

Instituto Politécnico de Viseu

Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu



Nádia Solange de Almeida Santos

Controlo de Qualidade em Laboratório de Ensaios

Agosto de 2011

Instituto Politécnico de Viseu

Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu



Nádia Solange de Almeida Santos

Controlo de Qualidade em Laboratório de Ensaios

Tese de Mestrado
Tecnologias Ambientais

Professora Doutora Isabel Brás

Agosto de 2011

Agradecimentos

O relatório de estágio devido à sua natureza tem o contributo de muitas pessoas. Desta forma cabe-me aqui agradecer a inestimável colaboração de todos que, de forma directa ou indirectamente, contribuíram para realização do relatório, sem os quais teria sido mais difícil chegar até este momento, particularmente:

- À Professora Doutora Isabel Brás, orientadora deste relatório, pelo incansável apoio, disponibilidade, motivação, paciência e empenho mostrado em ajudar a realizar o estágio. Aos conhecimentos técnicos e científicos transmitidos a que ficarei eternamente agradecida,
- À Doutora Ana Martins por me ter recebido na sua empresa como estagiaria;
- À Doutora Elsa Cancela pela disponibilidade, interesse e orientação mostrado em ajudar na realização do estágio;
- À Engenheira Márcia Tavares pelos conhecimentos técnicos e científicos da cromatografia;
- À equipa do laboratório da ControlVet, por me terem recebido de braços abertos e por estarem sempre prontos a interromper os seus trabalhos para me ajudar quando fosse necessário, e pelas amizades criadas.

Gostaria ainda de agradecer todos familiares e amigos por toda amizade, apoio e paciência que demonstraram para seguir em frente.

Prefácio

As constantes pressões da Humanidade os recursos naturais estão a potenciar a depleção dos que ainda existem e a torná-los cada vez mais inatingíveis devido à elevada poluição. A água é um recurso renovável cuja qualidade deve ser mantida por todos nós. Contudo sofre constantemente de descargas de substâncias químicas, detritos de solo e resíduos que alteram a sua qualidade.

Através da monitorização da qualidade das águas, pode-se dar o uso adequado às mesmas. Para realizar essas análises, normalmente são utilizados métodos tradicionais, exigem tempos e recursos humanos significativos, e os seus limites de detecção não respondem às exigências impostas pelos documentos normativos mais recentes.

Com o avanço da tecnologia, surgem métodos analíticos instrumentais mais sensíveis e selectivos e com maiores eficiências na detecção e quantificação de compostos em amostras complexas, tais como os que estão relacionadas com os problemas ambientais e protecção de alimentos.

Os métodos instrumentais, apesar de exigirem um elevado investimento em equipamento, tornam-se bastante competitivos uma vez que este é amortizado pela economia em recursos humanos e reagentes, permite alargar a gama de concentração dos elementos detectáveis até níveis da ordem de grandeza de parte por milhão ou parte por bilião.

Resumo

O estágio, objecto do presente trabalho, foi realizado na ControlVet, empresa vocacionada para o Controlo Laboratorial Ambiental e Alimentar e que se localiza na Zona Industrial de Tondela. Este teve a duração de seis meses e meio, com data de início a 18 de Novembro de 2010 e final de 31 de Maio de 2011. O laboratório da Controlvet – Segurança Alimentar, S.A. é acreditado pelo IPAC de acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025, com o nº L0224 e considerado apto pelo ERSAR.

O presente estágio teve como primeiro objectivo adquirir competências em todo o processo de controlo da qualidade de água. Foram observados e realizados um vasto leque de parâmetros em inúmeras amostras, todos eles determinados por métodos analíticos clássicos. Os processos analíticos de determinação da amónia, cloretos, fluoretos, nitratos, nitritos, oxidabilidade, sulfatos e turvação foram os mais estudados, assim como a manipulação de amostras, instrumentos e reagentes necessários para a realização dos mesmos e ainda a avaliação e interpretação dos resultados obtidos. Foi feita uma avaliação dos boletins de forma a verificar se cumpre os seus requisitos descritos na NP EN ISO/IEC 17025:2007.

Outro objectivo que se pretendeu atingir, prendeu-se com o aprofundamento do conhecimento de um método cromatográfico e, posteriormente, proceder à sua validação de forma que o laboratório consiga cumprir os requisitos de ensaios e calibrações descritos na NP 17025:2007. Para a validação do método, o processo utilizado consiste em confirmar que o procedimento analítico utilizado para um teste específico é adequado para o uso pretendido. Os resultados de validação do método são usados para avaliar a qualidade, fiabilidade e consistência dos resultados analíticos.

Com a realização do presente estágio foi possível aplicar os conhecimentos adquiridos durante o mestrado, e complementarmente na licenciatura em Engenharia do Ambiente, ao nível da caracterização e classificação de diferentes matrizes ambientais, aprofundamento do conhecimento de métodos instrumentais de análise e aplicação de sistemas de normalização.

Palavras-chave: Controlo de Qualidade, Ensaios Laboratoriais, HPLC, Processo de Validação; Cálculo de Incerteza.

Abstract

The preset report describes the tasks and knowledge acquired in ControlVet, an independent laboratory dedicated to the environmental and food control quality, located in Tondela industrial area. The work was developed between November 18th, 2010 and May 31th, 2011. Controlvet laboratory - Food Safety SA is accredited by IPAC in accordance with standard NP EN ISO / IEC 17025, with No. L0224.

This stage had as its primary objective to acquire skills in the process of monitoring the water quality. A wide range of parameters in a several samples were performed, following classical analytical methods. The analytical methods for ammonia, chlorides, fluorides, nitrates, nitrites, oxidizability, sulfate and turbidity were the most studied, as well as the technical procedures for samples handling, instruments and reagents needed and still the results evaluation and interpretation. A technical report is presented to exemplify how the information is reported to the client. The Controlvet technical reports must follow the NP EN ISO / IEC 17025:2007, and a critical approach is performed to assess if these requirements are attained.

Another purpose to be accomplished during the work period, held with in-depth knowledge of a chromatographic method as well as the method validation and calculation of uncertainties associated with these determinations. These actions are a key factor so that the laboratory can meet the requirements described in NP 17025:2007. The fundamental aim of the method validation is to have procedures to ensure the laboratory's customers that analytical development used for a specific test is suitable for its intended. The results of the validation method are used to evaluate the quality, reliability and consistency of analytical results.

Along the working period it was possible to apply the knowledge acquired during the master course in Environmental Technologies and in the Environmental Engineering bachelor, at the level of characterization and classification of different environmental matrices, a deeper knowledge of analytical instrumental methods and application of standardization systems.

Key Words: Quality control, Laboratory Testing, HPLC, Validation Process;
Calculation of Uncertainty.

Índice

Prefácio.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice das Figuras.....	ix
Índice das Tabelas.....	xi
Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Caracterização da Empresa.....	1
2. Qualidade em Laboratórios de Ensaio.....	5
2.1. Processo de Validação de Métodos Analíticos.....	7
2.1.1. Linearidade.....	8
2.1.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	9
2.1.3. Estudo de Repetibilidade.....	11
2.1.4. Precisão Intermédia.....	12
2.1.5. Teste de Recuperação.....	13
2.1.6. Estabelecimento do Critério de Aceitação do Branco.....	13
2.1.7. Avaliação da Exactidão.....	14
2.1.8. Incertezas.....	15
3. O Controlo de Qualidade de Água.....	19
3.1. Quadro Legal Aplicado à Qualidade da Água.....	20
3.2. Metodologias Analíticas.....	21
3.2.1. Amónia ou Azoto Amoniacal, NH_4^+	26
3.2.2. Cloretos, Cl^-	27

3.2.3.	Fluoretos, F ⁻	29
3.2.4.	Nitratos, NO ₃ ⁻	31
3.2.5.	Nitritos, NO ₂ ⁻	32
3.2.6.	Oxidabilidade	34
3.2.7.	Sulfatos, SO ₄ ⁻	36
3.2.8.	Turvação	37
3.3.	Apresentação de Resultados	39
4.	Caso de Estudo – Validação de uma Metodologia Analítica	43
4.1.	Métodos de Determinação de Açúcares.....	43
4.2.	Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC.....	47
4.3.	Metodologias Analíticas	49
4.3.1.	Equipamentos	49
4.3.2.	Método Analítico	50
4.3.	Apresentação dos Resultados.....	50
	Conclusão	63
	Bibliografia.....	65
	Anexo A: Tabela da distribuição <i>F</i> de Snedecor/Fisher.....	73
	Anexo B: Critérios de Controlo de Qualidade.....	75
	Anexo C: Boletins exemplificativos.....	83
	Anexo D: Determinação do Limite de Quantificação	91
	Anexo E: Exemplificação do cálculo de incerteza	93

Índice das Figuras

Figura 1: Logótipo da ControlVet	2
Figura 2: Representação da Empresa ControlVet.....	3
Figura 3: Esquema representativo do processo HPLC	48
Figura 4: Cromatograma representativo dos padrões de açúcares: frutose (a) a 4,72 min; glucose (b) a 5,90 min; sacarose (c) a 11,15 min; maltose (d) a 14,27 min e lactose (e) a 17,05 min.	51
Figura 5: Cromatograma representativo de uma amostra: torta de morango. Onde: frutose (a); glucose (b); sacarose (c) e maltose (d).....	52
Figura 6: Variação da área dos picos em função da concentração dos padrões dos açúcares	53
Figura 7: Variação da incerteza global em função da concentração	61

Índice das Tabelas

Tabela 1: Cronograma temporal do estágio.....	3
Tabela 2: Composição e tipos de conservantes que constituem o <i>kit</i> genérico	23
Tabela 3: Composição e tipos de conservantes que constituem o <i>kit</i> de controlo de inspecção	24
Tabela 4: Previa preparação da amostra para determinados parâmetros em análise.....	25
Tabela 5: Critérios do controlo de qualidade para a aplicação do método analítico.	39
Tabela 6: Caracterização das rectas de calibração dos açúcares e os respectivos factores de correlação.....	53
Tabela 7: Valores de para os açúcares	54
Tabela 8: Parâmetros do processo de validação do método analítico (repetibilidade avaliada em amostras de sumo).....	57
Tabela 9: Variação da incerteza percentual em função da concentração	60
Tabela A 1: Distribuição <i>F</i> de Snedecor/Fisher com percentual de 99%.....	73
Tabela B 1: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de amónia em águas	75
Tabela B 2: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de cloretos em águas	76
Tabela B 3: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de fluoretos em águas	77
Tabela B 4: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de nitratos em águas	78
Tabela B 5: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de nitritos em águas	79
Tabela B 6: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de sulfatos em águas	80
Tabela B 7: Critérios de controlo de qualidade para a determinação da turvação em águas	81

Tabela D 1: Resultados do Limite de Quantificação.....	91
Tabela E 1: Erros associados ao material usado na preparação das soluções padrões dos açúcares (frutose, glucose e sacarose)	93
Tabela E 2: Exemplificação e valores do cálculo da incerteza associada à preparação dos padrões dos açúcares (frutose, glucose e sacarose).....	93
Tabela E 3: Valores experimentais dos parâmetros σ , σ_{rel} e a incerteza associada à curva de calibração, σ_{rel} , (m=1 e n=6)	94
Tabela E 4: Resultados de repetibilidade dos açúcares: frutose, glucose e sacarose	95

Abreviaturas

CDTA – Ácido 1,2-ciclohexileno-dinitro-tetraacético;

CV – Coeficiente de Variação;

DP – Desvio Padrão;

ESI - *Electrospray Ionization*;

FIA – *Flow-Injection Spectrophotometric Determination*;

FL – Fluorescência;

FM – Fase Móvel;

HPAEC - *High-performance Anion-Exchange Chromatography*;

HPLC - *High-Performance Liquid Chromatograph*;

HPRPLC - *High-Performance Reversed-Phase Liquid Chromatography*;

IV – Infravermelho;

LC - *Liquid Chromatography*;

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação;

MDL – *Microwave Digestion Labstation*;

MRC – Materiais de Referência Certificada;

MS - *Mass Spectrometry*;

NED – N(1-naftil)-1,2-etilenodiamina;

NTU – Nephelometric Turbidity Unit;

PAD - *Pulsed Amperometric Detection*;

PLS – *Partial Least-Squares*;

PC – Padrão Controlo;

RID – Refractive Index Detectors;

UHPLC – *Ultra High-Performance Liquid Chromatography*;

UV – Ultra-Violeta;

1. Introdução

O presente trabalho foi elaborado no âmbito da primeira edição do Mestrado em Tecnologias Ambientais, leccionado na Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu, do Instituto Politécnico do Viseu. Teve como objectivo principal a aplicação de metodologias analíticas para controlo de qualidade de águas superficiais e de consumo e a validação de métodos cromatográficos. O estágio decorreu no período de 18 de Novembro de 2010 e 31 de Maio de 2011 na ControlVet.

A empresa localiza-se na Zona Industrial de Tondela e destaca-se por desenvolver soluções e serviços ambientais inovadores, de forma a apoiar os seus clientes e lhes permitir cumprir com todos os requisitos legais, promovendo o desenvolvimento sustentável de toda a envolvente. A ControlVet aposta ainda, em uniformizar critérios decorrentes da acreditação de laboratórios de ensaios químicos, e das próprias metodologias, nomeadamente a validação das metodologias analíticas e a quantificação da incerteza da medição.

1.1. Caracterização da Empresa

A ControlVet é um grupo empresarial de visão ibérica que desenvolve a sua actividade na área da Segurança Alimentar, Ambiente e Biotecnologia. O grupo iniciou a sua actividade em Março de 1999, na Zona Industrial de Tondela. Actualmente é constituído por um conjunto de empresas localizadas em zonas como Tondela, Aveiro, Coimbra, Beja e Madrid (Espanha); nomeadamente a ControlVet Segurança Alimentar (CSA), ControlVet Consultoria Técnica (CCT), Inogen, Ecogeo, ControlVet Genetics e Alicontrol, em Espanha (ControlVet – Segurança Alimentar, 2009).

A ControlVet presta serviços de assistência técnica à produção primária, serviços de consultoria e formação, e é um organismo independente de controlo (OIC), com reconhecimento do Ministério da Agricultura.

A expansão da ControlVet caracteriza-se pela sua solidez empresarial, pela dedicação e empenho ao Cliente e pela inovação de processos e serviços, o que tem permitido o

crescimento sustentado e a preferência de mais de 3.500 clientes. Com base no valor da marca ControlVet, no *Know-how* que possui na experiência acumulada, houve o crescimento em sistema Franchising através da ControlVet-CT – Consultadoria Alimentar. E no final do ano 2006, abriram as primeiras unidades franchisadas.

Nós cuidamos.



Figura 1: Logótipo da ControlVet

A ControlVet usufrui de uma unidade laboratorial acreditada pelo IPAC – Instituto Português de Acreditação e equipada com tecnologia avançada que é colocada aos serviços dos clientes, permitindo uma melhor satisfação dos mesmos.

A unidade laboratorial constituída por três partes: Microbiologia, Biologia Molecular e Química, é um centro tecnológico de referência, sendo o único laboratório privado em Portugal que possui e utiliza a tecnologia PCR Real time - Polymerase Chain Reaction, o que possibilita desenvolver serviços inovadores que são usados na pesquisa de patogénicos em microbiologia, detecção de fraudes, identificação de espécies, pesquisa de organismos geneticamente modificados (OMG's) e melhoramento animal.

Este laboratório analisa cerca de 100.000 amostras por anos, desde alimentação humana e animal, soros, águas e efluentes, recorrendo a mais de 500 métodos implementados, realizados por uma equipa cerca de 25 colaboradores, onde 11 realizam as suas competências na microbiologia e as restantes na química (ControlVet – Segurança Alimentar, 2009).



Figura 2: Representação da Empresa ControlVet

Durante o estágio a primeira fase envolveu a execução e interpretação de dados relativos a métodos analíticos de determinação da qualidade das águas já validados pelos técnicos do laboratório e a segunda a aplicação das metodologias de validação a um método cromatográfico específico. O cronograma apresentado na Tabela 1, demonstra como foi distribuído temporalmente o estágio.

Tabela 1: Cronograma temporal do estágio

	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai
Aplicação de métodos analíticos clássicos							
• Estudos das metodologias							
• Preparação de padrões / reagentes							
• Recepção de amostras							
• Tratamentos das amostras antes de iniciar os ensaios							
• Análise das amostras							
• Lançamento dos resultados para a elaboração do boletim							
Validação de métodos analíticos							
• Preparação de amostras para analisar por HPLC							
• Estudos dos parâmetros e funcionamento do cromatografo							
• Injecção dos padrões e amostras							
• Análise de cromatogramas dos padrões e amostras							

De forma a apresentar detalhadamente as tarefas desempenhadas no estágio, elaborou-se o presente documento que compreende, além da introdução, onde é caracterizado o trabalho e apresentada a empresa onde decorreu o estágio, três capítulos e a conclusão geral. O primeiro capítulo apresenta a descrição dos requisitos de controlo de qualidade de resultados analíticos por parte de laboratórios de ensaio, nomeadamente os requisitos a preencher por laboratórios acreditados de acordo com a NP EN ISO/IEC 17025:2007. Os restantes capítulos dedicam-se a apresentação de métodos e discussão de resultados, nomeadamente relativos aos procedimentos analíticos de controlo de qualidade de água e da validação do método.

2. Qualidade em Laboratórios de Ensaio

Actualmente, grande parte dos laboratórios de ensaio tentam assegurar a capacidade de obter resultados fidedignos que garantam aos seus clientes a real caracterização das suas amostras. Para conseguir este objectivo devem cumprir com requisitos, tais como:

- a. Uso de métodos validados;
- b. Controlo da qualidade;
- c. Participação em programas de ensaios interlaboratoriais;
- d. Acreditação segundo os requisitos descritos na norma portuguesa, NP EN ISO/IEC 17025:2007.

Os processos analíticos devem ter um acompanhamento constante de forma a garantir a competência técnica na realização dos ensaios e a autenticidade dos resultados. Por sua vez, os requisitos normativos ajudam no controlo do rigor na obtenção dos resultados de modo que estes sejam verídicos e confiáveis, expresso na incerteza da medição realizada (Silva, 2008).

A NP EN ISO/IEC 17025:2007 é um normativo internacional que salienta os requisitos gerais de competências técnicas para a realização de ensaios e/ou calibrações de métodos normalizados, métodos não normalizados e métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório, incluindo amostragens. Esta norma define, também, que os laboratórios acreditados devem utilizar métodos validados na realização das análises e que as incertezas envolvidas nos resultados devem ser estimadas. Especificamente, a secção 5.9 da NP EN ISO/IEC 17025:2007, refere a importância da garantia da qualidade de resultados de ensaios e calibrações, uma vez que na execução dos ensaios e calibrações, todos os equipamentos e materiais de medida utilizados têm um erro associado e sem uma determinação quantitativa do erro a medição não tem significado analítico.

Outro aspecto importante que o normativo adverte é o da estimativa da incerteza de medição, onde é indicado que:

- a) Um laboratório de calibração ou um laboratório de ensaio ao realizar suas próprias calibrações deve ter e deve aplicar um procedimento para estimar a incerteza de medição de todas as calibrações e tipos de calibrações;
- b) Os laboratórios de ensaio devem ter e aplicar procedimentos para cálculo das incertezas de medição.
- c) Quando for estimada a incerteza de medição, todos os componentes de incerteza que sejam importantes para uma determinada situação devem ser considerados, empregando-se métodos apropriados de análise.

Normalmente, o processo de medição está implementado num sistema de gestão da qualidade de um laboratório, porque existem (Silva, 2008):

- i. Técnicos qualificados;
- ii. Programas de manutenção e de calibração de equipamentos;
- iii. Reagentes e padrões de referência apropriados;
- iv. Procedimentos de medição documentados e padrões de verificação.

Deste modo, os processos estão estáveis e sob controlo estatístico conseguindo-se com os cálculos das incertezas admitir-se que os erros sistemáticos e os fortuitos sejam desprezados.

Para validação de um método, o processo de determinação das incertezas de medições é composta por um conjunto de actividades, em que os pormenores do processo devem constatar num procedimento operacional padrão do laboratório, que define nomeadamente a (Silva, 2008):

1. Modelação do sistema de medição;
 - 1.1. Objectivos da medição;
 - 1.2. Preparação da medição;
 - 1.3. Especificação do mensurado (valor da grandeza medida);

2. Determinação da estimativa do valor do mensurado;
3. Identificação das fontes principais de incertezas;
4. Determinação dos valores das fontes de incerteza;
5. Cálculo da incerteza - padrão e do coeficiente de sensibilidade para cada fonte de incertezas;
6. Cálculo da incerteza combinada;
7. Cálculo das incertezas expandida
8. Expressão do resultado.

2.1. Processo de Validação de Métodos Analíticos

O processo de validação tem como objectivo evidenciar que os resultados obtidos através de um método têm qualidade adequada aos fins com que são usados. Este processo pretende uniformizar os critérios utilizados de modo a demonstrar que um método de ensaio, nas condições em que é exercido, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (González et al; 2007).

Os técnicos laboratório realizam uma nova validação sempre que exista alguma modificação susceptível nas características do método e na implementação de novos métodos de ensaio.

O procedimento da validação de um método de ensaio exige as seguintes avaliações (González et al, 2007; Taverniers et al, 2004):

- 1) Avaliação fundamentos teóricos do método e adequabilidade aos fins que se propõem validar;
- 2) Calibração analítica:
 - i. Estudo da linearidade da recta de calibração;
 - ii. Estudo do limite de quantificação;

- iii. Estudo da repetibilidade;
 - iv. Estudo da precisão intermédia;
 - v. Estudo da sensibilidade e selectividade do método (Ensaio de recuperação);
- 3) Estabelecimento de critérios de aceitação de parâmetros, tais como, declive, ordenada na origem, brancos, concentração de titulante, padrão controlo, recuperação e limite de quantificação;
 - 4) Estudo da Exactidão: Participação em ensaios interlaboratoriais ou matérias de referência certificado;
 - 5) Cálculo de incertezas.

2.1.1. Linearidade

O estudo da linearidade da recta, nos métodos em que se utiliza uma curva de calibração, obriga que o laboratório avalie a linearidade através de um dos modelos estatísticos descritos na ISO 8466-1/90, nomeadamente:

- Preparação dos padrões necessários de acordo com o definido no método de ensaio e efectuar a sua leitura.
- Efectuar o estudo da função linear e não linear e apuramento dos desvios padrões residuais. Concretamente, esta avaliação faz-se a partir de um conjunto de pares ordenados (sinal instrumental vs concentração), calculando-se a função de calibração linear e não linear e os respectivos desvios-padrão (DP) residuais, $S_{y/x}$, S_{y2} , respectivamente do seguinte modo:

$$\frac{\text{-----}}{\text{-----}} \quad (1)$$

$$\frac{\text{-----}}{\text{-----}} \quad (2)$$

Onde:

- N Número de padrões de calibração
- y_i Sinal obtido para um padrão de concentração i
- \bar{y}_i Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração i
- \bar{y}_{i2} Sinal estimado pela função de calibração polinomial do segundo grau para um padrão da mesma concentração i

- Procedendo ao teste F_{calc} , calculando a diferença das variâncias (DS^2) pela equação seguinte:

(3)

Que permite calcular o valor teste, F_{calc} :

— (4)

O valor de F_{calc} é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher (Anexo A) com um grau de confiança de 99%.

Os critérios de decisão relativos à linearidade do método são:

- a) Se $F_{\text{calc}} \leq F$: a função de calibração polinomial não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.
- b) Se $F_{\text{calc}} > F$: a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a alternativa a). Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

2.1.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Após estabelecer a linearidade do método determinaram-se os respectivos limiares analíticos (limite de detecção e limite de quantificação).

O Limite de detecção (LD) é o sinal de saída ou o valor de concentração acima o qual é possível afirmar, com um nível declarado de confiança, que uma amostra é diferente de

uma amostra em branco que não contenha qualquer determinando de interesse (guia IPAC e ISO 17025). O limite de detecção pode ser calculado por duas formas:

1. Limite de detecção baseado no desvio padrão do padrão residual.

(5)

Onde S_{x0} representa o desvio-padrão (DP) correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade (ISO 8466-1/90).

2. Estudo do limite de detecção através dos mínimos quadrados da recta de calibração

A ISO 8466-1/90 indica ainda que num método analítico que envolve uma calibração linear o limite de detecção também pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, através da seguinte equação:

$$\text{—————} \quad (6)$$

$S_{y/x}$ Desvio padrão residual da curva de calibração

b Declive da curva de calibração

O Limite de quantificação (LQ), por sua vez, corresponde a um múltiplo declarado do limite de detecção numa concentração do determinando que se pode razoavelmente determinar com um nível aceitável de exactidão e precisão. O limite de quantificação pode ser calculado utilizando um padrão ou uma amostra adequados, e pode ser obtido a partir do ponto de calibração mais baixo da curva de calibração, descontando o branco. O estudo do limite de quantificação pode ser executado de três formas:

- 1) Limite de quantificação baseado no desvio padrão de brancos.

Em métodos analíticos gravimétricos e volumétricos, o limite de quantificação calcula-se através do desvio padrão residual associado ao padrão lido, como descreve a seguinte equação:

(7)

Média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões residuais, no mínimo 10, preparados de uma forma independente e lidos em condições de precisão intermédia

Desvio padrão associado a X_0

- 2) Estudo do limite de quantificação através do primeiro padrão da curva de calibração

Nos métodos analíticos que envolvem a utilização de uma calibração linear, a determinação do limite de quantificação corresponde a dez leituras do primeiro padrão da curva de calibração em condições de precisão intermédia. Seguem-se os cálculos da média, desvio padrão, e avalia-se o erro relativo e coeficiente de variação dos valores obtidos que devem ser inferiores a 10% caso contrário outro limite de quantificação terá que ser estudado.

- 3) Estudo do limite de quantificação através dos mínimos quadrados da recta de calibração

O limite de quantificação, em métodos analíticos que necessitam de uma curva de calibração, corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão, e de acordo com os resultados obtidos na equação da curva de calibração é determinado pela equação seguinte:

$$\text{-----} \quad (8)$$

2.1.3. Estudo de Repetibilidade

O estudo de repetibilidade consiste na aproximação entre resultados de medições sucessivas da mesma mensuranda, realizada nas mesmas condições de análise em curtos intervalos de tempo, isto é o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento e o mesmo reagente.

Para se determinar a repetibilidade do método efectua-se dez repetições do ensaio nas condições anteriormente descritas. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo:

(9)

Sendo, s_r o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados. Pode calcular-se a repetibilidade. Em percentagem de acordo com:

— (10)

Onde, \bar{x} representa a média das concentrações obtidas no ensaio de repetibilidade.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), expresso em percentagem, e o erro relativo da repetibilidade (Er) são determinados pelas respectivas equações:

— (11)

— (12)

Considera-se a repetibilidade aceitável quando o $CV \leq 10\%$

2.1.4. Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere a avaliação da precisão sobre uma amostra, amostras idênticas ou padrões, recorrendo ao mesmo método, preferencialmente no mesmo laboratório. Contudo, também pode ser diferente, mas, neste caso, deve-se definir exactamente quais as condições susceptíveis a variar, tais como: operador, equipamentos e tempo.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório por isso, é a mais aconselhável de empregar.

Para determinar a precisão intermédia, para efeitos de validação, o laboratório efectua no mínimo 15 ensaios. O valor da precisão intermédia está relacionado com o nível de concentração do ensaio. A precisão intermédia é avaliada através da seguinte equação:

$$\frac{\text{CV}}{\text{CV}} = \dots \quad (13)$$

Considera-se a precisão intermédia aceitável se $CV \leq 20\%$.

2.1.5. Teste de Recuperação

A recuperação consiste em adicionar à amostra um analito de concentração conhecida. Às amostras pode ser adicionado o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível (incluindo os extremos da gama de linearidade) e uma concentração próxima da intermédia da gama de linearidade de uso do método. O valor da recuperação é calculado pela seguinte equação:

$$\frac{\text{Concentração final (concentração da amostra contaminada com o analito)}}{\text{Concentração da amostra sem adição do analito}} \times \frac{\text{Concentração do analito adicionado}}{\text{Concentração do analito adicionado}} \quad (14)$$

Concentração final (concentração da amostra contaminada com o analito)
 Concentração da amostra sem adição do analito
 Concentração do analito adicionado

Desta forma pretende-se avaliar se o método identifica todo o analito adicionado.

Quando os ensaios de recuperação são remetidos com adição de volumes de analito, deve-se considerar a correcção de volumes, da seguinte forma:

$$\frac{\text{Concentração do analito adicionado}}{\text{Concentração do analito adicionado}} \times \frac{\text{Volume da amostra}}{\text{Volume da amostra}} \quad (15)$$

Onde, V_1 corresponde ao volume do analito adicionado, e V_2 o volume da amostra

2.1.6. Estabelecimento do Critério de Aceitação do Branco

No método de validação são realizados pelos menos cinco brancos e é estabelecido um critério de aceitação do branco com base nos valores obtidos, ou seja, a média dos

resultados dos brancos é mais ou menos duas vezes seu desvio padrão. Este valor final deve ser igual ou inferior a um terço da leitura do limite de quantificação ou do primeiro padrão.

2.1.7. Avaliação da Exactidão

A exactidão indica a proximidade do valor obtido no ensaio e o valor aceite como sendo verdadeiro. Existem duas formas de exprimir a exactidão: erro absoluto e erro relativo. Na avaliação da exactidão existem diferentes processos que se passam a descrever:

a. Materiais de Referencia Certificada (MRC)

A utilização dos MRC consiste na sua análise para avaliar a prestação do laboratório. O valor obtido no ensaio deve ser comparado com o valor certificado, para ser determinado o erro e a exactidão da análise. O erro relativo E_r é calculado da seguinte forma:

$$\frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor certificado}}{\text{Valor certificado}} \times 100 \quad (16)$$

Média aritmética de valores obtidos

Valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC)

Quando juntamente como MRC for indicado um intervalo de incertezas para o valor certificado e o valor obtido na determinação não estiver dentro do mesmo, o laboratório deve procurar as causas desse acontecimento e tentar corrigi-las ou aprová-las, dependendo do rigor atribuído para os resultados,

O laboratório em cada método de ensaio define um grau de exigência para a exactidão sendo satisfatório um erro igual ou inferior a 5%.

b. Ensaio Interlaboratoriais

O ensaio interlaboratorial é avaliado a partir do Factor de Desempenho (Z):

$$\frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor certificado}}{\text{Desvio padrão}} \times 100 \quad (17)$$

Sendo, x o valor obtido pelo laboratório; x_v o valor aceite como verdadeiro e s o desvio, incerteza de X_v , ou outro desvio. O critério de aceitação de x é definido pela entidade organizadora do ensaio interlaboratorial.

2.1.8. Incertezas

Na prática, a incerteza associada a um resultado provem de várias fontes possíveis, tais como definição incompleta, amostragem, efeitos e interferência da matriz, condições ambientais, incertezas dos equipamentos de massa e volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (Eurachem, 2000).

O cálculo de incertezas é definido como um parâmetro associado ao resultado de uma medição e caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurando (Eurachem, 2007). Na globalidade, o cálculo de incerteza, u , é efectuado a partir da equação 18, equiparado como desvio padrão relativo, tem o intuito de avaliar a importância dos erros associados aos equipamentos de medição na preparação dos padrões (e), da linearidade do método (l), da precisão global (s) e da recuperação (r) (Brás et al, 2011).

$$u = \sqrt{e^2 + l^2 + s^2 + r^2} \quad (18)$$

Os erros associados aos equipamentos de medição na preparação dos padrões (e), estão associados ao maior valor da incerteza da preparação de cada padrão individualmente, e_i , determinado por:

$$e_i = \frac{m_i}{m} \cdot u \quad (19)$$

Sendo, e_i o erro do equipamento de medida e m o valor medido por esse equipamento. Ou seja, pode-se definir a incerteza associada à preparação dos padrões como a soma da incerteza de cada medição necessária para preparar os padrões.

A incerteza associada à linearidade do método, isto é, à obtenção da curva de calibração, l , corresponde ao quociente entre o desvio padrão para uma dada

concentração, C_x , e a respectiva concentração do padrão, determinada pela curva de calibração, C_p , como representa a seguinte equação:

$$C_x = \frac{y - y_0}{m} \quad (20)$$

Onde C_x é calculado pela seguinte equação:

$$C_x = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_0)}{n \cdot m} \quad (21)$$

Onde, C_p , é o desvio padrão, m o declive da regressão linear dos pontos experimentais, n corresponde ao número de réplicas de C_p obtidos para cada C_x , n_0 equivale ao número de padrões injectados para construir a curva de calibração, y_0 é o valor de y calculado pela curva de calibração para cada valor de C_x , \bar{y} é a média dos valores experimentais de y , C_{pi} equivale ao valor da concentração do padrão i para construir a curva de calibração e \bar{C}_p é a média dos valor de C_p .

O parâmetro C_p está associado ao pior resultado do padrão relativo de medições consecutivas dos padrões, sendo no mínimo de seis réplicas. A incerteza relativa à precisão, u_p , é determinado pela equação 22:

$$u_p = \frac{C_p}{\bar{C}_p} \quad (22)$$

Na equação para determinar C_p , o C_p é o desvio padrão dos dados obtidos para a repetibilidade, da injeção do padrão e n_0 corresponde ao número de réplicas.

Na incerteza associada à exactidão, u_e , consequente de ensaios de recuperação, R , é calculada a partir da equação 23, e onde C_p é o desvio padrão relativo da percentagem de recuperação (razão entre o desvio padrão e a média das determinações) e n é o número de determinações. A recuperação é calculada como descrito anteriormente.

$$u_e = \frac{C_p}{R} \quad (23)$$

A incerteza expandida deve ser anunciada junto com resultado final e calculada utilizando um factor de correcção de $k=2$.

(24)

O resultado da análise terá a seguinte forma:

3. O Controlo de Qualidade de Água

Desde a revolução industrial, as constantes agressões ao planeta Terra provocadas pelo crescimento acelerado das áreas urbanas, parques industriais e extensas áreas de exploração tem trazido inúmeras preocupações, particularmente demonstradas pelas associações de preservação de meio ambiente.

Dos vários ecossistemas existentes, o aquático acaba de uma forma ou de outra, por ser o que sofre mais pressões, visto este ser um receptor temporário ou final de uma grande variedade e quantidade de poluentes. Os meios hídricos naturais, principalmente rios, são constantemente utilizados como meios receptores e agentes de transporte de efluentes domésticos e industriais, bem como de escorrências de terrenos agrícolas e de águas de escorrência de estrada. Como consequência e associada há necessidade do controlo de qualidade dos recursos hídricos, denota-se um aumento gradual no desenvolvimento de métodos rápidos e precisos para a detecção de determinados parâmetros no meio ambiente.

A água de abastecimento é considerada uma água potável, disponibilizada aos consumidores através de uma rede de distribuição pública. Antes de ser consumida, a água é submetida a diversas operações, tais como: captação, tratamentos físico-químicos, armazenamento e inserção na rede de distribuição.

Depois utilizada pelos consumidores, a água transforma-se numa água poluída, tecnicamente denominada água residual. As águas residuais domésticas, que todos produzimos em nossas casas, contêm uma elevada carga orgânica, bem como grandes quantidades de bactérias e vírus, os quais constituem uma ameaça para a saúde pública. Este resíduo líquido não sendo tratado, começa a decompor-se, originando a produção de gases com odor, a diminuição da concentração de oxigénio dissolvido na água e, se existirem nutrientes como fosfatos e nitratos, a promoção o crescimento de plantas aquáticas nos meios receptores. Em gamas de concentrações baixas, identificam-se nas águas residuais compostos tóxicos, que pelas suas propriedades tem um carácter muito lesivo para o ecossistema. Por estas razões é fundamental proceder ao tratamento de

águas residuais para posteriormente serem conduzidas de modo seguro até aos meios receptores aquáticos.

Para controlar a composição da água de abastecimento e água residual, existe um quadro legal que define os parâmetros e respectivas análises a efectuar de forma a avaliar a sua qualidade química, bioquímica e microbiológica, assim como valores máximos admissíveis desses parâmetros. De acordo com os resultados das análises que definem o respectivo enquadramento definem-se programas de monitorização da qualidade da água. A monitorização deve-se ao facto de possíveis mudanças em algumas características das águas poderem ocorrer com o tempo, devida a contaminações externas ou anomalias do próprio tratamento, permitindo assim agir de imediato no problema que está a alterar a composição da água.

3.1. Quadro Legal Aplicado à Qualidade da Água

A água de abastecimento humano deve apresentar qualidade de modo, quando for consumida, seja agradável e não prejudicial à saúde. Isso exige infra-estruturas e uma rede de distribuição que devem-se encontrar em boas condições de operação e manutenção.

No final do ano de 2003, entrou em vigor o Decreto-Lei nº 243/01, de 5 de Setembro que transpõe para o direito interno a Directiva nº 98/83/CE do Conselho, de 3 de Novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. Recentemente, este decreto-lei foi revogado pelo Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, tendo como objectivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição.

O Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto estabelece:

- Os requisitos legais de qualidade da água destinada ao consumo humano;
- As obrigações relativas à garantia dos parâmetros da qualidade da água disponibilizada;

- O programa de controlo da qualidade da água;
- O procedimento nas situações de incumprimento;
- As regras de aptidão dos laboratórios de ensaios;
- As regras de fiscalização e regime contra-ordenacional.

O controlo da qualidade da água da rede de abastecimento, segundo o ponto 1 do artigo 10º do Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, efectua-se de acordo com o mencionado no seu anexo II. Este anexo tem por objectivo definir os controlos de rotina e inspecção, assim como as frequências mínimas de amostragem, para a análise da água destinada ao consumo humano fornecida por sistemas de abastecimento público, redes de distribuição, fontanários, camiões ou navios-cisterna, utilizada em empresas de indústria alimentar e à venda em garrafas e outros recipientes.

O Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto, ainda em vigor, apresenta os parâmetros de qualidade de águas superficiais e às águas subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano. Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. É neste numerativo legal que são apontados os tipos de tratamento adequados a preparação de água para consumo dependendo da qualidade da água na fonte.

3.2. Metodologias Analíticas

Para a caracterização de uma massa de água, as respectivas amostras obedecem a um processo definido, desde a colheita até a determinação da concentração dos diferentes parâmetros que conduzem à definição da sua qualidade. Nestes processos deve-se obedecer a diferentes requisitos de modo a que não haja contaminações, desvirtuação e perda da mesma.

Na Controlvet, a programação das actividades de colheita e recolha de amostras são efectuadas por um documento designado por “Planeamento”, desencadeado pela assinatura de um protocolo com cada cliente. O responsável pela colheita de amostras

efectua a calendarização das visitas a efectuar por colaborador, por dia e por viatura. Cada colaborador tem disponível um mapa de recolha de amostras por cliente a visitar. Para cada amostra que se pretende recolher estão programados o tipo, a quantidade e os ensaios a efectuar, e definido antecipadamente um dos dois sistemas que podem ser utilizados para simplificar o processo de recolha e identificação de amostra:

- 1) É Impresso pelo *software* juntamente com o mapa as etiquetas com código de barras para identificar as amostras no momento da recolha;
- 2) A informação é carregada para um modo *offline* no *software* que é utilizável pelos computadores portáteis. Desta forma os colaboradores que efectuarem a recolha registando as amostras no respectivo mapa sendo atribuída uma codificação com que é identificada a amostra até ao laboratório.

O controlo da qualidade associado à recolha de amostras de água é efectuado de acordo com Clescer et al (1998), ISO 5667-3 / 2003 de forma a garantir a preservação e manuseamento das amostras, e ISO 5667-14 / 1998 de modo a garantir a qualidade das amostras.

As amostras são recolhidas por *kit's* compostos por recipientes de plásticos e de vidro, com respectivos conservantes, dependendo os parâmetros a analisar. A tabela 2 indica quais os recipientes que constituem o *kit* genérico, que conservantes a adicionar para as análises. Estes conservantes vão garantir que não haja decomposição da amostra desde o momento da recolha até à fase de análise no laboratório.

Existe um outro *kit* designado de controlo de inspecção. Os *kit's* de controlo de inspecção abrangem uma gama mais alargada de análises e consequentemente um maior número de recipientes (tabela 3). Os recipientes devem ser identificados através de etiquetas, e efectuada previamente no laboratório, para possibilitar uma correcta utilização, de forma inequívoca e durável.

Os frascos onde foram adicionados os conservantes são também identificados com a data da adição do conservante e a data de validade, permitindo assim a rastreabilidade dos mesmos. Na execução das recolhas, os *kit's* são entregues aos clientes, se forem estes a fazer a recolha, ou são técnicos especializados da ControlVet que realizam a recolha da amostra.

Tabela 2: Composição e tipos de conservantes que constituem o *kit* genérico

Tipo	Recipientes	Conservantes	Análises
G	Dois recipientes de plástico (1L)	-	Condutividade, pH, cor, turvação, nitratos, nitritos, cloretos, sulfatos e fluoretos
A	Um Frasco de vidro ¹ de 1L	1,5 mL de HNO ₃	Metais
I	Um frasco de vidro	-	Cheiro e sabor
E	Um copo de plástico com tampa	0,100 mL de H ₂ SO ₄	Amónio e oxidabilidade
H	Um copo de plástico com tampa	0,150 mL de HNO ₃	Alumínio, arsénio e selénio

¹ – Na utilização de frascos de vidro de 500 mL adiciona-se 0,75 mL de HNO₃, e em frascos de 250 mL acrescenta-se 0,375 mL do mesmo ácido.

No momento da recolha as amostras são identificadas através de colocação de etiqueta com código de barras ou por um código facultado pelo técnico. Em ambas as situações as identificações das amostras são postas no mapa de recolha de amostras ou directamente no modo *offline* do LAB (programa informático) onde constam as respectivas informações. No local de recolha deve-se registar a seguinte informação:

- Identificação do cliente;
- Identificação da Amostra;
- Identificação do ponto de colheita;
- Data e hora da colheita;
- Data e hora de entrega das amostras no laboratório;
- Resultados dos parâmetros analisados no local, nomeadamente pH, temperatura cloro residual livre e total;
- Indicação dos parâmetros a analisar (ou grupo de parâmetros);

- Identificação do responsável pela recolha;
- Outros aspectos relevantes (por exemplo relacionados com a conservação da amostra, com as condições ambientais, com o estado de conservação do ponto de amostragem, etc).

Tabela 3: Composição e tipos de conservantes que constituem o *kit* de controlo de inspecção

Tipo	Recipientes	Conservantes	Análises
G	Dois recipientes de plástico (1 L)	-	Condutividade, pH, cor, turvação, nitratos, nitritos, cloretos, sulfatos e fluoretos
A	Um frasco de vidro 1 de 1 L	1,5 mL de HNO ₃	Metais
I	Um frasco de vidro	-	Cheiro e sabor
E	Um copo de plástico com tampa	0,100 mL de H ₂ SO ₄	Amónio e oxidabilidade
H	Um copo de plástico com tampa	0,150 mL de HNO ₃	Alumínio, arsénio e selénio
D	Um frasco de vidro	100 mg de Na ₂ S ₂ O ₃	Pesticidas e PAH's
B	Um copo de plástico com tampa	0,100 mL de K ₂ Cr ₂ O ₇	Mercúrio
F	Um copo de plástico com tampa	2,0 mL de NaOH	Cianetos

1 – Na utilização de frascos de vidro de 500 mL adiciona-se 0,75 mL de HNO₃, e em frascos de 250 mL acrescenta-se 0,375 mL do mesmo ácido.

Quando as amostras chegam ao laboratório são registadas na aplicação LAB, onde também são inseridas todas as informações referentes à identificação da amostra, cliente e ensaios pretendidos. Após a recepção da amostra e se estiver identificada com código de barras é possível realizar um registo provisório da amostra no LAB. Este registo permite atribuição do número de análise e informa o laboratório dos ensaios a efectuar.

Neste caso a amostra fica assinalada como em estado pendente aguardando a inserção dos restantes dados.

Em função dos ensaios pretendidos pelo cliente a atribuição do número de amostra é do tipo: XX/ YYY/ VV, onde XX, identifica a secção do laboratório; YYY, o número sequencial de análise no ano em curso; e VV o ano em curso.

No período que antecede o início dos ensaios, as amostras são armazenadas a $3\pm 2^{\circ}\text{C}$ de forma a garantir a manutenção das suas características iniciais. Durante o armazenamento, as amostras são conservadas nas embalagens originais.

Para a prossecução das determinações, dependendo dos ensaios pretendidos pipeta-se volume pré-definido de amostra para o material corrente do laboratório, como está descrito na tabela 4.

Tabela 4: Previa preparação da amostra para determinados parâmetros em análise

Parâmetro	Volume (mL)	Material
Alcalinidade	100	Erlenmeyer
Amónio ou azoto amoniacal	20	Balões de volumétricos (25 mL)
Cloretos	100	Erlenmeyer
Fluoretos	20	Copos de plástico com tampa
Nitratos	1,0	Tubo de ensaio
Nitritos	50	Balão volumétrico (50 mL)
Oxidabilidade	25	Frascos descontaminados
Sulfatos	100	Erlenmeyer

Tendo desenvolvido durante o período de estágio actividades mais directamente relacionadas com a determinação de alguns parâmetros analíticos, faz-se de seguida uma abordagem mais pormenorizada destas metodologias, concretamente relativa aos

seus princípios teóricos, procedimentos experimentais e respectiva interpretação de resultados (Clescer et al, 1998).

3.2.1. Amónia ou Azoto Amoniacal, NH_4^+

A amónia é um composto facilmente biodegradável principalmente pela flora do meio aquático que a absorvem e utiliza como nutriente, sendo este muito importante para a produção de compostos azotados, nomeadamente proteínas. A sua origem nos meios hídricos é proveniente da degradação de resíduos de origem animal ou vegetal. Em concentrações elevadas, por exemplo, na água de consumo, pode causar danos graves nos humanos e animais, já que a amónia interfere no transporte do oxigénio pela hemoglobina, entre outros efeitos nefastos. Não é apenas para a saúde humana que o ião amónia é prejudicial, pois este a nível ecológico tem também bastantes implicações, influenciando a quantidade de oxigénio dissolvido na água o que faz com que haja inúmeras alterações metabólicas nos seres vivos aquáticos (Mendes, et al, 2004).

A determinação do teor de amónia em águas é efectuada através de um método desenvolvido internamente no laboratório, daí designado por MI-LAQ-30-02.

Princípio

Neste método a amónia reage com o fenol formando uma solução de cor azul. Esta reacção é catalisada pelo nitroprussiato de sódio e tem uma duração de 6 horas no escuro. A intensidade da cor é proporcional à concentração da amónia, e é medida no espectrofotómetro a 630 nm, região do visível.

Reagentes

- Solução stock e um padrão controlo (PC) de 1000 mg/L a partir do reagente cloreto de amónio;
- Solução intermédia e um PC de 10 mg/L a partir da solução anterior;

- Solução intermédia e um PC de 1 mg/L a partir da solução anterior;
- Soluções padrões de 0,05 a 0,5 mg/L preparados por pipetagem da solução anterior, e um PC de 0,2 mg/L;
- Reagente de nitroprussiato de sódio e fenol;
- Reagente de coloração – hidróxido de sódio, citrato trissódico dihidratado e ácido diclorocianurico.

Método

Tomar um determinado volume de água bidestilada (branco), dos padrões, padrão controlo e amostras para balões volumétricos. Adicionar a solução nitroprussiato de sódio e fenol e a solução de coloração. Agitar e deixar em repouso, no escuro, durante 6 horas. Por fim, leitura no espectrofotometro com comprimento de onda de 630 nm.

Cálculos

A determinação da concentração da amónia é feita a partir da curva de calibração.

3.2.2. Cloretos, Cl⁻

Os cloretos são os sais mais abundantes na natureza, principalmente na água do mar. Os seus teores são, por norma, mais baixos nas zonas altas e montanhas e mais elevados nas zonas baixas e nas águas subterrâneas. Quando uma amostra de água apresenta valores de cloretos a sua origem pode ser natural (rochas, solos, intrusão do mar em água doce, etc) ou de acção antrópica (esgotos sanitários, descargas industriais petrolíferas, curtumes, etc.). Para a saúde pública os cloretos alcalinos-terrosos têm um efeito laxativo que não deve ser ignorado mesmo que não atinja níveis tóxicos em águas de consumo porque podem ser prejudiciais em doentes com problemas renais ou cardiovasculares. A sua elevada concentração, também, altera a pressão osmótica dos microrganismos do meio hídrico bem como a corrosão de canalizações e materiais metálicos (Mendes, et al, 2004).

O processo de determinação do teor de cloretos está definido na norma portuguesa NP-423 de 1966, destinado a águas naturais.

Princípio

A determinação dos cloretos no meio hídrico é feita através de uma titulação argentimétrica onde existe competição para a captura de iões prata. A solução de prata, titulante, ao ser adicionada reage com os cloretos (Cl^-) primeiramente, formando um precipitado branco de cloreto de prata (AgCl) devido à sua inferior constante solubilidade. Quando todo o Cl^- estiver consumido a prata passa a reagir com o cromato de potássio (K_2CrO_4), indicador amarelo, formando cromato de prata (Ag_2CrO_4) de coloração avermelhada. É nesta mudança de cor que termina a titulação, considerando o cromato o indicador da titulação.

Reagentes

- Solução de nitrato de prata a 0,1 N;
- Solução de nitrato de prata a 0,02 N;
- Solução e um PC de cloreto de sódio a 1000mg Cl^-/L ,
- Solução e um PC de 100 mg Cl^-/L a partir da anterior – padronização;
- Padrão Controlo de 18,4 mg Cl^-/L a partir da anterior;
- Solução de cromato de potássio a 10% - solução indicadora;
- Solução de ácido sulfúrico a 0,1 N;
- Solução de hidróxido de sódio a 0,1 N

Método

Tomar um determinado volume de água bidestilada (branco), da solução de cloreto de sódio 100 mg/L, do PC e de amostra para erlenmeyer. Acertar o pH entre 6,5 a 10,5 das amostras, brancos, padronizações e padrão controlo, com hidróxido de sódio caso a amostra seja ácida, e ácido sulfúrico se a amostra for alcalina. Adicionar 3 – 4 gotas de

cromato de potássio. Titular com nitrato de prata a 0,02 N ou a 0,1 N, conforme o teor esperado de cloretos. Utiliza-se a solução de nitrato de prata de 0,02 N quando o teor esperado de cloretos for inferior a 35,5 mg/mL e a solução de nitrato de prata a 0,1 N para teores superiores.

Cálculos

Na determinação do teor de cloretos em águas quando, se utiliza este método de titulação nitrato de prata a 0,1 N ou 0,02 N as fórmulas de cálculo, expressas em mg de Cl⁻/L são as seguintes, respectivamente:

_____ ou _____

Volume de toma de amostra, expresso em centímetros cúbicos

Volume de solução de nitrato de prata a 0,1 N gasto na titulação, expresso em mililitros

Volume de solução de nitrato de prata a 0,02 N gasto na titulação, expresso em mililitros

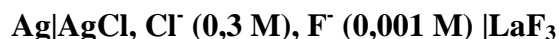
3.2.3. Fluoretos, F⁻

O ião fluoreto é a forma iónica do flúor, substância que é adicionada à água de abastecimento de forma a conseguir manter um bom nível de qualidade durante a sua distribuição. A concentração de fluoretos na água potável reduz a cárie dentária, e quando os seus teores são elevados podem ocorrer problemas patológicos, tais como: gastroenterites hemorrágicas, nefrides agudas e várias lesões a nível do fígado e coração. Podem, numa primeira instância, ocorrer vómitos, dores abdominais, náuseas e diarreia. Quando o nível de fluoretos exceder os limites recomendados, as águas devem ser desfluoretadas (Mendes, et al, 2004).

O processo de determinação dos fluoretos na água está definido no Standard Methods, na secção 4500 (F) C – Método do eléctrodo de ião selectivo.

Princípio

O eléctrodo de fluoretos é um sensor de ião selectivo. Este possui cristais de fluoretos de lantânio, através das quais um potencial é estabelecido por soluções de diferentes concentrações de flúor. A célula pode ser representada por:



O eléctrodo mede a actividade dos iões fluoretos na solução ao invés da concentração. A sua actividade depende da força iónica, pH e flúor em espécies complexantes. Por isso é adicionado uma solução tampão para uniformizar as forças iónicas, ajustar o pH e quebrar os complexos.

Reagentes

- Solução de fluoreto de sódio com concentração de 100 mg F⁻ /L
- Solução intermédia de 10 mg F⁻ /L;
- Soluções padrões entre 0,5 a 2 mg F⁻ /L;
- Padrão controlo de fluoreto de sódio de 1 mg F⁻ /L;
- Solução tampão: água bidestilada, ácido acético, cloreto de sódio e ácido 1,2-ciclohexilene-dinitilo-tetraacético (CDTA); acertar o pH com hidróxido de sódio, 6 N.

Método

Pipetar um determinado volume de água bidestilada (branco), padrões, amostra e PC, para copos de plástico. Adicionar a solução tampão. Determinar os fluoretos dos padrões, PC e amostras por potenciometria e em agitação.

Cálculos

A determinação da concentração dos fluoretos é feita a partir da curva de calibração.

3.2.4. Nitratos, NO_3^-

Tanto os nitratos como os nitritos são compostos de azoto. Na forma molecular, o azoto é um gás que ocupa cerca de 79% do volume da atmosfera e que por diversos processos é inserido nos ecossistemas terrestres. Os nitratos são um constituinte azotado essencial na formação da biomassa das plantas e animais, Contudo é considerado um poluente nas águas superficiais e subterrânea que potencialmente são transformadas em águas de consumo humano. No que diz respeito ao ecossistema aquático os nitratos surgem na água devido à aplicação de fertilizantes agrícolas, resíduos domésticos e industriais e à poluição atmosférica por azoto. Os nitratos presentes nos meios hídricos podem ser responsável pelo desenvolvimento de vegetação algal, designado por eutrofização no meio hídrico. Estes compostos interferem igualmente na saúde pública podendo dar origem a produtos cancerígenos e quando os nitratos se encontram em concentrações bastante elevadas podem causar meta-hemoglobinémia, mais conhecida nos bebés como o nome de “doença dos bebés azuis” (Mendes, et al, 2004).

O processo de determinação da turvação da água está definido na norma portuguesa NP4338-1/96 – método espectrométrico do 2,6 – dimetilfenol.

Princípio

Na presença do ácido sulfúrico e ácido ortofosfórico, os nitratos reagem com o 2,6-dimetilfenol formando 4-nitro-2,6-dimetilfenol, alaranjado, o que pode ser espectrofotometricamente medido na zona do ultra-violeta (UV). Esta reacção demora cerca de 5 minutos.

Reagentes

- Solução de nitrato de potássio de 1000 mg (N- NO_3) /L;
- Solução intermédia de 100 mg (N- NO_3) /L;
- Solução padrões entre 1 a 25 mg (N- NO_3) /L;

- Padrão controlo de 40 mg (NO₃) /L;
- Solução ácida: ácido sulfúrico, ácido ortofosfórico e ácido amidossulfónico;
- Reagente de coloração: ácido acético e 2,6-dimetilfenol;

Método

Pipetar um determinado volume de água bidestilada (branco), de amostra e dos padrões. Adicionar mistura ácida e reagente de coloração. Agitar e deixar repousar. Fazer leitura no espectrofotometro a 324 nm, em células de vidro.

Cálculos

A determinação da concentração dos nitratos é feita a partir da curva de calibração.

3.2.5. Nitritos, NO₂⁻

Os nitritos resultam da oxidação do azoto amoniacal (pode ser proveniente da esterilização ou desinfecção das águas por cloraminas) e/ou da redução microbiana ou química dos nitratos. Nas águas fluviais a sua concentração é elevada devido à presença de óxidos de azoto na atmosfera. Normalmente, é encontrado em quantidades diminutas nas águas, devido à sua instabilidade na presença de oxigénio. A existência nitritos nas águas indica que ocorrem processos biológicos devido a poluição orgânica, isto é decomposição de matéria biológica, ou contaminação de aditivos industriais. A sua presença transitória ou seja, é rapidamente oxidado a nitratos. Se por sua vez, a sua presença é persistente salienta que se trata de uma contínua contaminação de matéria orgânica. Os nitritos quando formados no estômago fixam-se na hemoglobina, o que dificulta a conversão da carboxihemoglobina em oxihemoglobina, consequentemente promovem a doença dos bebés azuis o que leva à morte por asfixia (Mendes, et al, 2004).

O processo de determinação de nitritos da água está definido na norma portuguesa NP EN 26777 / 96 – método espectrometria da absorção molecular.

Princípio

O nitrito reage com a sulfanilamida formando um sal diazoico. Por sua vez este sal reage com o dicloro-hidrato de N(1-naftil)-1, 2-etilenodiamina (NED) formando um complexo rosa/púrpura. A determinação de nitritos é feita pela comparação colorimétrica produzida pelo tratamento da amostra e dos padrões com sulfanilamida e dicloro-hidrato de NED. A intensidade da coloração é proporcional a concentração de nitritos.

Reagentes

- Solução de nitrito de sódio a 1000 mg NO₂⁻ /L;
- Solução de nitrito de sódio a 100 mg NO₂⁻ /L, a partir da anterior;
- Solução de nitrito de sódio a 1 mg NO₂⁻ /L, a partir da anterior;
- Soluções padrões de nitrito de sódio entre 0,01 a 0,05 mg NO₂⁻ /L;
- Padrão controlo de 0,01 mg N-NO₂⁻ /L;
- Solução de coloração – aminobenzeno-sulfonamida, ácido ortofosfórico e dicloro –hidrato de N(1-Naftil)-1,2-etilenodiamina.

Método

Tomar um determinado volume de água bidestilada (branco), de amostras, padrões e PC para balões volumétricos. Adicionar reagente de coloração e deixar repousar. Por fim, faz-se a leitura no espectrofotometro a 540 nm.

Cálculos

A determinação da concentração dos nitritos é feita a partir da curva de calibração.

3.2.6. Oxidabilidade

Um dos parâmetros químicos associados a compostos orgânicos mensuráveis na água é a oxidabilidade que consiste na quantidade de matéria orgânica quimicamente oxidável, tais como proteínas, gorduras, açúcares, entre outros. Uma água que apresenta baixa oxidabilidade indica que manifesta um baixo teor de matéria orgânica dissolvida, apresentando-se esta potável para consumo humano. A origem da matéria orgânica presente na água pode estar relacionada com o metabolismo dos organismos vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos, lixiviação e outras matrizes ambientais, ou pela acumulação de substâncias orgânicas originadas por actividades antropogénicas. A presença de compostos orgânicos oxidáveis em águas de consumo humano não reporta, directamente, impactes na saúde pública. Contudo, o aumento da oxidabilidade na água é indicador de contaminações quer microbiológica, quer química, e essa pode ser prejudicial (Mendes, et al, 2004).

Princípio

A oxidabilidade é determinada por digestão de uma solução de permanganato de potássio em meio ácido e em ebulição cerca de 10 minutos. O permanganato, MnO_4^- , (cor de rosa) oxida a matéria orgânica, reduzindo-se a Mn^{2+} . Após os 10 minutos, se a cor rósea permanecer indica que toda a matéria orgânica reagiu e que existe permanganato em excesso. Segue-se a adição da solução oxalato, que vai reagir com o permanganato em excesso. Por fim, ocorre a titulação com o permanganato onde se vai determinar a quantidade de oxalato em excesso, o que corresponde à quantidade de permanganato que reagiu com a matéria orgânica.

O processo de determinação da oxidabilidade da água está definido na ISO 8467 / 93 – Determinação do índice de permanganato.

Reagentes

- Solução de ácido sulfúrico a 7,5 M;
- Solução de ácido sulfúrico a 2 M – a partir da solução anterior;
- Solução de Oxalato de sódio a 0,05 M;
- Solução de Oxalato de sódio a 0,005 M – a partir da solução anterior;
- Solução de Permanganato de potássio a 0,02 M;
- Solução de Permanganato de potássio a 0,002 M – a partir da solução anterior;
- Solução de resorcinol a 100 mg/L – padrão controlo.

Método

Tomar um determinado volume de amostra, da solução resorcinol e de água bidestilada (branco) para frascos desinfectados e adicionar ácido sulfúrico 2 M. Vai ao banho de água entre 96 a 98°C durante 10 minutos. Ainda no banho, adiciona-se o permanganato de potássio 0,002 M e continua no banho durante 10 minutos. Adicionar a solução de oxalato de sódio de 0,005 M. Por fim titular com permanganato de potássio 0,002 M. Após titular o branco, volta-se adicionar oxalato de sódio e torna-se a titular até ficar de novo cor rosácea, designada padronização.

Cálculos

A determinação da quantidade de permanganato que reagiu com a matéria orgânica, calcula-se pela seguinte expressão matemática:

$$f = \frac{\text{Volume de permanganato gasto na titulação do branco (mL)} - \text{Volume de permanganato gasto na titulação da amostra (mL)}}{\text{Volume de permanganato gasto na padronização (mL)}}$$

f Factor de matéria orgânica (mg O₂/L). Este factor é calculado por:

$$\frac{\text{Volume de oxalato de sódio (mL)}}{\dots}$$

- c Concentração do oxalato de sódio (0,005 M);
 Massa molecular do oxigénio
 Volume tomado de amostra mL

3.2.7. Sulfatos, SO_4^-

Os sulfatos são iões, também, abundantes na natureza, pois estes, tal como os cloretos também se podem encontrar devido á dissolução de solos e rochas. Contudo a sua origem não é sempre natural e descargas de efluentes industriais ou domésticos pode igualmente aumentar a sua concentração no meio hídrico e como consequência efeitos laxantes no ser humano. A existência deste ião é também, resultante do processo de floculação/coagulação que se recorre aos sulfatos de alumínio ou de ferro

O processo de determinação do teor de cloretos está definido no standard methods, na secção 4500 (SO_4^-) E – método turbidimétrico.

Princípio

O método, normalmente, utilizado para a detecção de sulfatos baseia-se na precipitação do ião sulfato, existente na água sob a forma de SO_4^{2-} , com cloreto de bário (BaCl_2), dando-se a formação de cristais BaSO_4 que posteriormente são medidas espectrofotometricamente a 420 nm.

Reagentes

- Solução de sulfato de sódio de 100 mg SO_4^-/L ;
- Soluções padrões entre 10 a 40 mg SO_4^-/L ;
- Padrão controlo de sulfato de sódio de 25 mg SO_4^-/L ;
- Solução tampão: cloreto de magnésio, acetato de sódio, nitrato de potássio e ácido acético.

Método

Pipetar um determinado volume de água bidestilada (branco), amostra, padrões e PC para erlenmeyer. Adicionar a solução tampão. Colocar cloreto de bário e agitar durante 1 minuto. Colocar em células de vidro e deixar repousar 5 minutos. Por fim, efectuar a leitura no espectrofotometro a 420 nm.

Cálculo

A determinação da concentração dos sulfatos é feita a partir da curva de calibração.

3.2.8. Turvação

A turvação, também designado por turbidez, de uma água é causada, essencialmente, por matéria coloidal e em suspensão, de tamanho e natureza variados, por exemplo, lamas, areias, matéria orgânica e inorgânica, bem como compostos corados solúveis e microrganismos. Estes materiais não permitem a penetração da luz nos meios hídricos, impedindo a fotossíntese das plantas e algas. Os sedimentos podem transportar substâncias tóxicas, que através da cadeia alimentar pode levar à morte de seres vivos, principalmente organismos aquáticos.

O processo de determinação da turvação da água está definido na ISO 7027 / 99.

Princípio

A determinação da turvação é feita através de um equipamento óptico, designado turbidímetro, que mede a razão entre a intensidade de luz dispersa num determinada direcção e a intensidade de luz transmitida. A turvação é expressa em NTU (Nephelometric Turbidity Unit).

Reagentes

- Solução stock de formazina, 4000 NTU;
- Solução de formazina, 1000 NTU;
- Solução de formazina, 100 NTU;
- Soluções padrões entre 0,30 a 10 NTU;
- Padrão controlo de 4 NTU.

Método

Fazer a leitura no turbidímetro do branco, padrões, PC e amostra.

Cálculos

A determinação da turvação é feita a partir da curva de calibração.

3.3. Apresentação de Resultados

Como foi referido anteriormente, num laboratório acreditado deve-se cumprir com vários requisitos no sentido de garantir a qualidade dos resultados produzidos na sequência da determinação analítica efectuada. Neste sentido, na Controlvet são seguidos procedimentos padrão para atingir esses objectivos. No Anexo B estão apresentadas tabelas que definem os critérios dos ensaios aplicados para o controlo de qualidade dos métodos analíticos, tais como: a periodicidade com que é avaliada a curva de calibração, limiares analíticos, branco, repetibilidade, precisão exactidão, incerteza, sensibilidades, ensaios de recuperação e padrões nos extremos (estas metodologias foram previamente validadas no laboratório). Nas mesmas tabelas estão definidos os critérios de aceitação do método.

A tabela 5 sumaria os parâmetros de validação que devem ser controlados em cada método analítico aplicado em água superficial e de consumo. Desta forma é possível garantir que as metodologias são produtivas e continuam validadas.

Tabela 5: Critérios do controlo de qualidade para a aplicação do método analítico.

Controlo	Parâmetro						
	NH ₄ ⁺	Cl ⁻	F ⁻	NO ₃	NO ₂	SO ₄	Turvação
Curva de calibração	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Limiares analíticos	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Branco	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Repetibilidade	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Precisão	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Exactidão	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Incerteza	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sensibilidade	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Ensaio de recuperação	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Aferição do padrão primário		✓					
Padrões externos	✓				✓		✓

Uma vez que no período de estágio efectuaram-se inúmeras determinações em amostras provenientes de diferentes locais/clientes, não serão apresentados resultados específicos de nenhuma amostra, mas sim um boletim exemplificativo para avaliar a informação resultante das determinações experimentais e que é disponibilizada ao cliente (anexo C).

De acordo com NP EN ISO/IEC 17025:2007, na secção 5.10, a apresentação dos resultados dos ensaios realizados pelo laboratório deve ser feita de forma exacta, clara, inequívoca e objectiva. Os relatórios, também designados boletins, onde geralmente são apresentados os resultados deve abranger todas as informações solicitadas pelo cliente e as necessárias para a interpretação dos resultados do ensaio, incluindo todas as informações exigidas pelo método de análise utilizado. Portanto, cada relatório de ensaio deve incluir a seguinte informação (a menos que o laboratório tenha razões válidas para não o fazer):

- a) Um título (por exemplo; “Relatório de Ensaio”);
- b) O nome e a morada do laboratório, e deve conter o local onde os ensaios foram realizados, caso não for o mesmo laboratório;
- c) A identificação inequívoca do relatório de ensaio, uma identificação em cada página que garanta que essa página seja reconhecida como fazendo parte do relatório de ensaio e uma identificação clara do final do relatório de ensaio;
- d) O nome e morada do cliente;
- e) A identificação de método utilizado;
- f) A descrição, estado e identificação inequívoca dos itens ensaiados;
- g) A data de recepção dos itens para ensaios, sempre que seja essencial para a validade e utilização dos resultados, e as datas de realização dos ensaios;
- h) Referencia ao plano e aos procedimentos de amostragem utilizados pelo laboratório ou por outros organismos, sempre que estes sejam relevantes para a validade ou utilização dos resultados;
- i) Os resultados de ensaio, incluindo quando apropriado as unidades de medição;

- j) O(s) nome(s), função(ões) e assinatura ou identificação equivalente, da(s) pessoa(s) que autoriza(m) o relatório de ensaio;
- k) Quando relevante, uma declaração em como os resultados se referem apenas aos itens ensaiados.

Os boletins da ControlVet estão de acordo com a descrição da composição do boletim presente na NP EN ISO/IEC 17025:2007. Destes conta a seguinte informação: nome e morada do laboratório, nome e morada do cliente, número de amostra, data de colheita, data de recepção, data de início de ensaio, data de fim de ensaio, o tipo de amostra de água, referência do local da recolha, quem realizou a recolha e informação adicional como a lista de abreviaturas e informação que o laboratório considera pertinente dispor ao cliente e também a assinatura do técnico superior responsável pelo laboratório. A apresentação dos resultados no boletim está no formato de tabela dispondo os parâmetros analisados, o método utilizado, o resultado obtido, as respectivas unidades, o valor recomendado, o valor limite, o valor paramétricos e a apreciação, isto é, se está ou não conforme com os valores legislados.

Nos exemplos apresentados no anexo C, os resultados descritos tanto no boletim “genérico” como no boletim do controlo de inspecção estão conforme com os valores recomendados e valores paramétricos descritos no Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto. Excepto o pH do primeiro boletim e a dureza do segundo boletim, que se encontram ligeiramente abaixo do valor paramétrico e valor recomendado, respectivamente.

Os boletins agrupam a análise a parâmetros determinados para o controlo de qualidade que segundo Clescer et al (1998) podem ser divididos nos seguintes grupos:

1. Propriedades físicas agregadas (por exemplo: pH, Condutividade);
2. Propriedades químicas agregadas (como por exemplo: Cheiro, oxidabilidade);
3. Compostos inorgânico não metálicos (por exemplo: Nitratos, Nitritos);
4. Compostos orgânicos individuais (por exemplo: PAH's, Pesticidas);
5. Metais (por exemplo: zinco, ferro).

A amostra apresentada no boletim genérico trata-se de uma água de abastecimento e apresenta valores normalizados de cloro residual livre, mostrando que já foi objecto de desinfecção.

A amostra representativa no boletim de controlo de inspecção apresenta uma condutividade baixa, indicando uma água com teores diminutos de iões dissolvidos. Nesta situação, estes iões são cálcio ou magnésio (que conferem a dureza da água) cloretos, nitratos, ferro e manganês. Verifica-se a ausência de materiais perigosos como metais pesados ou compostos orgânicos tóxicos (por exemplo: bromatos e tricloroetano).

Verifica-se que tem características de uma água subterrânea devido aos iões manganês e ferro sendo característico em águas pouco arejadas.

4. Caso de Estudo – Validação de uma Metodologia Analítica

No seguimento de política de qualidade seguida no laboratório, foi proposta a validação da metodologia analítica para a determinação de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) com detecção de índice de refração (*Refractive Index Detectors* – RID). Na fase inicial deste capítulo é feita uma abordagem às metodologias apontadas para a determinação destes analitos, para posteriormente chegar ao conceito da técnica que foi seguida no estágio. Por fim, serão apresentados os procedimentos experimentais, assim como os respectivos resultados e parâmetros de validação.

4.1. Métodos de Determinação de Açúcares

A cromatografia líquida de alto desempenho tem sido a técnica por excelência aplicada à determinação de açúcares em alimentos. Os métodos de detecção empregues variam de RID (Chávez-Serín et al, 2004; Ferreira et al, 1997; Santos et al, 2006), detecção de massas (McRae et al, 2011; Zhang et al, 2011), Fluorescência (Alwael et al, 2010) e permuta iónica (Guignard et al, 2005).

A HPLC-RID é um método fácil por separar a fracção individual dos açúcares de outros componentes tais como: proteínas e outras macromoléculas que possam criar interferência no sistema e na análise qualitativa e quantitativa de mono- e dissacarídeos (Chávez-Serín et al, 2004). Chávez-Serín et al (2004) e Ferreira et al (1997) salientam que o HPLC deve ser o método de eleição para a análise de açúcares pelo facto de ter convenientes tais como: boa precisão, capacidade de separação, rapidez, ser simples e económico.

Contudo os métodos analíticos para a determinação de açúcares, apresentam vantagens e desvantagens. O HPLC-RID ou detectores de espalhamento de luz por evaporação são os mais escolhidos, contudo, estas técnicas não são as mais sensíveis. As técnicas de HPLC com detector amperiométrico de luz pulsada ou detectores de fluorescência

demonstram ser eficazes, porém em pH elevados não são as mais adequadas (McRae, 2011).

McRae, et al (2011) determinaram açúcares usando espectrometria de massa que permite distinguir homólogos de açúcares de massas diferentes. No entanto, em isómeros como a glicose, manose e galactose não podem ser diferenciados por massa. Contudo, o HPLC pode separar esses isómeros. Estes autores descreveram um novo método quantitativo por cromatografia líquida de ionização com detecção espectrométrica de massa (liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry - LC-ESI-MS/MS) para a análise de açúcares redutores com uma prévia derivatização. Verificaram que o método tem especificidade e sensibilidade em de matrizes complexas de açúcares, incluindo isótopos.

Zang et al (2011) determinaram açúcares a diferentes níveis de reacção *Maillard* com diluição isotópica. Os produtos da reacção *Maillard* foram preparados através da digestão por microondas (Microwave digestion labstation - MDL), com diferentes tempos de aquecimento. Por fim analisados por UHPLC – MS/MS (Ultra High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry). Para estes autores o uso de MDL torna o método mais rápido e sensível.

Na análise cromatográfica dos açúcares existem inúmeras dificuldades, especialmente devido à variedade de açúcares que ocorrem na natureza. Além disso, a grande variedade de grupos funcionais aumenta a diversidade química, assim complicando a escolha da fase estacionária e móvel. A cromatografia gasosa (GC) de detector de ionização de chama (*flame ionization detector* – FID) ou detector espectrométrico de massa (*Mass Spectrometry* – MS) tem sido empregado para separar e identificar açúcares. No entanto, devida à elevada polaridade hidrófila e baixa volatilidade dos açúcares, estes têm de ser convertidos em acetatos antes de ser analisado por GC. Logo HPLC é muitas vezes o escolhido para quantificar os açúcares (Guignard, 2005).

A cromatografia de alto desempenho de permuta iónica (*High-performance Anion-Exchange Chromatography* - HPAEC) quando acoplada a um detector por amperímetro de luz pulsada (*Pulsed Amperometric Detection* - PAD) é um método eficiente para quantificar açúcares em amostras naturais e produtos alimentares. O PAD é um método electroquímico baseado na oxidação dos açúcares por um eléctrodo com elevada

sensibilidade e selectividade. No entanto, a complexidade das amostras pode levar a um ruído excessivo. Consequentemente, as interferências entre os componentes da amostra e os compostos esperados podem alterar os resultados, levando à difícil integração dos picos. A detecção de espectrometria de massa é selectivo e sensível, e pode, portanto, melhorar os desempenhos cromatográficos. No entanto, a MS é comumente considerada incompatível com o eluentes alcalinos (C. Guignard, 2005).

Alwael et al (2010) analisaram monossacarídeos por cromatografia líquida de fase reversa (High-Performance Reversed-Phase Liquid Chromatography - HPRPLC) com detecção por fluorescência (FL), em matéria-prima complexa e materiais de fermentação. O método HPRPLC com detector de ultra-violeta (UV) ou fluorescência não pode ser usado directamente na determinação de açúcares, pelo facto de ser necessário o uso adequado de cromóforos ou de fluoróforos. Por esta razão, é crucial proceder à derivatização dos açúcares para uma detecção mais sensível e selectiva. Para a derivatização existe uma variedade de reagentes como por exemplo o ácido 2-aminobenzóico para a detecção por fluorescência. Os autores concluíram que o método HPRPLC-FL é rápido e pode ser utilizado para a determinação qualitativa e quantitativa de monossacarídeos em uma variedade de produtos complexos resultantes da biofermentação.

Existem outros métodos diferentes para a determinação do teor dos açúcares descritos em documentos na literatura, tais como, espectroscopia no infra-vermelho médio (Fourier transform mid-infrared – FT-MIR), espectroscopia próximo do infra-vermelho próximo (Fourier transform near-infrared - FT-NIR), espectrofotometria com injeção em fluxo (flow-injection spectrophotometric determination - FIA) e métodos colorimétricos e titulimétricos.

O NIR e o MIR são técnicas de espectroscopia que têm sido gradualmente desenvolvidos nos últimos anos como alternativas à química húmida na indústria de alimentos e agricultura, principalmente porque são métodos simples que podem ser aplicados com baixo custo, de forma rápido e não destrutiva, onde as amostras requerem pouca ou nenhuma preparação (Bureau et al, 2009; Rodriguez-Saona et al, 2001; Shen et al, 2011; Tewari et al, 2008). Recentemente, muitos estudos têm-se concentrado na aplicação da tecnologia MIR, uma vez que pode oferecer uma determinação mais precisa dos elementos e propriedades do que o método NIR (Shen et al, 2011).

A tecnologia MIR basea-se na determinação das ligações de grupos funcionais, tais como C-C, C-H, O-H, C = O e N-H, após a absorção de radiação na região do infravermelho médio, que é geralmente definida por de 400 a 4000 cm^{-1} , ou em comprimentos de onda de 2500 a 25000 nm (Shen et al, 2011). Como neste comprimento de onda é absorvida a radiação promovendo transição de vibração fundamental e espectros bem definidos levando a uma interpretação directa. Segundo, Bureau et al (2009), o FT-MIR foi desenvolvido para determinar o teor de sólidos solúveis totais como os açúcares usando a refletância total. Ao comparar com o método enzimático de determinação do teor de açúcares verificou que o tempo de análise reduzir significativamente.

Por outro lado, o método NIR é rápido e fornece uma análise sem o uso de quaisquer produtos químicos (Tewari et al, 2008). Permite uma análise directa de amostras, sem uma prévia preparação ou diluição, e são rapidamente absorvidas. Os espectros desta região de IV são complexos uma vez que resultam de absorções menos intensas e ocorrem sobreposições e combinações de ligações entre átomos de grupos funcionais diferentes. Por esta razão é necessário aplicar métodos estatísticos que permitem determinar as propriedades dos monossacarídeos utilizando vários comprimentos de onda. No entanto, a aplicação do NIR medição de sistemas aquosos tem sido difícil por causa da interferência das faixas vibracionais da água (Rodriguez-Saona et al, 2001).

Rambla et al, (1997) estudaram a capacidade de NIR para identificar e quantificar glicose, frutose, sacarose e o teor de açúcar total em misturas sintéticas e amostras de frutas da correlação dos açúcares espectrais com a concentração dos açúcares pelo método estatístico dos mínimos quadrados parciais (*Partial Least-Squares* - PLS). O espectro de absorvância foi entre 1200 e 2450 nm com uma velocidade de digitalização de 480 nm/min e uma resolução de 1 nm. Para os autores o NIR é importante na determinação dos açúcares em matrizes alimentares complexas, e o uso da primeira derivada nos espectros evita erros relacionados com a presença de partículas sólidas.

O método FIA em conjunto com a fotodegradação para a determinação dos açúcares totais é simples, barato e fácil de implementar. Este método tem vantagens como, análise rápida, baixo risco de contaminação e consumo reduzido de reagentes (Llamas et al, 2011).

Um estudo de comparação entre o método colorimétrico e titulométrico, afirma que ambos os métodos podem ser utilizados na quantificação dos açúcares com resultados fidedignos, contudo os resultados obtidos pelo método colorimétrico são os mais precisos (I. M. Demiate et al, 2002).

Os métodos, como titulométricos (complexação com EDTA; Lane-Enyon e Luff-Shoorl); gravimétricos (Musson-Walker) e Espectrofotométricos (ADNS; Autrona; Fenol-sulfúrico; e Somogyi-Nelson) consistem em reacções de oxidação e/ou redução entre grupos funcionais dos açúcares e soluções aquosas utilizadas nos métodos (Silva, et al; 2003).

Os métodos baseados na presença dos grupos funcionais acabam por não ser os mais fiáveis, pelo facto de poder existir outros compostos orgânicos, também com os mesmos grupos funcionais, que também serão quantificados nos métodos.

4.2. Aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC

Actualmente a HPLC é considerada da maior relevância porque é um método de separação e uma técnica de análise muito eficiente, ou seja, separa compostos em curtos espaços de tempo e é capaz de fornecer uma análise quantitativa à escala de parte por bilião. Martin e Synge, os responsáveis pelo desenvolvimento desta metodologia analítica, em 1941 estavam cientes que a fase estacionária, presente numa coluna, retinha partículas muito pequenas, e que a uma pressão elevada da fase móvel (FM) permitia o caudal ideal para que esta percorra a coluna desejável. Por isso é que o HPLC por vezes é referido com cromatografia líquida de alta pressão (Meyer, 1997).

A HPLC tem como princípio a separação de compostos de uma amostra, compostos estes que são arrastados por uma fase móvel perante uma fase estacionária. Normalmente, neste método analítico a fase móvel ou eluente é uma solução líquida e a fase estacionária ou resina uma superfície sólida. A separação de partículas ocorre na fase estacionária presente na coluna, dependendo da afinidade entre esta e o analito. Deste modo, a área de contacto é maior entre a fase estacionária e o composto em estudo o que permite maior eficiência de separação.

O sistema do processo de cromatografia, em termos genéricos divide-se em:

1. Sistema de alta pressão no qual a fase móvel é bombeada;
2. Injetor de amostras do tipo “loop”;
3. Coluna;
4. Sistema de detecção (índice de refração, condutividade, UV, amperimetria, espectrofotometria, entre outros);
5. Software para a aquisição e tratamento de dados.

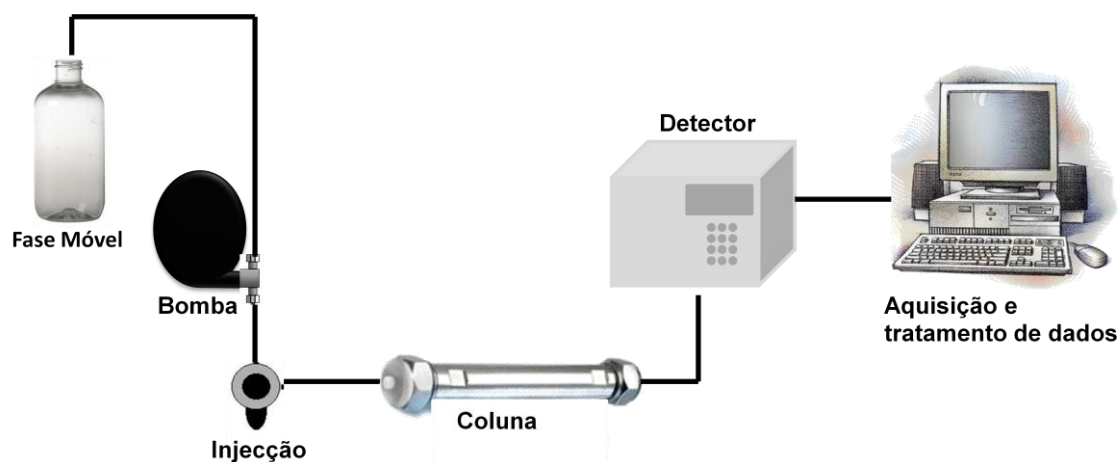


Figura 3: Esquema representativo do processo HPLC

A amostra líquida é introduzida na corrente do eluente, e é a partir da corrente que os compostos são separados à medida que se deslocam pela coluna, dependendo do seu tamanho e/ou peso molecular. Em seguida, o detector regista o índice de refração (para o equipamento em uso), e de seguida transmite um sinal um computador que o transforma num cromatograma através de um software.

O RID aplicados nas determinações de açúcares, não são selectivos e geralmente são utilizados para complementar os detectores de UV. Nestes detectores são registadas todas as zonas de eluição que tenham um índice de refractividade diferente do de uma fase móvel. O sinal emitido é mais intenso quanto maior for a diferença entre os índices

de refratividade da amostra e da fase móvel. Os detectores de índice de refração são aproximadamente 1000 vezes menos sensíveis do que os detectores UV (Meyer, 1997).

Sendo o objectivo do trabalho a validação do método de determinação de açúcares por HPLC-RID, otimizar as condições experimentais e de leitura e determinar os principais parâmetros do processo aplicados à determinação da frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose.

4.3. Metodologias Analíticas

4.3.1. Equipamentos

O HPLC de modelo LC-2010A *liquid chromatograph* (Shimadzu), é constituído por: autosampler, bomba quaternária, forno, uma coluna analítica de aço inox (Waters), com dimensões de 300x3,9mm e do tipo *Carbohydrate analysis*, um detector de índice de refração de modelo RID 10A (Shimadzu) e *software* do equipamento *LCsolutions* para analisar os dados.

Para este equipamento as condições experimentais mantidas foram:

- Na coluna a pressão entre 1000 a 1500 psi e a temperatura a 60°C;
- A fase móvel, FM, constituída por acetonitrilo (Fisher Chemical) e água com razão de 80:20 (v/v) e fluxo de 2 mL/min;
- Nestas condições o tempo de análise foi 20min.

Contudo a pressão pode variar dependendo do estado de colmatção da coluna, o que vai interferir com o fluxo da fase móvel, isto é, quanto maior for a pressão menor será o fluxo da fase móvel, que varia entre 0,5 a 2 mL/min. Estas condições também podem fazer variar o tempo de análise, pois se diminuir o fluxo da fase móvel tem-se de aumentar o tempo de análise entre 20 a 50 min.

4.2.2 Método Analítico

A quantificação dos açúcares é conseguida a partir de uma recta de calibração obtida pela equação que relaciona a área do pico (sinal do analito) em função da concentração dos padrões. Preparam-se padrões de frutose, glucose, maltose e sacarose (SIGMA) e sacarose (*Riedel – de Haën*) de forma a obter concentrações entre 1,0 % a 3,0 % (massa/volume – (m/v)), isto é, 1,0 a 3,0 g/100mL e prefazendo o volume com água bidestilada. Após a sua filtração com filtros de seringa de Nylon de 0,2 µm para *vials* (recipiente de vidro com amostra introduzido no HPLC) os padrões analisam-se no HPLC, obtendo-se a recta de calibração.

Também foram efectuadas a análise em amostras de alimentação humana e animal e soros. Para esta análise, as amostras têm de ser previamente preparadas. Pesam-se as amostras entre 1 a 5 g para frasco, dependendo do teor de açúcar esperado. Adicionam-se cerca de 30mL de água bidestilada a 80°C e levam-se ao ultra-sons durante 15 min. Seguidamente, transferem-se para balões volumétricos de 50 mL, lavam-se os frascos com água bidestilada e aferem-se os balões pelo menisco. Filtram-se as amostras com papel de filtro. Passam-se a amostra filtrada por colunas C18 e por fim filtrar com os filtros de seringa de Nylon de 0,2 µm para *vials*. Em amostras líquidas, como sumos, refrigerantes e bebidas alcoólicas, as amostras têm de ser desgaseificadas e apenas se filtram com filtros de seringa de Nylon de 0,2 µm.

4.3 Apresentação dos Resultados

Foram estabelecidas as condições experimentais tais como: composição e fluxo da fase móvel, bem como o tempo de análise, a temperatura do detector e o volume de injeção do analito. Para obter uma simetria dos picos do cromatograma foi usado acetonitrilo:água, como fase móvel na proporção de 80:20 (v/v), com um fluxo constante de 2 mL/min, obtendo-se o tempo de análise de 20min. Para determinar a curva de calibração foram injectados 20 µL dos padrões. Entretanto, o RID requer um controlo de temperatura, sendo a condição favorável de 60°C. A figura seguinte apresenta o cromatograma representativo de um padrão deste método analítico para determinar o teor de açúcares.

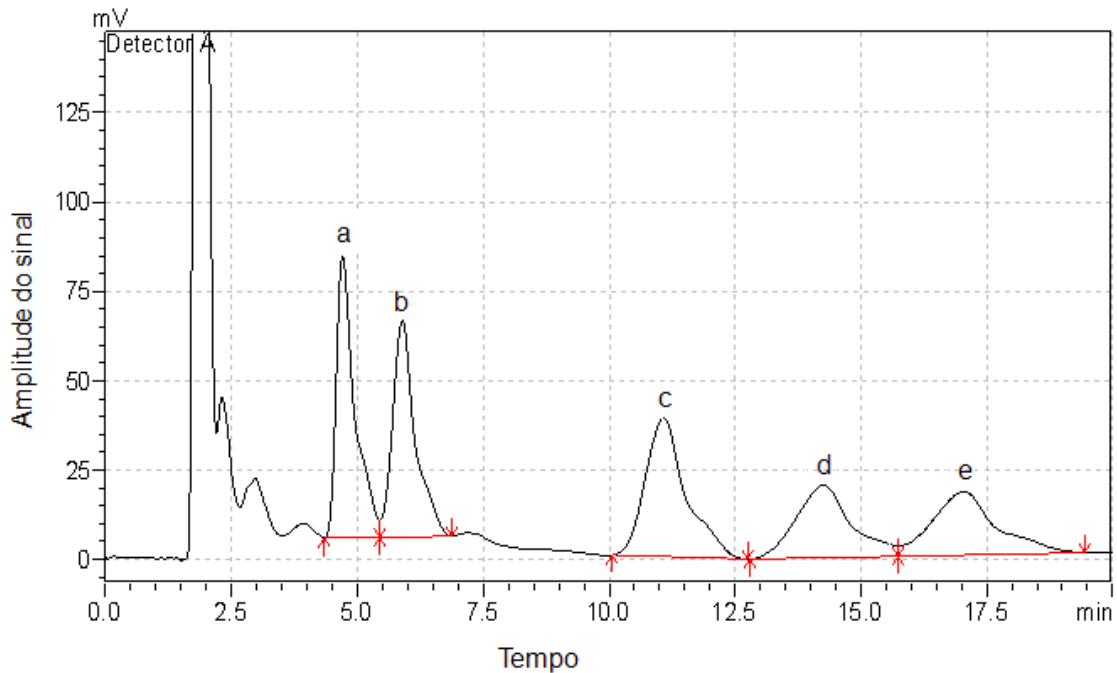


Figura 4: Cromatograma representativo dos padrões de açúcares: frutose (a) a 4,72 min; glucose (b) a 5,90 min; sacarose (c) a 11,15 min; maltose (d) a 14,27 min e lactose (e) a 17,05 min.

A análise da frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose foram executadas em simultâneo. Com a leitura de cada padrão obteve-se individualmente cada um dos açúcares e fez-se a sua identificação através dos tempos de retenção dos picos no cromatograma. O cromatograma representativo de um padrão evidencia a simetria dos picos, bem como os tempos de retenção dos vários tipos de açúcar, nas condições operacionais descritas anteriormente.

Na generalidade os alimentos não têm todos os tipos de açúcar, como demonstra a figura 5. Para a distinção dos picos dos mesmos e respectiva composição nos cromatogramas analisa-se os tempos de retenção e a amostra. Por exemplo, quando se tem dúvidas em atribuir o pico ao açúcar correspondente pode-se através da composição da amostra saber qual é o açúcar.

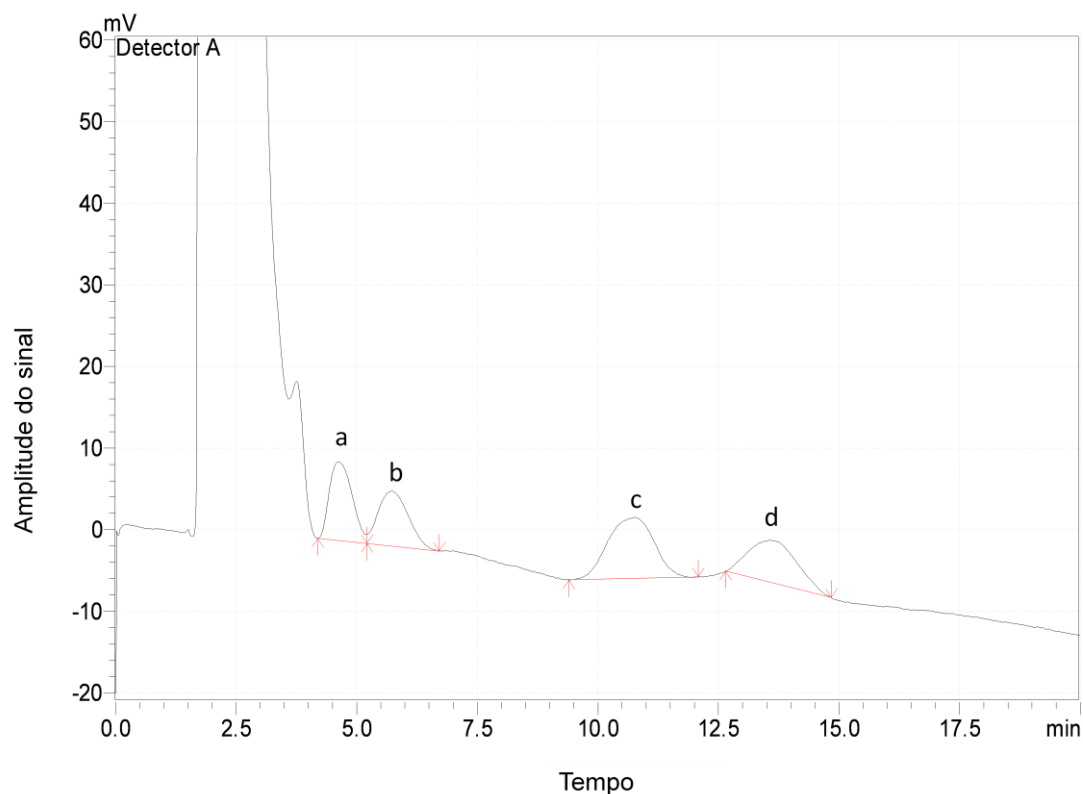


Figura 5: Cromatograma representativo de uma amostra: torta de morango. Onde: frutose (a); glucose (b); sacarose (c) e maltose (d).

Por vezes pode-se confundir o pico da maltose com o pico da lactose e só se distinguem através do tipo de amostra, ou seja, que tipo de açúcar é mais comum aparecer na amostra em análise. Os açúcares mais abundantes são a frutose, glucose e sacarose, sendo este último o que mais se destaca.

No processo de validação, o estudo da linearidade foram feitas as leituras de seis padrões, com concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g/100mL. A figura 4 apresenta as rectas de calibração obtidas na leitura do HPLC-RID sob a forma área do pico em função da concentração dos correspondentes açúcares.

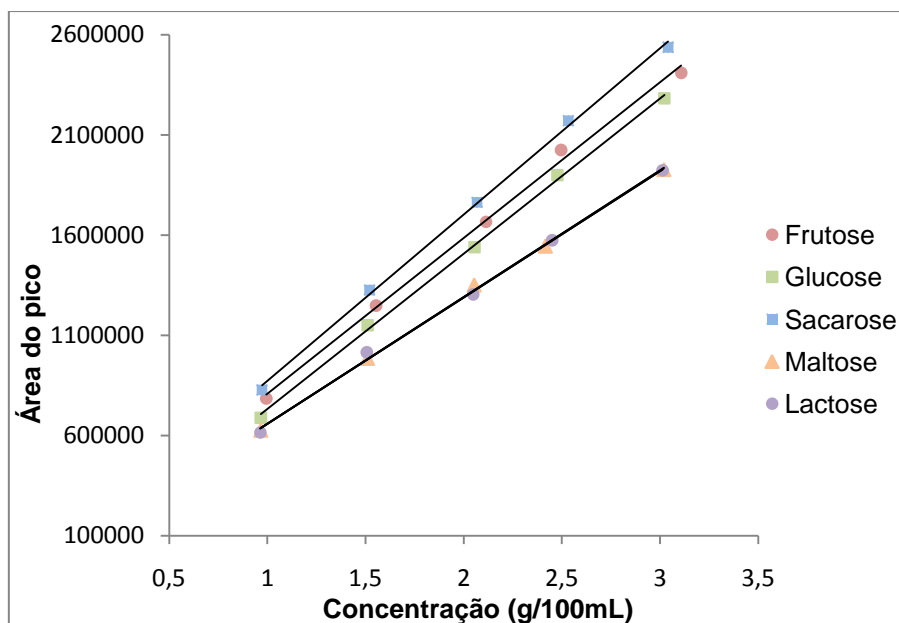


Figura 6: Variação da área dos picos em função da concentração dos padrões dos açúcares

Tabela 6: Caracterização das rectas de calibração dos açúcares e os respectivos factores de correlação

Monossacarídeos	Recta de Calibração	Factor de correlação
Frutose		0,9971
Glucose		0,9989
Sacarose		0,9986
Maltose		0,9992
Lactose		0,9979

A linearidade obtém-se a partir da relação área em função das concentrações dos padrões dos açúcares no intervalo de concentração de estudo. Para se poder comprovar a linearidade deve-se calcular os desvios padrões residuais da função de calibração, a diferença das variâncias (equação 3, do alínea 2.1.1.) e o valor do teste F (equação 4, do alínea 2.1.1.). Este último parâmetro, posteriormente, é comparado com o valor da distribuição de *F* de Snedecor/Fisher.

Tabela 7: Valores de para os açúcares

Monossacarídeos	Distribuição de tabelado a 99% (N=5)	
Frutose	1,89	
Glucose	0,84	
Sacarose	1,54	15,98
Maltose	3,11	
Lactose	1,57	

Ao relacionar o com a distribuição de tabelado a 99% foi verificado que em todos os açúcares são menores que tabelado, sendo assim pode-se comprovar a linearidade das funções de calibrações.

Os parâmetros obtidos no estudo da validação como a sensibilidade, precisão, coeficiente de variação e desvio padrão, limite de detecção e limite de quantificação estão representados na tabela 8.

Os valores de sensibilidade, obtidos através do declive da recta de calibração, demonstram que o método apresenta maior sensibilidade para a sacarose, seguem-se a glusoce, frutose e maltose e por fim a lactose. Estes resultados indicam que para uma variação equivalente de concentração dos açúcares, o detector apresenta maior sinal para a sacarose, induzindo maior variação de área do respectivo pico em relação aos restantes açúcares.

A determinação da precisão, foi efectuada a partir da leitura de dez vezes de uma amostra, que continha apenas frutose, glucose, sacarose. A repetibilidade da determinação da frutose, glucose e sacarose foram 7,77; 6,24 e 3,22 % respectivamente. Através destes resultados pode-se afirmação que a quantificação dos açúcares obedeceu ao critério, $r \leq 10\%$. A sacarose foi a que apresentou os valores mais precisos, ou seja os valores obtidos na análise da sacarose são os mais reprodutíveis.

Santos et al (2006) determinaram os parâmetros de validação no método HPLC-RID para análise de açúcares (frutose, glucose e sacarose) em amostras de processo de produção de polímeros biodegradáveis. Obtiveram valores de precisão dados pelo

coeficiente de variação para a frutose, glucose e sacarose de 3,60; 3,92 e 4,71% respectivamente. Outros autores como Chávez-Serín et al (2004) analisaram mono- e dissacarídeos no leite através de HPLC-RID, tendo desenvolvido o processo de validação do respectivo método. Estes autores tiveram como resultados da precisão para a frutose, sacarose e lactose de 12,61; 8,58 e 16,39 g/100g. E os respectivos desvios padrões foram de 0,10; 0,09 e 0,08 g/100g. Pode então concluir-se que os dados de precisão são da mesma ordem de grandeza dos espectáveis para este método.

Para determinar o limite de quantificação foi considerado o padrão mais pequeno, 1,0 g/100mL, seguindo o procedimento definido no ponto 2.1.2, estudo do limite de quantificação através do primeiro padrão da curva de calibração. Na prática foram feitas dez leituras desse padrão. O LQ para ser aceite como 1,0 g/100g, teve ser feito o cálculo do coeficiente de variâncias e do erro (equações 11 e 12 respectivamente no ponto 2.1.3.) e ambos têm de ser inferiores a 10%. De acordo com resultados (Anexo D), o LQ para os açúcares é o considerado. Relativamente ao LD, este é três vezes menor que o LQ, desta forma o valor do LD é de 0,3 g/100g.

Santos et al (2006), no seu estudo, apresentam valores de LQ para a frutose, glucose e sacarose de 0,0728; 0,122 e 0,0512 g/kg (0,0073; 0,0122 e 0,0051 g/100g), respectivamente. E no LD obtiveram 0,0218; 0,0367 e 0,0154 g/kg, (0,0022; 0,0037 e 0,0015 g/100g) respectivamente. Chávez-Serín et al (2004) indicam resultados de LQ para frutose, glucose, sacarose e lactose de 0,27; 0,24; 0,26 e 0,38 mg/mL (0,027; 0,024; 0,026 e 0,038g/100g), respectivamente. E como valores de LD tiveram 0,17; 0,13; 0,16 e 0,25 mg/mL (0,017; 0,013; 0,016 e 0,025 g/100g) respectivamente. Como já foi referido anteriormente, o cálculo do LQ foi determinado através do estudo do primeiro padrão da curva de calibração (descrito no capítulo 2, no ponto 2.1.2, alínea 2 do limite de quantificação), enquanto estes autores obtiveram este parâmetro através dos mínimos quadrados da recta de calibração (descrito no capítulo 2, no ponto 2.1.2, alínea 3 do limite de quantificação). Embora com metodologias diferentes, que se podem afirmar adequadas, verifica-se que os autores citados apresentam limites inferiores de quantificação.

Para definir o critério de aceitação do branco, foi preparado cinco brancos, cumprindo todo o processo de determinação do teor de açúcares. Na análise dos cromatogramas obtidos não foi verificado nenhum pico dos açúcares. Os resultados obtidos obedecem o

que está estipulado, ou seja valor final foi igual ou inferior a um terço da leitura do limite de quantificação e do primeiro padrão.

Tabela 8: Parâmetros do processo de validação do método analítico (repetibilidade avaliada em amostras de sumo)

Parâmetros	Frutose	Glucose	Sacarose	Maltose	Lactose
Sensibilidade	789973	790863	850874	639765	621291
Linearidade de trabalho (g/100mL)	0,99 - 3,02	0,97- 3,11	0,97 - 3,04	0,97 - 3,02	0,96 - 3,01
Repetibilidade (%)	7,77	6,24	3,22	-	-
Coefficiente de variação (%)	2,75	2,21	1,14	-	-
Media ± S (g/100mL)	1,68 ± 0,046	5,16 ± 0,11	4,93 ± 0,056	-	-
LQ (g/100g)			1,0		
LD (g/100g)			0,3		
Branco			< LD		

Para cálculo de incerteza foi avaliado a incerteza associada na preparação dos padrões, à linearidade do método e à precisão global. O outro parâmetro presente no cálculo da incerteza, a recuperação, não foi determinada experimentalmente, assim sendo foi desprezado. O Anexo E exemplifica os cálculos efectuados para a determinação de incerteza dos resultados da determinação dos açúcares.

Para a incerteza associada na preparação dos padrões, calculada pela equação 20 teve-se em conta a capacidade do material utilizado, bem como o seu erro associado. Ou seja, numa balança avalia-se a quantidade que foi pesada, na pipeta a quantidade que foi pipetada e no balão volumétrico o seu volume total.

Na linearidade, a respectiva incerteza foi calculada a partir da equação 21. O método avalia-se conforme o declive, o desvio padrão, o número dos padrões, a concentração dos padrões, e neste caso, a área do padrão obtida pela recta de calibração.

A incerteza relacionada com a precisão global, avaliado através da equação 22, foi a última a ser estudada na prática, e considera-se a média da concentração e o desvio padrão obtidos nas dez leituras de uma amostra (tratando-se de um sumo nesta avaliação).

A determinação da incerteza foi feita para a análise da frutose, da glucose, e da sacarose pelo facto de apenas existir em resultados da precisão global para esses três açúcares. Uma vez que no sumo em questão não foram identificados os restantes açúcares. A tabela 9 indica os resultados obtidos das incertezas associadas à preparação dos padrões, à linearidade e à precisão, bem como a incerteza global e a incerteza expandida. Já figura 7 demonstra a variação da incerteza global.

Com os resultados obtidos pode-se observar que com o aumento da concentração dos padrões a incerteza vai diminuindo, excepto o último padrão que aumenta ligeiramente. Esta é uma situação explicável uma vez que com padrões mais baixos, utilizam-se da medida com erros mais próximos dos valores medidos e a própria repetibilidade dos picos obtidos nos cromatogramas é mais baixa. Verifica-se, também, que a frutose é o açúcar com menores resultados de incerteza. Ao contrário da glucose que tem os resultados da incerteza maiores.

Segundo a análise da amostra apresentada no presente trabalho, a torta de morango, pode referir-se que os respectivos teores de açúcares são, considerando a incerteza estimada: $1,8 \pm 0,1$ g/100g de frutose, $3,9 \pm 0,3$ g/100g de glucose, $16,7 \pm 1,0$ g/100g de sacarose e 9,7 g/100g de maltose. A percentagem da incerteza é obtida pelo gráfico da figura 7, considerando a linha correspondente a cada açúcar. A incerteza da glucose e da sacarose, e uma vez que a concentração na amostra é superior à concentração apresentada no referido gráfico, foi considerada 7%. Isto resulta do facto de a partir da gama de concentração de 3,5 g/100 mL se verificar um patamar na incerteza estimada, podendo-se extrapolar que não há variação de incerteza para concentrações superiores. A incerteza associada à maltose não está apresentada uma vez que não foi estimada, por não haver dados suficientes para a realização da mesma.

De acordo com o boletim apresentado aos clientes o resultado do teor total de açúcar é a soma das concentrações de todos açúcares observados, assim, a amostra apresentada tem com teor total de açúcar $32,1 \pm 1,9$ g/100g.

Tabela 9: Variação da incerteza percentual em função da concentração

Monossacarídeos	Concentração	U_1	U_2	U_3	U_t (%)	$U_{expandido}$ (%)
	(g/100mL)					
Frutose	0,99	0,016	0,115	0,0087	11,6	23,2
	1,55	0,016	0,070	0,0087	7,2	14,4
	2,11	0,020	0,053	0,0087	5,7	11,4
	2,49	0,002	0,050	0,0087	5,0	10,0
	3,11	0,001	0,054	0,0087	5,5	11,0
Glucose	0,97	0,016	0,148	0,0070	14,9	29,8
	1,51	0,016	0,093	0,0070	9,4	18,8
	2,06	0,020	0,072	0,0070	7,5	15,0
	2,42	0,002	0,067	0,0070	6,7	13,4
	3,02	0,001	0,069	0,0070	6,9	13,8
Sacarose	0,97	0,016	0,147	0,0036	14,8	29,6
	1,52	0,016	0,089	0,0036	9,1	18,2
	2,07	0,020	0,067	0,0036	7,0	14,0
	2,43	0,002	0,060	0,0036	6,0	12,0
	3,04	0,001	0,045	0,0036	6,8	13,6

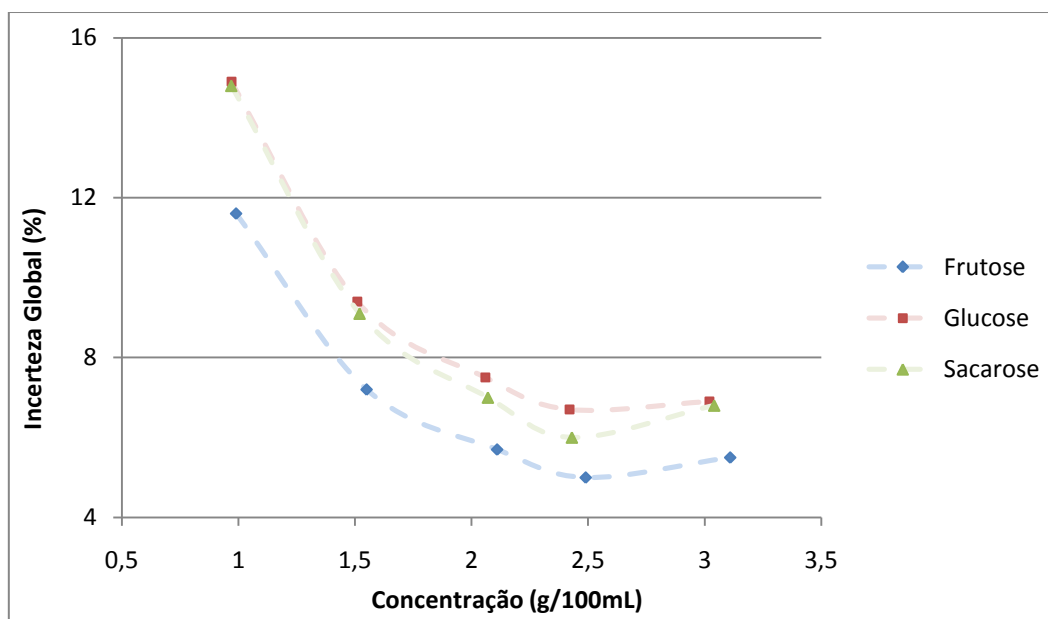


Figura 7: Variação da incerteza global em função da concentração

Avaliando os dados apresentados na literatura, o estudo do processo de validação deste método cromatográfico para a determinação de açúcares em amostras sólidas efectuado neste trabalho é adequado. Contudo o estudo da determinação do teor dos açúcares é complexo, por isso requer uma análise mais aprofundada, principalmente no que diz respeito condições experimentais e operacionais do equipamento.

Num estudo de análise de açúcares por HPLC e com fase móvel de apenas acetronitrilo, verificou-se que a temperatura da coluna tem um papel importante no desenvolvimento nos resultados cromatográficos e nos limites de detecção, principalmente quando a coluna é específica para açúcares. Portanto, para reduzir o LD e o LQ conclui-se que se deva reduzir a temperatura. Com o aumento da temperatura ocorre o desaparecimento do pico correspondente à glucose (Slimestad et al, 2006).

Chávez-Servín, et al (2004) apresentam resultados associados à optimização do método similar ao descrito no presente trabalho. Debruçaram-se na análise do efeito de duas condições experimentais, tais como, a razão apropriada para a fase móvel acetonitrilo:água e o poder de extracção dos açucares dos alimentos na solução etanol:água com razão de 1:1 (v:v). Os autores experimentaram a FM com razões de concentrações de 75:25, 80:20, 85:15 e 90:10 e verificaram que a razão 75:25 (v:v) eluia

mais rapidamente os açúcares e desta forma obtinha uma melhor simetria nos picos, com exceção de glucose e galactose que se sobrepunham. No que concerne à solução de extracção, investigaram que o etanol extraia outros compostos para além dos açúcares, por isso utilizou as soluções Carrez I e II para precipitar esses compostos.

Sims (1995) observou que a análise de HPLC é limitada na determinação dos açúcares em alimentos que contêm sal (NaCl), porque ocorre a eluição do sal, que na obtenção dos resultados interfere com os açúcares. O autor propõe como solução para este problema a adição de uma pequena percentagem de cloreto de sódio na fase móvel para ajustar a selectividade do pico do sal, mantendo a resolução dos picos dos açúcares. Esta solução pode ser usada em todas as matrizes alimentares, incluindo alimentos que não contêm sal. A adição de cloreto de sódio na fase móvel não tem qualquer inconveniente tanto na coluna como nos tempos de retenção. Esta modificação simples deverá ser útil na análise dos açúcares em diversas matrizes alimentares, particularmente na rotulagem nutricional.

Conclusão

O desenvolvimento e aprofundamento do saber promovem o aumento do conhecimento e a aquisição de metodologias de trabalho importantes para a inserção numa actividade profissional. Desta forma é possível afirmar que com presente estágio foram adquiridas competências em todo o processo de o controlo da qualidade a nível analítico, nomeadamente em amostras de água de consumo, superficiais e subterrâneas. Foram realizadas inúmeras análises associadas à determinação de propriedades físicas agregadas, propriedades químicas agregadas, compostos inorgânicos não metálicos, compostos orgânicos individuais e metais.

Ao longo do período de estágio foi promovida a aquisição de aptidões nos métodos cromatográficos, proceder aos cálculos dos processos de validação e incerteza para que os laboratórios consigam cumprir os requisitos de ensaios e calibrações descritos na NP 17025:2007.

Globalmente, foi possível estar enquadrada num grupo de trabalho interessado e competente que promoveu o interesse por esta área de actividade. Foi ainda possível contactar com as dificuldades do dia-a-dia empresarial mas também com as ferramentas necessárias para ultrapassar essas mesmas dificuldades.

Bibliografia

1. ALWAEEL, H.; CONNOLLY, D.; PAULL, B.; “Liquid chromatographic profiling of monosaccharide concentrations in complex cell-culture media and fermentation broths” *Anal. Methods*, Vol. 3 (2011) 62-69.
2. BRÁS, I., RATOLA, N., ALVES, A., “Uncertainty in the Quantification of Pentachlorophenol in Wood Processing Wastewaters by SPME-CG-MS” *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 66, Nº 8 (2011) 756-762.
3. BUREAU, S., RUIZ, D., REICH, M., GOUBLE, B., BERTRAND, D., “Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit” *Food Chemistry*, Vol. 115 (2009) 1133–1140.
4. CHÁVEZ-SERVÍN, J. L., CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; “Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection” *Journal of Chromatography A*, Vol. 1043 (2004) 211–215.
5. CLESCER, L.; GREENBERG, A.; EATON, A.; “**Standard Methods for the examination of water and wastewater**” 20^oedition, Apha Awwa Wef, 1998.
6. CONTROLVET – SEGUNRANÇA ALIMENTAR, 2009, (Consulta em 11 Fev. 2011) disponível em <http://www.controlvet.pt/>.
7. DECRETO-LEI nº236/98. **D. R. Série I-A.** 176 (1998-08-01) 3676-3722. Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Revoga o [Decreto-Lei n.º 74/90](#) de 7 de Março
8. DECRETO-LEI nº243/01. **D. R. Série I-A.** 206 (2001-09-05) 5754-5765. Aprova normas relativas à qualidade da água destinada ao consumo humano transpondo para o direito interno a Directiva n.º [98/83/CE](#), do Conselho, de 3 de Novembro, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano.

9. DECRETO-LEI n°306/07. **D. R. Série I.** 164 (2007-08-27) 5747-5765. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o [Decreto-Lei n.º 243/2001](#) de 5 de Setembro, que transpôs para a ordem jurídica interna a Directiva n.º [98/83/CE](#), do Conselho, de 3 de Novembro.
10. DEMIATE, I. M., WOSIACHI, G., CSELUSNIAK, C., NOGUEIRA, A., “Determinação dos açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre o método colorimétrico e titulimétrico” **Exact and Soil Sciences, Agrarian, S. Engineering**, Vol. 8, N° 1 (2002) 65-78.
11. EURACHEM/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, second Edition. UK: Ellison S. L. R., Rosslein M., Williams A. Editors, 2000.
12. EURACHEM/CITAC Guide, *Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches*, First Edition. UK: Ramsey M. H.; Ellison S. L. R. Editors, 2007.
13. FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; GOMES, A. M. P.; FERREIRA, M. A.; “Determination of sugars, and some other compounds in infant formulae, follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI” **Carbohydrate Polymers**, Vol. 37 (1998) 225–229.
14. GONZÁLEZ, A. G., MERRADOR, M. A.; “A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles” **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 26, N° 3, (2007).
15. GUIGNARD, C.; JOUVE, L.; BOGÉAT-TRIBOULOT, M. B.; DREYER, E.; HAUSMAN, J. F.; HOFFMANN, L.; “Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry” **Journal of Chromatography A**, Vol. 1085 (2005) 137-142.
16. ISO 5667-3. 2003 **Water quality -- Sampling: Guidance on the preservation and handling of water samples**, third edition (2003-11-21).
17. ISO 5667-14. 1998 **Water quality -- Sampling: Guidance on quality assurance of environmental water sampling and handling**, first edition (1998-11-15).

18. ISO 7027. 1999, Water quality – **Determination of turbidity**, second edition (1999-12-15).
19. ISO 8466-1. 1990, water quality – **Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the of the linear calibration function**, (1990-03-01).
20. ISO 8467. 1993, Water quality – **Determination of permanganate index**; second edition (1993-06-15).
21. LANGEMEIER, J. M., ROGERS, D. E., “Rapid Method for Sugar Analysis of Doughs and Baked Products” **Cereal Chem**, Vol. 72, N° 4, (1995) 349-351.
22. LLAMAS, N. E., NEZIO, M. S., BAND, B. S., “Flow-injection spectrophotometric method with on-line photodegradation for determination of ascorbic acid and total sugars in fruit juices” **Journal of Food Composition and Analysis**, Vol. 24 (2011) 127–130.
23. MCRAE, G.; MONREAL, C. M.; “LC-MS/MS quantitative analysis of reducing carbohydrates in soil solutions extracted from crop rhizospheres” **Anal Bioanal Chem**, Vol. 400 (2011) 2205-2215.
24. MEYER, V. R., “**Practical High-Performance Liquid Chromatography**” 2nd edition, (1997) John Wiley & Sons.
25. NP 423. 1966, Água – **Determinação de teor em cloretos**; Lisboa: IGPAI.
26. NP 4338-1. 1996, Qualidade da água – **Determinação de nitrates. Parte 1: Método espectrométrico do 2,6-dimetilfenol**. Monte de Caparica: IPQ.
27. NP EN 26777. 1996, Qualidade da água – **Determinação de nitritos. Método por espectrometria de absorção molecular (ISO 6777:1985)**, Monte da Caparica: IPQ.
28. NP EN ISO/IEC 17025. 2007, **Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios e calibração**, Monte da Caparica, IPQ.

29. RAMBLA, F. J., GARRIGUES, S., GUARDIA, M.; “PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose, and sucrose in aqueous solutions of fruit juices” **Analytica Chimica Acta**, Vol. 344 (1997) 41-53.
30. RODRIGUEZ-SAONA, L. E., FRY, F. S., MCLAUGHLIN, M. A., CALVEY, E. M., “Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy” **Carbohydrate Research**, Vol. 336 (2001) 63–74.
31. SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V.; “Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de produção de polímeros biodegradáveis” **Eclética Química: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho** (2006) 13-19.
32. SHEN, F., YING, Y., LI, B., ZHENG, Y., HU, J., “Prediction of sugars and acids Chinese rice wine by mid-infrared spectroscopy” **Food Research International**, Vol. 44 (2011) 1521–1527.
33. SILVA, P. A. L. “Estimativa da Incerteza de Medição: alternativas para o Diagrama de Ishikawa e para o gráfico das contribuições individuais” **Congresso da qualidade em Metrologia**, (2008).
34. SILVA, R., MONTEIRO, V. N., ALCANFOR, J. A. X., ASSIS, E. M., ASQUIERI, E. R., “Comparação de Métodos para a Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Mel” **Ciências tecnológicas alimentares, Campinas**, Vol. 23, Nº 3 (2003) 337-341.
35. SIMS, A., “HPLC Analysis of Sugar in Food Containing Salt” **J. Agric. Food Chem.** Vol. 43 (1995) 377-380.
36. SLIMESTAD, R., VÅGEN, I. M.; “Thermal Stability of Glucose and other Sugar Aldoses in Normal Phase High Performance Liquid Chromatography” **Journal of Chromatography A**; Vol. 1118 (2006) 281–284.

37. TAVERNIERS, I., LOOSE, M., BOCKSTAELE, E. V.; “Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance” **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 23, N° 8 (2004).
38. TEWARI, J. C. DIXIT, V., CHO, B. K., MALIK, K. A.; “Determination of origin an sugars of fruits using genetic algorithm, correspondence analysis and partial least square combined with fiber optic NIR spectroscopy” **Spectrochimica Acta Part A**, Vol. 71 (2008) 1119–1127.
39. ZHANG, Y.; REN, Y.; JIAO, J.; LI, D.; ZHANG, Y.; “Ultra High-Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Analysis of Asparagine, Sugars, and Acrylamide in Maillard Reactions” **Anal. Chem**, Vol. 83 (2011) 3297–3304

Anexos

Anexo A: Tabela da distribuição F de Snedecor/FisherTabela A 1: Distribuição F de Snedecor/Fisher com percentual de 99%

v1 →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30
v2 ↓																	
1	4052.18	4999.34	5403.53	5624.26	5763.96	5858.95	5928.33	5980.95	6022.40	6055.93	6083.40	6106.68	6156.97	6208.66	6234.27	6239.86	6260.35
2	98.50	99.00	99.16	99.25	99.30	99.33	99.36	99.38	99.39	99.40	99.41	99.42	99.43	99.45	99.46	99.46	99.47
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.34	27.23	27.13	27.05	26.87	26.69	26.60	26.58	26.50
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.45	14.37	14.20	14.02	13.93	13.91	13.84
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.96	9.89	9.72	9.55	9.47	9.45	9.38
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.56	7.40	7.31	7.30	7.23
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.54	6.47	6.31	6.16	6.07	6.06	5.99
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.73	5.67	5.52	5.36	5.28	5.26	5.20
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	4.96	4.81	4.73	4.71	4.65
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.77	4.71	4.56	4.41	4.33	4.31	4.25
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.25	4.10	4.02	4.01	3.94
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.01	3.86	3.78	3.76	3.70
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.82	3.66	3.59	3.57	3.51
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.66	3.51	3.43	3.41	3.35
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.52	3.37	3.29	3.28	3.21
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.62	3.55	3.41	3.26	3.18	3.16	3.10
17	8.40	6.11	5.19	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.46	3.31	3.16	3.08	3.07	3.00
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.43	3.37	3.23	3.08	3.00	2.98	2.92
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.15	3.00	2.92	2.91	2.84
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.29	3.23	3.09	2.94	2.86	2.84	2.78

Anexo B: Critérios de Controlo de Qualidade

Tabela B 1: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de amónia em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	Anual excepto se houver intervenção no equipamento	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 0,05-0,55 mg (NH ₄)/L, onde $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ=0.05mg/L; LD=0,02mg/L
Branco	Diário	<0,02(Abs)
Repetibilidade	Diário	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 6,84% em valor relativo
Precisão	Diário	$0,17 < PC < 0,23 \text{mg/L}$
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 5,6% em valor relativo
Sensibilidade	Diário	$-0,0045 < \text{ordenada} < 0,0104$ $0,8698 < \text{declive} < 1,0771$
Padrões nos Extremos	Diário	Verificar diariamente os padrões dos extremos: $0,0417 < P_i < 0,0600 \text{ (Abs)}$ $0,4354 < P_f < 0,5316 \text{ (Abs)}$
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de $100 \pm 10\%$

Tabela B 2: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de cloretos em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ=8,7; LD=3,3 mg (Cl ⁻)/L
Branco	Diária	<0,13mL de AgNO ₃ (C=0,10N) <0,71mL de AgNO ₃ (C=0,02N)
Repetibilidade	Diária	Realizar com uma frequência mínima de 5%. Superior a 35,5 mg/L – 5,6%; Até 35,5mg/L 5,6225 em valor relativo.
Precisão	Diária	Realizar a análise de um padrão de controlo de NaCl 15,812 < PC < 22,210 mg(Cl ⁻)/L
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 3,9% em valor relativo
Aferição do AgNO₃	Diária	Fazer a aferição em duplicado, Abs (Vaf1-Vaf2)<0,2mL Titulante com C=0,02N → 0,0192 <N< 0,0203 Titulante com C=0,10N → 0,0948 <N< 0,1008
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de 100 ±10%

Tabela B 3: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de fluoretos em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	Diária	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 0,5-2 mg (F ⁻)/L, onde $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ= 0,5; LD=0,2mg(F ⁻)/L
Repetibilidade	Série/Dia de análise	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 7,5570% em valor relativo
Precisão	Série/Dia de análise	$0,899 < PC < 1,088 \text{mg(F}^- \text{)/L}$
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 3,4% em valor relativo
Sensibilidade	Diária	$1,7770 < \text{ordenada} < 2,8442$ $(-) 0,0215 < \text{declive} < (-) 0,0156$
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de $100 \pm 10\%$

Tabela B 4: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de nitratos em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	Série/Dia de análise	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 1-25 mg (N-NO ₃)/L, onde $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ=1mg/L; LD=0,33mg/L
Branco	Série/Dia de análise	<0,02(Abs)
Repetibilidade	Série/Dia de análise	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 8,8256% em valor relativo
Precisão	Série/Dia de análise	7,794 < PC < 10,316mg/L
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 5,6% em valor relativo
Sensibilidade	Diária	-0,0242 < ordenada < 0,0321 0,0557 < declive < 0,0705
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de 100 ±10%

Tabela B 5: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de nitritos em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	de Anual	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 0,01-0,05 mg (NO ₂)/L, onde: $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ = 0,01 mg (NO ₂)/L; LD = 0,003 mg (NO ₂)/L
Branco	Diária	<0,004(Abs)
Repetibilidade	Diária	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 5,84% em valor relativo
Precisão	Diária	0,027 < PC < 0,038 mg(NO ₂)/L
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 4,4% em valor relativo
Sensibilidade	Anual (quando se realiza a recta de calibração)	-0,02883 < ordenada < 0,02989 0,83162 < declive < 1,14578
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de 100 ±10%
Padrões nos extremos	Diária	Verificar diariamente um em cada extremo 0,0094 < Pi < 0,0128 (Abs) 0,0455 < Pf < 0,0531 (Abs)

Tabela B 6: Critérios de controlo de qualidade para a determinação do teor de sulfatos em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	Série/Dia de análise	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 10-40 ppm, onde: $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ=10 ppm; LD=3,3 ppm
Branco	Diária	<0,0005(Abs)
Repetibilidade	Diária	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 9,28% em valor relativo
Precisão	Série/Dia de análise	20,17 < PC < 29,37 mg/L
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 6,3% em valor relativo
Sensibilidade	Diária	-0,05854 < ordenada < 0,1747 0,0132 < declive < 0,0223
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de 100 $\pm 10\%$

Tabela B 7: Critérios de controlo de qualidade para a determinação da turvação em águas

Controlo	Periodicidade	Critério
Curva de calibração	Trimestral, excepto se houver alteração no equipamento	Recta de calibração, pelo menos 3 padrões, de primeira ordem. Padrões a variar entre 0,30-10NUT, onde: $R \geq 0,995$
Limiares analíticos	Mensal	O coeficiente de variação e o erro relativo médio ao longo do tempo deve ser $\leq 10\%$ LQ = 0,30 NTU; LD = 0,06 NTU
Branco	Diária	0,0095-0,0822
Repetibilidade	Diária	Realizar com uma frequência mínima de 5% do total das amostras 8,66% em valor relativo
Precisão	Diária	$3,57 < PC < 4,37$ NTU
Exactidão	Pelo menos um por ano	Avaliada através de ensaios interlaboratoriais critério baseado na análise dos Z-scores da entidade organizadora.
Incerteza	Recalculada anualmente	Calculada com base nos ensaios interlaboratoriais e precisão intermédia. 4,4% em valor relativo
Sensibilidade	Trimestral (quando se realiza a recta de calibração)	-0,0332 < ordenada < 0,0915 0,9022 < declive < 1,0119
Ensaio de recuperação	Mensal	Realizar o ensaio com amostras reais quantificadas. Recuperação de $100 \pm 10\%$
Padrões nos extremos	Diária	Verificar diariamente um em cada extremo $0,2876 < P_i < 0,3714$ NTU $9,0243 < P_f < 10,1652$ NTU

Anexo C: Boletins exemplificativos

Boletim exemplificativo de controlo de inspecção



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817

Fax: 232 817 819



Relatório n. 69464 / 11 Pg 1/5

Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Data de Emissão: 15-06-2011

No. de Análise: Número da amostra

Data Colheita: 09-05-2011

Data Recepção: 09-05-2011

Data Inicio Ensaio: 09-05-2011

Data Fim Ensaio: 15-06-2011

Código Cliente: 3193 CTVCbr

Nome e Morada do Cliente

Unidade: Cliente

43103 / 11

Identificação da Amostra:

Produto: Água de abastecimento e consumo

Acondicionamento: frasco

Referência: Água de furo

A colheita de amostra foi efectuada por um técnico da Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
Oxidabilidade	ISO 8467:1993	<1.0 (L.Q.)	mg(O ₂)/L			<=5,0 [66]	C
Condutividade (20°C)	NP EN 27888:1996	127.5	uS/cm			<=2500 [66]	C
Turvação	ISO 7027:1999	0.59	NTU			<=4 [66]	C
Cálcio	ISO 7980:1986	12.8	mg(Ca)/L	<=100 [66]			C
Cloretos	NP 423:1966	26.4	mg(CL ⁻)/L			<=250 [66]	C
Manganês	SMEWW 3113-B	<4 (L.Q.)	ug(Mn)/L			<=50 [66]	C
Cobre	SMEWW 3113-B	12	ug(Cu)/L			<=2000 [66]	C
Fluoretos	SMEWW 4500 C	<0.5 (L.Q.)	mg(F)/L			<=1.5 [66]	C
Dureza	SMEWW 2340-B	44.3	mg(CaCO ₃)/L	>=150 e <=500 [66]			NC
Chumbo	SMEWW 3113-B	<5 (L.Q.)	ug(Pb)/L			<=25 [66]	C

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ - Limite de quantificação; LD - limite de detecção; V.L - Valor Limite; V.R. - Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817
Fax: 232 817 819



Relatório n. 69464 / 11 Pg 2/5

Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Data de Emissão: 15-06-2011

No. de Análise: **Número da amostra**

Data Colheita: 09-05-2011

Data Receção: 09-05-2011

Data Início Ensaio: 09-05-2011

Data Fim Ensaio: 15-06-2011

Código Cliente: 3193 CTVCbr

Nome e Morada do Cliente

Unidade: **Cliente**

Identificação da Amostra:

43103 / 11

Produto: Água de abastecimento e consumo Acondicionamento: frasco
Referência: Água de furo
A colheita de amostra foi efectuada por um técnico da Controlvet.

	Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Aprovação
(a)	Mercurio	DIN EN 1483	<0.10 (LQ)	ug(Hg)/L			<=1.0 {66}	C
	Cádmio	SMEWW 3113-B	<0.5 (L.Q.)	ug(Cd)/L			<=5.0 {66}	C
	Niquel	SMEWW 3113-B	<4 (L.Q.)	ug(Ni)/L			<=20 {66}	C
	Crómio	SMEWW 3113-B	<2 (L.Q.)	ug(Cr)/L			<=50 {66}	C
(a)	Carbono orgânico total	DIN EN 1484	<0.5 (LQ)	mg(C)/L				
(a)	Cianetos	DIN EN ISO 14403	<5 (LQ)	ug(Cn)/L			<=50 {66}	C
	PH (25°C)	SMEWW 4500-H+B	7.0				>=6.5 e <=9 {66}	C
(a)	Boro	DIN EN ISO 11885	<0.05 (LQ)	mg(B)/L			<=1.0 {66}	C
(a)	Alumínio	DIN EN ISO 17294	32.0	ug(Al)/L			<=200 {66}	C
(a)	Benzeno	DIN 38407-9-1	<0.2 (LQ)	ug/L			<=1 {66}	C

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ - Limite de quantificação; LD - limite de detecção; V.L. - Valor Limite; V.R. - Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817
Fax: 232 817 819

Relatório n. 69464 / 11 Pg 3/5

Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Data de Emissão: 15-06-2011

No. de Análise: Número da amostra
 Data Colheita: 09-05-2011
 Data Recepção: 09-05-2011
 Data Início Ensaio: 09-05-2011
 Data Fim Ensaio: 15-06-2011
 Código Cliente: 3193 CTVCbr

Nome e Morada do Cliente

Unidade: Cliente

43103 / 11

Identificação da Amostra:

Produto: Água de abastecimento e consumo Acondicionamento: frasco
 Referência: Água de furo
 A colheita de amostra foi efectuada por um técnico da Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
(a) Benzo(a)pireno	DIN EN ISO 17993	<0.010 (LQ)	ug/L			<=0.10 [66]	C
(a) Bromatos	DIN EN ISO 15061	<1 (LQ)	ug(BrO3)/L			<=10 [66]	C
(a) 1,2 dicloroetano	DIN EN ISO 10301	<0.3 (LQ)	ug/L			<=3 [66]	C
(a) Epácloridrina	DIN EN 14207	<0.1 (LQ)	ug/L			<=0.1 [66]	C
(a) Tetracloroetano	DIN EN ISO 10301	<0.1 (LQ)	ug/L			<=10 [66]	C
(a) Tricloroetano	DIN EN ISO 10301	<0.1 (LQ)	ug/L			<=10 [66]	C
Antimónio	SMEWW 3113-B	<4 (L.Q.)	ug(Sb)/L			<=5 [66]	C
(a) Tri-halometanos	DIN EN ISO 10301						
Clorofórmio		<0.5 (LQ)	ug/L				
Bromofórmio		<0.5 (LQ)	ug/L				
Dibromoclorometano		<0.5 (LQ)	ug/L				
Bromodiclorometano		<0.5 (LQ)	ug/L				
(a) Cloreto de vinilo	DIN EN ISO 10301	<0.3 (LQ)	ug/L			<=0.5 [66]	C

Lista de abreviaturas: NE - Número estimado; UFC - Unidades formadoras de colónias; LQ - Limite de quantificação; LD - limite de detecção; V.L. - Valor Limite; V.R. - Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
 O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
 Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
 A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
 pelo laboratório



Segurança Alimentar

Telef. 232 817 817
Fax: 232 817 819



Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Relatório n. 69464 / 11 Pg 4/5

Data de Emissão: 15-06-2011

No. de Análise: Número da amostra

Data Colheita: 09-05-2011

Data Recepção: 09-05-2011

Data Início Ensaio: 09-05-2011

Data Fim Ensaio: 15-06-2011

Código Cliente: 3193 CTVCbr

Nome e Morada do Cliente

Unidade: Cliente

43103 / 11

Identificação da Amostra:

Produto: Água de abastecimento e consumo Acondicionamento: frasco
Referência: Água de furo
A colheita de amostra foi efectuada por um técnico da Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
Amónio	MI-LAQ-09-02	0.34	mg(NH4)/L			<=0.5 [66]	C
Cor	SMEWW 2120-C	<5 (L.Q.)	mg/L Pt-Co			<=20 [66]	C
(a) Ferro	DIN EN ISO 11885	110	ug(Fe)/L			<=200 [66]	C
Cheiro	EN 1522:2005	<2	TON			<=3 [66]	C
(a) Hidrocarbonetos aromáticos Policíclicos (HAP)	DIN EN ISO 17993						
Fluoranthene		<0.01 (LQ)	ug/L				
Benzo(b)fluoranthene		<0.01 (LQ)	ug/L				
Benzo(k)fluoranthene		<0.01 (LQ)	ug/L				
Benzo(a)pyrene		<0.01 (LQ)	ug/L				
Benzo(g,h,i)perylene		<0.01 (LQ)	ug/L				
indeno(1,2,3)pyrene		<0.01 (LQ)	ug/L				
Nitratos	NP 4338-1:1996	<4.4 (L.Q.)	mg(NO3)/L			<=50 [66]	C
Sulfatos	SMEWW 4500 (SO4) E	<10.0 (L.Q.)	mg(SO4)/L			<=250 [66]	C
(a) Selénio	DIN EN ISO 17294	<1 (LQ)	ug(Se)/L			<=10 [66]	C

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório



Segurança Alimentar

Telef: 232 817 817
Fax: 232 817 819

Relatório n. 69464 / 11 Pg 5/5

Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Data de Emissão: 15-06-2011

No. de Análise: Número da amostra

Data Colheita: 09-05-2011

Data Recepção: 09-05-2011

Data Início Ensaio: 09-05-2011

Data Fim Ensaio: 15-06-2011

Código Cliente: 3193 CTVCbr

Nome e Morada do Cliente

Unidade: Cliente

Identificação da Amostra:

43103 / 11

Produto: Água de abastecimento e consumo Acondicionamento: frasco
 Referência: Água de furo
 A colheita de amostra foi efectuada por um técnico da Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
Sódio	ISO 9664-1:1993	13.1	mg(Na)/L			<=200 [66]	C
Magnésio	ISO 7980:1986	3.0	mg(Mg)/L	<=50 [66]			C
Nitritos	NP EN 26777:1996	<0.01 (L.Q.)	mg(NO2)/L			<=0.5 [66]	C
(a) Acetilamida	DIN 38413	<0.1 (L.Q.)	ug/L			<=0.10 [66]	C

Critério: [66] - DL 306/2007 de 27 de Agosto

Esta apreciação não está incluída no âmbito da acreditação.

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ - Limite de quantificação; LD - limite de detecção; V.L. - Valor Limite; V.R. - Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
 O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
 Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
 A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório

Boletim exemplificativo genérico



Segurança Alimentar

Telef. 232 817 817
Fax: 232 817 819



Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Relatório n. 51316 / 11 Pg 1/2

Data de Emissão: 09-05-2011

No. de Análise: **Número da amostra**

Data Colheita: 29-04-2011
Data Recepção: 29-04-2011
Data Inicio Ensaio: 29-04-2011
Data Fim Ensaio: 09-05-2011
Código Cliente: 0142

Nome e Morada do Cliente

Unidade: **Cliente**

Identificação da Amostra:

40169 / 11

Produto: Água de abastecimento e consumo Acondicionamento: frasco
Referência: Torneira N.º 5
A colheita de amostra não foi efectuada pela Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
Oxidabilidade	ISO 8467:1993	<1.0 (L.Q.)	mg(O ₂)/L			<=5,0 [66]	C
Condutividade (20°C)	NP EN 27888:1996	62.5	uS/cm			<=2500 [66]	C
Cloro Residual Livre (Campo)	MI-LAQ-119-03	0.2	mg(Cl ₂)/L	>=0.2 e <=0.6 [66]			C
Turvação	ISO 7027:1998	<0,30 (L.Q.)	NTU			<=4 [66]	C
Manganês	SMEWW 3113-B	17	ug(Mn)/L			<=50 [66]	C
PH (25°C)	SMEWW 4500-H+B	6.4				>=6.5 e <=9 [66]	NC
Amónio	MI-LAQ-39-02	<0.05 (L.Q.)	mg(NH ₄)/L			<=0.5 [66]	C
Cor	SMEWW 2120-C	<5 (L.Q.)	mg/L Pt-Co			<=20 [66]	C
Cheiro	EN 1822:2006	<2	TON			<=3 [66]	C
Sabor	EN 1822:2006	<2	FTN			<=3 [66]	C

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ – Limite de quantificação; LD – limite de detecção; V.L. – Valor Limite; V.R. – Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório



Segurança Alimentar

Telef. 232 817 817
Fax: 232 817 819



Controlvet Segurança Alimentar SA.

Zona Industrial de Tondela ZIM II, Lotes 2 e 6 3460-070 Tondela

Relatório n. 51316 / 11 Pg 2/2

Data de Emissão: 09-05-2011

No. de Análise: Número da amostra

Data Colheita: 29-04-2011

Data Recepção: 29-04-2011

Data Início Ensaio: 29-04-2011

Data Fim Ensaio: 09-05-2011

Código Cliente: 0142

Nome e Morada do Cliente

Unidade: Cliente Site

40169 / 11

Identificação da Amostra:

Produto: Água de abastecimento e consumo

Acondicionamento: frasco

Referência: Torneira N.º 5

A colheita de amostra não foi efectuada pela Controlvet.

Ensaio	Método	Resultado	Unidade	V.R.	V.L.	V.P.	Apreciação
Nitratos	NP 4338-1:1998	10,9	mg(NO3)/L			<=50 1661	C

Critério: [66] - DL 306/2007 de 27 de Agosto

Esta apreciação não está incluída no âmbito da acreditação.

Lista de abreviaturas: NE- Número estimado; UFC- Unidades formadoras de colónias; LQ - Limite de quantificação; LD - limite de detecção; V.L. - Valor Limite; V.R. - Valor Recomendado; VP - Valor Paramétrico; C - Conforme; A - Aceitável; NC - Não Conforme; Unid. - Unidade; DO - Densidade óptica.

O ensaio assinalado com (s) foi subcontratado e não é acreditado.
O ensaio assinalado com (a) foi subcontratado e é acreditado.

Este Relatório de Ensaio refere-se apenas às amostras analisadas.
Proibida a reprodução parcial deste documento.

Os ensaios assinalados com * não estão incluídos no âmbito da acreditação.
A colheita de amostra efectuada não está incluída no âmbito da acreditação.

Mod 201.18 Documento Processado por Computador

Nome do técnico responsável
pelo laboratório

Anexo D: Determinação do Limite de Quantificação

Tabela D 1: Resultados do Limite de Quantificação

	Frutose	Glucose	Sacarose	Maltose	Lactose
	1,2	1,10	1,06	0,96	1,13
	1,1	1,20	1,04	1,07	1,12
	0,9	1,10	1,07	0,90	1,06
	1,0	0,96	1,11	1,06	1,05
	1,2	1,15	0,99	0,89	1,05
	1,0	1,15	0,91	0,88	1,13
	1,0	1,10	0,91	0,88	1,02
	1,0	1,06	0,90	0,87	1,13
	1,0	1,06	0,90	0,87	1,11
	1,1	1,08	0,91	0,89	1,12
Média	1,06	1,10	0,98	0,93	1,09
Desvio Padrão	0,10	0,06	0,08	0,08	0,04
Er (%)	5,68	9,6	2,2	7,2	8,8
C.V. (%)	9,35	5,9	8,5	8,3	4,1

Anexo E: Exemplificação do cálculo de incerteza

Tabela E 1: Erros associados ao material usado na preparação das soluções padrões dos açúcares (frutose, glucose e sacarose)

Material	Erro associado	Referencia
Balão volumétrico 100 mL	0,1 mL	V ₁
Balão volumétrico 25 mL	0,04 mL	V ₂
Pipeta volumétrica 20 mL	0,03 mL	V ₃
Pipeta volumétrica 15 mL	0,03 mL	V ₄
Pipeta volumétrica 10 mL	0,02 mL	V ₅
Pipeta 1 - 5 mL	0,04 mL	V ₆
Balança	0,001 g	B

Tabela E 2: Exemplificação e valores do cálculo da incerteza associada à preparação dos padrões dos açúcares (frutose, glucose e sacarose)

Soluções padrões	Medida	Material				
1,00	V = 8 (V = 5+3)	V ₆ + V ₆	_____			
	V = 25	V ₂	—	—	—	0,0156
1,50	V = 12,5 (V = 10+2,5)	V ₅ + V ₆	_____			
	V = 25	V ₂	—	—	—	0,0162
2,00	V = 17 (V = 15+2)	V ₄ + V ₆	_____			
	V = 25	V ₂	—	—	—	0,0202
2,50	V = 20	V ₃	_____			
	V = 25	V ₂	—	—		0,0022
3,00	m = 3,0221	B	_____			
	V = 100	V ₁	—	—		0,0011

Tabela E 3: Valores experimentais dos parâmetros β , γ , δ e a incerteza associada à curva de calibração, σ , (m=1 e n=6)

Monossacarídeos	(g/100mL)			
Frutose	0,99	742024	0,129	0,115
	1,55	1176817	0,114	0,070
	2,11	1611610	0,109	0,053
	2,50	1909244	0,111	0,050
	3,11	2384575	0,124	0,0538
Glucose	0,97	792817	0,158	0,148
	1,51	1214474	0,143	0,093
	2,06	1636130	0,140	0,072
	2,48	1963811	0,147	0,067
	3,02	2385743	0,166	0,069
Sacarose	0,97	762485	0,161	0,147
	1,52	1216351	0,143	0,089
	2,07	1670218	0,135	0,067
	2,53	2055706	0,137	0,060
	3,04	2477092	0,152	0,045

Tabela E 4: Resultados de repetibilidade dos açúcares: frutose, glucose e sacarose

	Repetibilidade		
	Frutose	Glucose	Sacarose
	1,6445	5,1271	4,8316
	1,7252	5,0637	4,8445
	1,7056	5,0629	4,9060
	1,7298	5,1964	4,9765
	1,6212	5,1111	4,9416
	1,6454	4,9718	4,9256
	1,6741	5,2392	4,9276
	1,6058	5,2988	4,9909
	1,6784	5,3409	4,9865
	1,7320	5,14728	4,9713
Média	1,6762	5,1559	4,9302
Desvio Padrão	0,0462	0,1141	0,0563