2,03%	
	barra energética	0,92%		2,58%	
	gelatina	3,20%		8,95%	
	ice tea	1,59%		4,45%	
	iogurte	2,63%		7,37%	
	leite	1,04%		2,91%	
	vinho	2,17%		5,72%	
Aspartame	adoçante líquido	0,48%	1,57%	1,35%	4,4%
	adoçante pó	3,30%		9,25%	
	barra	0,71%		1,98%	
	gelatina	2,14%		6,01%	
	ice tea	2,29%		6,41%	
	iogurte	1,32%		3,71%	
	leite	0,94%		2,63%	
	vinho	1,34%		3,76%	

Sacarina	adoçante líquido	0,73%	1,02%	2,03%	2,9%
	adoçante pó	0,60%		1,69%	
	barra	0,40%		1,13%	
	gelatina	2,14%		6,00%	
	ice tea	1,12%		3,14%	
	iogurte	1,15%		3,23%	
	leite	0,64%		1,80%	
	vinho	1,39%		3,88%	

Relativamente a este teste todos os valores obtidos para o CVRM foram abaixo de 5% e todos os valores para o LPIR foram abaixo de 10%, o que significa que todos os valores são aceitáveis.

4.6. Análise da Exatidão

Para o estudo da exatidão são feitos ensaios com o material de referência da FAPAS T03190QC Soft Drink. Foram efetuados os estudos de repetibilidade, precisão intermédia e efetuou-se o cálculo do z-score, para determinar se o método era repetível, preciso e exato.

Começando por apresentar os resultados do teste de repetibilidade ao Fapas. Na seguinte tabela 4.12 apresentam-se os valores de coeficiente de variação relativo e limite de repetibilidade relativo para cada adoçante na fapas.

Tabela 4.12: Valores de coeficiente de variação relativo e limite de repetibilidade relativo para cada adoçante no material de referência

Adoçante	Coeficiente de variação relativo	Limite da repetibilidade relativo
Acessulfame	0,22%	0,62%
Aspartame	4,39%	12,3%
Sacarina	3,34%	9,34%

Passando para o Teste de precisão intermédia, determinou-se o coeficiente de variação relativo médio e o limite da precisão intermédia relativa para cada adoçante e apresentam-se os valores na seguinte tabela 4.13.

Tabela 4.13: coeficiente de variação relativo médio e o limite da precisão intermédia relativa para cada adoçante do material de referência

Adoçante	CVRM	LPIR
Acessulfame	2,59%	7,25%
Aspartame	2,06%	5,77%
Sacarina	1,12%	3,13%

Com limites de repetibilidade relativos abaixo de 15% e um desvio padrão da precisão intermédia relativa e o limite da precisão intermédia relativa abaixo de 5% e 10%

respetivamente, pôde-se dizer para o material de referência que os ensaios efetuados foram feitos de forma repetível e precisa.

Com esta conclusão tirada passou-se ao cálculo dos Z-scores dos dois testes para saber se os ensaios e por sua vez o método conseguia fazer determinações exatas. Os valores dos Z-scores encontram-se na seguinte tabela 4.14

Tabela 4.14: Z-score do teste de repetibilidade e Z-score médio do teste de precisão intermédia para cada adoçante do material de referência.

Adoçante	Z-score do teste de repetibilidade	Z-score médio do Teste de precisão intermédia
Acessulfame	0,47	0,48
Aspartame	0,05	0,86
Sacarina	0,27	0,10

Como se pode verificar na tabela 4.14, todos os Z-scores determinados são inferiores a 2 e, portanto, aceitáveis, ou seja, o método era capaz de dar resultados com exatidão aceitável

4.7. Teste de alteração de sensibilidade após refrigeração

Ao longo deste trabalho um dos problemas que se encontrou foi a deterioração dos adoçantes ao longo do tempo, especialmente em amostras com baixas concentrações. A deterioração podia ter de algumas causas, mas as mais preocupantes eram, deterioração por temperatura e por oxidação. Para verificar se era possível preservar amostras por um período mais alargado recorrendo à refrigeração, procedeu-se ao seguinte:

Uma sequência denominada A1 de amostras e padrões foi lida no equipamento e no dia seguinte procedeu-se à sua refrigeração a 4°C durante 2 dias e após esses 2 dias voltou-se a ler a sequência, agora denominada A2, para determinar a descida da sensibilidade da reta de calibração e se os valores das amostras eram concordantes a 95%. Adicionalmente outro conjunto de amostras e padrões foi preparado para dois conjuntos de vials, onde um conjunto chamado B1 foi lido no dia de preparação, o outro conjunto chamado B2 foi refrigerado de imediato a 4°C durante 2 dias, após esses 2 dias leu-se a sequência para determinar a descida da sensibilidade da reta de calibração e se os valores das amostras eram concordantes.

Os resultados obtidos para este teste foram insatisfatórios numa vertente importante, devido a uma falha do equipamento foram lidas apenas os valores para as retas de calibração no dia após a refrigeração, portanto não foi possível comparar valores de amostras. Uma vez que só se obtiveram valores para as retas de calibração foram apenas abordadas, as quedas de sensibilidade das retas, as variações dos valores dos padrões e se as retas produzidas possuíam uma correlação aceitável superior a 0,995. Dito isto, nas seguintes tabelas apresentam-se todos os valores relativos a este teste.

Na seguinte tabela 4.15 apresentam-se os valores das retas das sequências A1 e A2 assim como a variação e a variação relativa entre áreas para cada adoçante.

Tabela 4.15 Valores das retas de calibração das sequências A1 e A2, variação e a variação relativa entre as áreas para cada adoçante

Adoçante	Concentração mg/l	Área A1	Área A2	Varição	Varição relativa
Acessulfame	2,01	13,0	17,1	4,1	31,6%
	5,03	40,9	51,3	10,4	25,5%
	10,06	74,3	91,6	17,2	23,2%
	25,15	181,5	202,1	20,6	11,3%
	50,30	361,0	405,4	44,4	12,3%
	75,45	536,2	595,6	59,4	11,1%
	100,60	705,7	789,9	84,1	11,9%
Aspartame	1,98	54,9	15,4	-39,5	-72,0%
	4,95	122,8	18,8	-104,0	-84,7%
	9,90	267,9	91,6	-176,3	-65,8%
	24,75	676,3	351,8	-324,5	-48,0%
	49,51	1359,1	918,3	-440,8	-32,4%
	74,26	2029,0	1570,4	-458,5	-22,6%
	99,02	2698,2	2287,6	-410,6	-15,2%
Sacarina	1,73	173,5	179,1	5,5	3,2%
	4,33	452,5	448,4	-4,2	-0,9%
	8,66	884,5	887,9	3,5	0,4%
	21,65	2188,0	2178,8	-9,2	0,3%
	43,31	4360,3	4364,0	3,7	0,1%
	64,96	6356,2	6306,9	-49,2	0,5%
	86,61	8245,4	8194,7	-50,7	0,4%

Na seguinte tabela 4.16 apresentam-se os valores das retas das sequências B1 e B2 assim como a variação e a variação relativa entre áreas para cada adoçante.

Tabela 4.16: Valores das retas de calibração das sequências B1 e B2, variação e a variação relativa entre as áreas para cada adoçante

Adoçante	Concentração mg/l	Área B1	Área B2	Variação	Variação relativa
Acessulfame	2,02	15,9	13,6	-2,3	-14,3%
	5,06	35,7	32,4	-3,3	-9,3%
	10,12	75,6	64,0	-11,6	-15,3%
	25,31	183,0	161,5	-21,6	-11,8%
	50,62	368,9	340,4	-28,5	-7,7%
	75,93	557,0	508,0	-49,0	-8,8%
	101,24	746,2	668,6	-77,6	-10,4%
Aspartame	1,96	47,6	25,8	-21,7	-45,7%
	4,90	126,3	75,4	-50,9	-40,3%
	9,81	253,2	173,6	-79,6	-31,4%
	24,52	647,8	478,1	-169,8	-26,2%
	49,04	1327,8	1175,3	-152,5	-11,5%
	73,56	2031,6	1835,0	-196,6	-9,7%
	98,08	2721,6	2417,3	-304,4	-11,2%
Sacarina	1,77	174,8	172,3	-2,6	-1,5%
	4,43	455,2	438,5	-16,7	-3,7%
	8,86	888,3	892,0	3,8	0,4%
	22,15	2206,1	2191,8	-14,3	-0,6%
	44,30	4399,9	4354,6	-45,3	-1,0%
	66,46	6455,6	6411,2	-44,4	-0,7%
	88,61	8466,3	8365,0	-101,3	-1,2%

Como se pode ver nas tabelas 4.15 e 4.16, existiu uma variação alta em vários valores das soluções de calibração, especialmente nas soluções padrão de concentrações mais baixas. Nos padrões da sequência A de aspartame verificaram-se variações acima dos 80% o que era esperado, visto que o aspartame era o composto que mais facilmente se degradava. As soluções de acessulfame da sequência A também tiveram variações altas. Isto demonstra que o método usado para a sequência A não foi o suficiente para impedir degradação extrema. Ao comparar os valores para o acessulfame e aspartame da sequência B com a A tornou-se evidente que, o método usado na sequência B funcionou muito melhor para a preservação das soluções, uma vez que as variações da sequência B são significativamente mais baixas que as da sequência A.

No caso das soluções padrão da sacarina não se verificou nenhuma variação significativa, portanto se pôde concluir que ambos métodos A e B conservam bem as soluções.

Na seguinte tabela 4.17 apresentam-se as constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências A1 e A2 assim como variação e a variação relativa % para cada um dos adoçantes.

Tabela 4.17: constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências A1 e A2, variação e a variação relativa entre as constantes para cada um dos adoçantes.

Adoçante	Constante	A1	A2	Variação	Variação relativa
Acessulfame	m (Área/(mg/l))	7,0192	7,7820	0,8	10,9%
	r	0,9999	0,9999	0,0	0,0%
Aspartame	m (Área/(mg/l))	27,332	23,450	-3,9	-14,2%
	r	1,0000	0,9953	0,0	-0,5%
Sacarina	m (Área/(mg/l))	95,753	95,096	-0,7	-0,7%
	r	0,9996	0,9996	0,0	0,0%

Na seguinte tabela 4.18 apresentam-se as constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências B1 e B2 assim como variação e a variação relativa para cada um dos adoçantes.

Tabela 4.18 constantes declive e coeficiente de correlação de cada reta das sequências B1 e B2, variação e a variação relativa entre as constantes para cada um dos adoçantes.

Adoçante	Constante	B1	B2	Variação	Variação relativa
Acessulfame	m (Área/(mg/l))	7,3574	6,6602	-0,7	-9,5%
	r	1,0000	0,9999	0,0	0,0%
Aspartame	m (Área/(mg/l))	27,841	25,386	-2,5	-8,8%
	r	0,9999	0,9991	0,0	-0,1%
Sacarina	m (Área/(mg/l))	95,844	94,843	-1,0	-1,0%
	r	0,9998	0,9998	0,0	0,0%

Tendo em conta os resultados apresentados pôde-se verificar o seguinte:

Ao contrário do era esperado, os valores das áreas e a sensibilidade das retas do acessulfame da sequência A2 aumentaram em comparação às da A1 e as ambas as retas mantiveram um coeficiente de correlação aceitáveis. Este aumento é um pouco inexplicável, pois todos os outros valores dos conjuntos 2 baixaram. Uma vez que só foi possível recolher um único conjunto de dados para esta situação, são necessários mais ensaios para se poder retirar conclusões concretas e saber se esta situação foi puro acaso.

Relativamente a todos os outros resultados da sequência A2 como esperado, diminuíram na área integrada e na sensibilidade. A reta do aspartame, o composto que mais facilmente se degrada, foi a mais afetada.

Passando agora para as retas da sequência B2, todas elas mantiveram um coeficiente de correlação aceitável, portanto poderiam ser usadas para determinações, embora as sensibilidades tivessem sido mais baixas.

Por fim, as retas da sacarina em ambos os casos permanecem praticamente inalteradas. Pode-se concluir então que o método de preservação por refrigeração funciona perfeitamente para a sacarina.

5. Conclusões

Os objetivos do trabalho foram cumpridos. Confirmou-se que o método é capaz de fazer determinações simultâneas de acessulfame, aspartame e sacarina em 8 matrizes diferentes de forma exata, repetível e precisa. De tudo que foi discutido pôde-se retirar as seguintes conclusões:

Do estudo da linearidade confirmou-se a linearidade do método para todos os adoçantes. Determinou-se também que para ter retas de calibração ideais, 7 pontos de calibração são necessários para garantir que as retas, mantêm um coeficiente de correlação acima de 0,995. No entanto, para melhor averiguar os valores dos L.Q e L.D das retas é recomendado ensaios adicionais para o estudo da linearidade

Ao fazer os testes da justeza confirmou-se a justeza em todas as matrizes, uma vez que todos os valores determinados das taxas de recuperação situavam-se no intervalo de 80% a 120%. No entanto, podem ser necessários estudos adicionais nas matrizes de vinho, leite e iogurte de forma a minimizar os efeitos que as matrizes têm nas taxas de recuperação. No vinho deve-se procurar formas de melhor separar os seus compostos e nos dois produtos lácticos deve-se procurar formas de minimizar as perdas do aspartame, assim como determinar a se a sua causa é realmente devido à acidez das matrizes.

Nos estudos da repetibilidade determinou-se que todas as matrizes são capazes de produzir ensaios com repetibilidades aceitáveis, uma vez que todos os limites de repetibilidade relativos foram inferiores a 14% e conclui-se que independentemente da matriz o método tem repetibilidade aceitável.

No estudo de precisão intermédia todos os limites de precisão intermédia relativos ficaram abaixo de 10% e conclui-se que independentemente da matriz o método tem precisão intermédia aceitável.

Na análise do material de referência os estudos de repetibilidade e precisão intermédia foram aceitáveis com limites de repetibilidade relativos inferiores a 14% e os limites de precisão intermédia relativos ficaram abaixo de 10% e como todos os Z-scores dos ensaios efetuados com o fapas foram inferiores a 2 conclui-se que o método tem capacidade de dar quantificações exatas para os 3 analitos.

Por fim fez-se um estudo dos efeitos de preservação por refrigeração a 4 °C nos padrões de calibração e das retas de calibração. No caso do acessulfame é necessário fazer mais ensaios para verificar se o caso de a sensibilidade subir após a refrigeração foi um acaso. Para o aspartame só refrigeração imediata conserva como desejado as amostras. No caso das retas da sacarina, estas conservam perfeitamente a sua sensibilidade em ambos os métodos de refrigeração.

CONTRIBUIDORES DA WIKIPÉDIA (2010). SUCRALOSE. [ONLINE] WIKIPEDIA.ORG. AVAILABLE AT: [HTTPS://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/SUCRALOSE](https://pt.wikipedia.org/wiki/SUCRALOSE) [ACEDIDO 29 JUN. 2025].

CONTRIBUIDORES DA WIKIPÉDIA (2022A). ASPARTAME. [ONLINE] WIKIPEDIA.ORG. AVAILABLE AT: [HTTPS://PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/ASPARTAME](https://pt.wikipedia.org/wiki/ASPARTAME) [ACEDIDO 15 MAIO 2025].

CONTRIBUIDORES DA WIKIPÉDIA (2022B). SACARINA. [ONLINE] WIKIPEDIA.ORG. AVAILABLE AT: [HTTPS://PT.WIKIPEDIA.ORG/W/INDEX.PHP?TITLE=ESPECIAL:CITAR&PAGE=SACARINA&ID=68574107&WPFORMIDENTIFIER=TITLEFORM](https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Citar&page=Sacarina&id=68574107&wpformidentifier=titleform) [ACCESSED 29 JUN. 2025].

Anexos

Anexo A: Declaração de Integridade

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter conduzido este trabalho académico com integridade. Não plagiei ou apliquei qualquer forma de uso indevido de informações, ou falsificação de resultados ao longo do processo que levou à sua elaboração.

Declaro que o trabalho apresentado neste documento é original e da minha autoria, não tendo sido utilizado anteriormente para nenhum outro fim.

Declaro ainda que tenho pleno conhecimento do Código de Conduta Ética do P.PORTO.



ISEP, Porto, 15 de julho de 2025

Anexo B: Dados experimentais obtidos não apresentados

Neste anexo irão se apresentar todos os dados que não foram apresentados no corpo do relatório assim como quais queres exemplos de cálculo para esses mesmos dados.

Com os dados das retas obtidas anteriormente procedeu-se à determinação das concentrações dos ensaios para cada adoçante. Dito isto, apresentam-se todas as áreas determinadas e as concentrações de todos os ensaios de todas as matrizes para cada adoçante, assim como a data em que o ensaio foi feito e a massa ou volume medido de cada matriz na seguinte tabela B.1. Os valores marcados a vermelho na tabela B.1 foram rejeitados do estudo.

Tabela B.1: Data de efetuação do ensaio, Tipo de matriz do ensaio, Massa ou volume medido, Área e concentração de cada ensaio para cada adoçante

data	Amostra	Mi (g)/ Vi (ml)	Área aces	C. aces (mg/l)	Área asp	C. asp (mg/l)	Área sac	C. sac (mg/l)
09/05	vinho A	10	268,90	36,099	777,7	32,91	2631,8	27,40
	vinho B	10	267,31	35,894	850,2	35,87	2955,4	30,72
	vinho C	10	296,38	39,661	739,2	31,34	2864,6	29,79
	vinho D	10	258,88	34,800	822,1	34,72	2843,4	29,57
	vinho E	10	255,49	34,361	776,8	32,87	2614,0	27,21
	vinho F	10	268,59	36,059	783,7	33,15	2627,4	27,35
	vinho G	10	312,47	41,747	926,1	38,96	3233,1	33,58
	vinho H	10	271,83	36,479	801,8	33,89	2696,9	28,07
	leite A	2,022	733,88	96,365	2072,3	85,73	8062,5	83,21
	leite A	2,024	740,36	97,204	2090,0	86,45	8077,4	83,36
	leite B	2,048	730,57	95,935	2057,5	85,12	7982,9	82,39
	leite C	2,053	736,97	96,764	2063,9	85,39	8027,4	82,85
	leite D	5,021	796,64	104,499	2209,1	91,31	8626,6	89,01
	leite E	2,06	738,50	96,963	2057,0	85,11	8050,9	83,09
	leite F	2,055	739,78	97,129	2048,5	84,76	8033,1	82,91
	leite G	2,054	731,88	96,106	2069,1	85,60	8022,0	82,79
21/05	Barra ener. Br A	1,002	N/D	0	N/D	0	21,5	0,46
	Barra ener. Br B	1,004	N/D	0	N/D	0	26,6	0,51
	Branco gelatina	10,075	N/D	0	N/D	0	12,6	0,38
	Gelatina A	10,09	13,71	2,109	45,0	2,35	187,8	2,05
	Gelatina B	10,107	13,67	2,104	43,4	2,29	196,4	2,14
	Gelatina C	10,102	14,13	2,165	45,3	2,36	189,4	2,07
	Gelatina D	10,039	12,76	1,982	45,2	2,36	187,3	2,05
	Gelatina E	10,047	14,54	2,220	45,4	2,36	190,8	2,08
	Gelatina F	10,021	13,89	2,133	46,1	2,39	189,0	2,06
	Gelatina G	10,033	15,49	2,347	46,0	2,39	191,9	2,09
	Gelatina H	10,056	13,30	2,054	45,6	2,37	188,1	2,06
	Gelatina I	10,058	12,93	2,005	46,1	2,39	188,8	2,06
	Gelatina J	10,114	17,01	2,549	44,9	2,35	195,6	2,13
	Ice tea A	10	26,60	3,826	94,8	4,33	360,2	3,70
	Ice tea B	10	25,85	3,726	79,1	3,71	362,5	3,72
	Ice tea C	10	25,42	3,669	92,2	4,23	356,5	3,66
Ice tea D	10	24,36	3,528	102,8	4,65	350,9	3,61	
Ice tea E	10	24,51	3,547	101,2	4,58	349,7	3,60	
Ice tea F	10	24,73	3,577	52,2	2,63	373,2	3,82	
Ice tea G	10	25,08	3,623	56,2	2,80	365,0	3,74	
Ice tea H	10	24,42	3,535	98,3	4,47	352,3	3,62	

	Ice tea I	10	24,28	3,516	102,5	4,64	352,0	3,62
	Ice tea J	10	26,95	3,872	102,8	4,65	358,2	3,68
	Adoçante pó A	0,1036	151,06	20,402	182,4	7,81	1776,1	17,21
	Adoçante pó B	0,1029	150,22	20,291	222,0	9,39	1782,9	17,28
	Adoçante pó C	0,1022	152,47	20,590	152,7	6,63	1799,4	17,44
	Adoçante pó D	0,1012	145,11	19,610	160,5	6,94	1761,7	17,08
	Adoçante pó E	0,1037	148,90	20,115	165,9	7,16	1765,9	17,12
	Adoçante pó F	0,1008	154,17	20,816	235,6	9,93	1801,6	17,46
	Adoçante pó G	0,1017	150,33	20,305	221,5	9,37	1768,4	17,14
	Adoçante pó H	0,1013	151,01	20,396	142,3	6,22	1774,5	17,20
	Adoçante pó I	0,1021	151,03	20,399	190,1	8,12	1788,0	17,33
	Adoçante pó J	0,1033	152,11	20,542	111,6	5,00	1777,9	17,23
22/05	Vinho A	10	255,59	34,951	858,0	46,65	2639,7	26,93
	Vinho B	10	248,99	34,049	821,9	44,93	2636,8	26,89
	Ice tea A	10	25,06	3,440	107,6	9,73	350,1	3,55
	Ice tea B	10	24,32	3,338	101,8	9,33	346,4	3,52
	Gelatina A	10,009	13,68	1,871	39,8	4,97	174,8	1,88
	Gelatina B	10,008	13,47	1,842	34,8	4,63	171,8	1,85
	Adoçante pó	0,1	146,80	20,220	460,6	27,79	1681,0	16,26
	Adoçante pó B	0,1003	146,60	20,192	375,6	23,76	1687,0	16,32
	Adoçante pó C	0,1007	134,60	18,538	386,9	24,29	1538,0	14,89
	Adoçante pó D	0,1009	134,30	18,497	310,9	23,99	1566,0	15,16
	Adoçante pó E	0,101	141,90	19,544	373,1	23,64	1654,0	16,00
	Adoçante pó F	0,1008	150,90	20,785	382,9	24,10	1751,0	16,93
	Adoçante pó G	0,1016	296,50	40,537	870,1	47,22	3404,0	35,04
	Adoçante pó H	0,1008	149,70	20,619	386,6	24,28	1740,0	16,82
	Adoçante pó I	0,1001	150,80	20,771	348,5	22,47	1722,0	16,65
		Barra ener. Branco	1,028	N/D	0	N/D	0	19,5
	Barra ener. A	1,023	352,10	48,129	2220,0	111,29	7977,0	83,56

	Barra ener. B	1,019	707,10	96,601	2217,0	111,14	7949,0	83,27
	Barra ener. C	1,03	703,90	96,164	2209,0	110,76	7964,0	83,43
	Barra ener. D	1,039	705,80	96,423	2198,0	110,24	7941,0	83,18
	Barra ener. E	1,007	697,60	95,304	2203,0	110,48	7912,0	82,87
	Barra ener. F	1,01	675,50	92,286	1086,0	57,47	7919,0	82,95
	Barra ener. G	1,025	702,90	96,027	2157,0	108,30	7964,0	83,43
	Barra ener. H	1,014	704,60	96,260	2209,0	110,76	7934,0	83,11
	Barra ener. I	1,01	684,10	93,460	2204,0	110,53	7692,0	80,54
	Barra ener. J	1,017	701,00	95,768	2235,0	112,00	7777,0	81,44
	Leite A	0,1037	362,20	49,508	1055,0	56,00	4160,0	43,06
	Leite B	0,1008	351,00	47,978	1027,0	54,67	4025,0	41,63
	Adoçante pó	0,103	148,80	21,373	318,9	17,42	1755,7	18,12
	Adoçante pó B	0,1021	151,17	21,711	347,5	18,55	1769,4	18,27
	Vinho A	10	190,90	27,384	807,6	36,74	2610,6	27,39
	Vinho B	10	188,29	27,011	806,7	36,70	2558,0	26,82
	Ice tea A	10	23,49	3,442	96,8	8,63	336,8	3,28
	Ice tea B	10	23,02	3,374	105,0	8,96	341,0	3,33
	Gelatina A	10,008	13,59	1,995	43,2	4,39	165,1	1,53
	Gelatina B	10,016	13,09	1,922	43,4	4,40	166,5	1,55
	Barra ener. Branco	1,0141	N/D	0	N/D	0	16,1	0,01
	Barra ener. A	1,025	619,99	88,662	2338,0	97,25	7708,6	82,70
	Barra ener. B	1,0164	620,56	88,744	2319,1	96,51	7717,7	82,80
27/05	Leite A	2,019	628,86	89,929	2218,2	92,52	7701,8	82,63
	Leite B	2,0149	632,33	90,424	2248,1	93,70	7818,3	83,89
	Adoçante Liq. A co4	10,0274	126,53	18,191	503,7	24,72	1696,9	17,48
	Adoçante Liq. B	10,002	126,66	18,210	504,8	24,77	1694,0	17,45
	Adoçante Liq. C	10,0454	128,53	18,477	504,6	24,76	1694,9	17,46
	Adoçante Liq. D	10,024	126,94	18,250	501,7	24,65	1687,9	17,38
	Adoçante Liq. E	10,0195	128,55	18,480	497,6	24,48	1696,5	17,47
	Adoçante Liq. F	10,0157	126,08	18,128	499,1	24,54	1694,5	17,45
	Adoçante Liq. G	10,0368	128,75	18,509	507,9	24,89	1691,9	17,43

	Adoçante Liq. H	10,0294	126,97	18,255	496,4	24,43	1681,1	17,31
	Adoçante Liq. I	10,0175	128,78	18,513	503,3	24,71	1691,3	17,42
	Adoçante Liq. J	10,0064	127,97	18,398	502,6	24,68	1699,5	17,51
02/06	Vinho A	10	312,98	42,353	966,0	34,13	3034,3	29,25
	Vinho B	10	301,25	40,776	987,4	34,88	2995,6	28,88
	Ice tea A	10	26,37	3,710	116,3	4,39	352,1	3,39
	Ice tea B	10	25,78	3,631	118,1	4,45	342,1	3,29
	Leite A	2,0029	730,17	98,471	2189,7	77,00	8672,1	83,91
	Leite B	2,0001	736,06	99,262	2193,2	77,13	8670,2	83,89
	Barra ener. Branco	0,9998	N/D	0	N/D	0	13,6	0,15
	Barra ener. A	1,0036	725,78	97,880	2256,8	79,36	8517,8	82,41
	Barra ener. B	1,0117	707,59	95,434	2229,8	78,41	8479,3	82,04
	Gelatina A	10,008	14,25	2,071	43,7	1,82	170,2	1,65
	Gelatina B	10,01	14,74	2,138	43,8	1,82	169,9	1,64
	Adoçante pó A	0,1012	142,66	19,443	466,1	16,61	1796,3	17,25
	Adoçante pó B	0,101	139,38	19,002	450,2	16,05	1789,7	17,19
	Adoçante Liq. A	10	148,66	20,250	552,0	19,62	1785,4	17,15
	Adoçante Liq. B	10,025	143,24	19,521	545,7	19,40	1758,4	16,88
	logurt. A	2,0638	727,06	98,052	2423,6	85,20	8545,3	82,68
	logurt. B	2,0265	725,40	97,829	2390,9	84,05	8543,3	82,66
	logurt. C	2,0221	724,35	97,688	2439,5	85,76	8560,0	82,82
	logurt. D	2,0115	733,34	98,897	2420,3	85,09	8531,3	82,54
	logurt. E	2,0158	730,40	98,501	2422,4	85,16	8536,5	82,59
logurt. F	2,0011	726,35	97,957	2428,5	85,37	8590,9	83,12	
logurt. G	2,0255	716,66	96,653	2396,7	84,26	8450,2	81,76	
logurt. H	2,0177	716,74	96,664	2414,4	84,88	8475,3	82,00	
logurt. I	2,0139	721,02	97,239	2423,7	85,20	8542,0	82,65	
logurt. J	2,025	726,44	97,968	2399,2	84,35	8536,9	82,60	
03/6	Vinho A	10	337,35	44,705	969,3	42,27	2853,2	27,36
	Vinho B	10	334,12	44,276	961,7	41,97	2740,9	26,28
	Ice tea A	10	26,66	3,321	108,8	8,16	355,3	3,37
	Ice tea B	10	27,39	3,420	111,7	8,27	354,1	3,36
	Leite A	2,0029	760,31	100,859	2291,0	94,67	8692,1	83,56
	Leite B	2,0001	757,50	100,485	2275,9	94,08	8678,4	83,42
	Barra ener. Branco	0,9998	N/D	0	N/D	0	21,4	0,16
	Barra ener. A	1,0036	734,28	97,403	2346,9	96,89	8488,3	81,60

	Barra ener. B	1,0117	728,41	96,623	2362,3	97,50	8497,8	81,69
	Gelatina A	10,008	17,39	2,060	35,7	3,47	175,4	1,64
	Gelatina B	10,01	16,47	1,935	35,7	3,47	176,9	1,66
	Adoçante pó B	0,101	298,80	39,588	997,8	43,40	3543,4	34,00
	Adoçante Liq. A	10	148,99	19,698	554,5	25,83	1801,9	17,24
	Adoçante Liq. B	10,025	142,30	18,811	544,2	25,42	1763,2	16,87
	logurt. A	2,0638	749,11	99,371	2458,8	101,33	8570,0	82,38
	logurt. B	2,0265	748,58	99,301	2510,0	103,36	8612,1	82,79
09/06	Vinho A	10	255,86	34,980	904,5	33,00	2830,0	28,66
	Vinho B	10	272,44	37,242	912,8	33,31	2867,4	29,04
	Ice tea A	10	36,07	4,876	115,4	4,46	362,6	3,54
	Ice tea B	10	35,93	4,856	111,0	4,30	361,9	3,53
	Leite A	2,0302	734,95	100,337	2151,3	77,93	8303,0	85,35
	Leite B	2,0274	756,10	103,222	2153,0	77,99	8310,6	85,43
	Barra ener. Branco	1,0185	N/D	0	N/D	0	21,4	0,17
	Barra ener. A	1,003	735,31	100,386	2249,1	81,46	8212,3	84,41
	Barra ener. B	1,0505	745,18	101,733	2277,0	82,46	8309,1	85,42
	Gelatina A	10,011	16,80	2,224	45,5	1,89	180,1	1,74
	Gelatina B	10,039	15,75	2,079	43,7	1,83	176,3	1,70
	Adoçante pó A	0,1005	157,19	21,520	384,6	14,27	1814,7	18,14
	Adoçante pó B	0,1005	156,94	21,485	470,7	17,37	1818,7	18,18
	Adoçante pó C	0,1004	147,43	20,189	423,0	15,66	1765,5	17,63
	Adoçante pó D	0,1003	150,71	20,636	443,1	16,38	1790,5	17,89
	Adoçante pó E	0,1003	149,64	20,490	436,2	16,13	1785,6	17,84
	Adoçante pó F	0,1006	146,84	20,108	472,4	17,44	1786,9	17,85
	Adoçante pó G	0,101	150,69	20,633	458,2	16,92	1787,4	17,85
	Adoçante pó H	0,1007	153,33	20,993	430,2	15,92	1791,3	17,89
	Adoçante pó I	0,1001	153,27	20,985	452,7	16,73	1799,3	17,98
Adoçante pó J	0,1013	149,82	20,515	442,9	16,37	1776,6	17,74	
Adoçante Liq. A	10,0159	155,98	21,354	551,6	20,29	1801,6	18,00	
Adoçante Liq. B	10,0323	149,20	20,429	555,8	20,44	1793,7	17,92	

11/6	logurt. A	2,0046	740,67	101,117	2353,1	85,20	8282,0	85,14
	logurt. B	2,0047	732,53	100,007	2340,3	84,74	8270,9	85,02
	Vinho A	10	267,57	36,334	959,1	35,97	2729,1	27,76
	Vinho B	10	269,26	36,565	945,0	35,44	2696,3	27,42
	Ice tea A	10	29,31	3,851	114,8	4,61	352,0	3,43
	Ice tea B	10	30,08	3,954	115,9	4,65	355,3	3,46
	Leite A	2,0133	723,45	98,876	2114,3	78,88	8175,2	84,66
	Leite B	2,0118	728,38	99,552	2135,5	79,67	8228,7	85,22
	Barra ener. Branco	1,0083	N/D	0	N/D	0	23,4	0,17
	Barra ener. A	1,0134	724,74	99,053	2269,7	84,65	8151,7	84,42
	Barra ener. B	1,0095	722,00	98,677	2246,1	83,77	8100,9	83,89
	Gelatina A	10	18,10	2,351	47,5	2,15	177,9	1,70
	Gelatina B	10,006	18,87	2,454	44,9	2,05	171,9	1,64
	Adoçante pó A	0,1007	151,55	20,417	459,4	17,41	1784,2	17,89
	Adoçante pó B	0,1008	150,57	20,282	451,4	17,11	1754,2	17,57
	Adoçante Liq. A	10,005	149,33	20,112	572,8	21,62	1792,8	17,98
	Adoçante Liq. B	10,0248	152,17	20,501	568,8	21,47	1789,6	17,94
	logurt. A	2,019	723,64	98,902	2359,2	87,97	8196,8	84,89
	logurt. B	2,0189	715,38	97,769	2324,5	86,69	8109,4	83,98
	12/06	Vinho A	10	248,57	34,860	919,2	33,73	2707,3
Vinho B		10	248,05	34,786	896,7	32,90	2698,3	27,41
Ice tea A		10	27,60	3,621	111,5	4,26	349,4	3,39
Ice tea B		10	27,12	3,555	115,3	4,39	359,5	3,49
Leite A		2,0216	716,09	101,465	2171,9	79,56	8146,0	84,30
Leite B		2,0371	702,86	99,580	2159,1	79,09	8098,1	83,80
Barra ener. Branco		1	N/D	0	N/D	0	13,4	0,05
Barra ener. A		1,006	681,12	96,484	2286,2	83,74	8066,1	83,47
Barra ener. B		1,0246	691,84	98,011	2244,0	82,20	8045,9	83,26
Gelatina A		10,0016	17,74	2,246	50,8	2,05	190,6	1,81
Gelatina B		10,0119	16,88	2,127	54,1	2,17	180,9	1,71
Adoçante pó A		0,1023	148,18	20,558	470,1	17,29	1763,4	17,64
Adoçante pó B		0,1012	148,30	20,574	458,6	16,87	1782,7	17,85
Adoçante Liq. A		10,0019	145,02	20,107	557,0	20,47	1769,9	17,71
Adoçante Liq. B		10,0162	148,13	20,550	556,6	20,46	1770,9	17,72

13/06	logurt. A	2,0296	678,10	96,053	2320,8	85,01	7841,0	81,12
	logurt. B	2,0081	713,37	101,078	2406,7	88,15	8127,8	84,11
	Leite A	2,0371	702,58	105,741	2177,5	88,41	8147,2	85,32
	Leite B	2,0112	708,00	106,555	2133,9	86,69	8083,1	84,64
	Adoçante pó A	0,1021	158,60	24,066	407,4	18,68	1807,7	18,48
	Adoçante pó B	0,1011	159,73	24,235	376,0	17,44	1800,6	18,40
	Adoçante Liq. A	10,0198	142,92	21,711	527,7	23,42	1784,0	18,23
	Adoçante Liq. B	10,019	150,56	22,858	532,3	23,60	1773,1	18,11
	logurt. A	2,0203	687,40	103,462	2396,0	97,01	8096,7	84,79
	logurt. B	2,0149	737,19	110,938	2391,6	96,84	8202,6	85,90

Com as concentrações dos ensaios determinadas passou-se à determinação dos CVR e das taxas de recuperação dos ensaios em duplicado. Portanto, nas seguintes tabelas B.2, B.3 e B.4 apresentam-se todos os dados adicionais necessários usados no cálculo dos valores mencionados, assim com as datas em que os ensaios foram feitos.

Tabela B.2: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio do acessulfame

data	matriz	vi ml	ci mg/L	vf ml	cf mg/L	valor médio ensaio mg/L	CVR	taxa recup	taxa recup passa
09/mai	leite	20	513,02	100	102,60	96,78	0,61%	94,3%	OK
	vinho	3	513,02	50	30,78	36,00	0,40%	116,9%	OK
21/mai	adoçante pó	4	507,81	100	20,31	20,35	0,39%	100,2%	OK
	ice tea	0,4	507,81	50	4,06	3,78	1,88%	92,9%	OK
	gelatina	0,4	507,81	100	2,03	2,11	0,18%	103,7%	OK
22/mai	barra	20	506,61	100	101,32	96,38	0,32%	95,1%	OK
	leite	10	506,61	100	50,66	48,74	2,22%	96,2%	OK
	vinho	3	506,61	50	30,40	34,50	1,85%	113,5%	OK
	adoçante pó	4	506,61	100	20,26	20,21	0,10%	99,7%	OK
	ice tea	0,4	506,61	50	4,05	3,39	2,14%	83,6%	OK
	gelatina	0,4	506,61	100	2,03	1,86	1,11%	91,6%	OK
27/mai	leite	20	501,40	100	100,28	90,18	0,39%	89,9%	OK
	barra	20	501,40	100	100,28	88,70	0,07%	88,5%	OK
	vinho	3	501,40	50	30,08	27,20	0,97%	90,4%	OK
	adoçante pó	4	501,40	100	20,06	21,54	1,11%	107,4%	OK
	adoçante líquido	4	501,40	100	20,06	18,20	0,07%	90,7%	OK
	ice tea	0,4	501,40	50	4,01	3,41	1,42%	85,0%	OK
	gelatina	0,4	501,40	100	2,01	1,96	2,63%	97,6%	OK
02/jun	leite	20	515,43	100	103,09	98,87	0,57%	95,9%	OK
	iogurte	20	515,43	100	103,09	97,94	0,16%	95,0%	OK
	barra	20	515,43	100	103,09	96,66	1,79%	93,8%	OK
	vinho	3	515,43	50	30,93	41,56	2,68%	134,4%	K.O
	adoçante líquido	4	515,43	100	20,62	19,89	2,59%	96,5%	OK
	adoçante pó	4	515,43	100	20,62	19,22	1,62%	93,2%	OK
	ice tea	0,4	515,43	50	4,12	3,67	1,53%	89,0%	OK
	gelatina	0,4	515,43	100	2,06	2,10	2,23%	102,1%	OK
03/jun	leite	20	515,43	100	103,09	100,67	0,26%	97,7%	OK
	iogurte	20	515,43	100	103,09	99,34	0,05%	96,4%	OK
	barra	20	515,43	100	103,09	97,01	0,57%	94,1%	OK
	vinho	3	515,43	50	30,93	44,49	0,68%	143,9%	K.O
	adoçante líquido	4	515,43	100	20,62	19,25	3,26%	93,4%	OK

	ice tea	0,4	515,43	50	4,12	3,37	2,09%	81,7%	OK
	gelatina	0,4	515,43	100	2,06	2,00	4,42%	96,9%	OK
09/jun	iogurte	20	514,23	100	102,85	100,56	0,78%	97,8%	OK
	barra	20	514,23	100	102,85	101,06	0,94%	98,3%	OK
	leite	20	514,23	100	102,85	101,78	2,00%	99,0%	OK
	vinho	3	514,23	50	30,85	36,11	4,43%	117,0%	OK
	adoçante pó	4	514,23	100	20,57	21,50	0,12%	104,5%	OK
	adoçante líquido	4	514,23	100	20,57	20,89	3,13%	101,6%	OK
	ice tea	0,4	514,23	50	4,11	4,87	0,29%	118,3%	OK
	gelatina	0,4	514,23	100	2,06	2,15	4,74%	104,6%	OK
11/jun	barra	20	511,42	100	102,28	98,86	0,27%	96,7%	OK
	iogurte	20	511,42	100	102,28	98,34	0,81%	96,1%	OK
	leite	20	511,42	100	102,28	99,21	0,48%	97,0%	OK
	vinho	3	511,42	50	30,69	36,45	0,45%	118,8%	OK
	adoçante pó	4	511,42	100	20,46	20,35	0,47%	99,5%	OK
	adoçante líquido	4	511,42	100	20,46	20,31	1,35%	99,3%	OK
	ice tea	0,4	511,42	50	4,09	3,90	1,87%	95,4%	OK
	gelatina	0,4	511,42	100	2,05	2,40	3,02%	117,4%	OK
12/jun	leite	20	503,00	100	100,60	100,52	1,33%	99,9%	OK
	barra	20	503,00	100	100,60	97,25	1,11%	96,7%	OK
	iogurte	20	503,00	100	100,60	98,57	3,60%	98,0%	OK
	vinho	3	503,00	50	30,18	34,82	0,15%	115,4%	OK
	adoçante pó	4	503,00	100	20,12	20,57	0,06%	102,2%	OK
	adoçante líquido	4	503,00	100	20,12	20,33	1,54%	101,0%	OK
	ice tea	0,4	503,00	50	4,02	3,59	1,30%	89,2%	OK
	gelatina	0,4	503,00	100	2,01	2,19	3,86%	108,7%	OK
13/jun	leite	20	506,21	100	101,24	106,15	0,54%	104,8%	OK
	iogurte	20	506,21	100	101,24	107,20	4,93%	105,9%	OK
	adoçante pó	4	506,21	100	20,25	24,15	0,49%	119,3%	OK
	adoçante líquido	4	506,21	100	20,25	22,28	3,64%	110,1%	OK

Tabela B.3: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio do aspartame

data	matriz	vi ml	ci mg/L	vf ml	cf mg/L	valor médio Ensaio mg/L	CVR%	taxa recup	taxa recup passa
09/mai	leite	20	494,70	100	98,94	86,09	0,59%	87,0%	OK
	vinho	3	494,70	50	29,68	33,40	2,08%	112,5%	OK
	ice tea	0,4	507,81	50	4,06	4,28	1,69%	105,3%	OK
21/mai	gelatina	0,4	507,81	100	2,03	2,32	1,92%	114,1%	OK
	adoçante pó	4	507,81	100	20,3124	7,66	21%	38%	K.O
22/mai	barra	20	491,96	100	98,39	111,21	0,09%	113,0%	OK
	leite	10	491,96	100	49,20	55,33	1,70%	112,5%	OK
	adoçante pó	4	498,62	100	19,94	23,11	3,93%	115,9%	OK
	vinho	3	491,96	50	29,52	45,79	2,65%	155,1%	K.O
	ice tea	0,4	491,96	50	3,94	9,53	3,02%	242,1%	K.O
	gelatina	0,4	491,96	100	1,96784	4,80	5%	244%	K.O
27/mai	barra	20	513,52	100	102,70	96,88	0,54%	94,3%	OK
	leite	20	513,52	100	102,70	93,11	0,90%	90,7%	OK
	vinho	3	513,52	50	30,81	36,72	0,07%	119,2%	OK
	adoçante liquido	4	513,52	100	20,54	24,51	0,17%	119,3%	OK
	adoçante pó	4	513,52	100	20,54	17,98	4,45%	87,5%	OK
	ice tea	0,8	513,52	50	8,22	8,79	2,61%	107,0%	OK
	gelatina	0,8	513,52	100	4,11	4,40	0,19%	107,0%	OK
	02/jun	iogurte	20	501,76	100	100,35	84,63	0,96%	84,3%
vinho		3	501,76	50	30,11	34,50	1,54%	114,6%	OK
adoçante liquido		4	501,76	100	20,07	19,51	0,79%	97,2%	OK
adoçante pó		4	501,76	100	20,07	16,33	2,42%	81,4%	OK
ice tea		0,4	501,76	50	4,01	4,42	1,00%	110,1%	OK
gelatina		0,4	501,76	100	2,01	1,82	0,16%	90,8%	OK
barra		20	501,76	100	100,35	78,88	0,85%	78,6%	K.O
leite		20	501,76	100	100,35	77,06	0,11%	76,8%	K.O
03/jun	iogurte	20	501,76	100	100,35	102,34	1,40%	102,0%	OK
	barra	20	501,76	100	100,35	97,20	0,44%	96,9%	OK
	leite	20	501,76	100	100,35	94,38	0,45%	94,0%	OK
	vinho	3	501,76	50	30,11	42,12	0,50%	139,9%	K.O

	adoçante líquido	4	501,76	100	20,07	25,62	1,13%	127,7%	K.O
	ice tea	0,4	501,76	50	4,01	8,21	0,99%	204,6%	K.O
	gelatina	0,4	501,76	100	2,01	3,47	0,01%	173,1%	K.O
09/jun	iogurte	20	494,31	100	98,86	84,97	0,38%	85,9%	OK
	barra	20	494,31	100	98,86	81,96	0,87%	82,9%	OK
	vinho	3	494,31	50	29,66	33,15	0,64%	111,8%	OK
	adoçante líquido	4	494,31	100	19,77	20,36	0,53%	103,0%	OK
	adoçante pó	4	494,31	100	19,77	17,41	0,25%	88,0%	OK
	ice tea	0,4	494,31	50	3,95	4,38	2,60%	110,7%	OK
	gelatina	0,4	494,31	100	1,98	1,86	2,44%	93,9%	OK
	leite	20	494,31	100	98,86	77,96	0,06%	78,9%	K.O
11/jun	iogurte	20	503,72	100	100,74	87,33	1,04%	86,7%	OK
	barra	20	503,72	100	100,74	84,21	0,74%	83,6%	OK
	vinho	3	503,72	50	30,22	35,71	1,04%	118,1%	OK
	adoçante líquido	4	503,72	100	20,15	21,54	0,49%	106,9%	OK
	adoçante pó	4	503,72	100	20,15	17,26	1,23%	85,7%	OK
	ice tea	0,4	503,72	50	4,03	4,63	0,60%	114,8%	OK
	gelatina	0,4	503,72	100	2,01	2,10	3,37%	104,0%	OK
	leite	20	503,72	100	100,74	79,27	0,70%	78,7%	K.O
12/jun	iogurte	20	495,10	100	99,02	86,58	2,57%	87,4%	OK
	barra	20	495,10	100	99,02	82,97	1,32%	83,8%	OK
	leite	20	495,10	100	99,02	79,32	0,42%	80,1%	OK
	vinho	3	495,10	50	29,71	33,31	1,75%	112,1%	OK
	adoçante líquido	4	495,10	100	19,80	20,46	0,05%	103,3%	OK
	adoçante pó	4	495,10	100	19,80	17,08	1,74%	86,3%	OK
	ice tea	0,4	495,10	50	3,96	4,33	2,23%	109,2%	OK
	gelatina	0,4	495,10	100	1,98	2,11	4,03%	106,7%	OK
13/jun	iogurte	20	490,40	100	98,08	96,93	0,13%	98,8%	OK
	leite	20	490,40	100	98,08	87,55	1,39%	89,3%	OK
	adoçante líquido	4	490,40	100	19,62	23,51	0,55%	119,9%	OK
	adoçante pó	4	490,40	100	19,62	18,06	4,84%	92,1%	OK

Tabela B.4: Data de ensaio; Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, CVR, Taxa de recuperação e aceitação ou falha da taxa de recuperação para os ensaio da sacarina

data	matriz	vi ml	ci mg/L	vf ml	cf mg/L	valor médio ensaio mg/L	CVR	taxa recup	Taxa recup passa
09/mai	leite	20	430,30	100	86,06	83,29	0,13%	96,8%	OK
	vinho	3	430,30	50	29,68	27,73	1,71%	93,4%	OK
21/mai	adoçante pó	4	439,25	100	17,57	17,25	0,26%	98,2%	OK
	gelatina	0,4	439,25	100	1,76	2,09	2,80%	119,2%	OK
	ice tea	0,4	439,25	50	3,51	3,71	0,43%	105,5%	OK
22/mai	adoçante pó	4	437,53	100	17,50	16,29	0,25%	93,1%	OK
	barra	20	437,53	100	87,51	83,42	0,25%	95,3%	OK
	gelatina	0,4	437,53	100	1,75	1,86	1,09%	106,4%	OK
	ice tea	0,4	437,53	50	3,50	3,53	0,71%	100,9%	OK
	leite	10	437,53	100	43,75	42,34	2,39%	96,8%	OK
27/mai	vinho	3	437,53	50	26,25	26,91	0,08%	102,5%	OK
	adoçante liquido	4	432,71	100	17,31	17,46	0,13%	100,9%	OK
	adoçante pó	4	432,71	100	17,31	18,19	0,58%	105,1%	OK
	barra	20	432,71	100	86,54	82,75	0,08%	95,6%	OK
	gelatina	0,4	432,71	100	1,73	1,54	0,66%	88,9%	OK
	ice tea	0,4	432,71	50	3,46	3,31	0,91%	95,5%	OK
	leite	20	432,71	100	86,54	83,26	1,07%	96,2%	OK
02/jun	vinho	3	432,71	50	25,96	27,11	1,49%	104,4%	OK
	adoçante liquido	4	501,76	100	20,07	17,02	1,09%	84,8%	OK
	adoçante pó	4	501,76	100	20,07	17,22	0,26%	85,8%	OK
	barra	20	501,76	100	100,35	82,23	0,32%	81,9%	OK
	gelatina	0,4	501,76	100	2,01	1,64	0,12%	81,9%	OK
	ice tea	0,4	501,76	50	4,01	3,34	2,02%	83,2%	OK
	iogurte	20	501,76	100	100,35	82,67	0,02%	82,4%	OK
03/jun	leite	20	501,76	100	100,35	83,90	0,02%	83,6%	OK
	vinho	3	501,76	50	30,11	29,07	0,91%	96,5%	OK
	adoçante liquido	4	434,43	100	17,38	17,05	1,54%	98,1%	OK
	barra	20	434,43	100	86,89	81,64	0,08%	94,0%	OK
	gelatina	0,4	434,43	100	1,74	1,65	0,60%	95,0%	OK
	ice tea	0,4	434,43	50	3,48	3,37	0,25%	96,9%	OK
03/jun	iogurte	20	434,43	100	86,89	82,58	0,35%	95,0%	OK
	leite	20	434,43	100	86,89	83,49	0,11%	96,1%	OK

	vinho	3	434,43	50	26,07	26,82	2,85%	102,9%	OK
09/jun	adoçante líquido	4	442,00	100	17,68	17,96	0,32%	101,6%	OK
	adoçante pó	4	442,00	100	17,68	18,16	0,16%	102,7%	OK
	barra	20	442,00	100	88,40	84,92	0,84%	96,1%	OK
	gelatina	0,4	442,00	100	1,77	1,72	1,54%	97,3%	OK
	ice tea	0,4	442,00	50	3,54	3,53	0,14%	99,9%	OK
	iogurte	20	442,00	100	88,40	85,08	0,10%	96,2%	OK
	leite	20	442,00	100	88,40	85,39	0,07%	96,6%	OK
	vinho	3	442,00	50	26,52	28,85	0,95%	108,8%	OK
11/jun	adoçante líquido	4	442,00	100	17,68	17,96	0,13%	101,6%	OK
	adoçante pó	4	442,00	100	17,68	17,73	1,25%	100,3%	OK
	barra	20	442,00	100	88,40	84,15	0,45%	95,2%	OK
	gelatina	0,4	442,00	100	1,77	1,67	2,52%	94,4%	OK
	ice tea	0,4	442,00	50	3,54	3,44	0,68%	97,3%	OK
	iogurte	20	442,00	100	88,40	84,43	0,76%	95,5%	OK
	leite	20	442,00	100	88,40	84,94	0,47%	96,1%	OK
	vinho	3	442,00	50	26,52	27,59	0,88%	104,0%	OK
12/jun	adoçante líquido	4	433,05	100	17,32	17,72	0,04%	102,3%	OK
	adoçante pó	4	433,05	100	17,32	17,74	0,80%	102,4%	OK
	barra	20	433,05	100	86,61	83,36	0,18%	96,2%	OK
	gelatina	0,4	433,05	100	1,73	1,76	3,87%	101,7%	OK
	ice tea	0,4	433,05	50	3,46	3,44	2,06%	99,2%	OK
	iogurte	20	433,05	100	86,61	82,61	2,56%	95,4%	OK
	leite	20	433,05	100	86,61	84,05	0,42%	97,0%	OK
	vinho	3	433,05	50	25,98	27,45	0,24%	105,7%	OK
13/jun	adoçante líquido	4	443,04	100	17,72	18,17	0,44%	102,5%	OK
	adoçante pó	4	443,04	100	17,72	18,44	0,29%	104,0%	OK
	iogurte	20	443,04	100	88,61	85,34	0,93%	96,3%	OK
	leite	20	443,04	100	88,61	84,98	0,56%	95,9%	OK

Dos ensaios exemplificados nas tabelas B.2, B.3 e B.4 foram rejeitados todos os ensaios que não passassem na taxa de recuperação e que os CVRs fossem superior a 5%.

Para o cálculo dos valores das taxas de recuperação e CVR para o teste de repetibilidade utilizaram-se os dados da seguinte tabela B.5.

Tabela B.5: Matriz do ensaio, Volume de fortificação (Vi) ml, Concentração da solução fortificante (Ci) mg/l, Volume final da amostra (Vf) ml, Concentração final esperada da amostra (Cf) mg/l, Valor médio do ensaio obtido mg/l, para os ensaios do teste de recuperação para cada adoçante

Adoçante	matriz	vi ml	ci mg/L	vf ml	cf mg/L	valor médio obtido mg/L
Acessulfame	adoçante líquido	4,00	501,401	100	20,05604	18,34
	adoçante pó	4,00	507,81	100	20,3124	20,35
	barra energética	20,00	506,611	100	101,32224	95,37
	gelatina	0,40	507,81	100	2,03124	2,10
	ice tea	0,40	507,81	50	4,06248	3,64
	iogurte	20,00	515,429	100	103,0858	97,74
	leite	20,00	513,02	100	102,604	96,64
	vinho	3,00	513,02	50	30,7812	36,19
Aspartame	adoçante líquido	4	513,52	100	20,54	24,64
	adoçante pó	4	494,31	100	19,77	16,55
	barra	20	491,96	100	98,39	110,61
	gelatina	0,4	507,81	100	2,03	2,36
	ice tea	0,4	507,81	50	4,06	4,50
	iogurte	20	501,76	100	100,35	84,93
	leite	20	494,70	100	98,94	85,45
	vinho	3	494,70	50	29,68	33,54
Sacarina	adoçante líquido	4	432,71	100	17,31	17,44
	adoçante pó	4	439,25	100	17,57	17,25
	barra	20	437,53	100	87,51	82,78
	gelatina	0,4	439,25	100	1,76	2,08
	ice tea	0,4	439,25	50	3,51	3,68
	iogurte	20	501,76	100	100,35	82,54
	leite	20	430,30	100	86,06	82,94
	vinho	3	430,30	50	29,68	28,59

Para calcular as taxas de recuperação efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Taxa de recuperação} = 1 - \frac{Cf - \text{valor médio do ensaio}}{Cf} \times 100$$

Este cálculo foi feito para todos os ensaios, sejam eles para o teste de repetibilidade ou precisão intermédia para matrizes ou material de referência

Apresenta-se a seguir um exemplo de cálculo para o ensaio de 13 de junho à matriz do leite para o teste de precisão intermédia.

$$\text{Taxa de recuperação} = 1 - \frac{88,61 - 84,98}{88,61} \times 100 = 95,9\%$$

Com os ensaios das amostras calculados passa-se para os dados obtidos para o material de referência. Exposto na seguinte B.6 semelhante à tabela B.1 estão todas as áreas determinadas e as concentrações de todos os ensaios do material de referência para cada adoçante, assim como a data em que o ensaio foi feito. O valores marcados a vermelho na tabela B.6 foram rejeitados do estudo.

Tabela B.6: Data de efetuação do ensaio, Área e concentração de cada ensaio para cada adoçante nos ensaios ao material de referência FAPAS T03190QC

data	Amostra	Abs aces	C. aces (mg/l)	Abs asp	C asp (mg/l)	Abs sac	C sac (mg/l)
09/mai	fapas A	31,528	35,66	808,18	341,5	1454,7	153,0
	fapas B	31,640	35,85	1215,33	507,6	1466,8	154,2
	fapas C	31,601	35,78	857,35	361,6	1552,9	163,1
	fapas D	31,520	35,65	796,05	336,6	1449,4	152,5
	fapas E	31,611	35,80	748,86	317,3	1404,6	147,9
	fapas F	31,629	35,83	835,89	352,8	1511,4	158,8
	fapas G	31,580	35,75	849,76	358,5	1545,0	162,3
	fapas H	31,534	35,67	811,11	342,7	1476,2	155,2
22/mai	fapas A	28,113	38,61	844,25	460,0	1463,0	141,8
	fapas B	26,300	36,11	831,34	453,8	1471,0	142,5
27/mai	fapas A	23,863	34,97	831,71	376,9	1477,8	151,0
	fapas B	23,803	34,88	818,33	371,6	1456,8	148,7
02/jun	fapas A	26,845	37,74	875,67	309,6	1506,3	144,4
	fapas B	27,984	39,28	881,82	311,8	1525,2	146,2
03/jun	fapas A	54,749	71,44	858,72	378,9	1528,2	146,1
	fapas B	44,739	57,81	835,91	369,8	1527,8	146,0
09/jun	fapas A	35,017	47,31	865,06	315,8	1528,0	151,7
	fapas B	36,375	49,17	840,56	307,0	1498,0	148,6
11/jun	fapas A	33,143	43,65	856,33	321,5	1518,5	151,1
	fapas B	32,600	42,92	831,25	312,2	1477,8	146,9

Com os valores dos ensaios demonstrados passasse a apresentar na tabela B.7 e B.8 os valores obtidos para as médias de todos os ensaio em duplicado e o desvio padrão da precisão intermédia para cada matriz e o material de referência para cada adoçante.

Tabela B.7: Média dos ensaios em duplicado, e desvio padrão da precisão intermédia para cada matriz e adoçante

Adoçante	matriz	Média dos ensaios (mg/l)	Desvio Padrão da precisão intermédia
Acessulfame	adoçante líquido	20,16466	0,52
	adoçante pó	20,98561	0,15
	barra energética	96,56095	0,89
	gelatina	2,095546	0,07
	ice tea	3,746271	0,06
	iogurte	100,3233	2,64
	leite	93,65625	0,97
	vinho	34,17969	0,74
Aspartame	adoçante líquido	21,6509	0,10
	adoçante pó	18,17663	0,60
	barra	92,40452	0,65
	gelatina	2,433616	0,05
	ice tea	5,136662	0,12
	iogurte	90,46233	1,20
	leite	82,63028	0,77
	vinho	34,46642	0,46
Sacarina	adoçante líquido	17,62022	0,13
	adoçante pó	17,62727	0,11
	barra	83,20901	0,34
	gelatina	1,742506	0,04
	ice tea	3,4582	0,04
	iogurte	83,7873	0,97
	leite	79,51618	0,51
	vinho	27,69081	0,38

Tabela B.8: Média dos ensaios em duplicado, e desvio padrão da precisão intermédia para o material de referência para cada adoçante

Adoçante	Média dos ensaios (mg/l)	Desvio padrão da precisão intermédia
acesulfame	39,67889	1,027767
aspartame	353,62	7,287453
sacarina	148,02	1,656322

O desvio padrão da precisão intermédia é calculado segundo a equação 2.8 e a seguir demonstra-se um exemplo de cálculo da mesma para o valor do acesulfame do material de referência.

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

$$Si_{(Aces\ Fappas)} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 6} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

$$\begin{aligned} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2 &= (35,66 - 35,85)^2 + (38,61 - 36,11)^2 + (34,97 - 34,88)^2 \\ &+ (37,74 - 39,28)^2 + (47,31 - 49,17)^2 + (43,65 - 42,92)^2 = 12.6583 \end{aligned}$$

$$Si_{(Aces\ Fappas)} = \sqrt{\frac{1}{2 \times 6} \times 12.6583} = 1,027767$$

Como exemplo dos valores que se utilizaram para determinação das retas de calibração apresentam-se as seguintes tabelas B.9, B.10 e B.11, onde demonstram as medianas e os desvios padrão das concentrações e absorbâncias.

Tabela B.9: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorbâncias usadas para construção das retas de calibração do acessulfame

Mediana das concentrações	Desvio padrão das concentrações	Mediana das absorbâncias	Desvio padrão das absorbâncias
2,04	0,02	14,50	1,93
5,11	0,06	38,27	2,97
10,18	0,10	74,28	4,85
25,45	0,26	186,5	12,1
50,90	0,52	372,1	15,3
76,35	0,78	557,3	24,5
101,8	1,04	747,0	37,4

Tabela B.10: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorbâncias usadas para construção das retas de calibração do aspartame

Mediana das concentrações	Desvio padrão das concentrações	Mediana das absorbâncias	Desvio padrão das absorbâncias
1,98	0,03	41,90	16,83
4,98	0,05	117,0	30,63
9,89	0,15	226,8	67,4
24,75	0,36	545,8	138,5
49,49	0,72	1225	171,1
74,24	1,08	1907	204,7
98,98	1,44	2541	242,2

Tabela B.11: Medianas e desvios padrão das concentrações e absorbâncias usadas para construção das retas de calibração da sacarina

Mediana das concentrações	Desvio padrão das concentrações	Mediana das absorbâncias	Desvio padrão das absorbâncias
1,74	0,02	180,8	6,5
4,34	0,04	446,7	5,8
8,72	0,08	896,1	17,5
21,80	0,20	2229	157
43,60	0,41	4357	103
65,40	0,61	6380	201
87,20	0,82	8312	338

Anexo C: Exemplos de cálculo para os valores apresentados no corpo principal do trabalho

Continuando do exemplo do anexo anterior irá se demonstrar um exemplo de cálculo para o CVRM do teste de precisão intermédia.

$$CVRM = \frac{Si_{(Aces\ Fappas)}}{Média\ dos\ ensaios\ considerados} \times 100 = \frac{1,027767}{39,67889} = 2,5902\%$$

Do CVRM retira-se o limite da precisão intermédia relativa % que nada mais que $2,8 \times CVRM$

$$LPIR(Aces. Fappas) = 2,8 \times CVRM = 2,8 \times 2,5902 = 7,2526 \%$$

O limite da repetibilidade relativa muito semelhante ao limite da precisão intermédia relativa é nada mais que $2,8 \times CVR$. Portanto, usando como exemplo o teste para a sacarina no adoçante líquido:

$$\text{Limite da repetibilidade relativa (Sac Adoçante líquido)} = 2,8 \times 0,326 \% = 0,914\%$$

Por fim, têm-se um exemplo para a variação relativa usada do teste de refrigeração:

$$variação\ relativa = (Valor1 - Valor\ 2)/Valor1 \times 100$$

Usando como exemplo os valores para o declive da reta do acessulfame do teste B

$$\textit{variação relativa} = \frac{7,0192 - 7,7820}{7,0192} \times 100 = 10,9\%$$