

MSC

2.^o
CICLO

FCUP
2021

U. PORTO

Validação de um método analítico para a
determinação de polióis por cromatografia líquida
de alta eficiência

Ana Raquel da Costa Duarte

FC

U. PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO
FC

Validação de um método analítico para a determinação de polióis por cromatografia líquida de alta eficiência

Ana Raquel da Costa Duarte

Relatório de estágio de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em Tecnologia e
Ciência Alimentar

2021

U. PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO
FC

Validação de um método analítico para a determinação de polióis por cromatografia líquida de alta eficiência

Ana Raquel da Costa Duarte

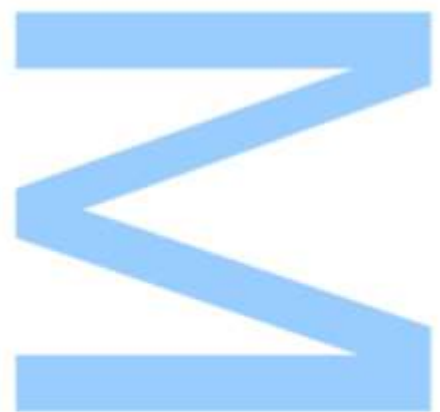
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar,

Departamento de Química e Bioquímica,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2021

Orientador

José António Maia, Professor Auxiliar,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Universidade do Minho
Escola de Engenharia



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____ / ____ / ____

Assinado por : **LUÍS MIGUEL SOARES RIBEIRO**

LEITE DA CUNHA

Num. de Identificação: BI082306940

Data: 2021.12.15 23:28:37+00'00'



Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha família, mais concretamente aos meus pais, irmã e avós que sempre me apoiaram e sempre acreditaram em mim e nas minhas capacidades, que me encorajam a superar os meus receios e a ser a minha melhor versão a cada dia que passa.

De seguida, ao meu namorado por todo o apoio, carinho, animação e positividade demonstradas ao longo de toda esta jornada.

Aos meus amigos que partilharam comigo ao longo de 5 anos, uma caminhada que vai ficar para a vida com muitas e boas recordações, com saudade, mas com o sentimento de dever cumprido.

Gostaria de agradecer também à Dr^a. Alice Santos, pela amabilidade prestada, pela sua prontidão em ajudar e pelo seu cuidado com o próximo. Foi o meu primeiro contacto com a empresa e não podia estar mais agradecida pelos conhecimentos e pelos esclarecimentos prestados.

À Engenheira Laura Sousa, pela ajuda que me concedeu com o intuito de concretizar os meus objetivos laboratoriais.

À Clariana, por toda a ajuda e confiança que me proporcionou ao longo do estágio. Pela sua bondade e capacidade de compreensão.

À Rita, por toda a disponibilidade demonstrada em prestar auxílio em diversas ocasiões.

Às técnicas de laboratório, Joana e Isabel, que me ajudaram a melhorar os meus conhecimentos a nível laboratorial, a consolidar ao nível da prática técnicas que são essenciais e pela capacidade de me darem autonomia e confiança para executar determinadas tarefas.

A todos os colaboradores da empresa Silliker e aos meus colegas estagiários pela simpatia prestada ao longo destes 9 meses de trabalho.

Por último, mas não menos importante, os meus sinceros agradecimentos, ao meu orientador da faculdade, o professor doutor José António Maia, pelas palavras de encorajamento, pela sua rápida capacidade de resposta face a um problema, e ainda por toda a ajuda e preocupação prestadas ao longo deste ano de trabalho.

Um *bem-haja* a todos os que tornaram possível a conclusão deste ciclo de estudos e desta etapa tão importante!

Obrigada do fundo do meu coração!

Resumo

Os polióis são compostos que se inserem no grupo dos carboidratos. Advêm da hidrogenação do grupo aldeído ou cetona da fonte proveniente de açúcar, são obtidos a partir de fontes de origem natural, e surgem na alimentação pelo facto de cada vez mais, nos dias atuais, as pessoas consumirem altos teores de açúcar por dia, o que se reflete na saúde da população. Tanto a obesidade, como a diabetes estão relacionadas com o consumo em excesso de açúcar, aliados à falta de exercício físico.

No âmbito desta temática, a empresa Silliker, S.A quis implementar e validar um método, que permitisse quantificar com elevada confiança, polióis presentes nas formulações de produtos alimentares, através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por índice de refração (HPLC). Sendo este, o objetivo do presente trabalho.

A validação engloba os polióis Isomaltitol, Maltitol, Eritritol, Lactitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol.

Para tal, inicialmente foram preparadas duas soluções padrão de maior concentração (soluções- mãe). Uma delas possuindo os polióis Isomaltitol, Maltitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol, e a outra, os polióis Eritritol e Lactitol.

O método para cada um destes foi considerado linear e sensível face a pequenas variações na concentração das soluções. O limite de quantificação diz respeito ao padrão de menor concentração, isto é, 0,5 g/100g. Foi possível comprovar a necessidade de dividir as matrizes alimentares em gamas de trabalho. Por isso, quer a repetibilidade, quer a precisão intermédia, quer a exatidão foram avaliadas com base nas gamas de trabalho. Para a repetibilidade realizaram-se 7 ensaios por cada amostra, e comprovou-se, com os valores do desvio padrão relativo da repetibilidade ($\overline{CV}_r$), que esta é satisfatória. Para a precisão intermédia, efetuaram-se 6 duplicados, sendo seguro afirmar, através dos valores de desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) para cada uma das gamas de trabalho, referentes a cada um dos polióis, que a precisão intermédia é satisfatória. A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação, sendo que as taxas deveriam estar compreendidas no intervalo de 80 % a 120 % para a exatidão ser considerada satisfatória. Como todas as taxas de recuperação das gamas de trabalho estão dentro deste intervalo, pode afirmar-se que o método possui uma boa exatidão.

Palavras chave: Sacarose, adoçante, polióis, Isomaltitol, Maltitol, Eritritol, Lactitol, Manitol, Xilitol, Sorbitol, validação.

Abstract

Polyols are compounds that fall into the carbohydrate group. They come from the hydrogenation of the aldehyde or ketone group of the sugar source, are obtained from sources of natural origin, and appear in the diet due to the fact that more and more nowadays people consume high levels of sugar per day, which reflects on the health of the population. Both obesity and diabetes are related to the excess consumption of sugar, combined with lack of exercise.

In this context, the company Silliker, S.A. wanted to implement and validate a method, which allows the quantification with high confidence, of polyols present in food formulations, through the technique of High Performance Liquid Chromatography with refractive index detection (HPLC). This is the objective of the present work.

The validation includes the polyols Isomaltitol, Maltitol, Erythritol, Lactitol, Mannitol, Xylitol and Sorbitol.

To do this, two standard solutions of higher concentration (mother solutions) were initially prepared. One of them had the polyols Isomaltitol, Maltitol, Mannitol, Xylitol and Sorbitol, and the other had the polyols Erythritol and Lactitol.

The method for each of these was found to be linear and sensitive to small variations in the concentration of the solutions. The quantification limit refers to the standard of lowest concentration, i.e., 0.5 g/100g. It was possible to prove the necessity of dividing the food matrices into working ranges. Therefore, both repeatability, intermediate precision and accuracy were evaluated based on the working ranges. For repeatability, 7 tests were performed for each sample, and the relative standard deviation of repeatability ($\overline{CV}_r$) values were found to be satisfactory. For the intermediate precision, 6 duplicates were performed, and it is safe to say from the values of the relative standard deviation of intermediate precision (CV_{PI}) for each of the working ranges for each of the polyols that the intermediate precision is satisfactory. Accuracy was evaluated based on recovery tests, and the rates should be in the range of 80 % to 120 % for accuracy to be considered satisfactory. As all recovery rates for the working ranges are within this range, the method can be said to have good accuracy.

Keywords: Sucrose, sweetener, polyols, Isomaltitol, Maltitol, Erythritol, Lactitol, Mannitol, Xylitol, Sorbitol, validation.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas	xvii
1. A empresa	1
1.1 O grupo Mérieux NutriScience	2
1.2 A empresa Silliker Portugal, S.A.	2
2. Enquadramento teórico	4
3. Introdução	7
3.1 Sacarose	8
3.2 Aditivos alimentares	9
3.2.1 Adoçantes não nutritivos/ artificiais	14
3.2.2 Adoçantes nutritivos	15
Polióis	15
3.2.2.1 Isomaltitol (E953)	19
3.2.2.2 Maltitol (E965)	20
3.2.2.3 Eritritol (E968)	21
3.2.2.4 Lactitol (E966)	22
3.2.2.5 Manitol (E421)	23
3.2.2.6 Xilitol (E967)	25
3.2.2.7 Sorbitol (E420)	26
3.2.3 Importância da validação do método para a determinação de polióis	27
4. Notas sobre a validação de métodos analíticos	28
4.1 Avaliação indireta	30
4.1.1 Identificação	30
4.1.2 Especificidade/ seletividade	30
4.1.3 Quantificação	31
• Curva de calibração	31
• Sensibilidade	32
• Desvio padrão do método	33
• Limiares analíticos	33
Limite de deteção (LD)	33

Limite de Quantificação (LQ)	34
4.1.4 Linearidade	34
4.1.5 Gama de trabalho	34
4.1.6 Precisão	35
• Repetibilidade.....	35
• Reprodutibilidade.....	36
• Precisão intermédia	36
4.1.7 Robustez	37
4.2 Avaliação direta	37
4.2.1 Materiais de referência certificados (MRC)	38
• Erro relativo	38
• Teste de hipóteses (teste t)	38
• Fator de desempenho Z.....	39
• Erro normalizado.....	39
4.2.2 Ensaio interlaboratoriais	40
4.2.3 Testes comparativos	40
4.2.4 Ensaio de recuperação	40
5. Parte experimental	41
5.1 Reagentes	42
5.2 Material e Instrumentação	43
5.3 Procedimento	43
▪ Preparação das soluções padrão para as retas de calibração	43
❖ Solução padrão conjunta: Isomaltitol, Maltitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol.	44
Preparação da solução- mãe padrão conjunta	44
❖ Solução padrão (E+L): Eritritol e Lactitol.	44
Preparação da solução-mãe padrão (E+L).....	44
Matrizes alimentares	45
Preparação da amostra	45
Ensaio de recuperação	45
Soluções de Carrez I e II	46
Preparação da fase móvel	46
5.4 Condições cromatográficas	47
6. Resultados e Discussão	48
6.1 Curva de calibração e Linearidade	49
6.2 Sensibilidade do método	57
6.3 Desvio padrão do método	63
6.4 Limiares analíticos	63

6.5	Precisão	71
6.5.1	Repetibilidade	71
6.5.2	Gama de trabalho	79
6.5.3	Precisão Intermédia	89
6.6	Exatidão	94
7.	Conclusão	106
8.	Referências Bibliográficas	109
9.	Anexos	114
Anexo I		117
Anexo II		118
Anexo III		120
Anexo IV		124

Lista de Figuras

Figura 1: Imagem das instalações da Silliker Portugal, S.A.	3
Figura 2: Estrutura química da sacarose (glicose+frutose).	9
Figura 3: Representação da reação (1)- Redução de um aldeído a um grupo hidroxilo primário. Representação da reação (2) - Redução de uma cetona a um grupo hidroxilo secundário.	16
Figura 4: Estrutura química do Isomaltitol (mistura equimolar do dissacárido glicose+ manitol e do dissacárido: glicose+ sorbitol).	20
Figura 5: Estrutura química do Maltitol.	21
Figura 6: Estrutura química do Eritritol.	22
Figura 7: Estrutura química do Lactitol.	23
Figura 8: Estrutura química do Manitol.	24
Figura 9: Estrutura química do Xilitol.	25
Figura 10: Estrutura química do Sorbitol.	26
Figura 11: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Isomaltitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).	50
Figura 12: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Maltitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).	51
Figura 13: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Eritritol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).	52
Figura 14: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Lactitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).	53
Figura 15: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Manitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).	54
Figura 16: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Xilitol, com o sinal analítico (u.a) em função da concentração das soluções padrão (g/L).	55
Figura 17: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Sorbitol, com o sinal analítico (u.a) em função da concentração das soluções padrão (g/L).	56

Figura 18: Representação esquemática do metabolismo dos polióis no organismo, adaptada do livro “ <i>Sweeteners- Pharmacology, Biotechnology and Applications</i> ” da referência 19.....	117
Figura 19: Representação do cromatograma correspondente à solução padrão conjunta de maior concentração.	118
Figura 20: Representação do cromatograma correspondente à solução padrão E+L de maior concentração.	119
Figura 21: Representação gráfica dos declives para o Isomaltitol, nos diferentes dias.	120
Figura 22: Representação gráfica dos declives para o Maltitol, nos diferentes dias.	121
Figura 23: Representação gráfica dos declives para o Eritritol, nos diferentes dias.	121
Figura 24: Representação gráfica dos declives para o Lactitol, nos diferentes dias.	122
Figura 25: Representação gráfica dos declives para o Manitol, nos diferentes dias.	122
Figura 26: Representação gráfica dos declives para o Xilitol, nos diferentes dias....	123
Figura 27: Representação gráfica dos declives para o Sorbitol, nos diferentes dias.	123
Figura 28: Representação da tabela para o valor de G tabelado, retirado do livro da referência 57.....	124
Figura 29: Representação da tabela para o teste C de Cochran, retirada do livro da referência 57.....	125

Lista de Tabelas

Tabela 1: Listagem das 25 classes de aditivos com as suas funções e exemplos, adaptado da ref.16.....	10
Tabela 2: Listagem das classes e dos diversos adoçantes, alguns exemplos, contribuições energéticas e o poder adoçante dos mesmos ^{5, 16, 17, 18, 19}	13
Tabela 3: Apresentação dos valores da absorção e da fermentação em g/100g no organismo humano para cada um dos polióis listados ²⁴	16
Tabela 4: Classificação, em forma de lista, da higroscopicidade de cada um dos polióis e apresentação dos valores do calor de solução dos polióis (Kcal/g) ¹⁹	18
Tabela 5: Apresentação dos valores de índice glicémico no sangue, para os polióis ²²	18
Tabela 6: Reagentes utilizados no procedimento dos polióis, bem como a fórmula química de cada um, a massa molar, a marca dos reagentes e o seu grau de pureza.	42
Tabela 7: Listagem do conjunto de produtos alimentares e matrizes alimentares utilizadas na validação do método.	45
Tabela 8: Apresentação das condições cromatográficas para o procedimento dos polióis.	47
Tabela 9: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Isomaltitol.	50
Tabela 10: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Maltitol.	51
Tabela 11: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Eritritol.	52
Tabela 12: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Lactitol.	53
Tabela 13: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Manitol.	54
Tabela 14: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Xilitol.	55
Tabela 15: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Sorbitol.	56
Tabela 16: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Isomaltitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	58

Tabela 17: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Maltitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	58
Tabela 18: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Eritritol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	59
Tabela 19: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Lactitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	60
Tabela 20: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Manitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	60
Tabela 21: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Xilitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	61
Tabela 22: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Sorbitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.	62
Tabela 23: Apresentação dos valores de $s_{\text{método}}$ e de CV, para cada um dos polióis...	63
Tabela 24: Valores de concentração inicial (C_{inicial}) de cada um dos polióis no duplicado efetuado para uma amostra de suplemento alimentar, e ainda os valores médios (C_{inicial}) de concentração inicial para cada um dos polióis.	64
Tabela 25: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Isomaltitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.	65
Tabela 26: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Maltitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.....	66
Tabela 27: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão E+L de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Eritritol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.....	67
Tabela 28: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão E+L de maior concentração, bem como de concentração obtida,	

para os 7 ensaios efetuados relativos ao Lactitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média..... 68

Tabela 29: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Manitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média..... 69

Tabela 30: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Xilitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média..... 70

Tabela 31: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Sorbitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média..... 71

Tabela 32: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para a matriz alimentar bolacha, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/ 100 g) obtidos nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis. 73

Tabela 33: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de cereais, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis..... 73

Tabela 34: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de barras de cereais, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis. 74

Tabela 35: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de chocolate, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis..... 75

Tabela 36: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de doce, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis. 75

Tabela 37: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de suplemento alimentar, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e

o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis. 76

Tabela 38: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de sumo, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis. 77

Tabela 39: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de gelado, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis..... 77

Tabela 40: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de tâmara, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis..... 78

Tabela 41: Apresentação dos valores da variância máxima ($s_{\text{máx}}^2$) para cada um dos polióis, obtidos por comparação com todos os valores das variâncias obtidas, o valor do somatório de cada variância e ainda os valores do C calculado e do C tabelado, para um intervalo de confiança de 95%. 81

Tabela 42: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Isomaltitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 82

Tabela 43: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Maltitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 83

Tabela 44: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Eritritol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 84

Tabela 45: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Lactitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 85

Tabela 46: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Manitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 86

Tabela 47: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Xilitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr). 87

Tabela 48: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Sorbitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo (CV_r) e o limite de repetibilidade (rr).....	89
Tabela 49: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Isomaltitol.....	90
Tabela 50: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Maltitol.	91
Tabela 51: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Eritritol.....	91
Tabela 52: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Lactitol.	92
Tabela 53: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Manitol.	93
Tabela 54: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Xilitol.	93
Tabela 55: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Sorbitol.....	94
Tabela 56: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{extensão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Isomaltitol.	96
Tabela 57: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{extensão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Maltitol.	98
Tabela 58: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{extensão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Eritritol.	99

Tabela 59: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{exatidão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Lactitol. 101

Tabela 60: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{exatidão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Manitol. 102

Tabela 61: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{exatidão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Xilitol. 103

Tabela 62: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($R \pm \mu_{\text{exatidão}}R$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($R_{\text{gama de trabalho}}$), para o Sorbitol. 104

Lista de Abreviaturas

b- Ordenada na origem

C_{analito} - Concentração de analito

C_{inicial} - Concentração inicial

C_{obtida} - Concentração obtida

C_{final} - Concentração final

$C_{\text{fortificação}}$ - Concentração de fortificação

$C_{\text{teórica}}$ - Concentração teórica

CV - Desvio padrão relativo do método

CV_r – Desvio padrão reativo da repetibilidade

$\overline{CV_r}$ - Desvio padrão relativo médio da repetibilidade

CV_{PI} - Desvio padrão relativo da precisão intermédia

Er- Erro relativo

E+L- Eritritol + Lactitol

EUA- Estados Unidos da América

HPLC- High Performance Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IPAC- Instituto Português de Acreditação

IR- Índice de Refração

$\mu_{\text{exatidão}}$ - Incerteza da exatidão

LD- Limite de Detecção

LQ- Limite de Quantificação

m- Declive

MIA- Métodos Instrumentais de Análise

R- Taxa de recuperação

$\bar{R}$ - Taxa de recuperação média

r- Coeficiente de correlação linear

r_r - Limite de repetibilidade

r_{PI} - Limite da precisão intermédia

$r_{\text{gama de trabalho}}$ - Limite de repetibilidade por gama de trabalho

SP- Solução padrão

s- Sensibilidade

$s_{y/x}$ - Desvio padrão residual

$s_{\text{método}}$ - Desvio padrão do método

T- Temperatura

UE- União Europeia

$V_{\text{adicionado SP}}$ - Volume adicionado da solução padrão

X- Valor considerado verdadeiro

X_{lab} - Valor obtido experimentalmente

x^* - Valor suspeito

1. A empresa

1.1 O grupo Mérieux NutriScience

O grupo Mérieux Nutriscience foi fundado em 1897. Atualmente está presente em 27 países e possui 100 laboratórios em todo o mundo. A sua missão engloba proteger a saúde dos consumidores, através do seu vasto repertório de serviços analíticos e de consultadoria em empresas agroalimentares. Desenvolve assim, inúmeras análises laboratoriais, auditorias, consultadorias, formação e ainda serviços de investigação ¹.

Os seus serviços prestados estão presentes nas seguintes áreas:

- ✓ Qualidade e Segurança Alimentar
- ✓ Agroquímicos
- ✓ Águas e Ambiente
- ✓ Farmacêutica e dispositivos médicos
- ✓ Bens de consumo
- ✓ Cosmética e Higiene pessoal
- ✓ Serviços de Inovação *Biofortis*

1.2 A empresa Silliker Portugal, S.A.

A Silliker foi fundada em 1967 nos Estados Unidos, sendo que mais tarde, em 1996, o Institut Mérieux tornou-se acionista da Silliker. A atual Silliker Portugal, S.A surge em 1997 em Vila Nova de Gaia como Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade (EGI), tornando-se líder do mercado por fazer face às necessidades do mesmo, numa altura em que os serviços na área da qualidade e segurança alimentar eram cada vez mais requisitados, tais como análises laboratoriais e assessoria técnica. Em 2008 a multinacional norte americana Silliker adquire a EGI, passando a denominar-se Silliker Portugal, S.A (figura 1) ².

Com vista a fornecer ao seu cliente a informação mais fidedigna e confiável, em 1993 integrou-se no Instituto Português da Qualidade (IPQ) e os seus laboratórios em Portugal tornaram-se acreditados pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), com o número de acreditação L0087, através do referencial normativo ISO/IEC 17025-Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios e calibração ³.

Esta empresa possui uma vasta oferta de serviços que inclui não só análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, mas também auditorias, consultadorias, rotulagem e legislação ².

Na Silliker Portugal, S.A., o departamento de análises laboratoriais está dividido em 3 laboratórios (o laboratório de análises físico-químicas, o **laboratório de Métodos Instrumentais de Análise – MIA** e o laboratório de microbiologia), já o departamento da assessoria técnica está vocacionado para o HACCP, Higiene e Segurança Alimentar, Qualidade, Formação Profissional e Desenvolvimento ².



Figura 1: Imagem das instalações da Silliker Portugal, S.A.

2. Enquadramento teórico

A garantia da qualidade alimentar é cada vez mais um fator decisivo no que concerne à aquisição de produtos alimentares. Pode ser descrita como uma prova de que o produto alimentar possui os requisitos necessários para satisfazer as necessidades e expectativas do consumidor ⁴.

A noção de «consumidor» tem vindo a sofrer bastantes alterações. O consumidor que hoje conhecemos está bastante informado e preocupado com os produtos alimentares que adquire, devido quer ao aumento da literacia da população, quer à facilidade de acesso a informação.

Com o intuito de agradar os consumidores, o mercado tem se tornado cada vez mais competitivo e está em constante renovação. As empresas optam quer por inovar os produtos já existentes, quer por lançar produtos novos no mercado. A inovação que o consumidor procura pode estar de acordo com o prazer, a saúde, o bem estar, a sustentabilidade e ainda a conveniência, sendo as preocupações com a saúde o ponto de partida para este trabalho.

O açúcar, ou a quantidade deste existente nos produtos alimentares, é frequentemente considerado um perigo para a saúde pública e por este motivo, as empresas optaram pela procura de alternativas. O consumo em excesso deste produto pode dar origem a diversas doenças crónicas, tais como a diabetes ou a obesidade. A diabetes tipo II provém do facto do organismo não ser capaz de usar a insulina que produz de forma eficaz. Das possíveis causas para tal, fazem parte a genética, a baixa atividade física diária, a alimentação e ainda a obesidade ⁵. Tanto a obesidade como o desenvolvimento da doença da diabetes tipo II estão relacionadas com o consumo em excesso de ácidos gordos saturados e de alimentos ricos em açúcar, incluindo bebidas ^{5, 6, 7, 8}. Com o passar do tempo, se a diabetes não for controlada, tal como a obesidade, podem traduzir-se num elevado risco de enfarte ⁵.

Como solução para o problema da quantidade de açúcar nos alimentos e nas bebidas, surgiu a possibilidade de adição de edulcorantes às formulações dos produtos alimentares que atuam como substitutos do açúcar, como é o caso dos polióis ⁹.

O objetivo do trabalho desenvolvido na empresa Silliker Portugal, S.A, durante este estágio curricular, consistiu na realização de diversas etapas tendo em vista a validação do método analítico para a quantificação de polióis nos produtos alimentares, nomeadamente, na bolacha, nos cereais, nas barras de cereais, no chocolate, no doce, no suplemento alimentar, no sumo, no gelado e na tâmara, através da cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por índice de refração (*High Performance Liquid Chromatography*- HPLC) , inserido no laboratório de MIA.

Como já foi referido, a empresa segue a norma ISO/IEC 17025 e, por isso mesmo, é do seu interesse tornar os seus métodos acreditados, para assim poder fornecer respostas fidedignas e resultados atualizados às empresas que colaboram consigo, e ainda para se poderem adaptar ao mercado e às exigências do mesmo.

3. Introdução

3.1 Sacarose

A sacarose (figura 2) é um dissacárido formado pela união de dois monossacáridos, a glicose e a frutose, que fornece 4 kcal/g de energia. Por dia, um indivíduo ingere entre 14 g a 60 g. É conhecida como sendo o açúcar de mesa ou o açúcar comum e pode ser encontrado maioritariamente na cana de açúcar e na beterraba ^{10, 11, 12}.

Trata-se de um carboidrato simples de um elevado índice glicémico, largamente utilizada na indústria da panificação ¹⁰. Como se trata de um carboidrato simples, é facilmente digerido pelo organismo, fazendo com que os níveis de glicose aumentem rapidamente na corrente sanguínea (aumento da glicemia), sendo necessário o organismo produzir mais insulina para a poder transportar para as células. Isto promove a hipoglicemia no sangue e consequentemente a fome. Por este motivo, o indivíduo sente necessidade de ingerir mais alimentos, promovendo o consumo diário de mais calorias do que aquelas que são aconselhadas ¹⁰.

Segundo o estudo feito à população indiana, existe uma forte relação causa efeito entre o consumo de doces e o aparecimento de algumas doenças tais como a obesidade e a diabetes. Em 2014 a Índia era o 2º país em todo o mundo, a seguir à China, com maior número de pessoas acima do peso considerado normal. Uma razão para tal é o facto de o açúcar já fazer parte da cultura indiana desde há muito tempo, uma vez que as oferendas religiosas indianas, incluem o leite, o requeijão, a manteiga clarificada, o mel e o açúcar ⁶. Portanto, o açúcar não é apenas utilizado como uma forma de alimentação, mas também como algo já enraizado no estilo de vida deste povo ⁶.

O açúcar possui propriedades importantes para a indústria alimentar. Confere aos alimentos doçura, textura, é higroscópica, inibe o crescimento microbiano em compotas e geleias e aumenta o tempo de vida útil dos mesmos ^{7, 11}. Contudo, existem compostos que são detentores de características semelhantes à sacarose e, por isso, podem atuar como substitutos desta, preservando o sabor e a textura do produto alimentar ⁷. Estes substitutos podem ser identificados como edulcorantes/ adoçantes. Esta classe pertence ao grupo dos aditivos alimentares.

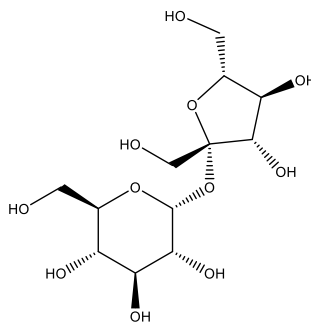


Figura 2: Estrutura química da sacarose (glicose+frutose).

3.2 Aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são adicionados a alimentos processados ou a bebidas com o intuito de melhorar as suas características organoléticas, bem como aumentar o tempo de conservação dos produtos alimentares até serem consumidos ¹³.

Segundo o Regulamento (EC) nº 1333/2008 do parlamento europeu e do conselho europeu em 16 de dezembro de 2008 sobre aditivos alimentares, a definição de aditivo alimentar é qualquer substância que não é consumida como sendo um alimento por si só e não é utilizada como ingrediente, contendo ou não um valor nutritivo, sendo adicionado intencionalmente aos alimentos com o intuito de produzir uma função tecnológica, incluindo alterações nas características organoléticas, na fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, transporte e conservação do alimento ^{14, 15}.

Os aditivos alimentares podem ser de origem natural ou sintética, sendo que a primeira pode surgir naturalmente no alimento ou provir de uma fonte natural e a segunda é classificada como substâncias que são sintetizadas artificialmente e recorrentemente utilizadas por possuírem elevada estabilidade química, serem de uso fácil e terem um baixo custo associado ¹⁶.

Este vasto grupo abrange 25 classes (tabela 1) sendo a de maior relevância para este trabalho a classe adoçante ¹⁶. Os adoçantes são utilizados para intensificar os níveis de doçura ou até mesmo para incrementar a percepção do sabor doce, levando a uma maior aceitação por parte do consumidor relativamente àquele tipo de produto ¹⁶.

Tabela 1: Listagem das 25 classes de aditivos com as suas funções e exemplos, adaptado da ref.16.

Classe de aditivos	Função	Exemplo
Reguladores de acidez	Controlar ou modificar o pH, influenciando o sabor, o odor, a viscosidade e a textura dos alimentos.	Ácido cítrico
Agentes anti-aglomerantes	Evitar que alimentos em pó se aglomerem.	Carbonato de cálcio
Agente anti -espuma	Formar uma barreira que promova uma menor transferência de O ₂ , diminuindo a produção de espuma.	Ésteres de ácidos gordos
Antioxidante	Aumentar o tempo de vida útil.	Ácido ascórbico (Vitamina C)
Agente de massa	Aumentar e estabilizar o volume do produto final durante o processamento e armazenamento.	Metilcelulose
Agente carbonatante	Melhorar a percepção tátil e proporcionar leve acidez, sabor picante e efervescência a bebidas (refrigerantes, vinho, cerveja, sumos de fruta).	Dióxido de carbono
Agente transportador	Auxiliar na dispersão, dissolução e diluição de um aditivo alimentar sem modificar as suas propriedades, facilitando o uso de agentes de aromatizantes e espumantes.	Óleos vegetais
Agente de cor	Fixar a cor dos alimentos durante o armazenamento.	Carotenoides

Agente de retenção de cor	Intensificar, preservar ou estabilizar a cor original dos alimentos.	Hidróxido de magnésio
Emulsionante	Estimular a estabilidade do alimento, aumentar o prazo de validade, inibir a separação de fases e controlar a viscosidade e a textura.	Monoglicerídeos
Agente firmador	Manter a firmeza e a textura dos alimentos processados, estabilizando a estrutura celular de frutas e vegetais.	Cloreto de cálcio
Intensificador de sabor	Intensificar o sabor com vista a uma maior aceitação por parte do consumidor.	Glutamato monossódico
Tratamento da farinha e agentes de branqueamento	Acelerar a maturação e envelhecimento da farinha.	Ácido glutâmico
Agente espumante	Estabilização das espumas	Ovalbumina
Agente gelificante	Promover a formação de géis, produzindo uma estrutura física tridimensional, melhorando a homogeneidade dos alimentos	Pectina
Agente de brilho	Fornecer uma aparência mais atrativa aos alimentos, por torná- los mais brilhantes.	Cera de abelha
Humectante	Proteção dos alimentos face à perda de humidade.	Glicerol
Conservante/ Agentes antimicrobianos	Prevenir a deterioração e garantir a segurança alimentar.	Natamicina
Propelente/ Aerossóis pressurizados	Promover a estabilização das estruturas físicas dos alimentos apresentados como sprays, líquidos ou espumas.	Dióxido de carbono

Agente de levedura	Promover a expansão da massa em produtos de panificação e farinha com fermento, melhorando a textura e o sabor.	Carbonato de sódio
Agente quelante	Estabilização dos alimentos, através da complexação de iões metálicos que catalisam reações como a hidrólise e processos de degradação.	Ácido ascórbico que complexa com o ferro para promover a sua ingestão
Estabilizantes	Estabilização de emulsões e suspensões.	Caseína
Adoçante	Intensificar os níveis de doçura e/ou percepção do sabor doce e substituição do açúcar.	Manitol
Espessante	Obter a viscosidade necessária	Amido

Os adoçantes dividem-se em duas subclasses, os artificiais ou não nutritivos e os nutritivos, sendo que os artificiais são comumente utilizados como alternativa ao açúcar, possuem baixos níveis de calorias e devem demonstrar segurança ao serem utilizados e conter um sabor residual baixo. Já os nutritivos, são baseados em diferentes tipos de carboidratos, contém um menor nível energético do que o açúcar, no entanto não são isentos de calorias ¹⁶.

O grupo dos adoçantes está quimicamente dividido em sulfonamidas, péptidos, clorossacáridos e polióis, sendo este último o mais relevante para este trabalho. Sulfonamidas, péptidos e clorossacáridos pertencem ao grupo dos adoçantes não nutritivos, enquanto que os polióis podem ser inseridos na classe nutritiva, tal como pode ser visto na tabela 2 ⁸.

Tabela 2: Listagem das classes e dos diversos adoçantes, alguns exemplos, contribuições energéticas e o poder adoçante dos mesmos ^{5, 16, 17, 18, 19}.

Classe dos adoçantes	Adoçantes	Exemplos	Teor calórico ^[1] (Kcal/g)	Poder adoçante (sacarose= 1)
Não Nutritivos	Sulfonamidas	Acessulfame- k	0	200
		Ciclamato	0	30 a 50
		Sacarina	0	200 a 700
	Péptidos	Aspartame	4 ^a	160 a 220
	Clorossacáridos	Sucralose	0	600
Nutritivos	Polióis	Isomaltitol	2,0	0,45 a 0,65
		Maltitol	3,0	0,90
		Eritritol	0,2	0,70
		Lactitol	2,0	0,30 a 0,40
		Manitol	1,6	0,50 a 0,70
		Xilitol	2,4	Igual
		Sorbitol	2,6	0,50 a 0,70

Nota: Sacarose= 4Kcal/g.

[1] - Valores aceites nos EUA. Na EU, todos os polióis exceto o eritritol, possuem um teor calórico = 2,4 Kcal/g. O eritritol tem 0 kcal/g ¹⁹.

^a - este valor é considerado insignificante devido ao seu baixo consumo.

Portanto, em condições ideais, os adoçantes devem possuir ¹⁹ :

- ✓ um baixo valor calórico;
- ✓ não provocarem efeitos prejudiciais na saúde dos indivíduos;
- ✓ terem um longo tempo de vida útil;
- ✓ Serem estáveis a temperaturas e a pH's numa ampla faixa de trabalho;
- ✓ Uma vez inseridos nas formulações, devem ter um início de ação rápido e não deixar qualquer sabor residual;
- ✓ Devem ser bastante solúveis em água e facilmente dissolvidos;
- ✓ Não serem higroscópicos;
- ✓ Apresentarem efeito sinérgico quando combinados com outros adoçantes.

3.2.1 Adoçantes não nutritivos/ artificiais

Esta classe de adoçantes, tem sido bastante utilizada na alimentação para diabéticos e para a perda de peso. Possui altos níveis de intensidade de doçura, uma vez que contém níveis muito superiores à sacarose e um valor calórico pouco relevante ¹¹. Nos Estados Unidos, desde 1958 a organização que é responsável por avaliar a segurança dos produtos alimentares com este tipo de adoçantes é a *Food and Drug Administration* (FDA). Globalmente existem diversas organizações responsáveis por assegurar a segurança dos produtos alimentares. Por exemplo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) também é responsável por admitir a utilização destes adoçantes nos alimentos ¹¹.

Segundo a Academia de Nutrição e Dietética (fundada nos Estados Unidos com profissionais ligados à área da nutrição com vista a melhorar a saúde da população no país ¹⁹) estes adoçantes podem melhorar o paladar de alguns alimentos que estão inseridos nas dietas e deste modo promover a aceitação desses produtos, levando a um maior consumo ⁸.

Aquando da realização de diversos estudos, verificou-se que o consumo de produtos que continham adoçantes não nutritivos, promoviam o apetite e, portanto, a função destes aditivos na redução da obesidade não estava a ser levada a cabo. A título de exemplo, foi realizado um estudo em animais que consistia em fornecer a um grupo, bebidas adocicadas com sacarina e a outro bebidas que continham apenas açúcar. Os investigadores chegaram à conclusão de que os ratos que ingeriram bebidas adocicadas com sacarina consumiram mais alimentos no geral e aumentaram mais de peso, em comparação com o grupo dos ratos que ingeriram bebidas que continham apenas açúcar ⁸.

Em crianças e adolescentes, também se verificou que havia uma correlação entre o consumo de alimentos que continham adoçantes não nutritivos e o aumento do índice de massa corporal. A percepção de que o uso deste tipo de adoçantes promove a perda de peso, leva a uma ideia errada por parte do consumidor face ao consumo de alimentos que possuem este tipo de formulações ⁸.

Nos produtos alimentares que contenham este tipo de edulcorantes, é necessário que haja uma combinação destes com a sacarose, para que o produto mantenha as suas características. Porém, é possível ainda que haja a adição de outros edulcorantes, os polióis, com o intuito de mascarar os sabores desagradáveis de alguns adoçantes não nutritivos ²⁰.

A maioria destes adoçantes artificiais não são metabolizados, como é o caso do acessulfame-K, no entanto, o aspartame é digerido e os produtos desta reação são a fenilalanina, o ácido aspártico e o metanol. Para pessoas que sofram de fenilcetonúria, uma doença genética rara, não lhes é permitido o uso deste tipo de adoçante pois podem advir consequências graves para a saúde destes indivíduos. Nos indivíduos saudáveis existe uma enzima específica no organismo que permite a transformação do aminoácido fenilalanina em tirosina: a fenilalanina hidroxilase. Nos indivíduos que sofram desta patologia, a enzima sofre uma mutação impossibilitando a formação de tirosina, havendo por isso um acúmulo de fenilalanina no sangue podendo provocar convulsões e ainda causar deficiências intelectuais ²¹.

É necessário ter ainda em atenção, que o uso deste tipo de edulcorantes encontra-se em debate devido ao facto de serem discutidas as vantagens e desvantagens para a saúde humana. A FDA não permite o uso do ciclamato nos produtos alimentares, pelo facto de se ter verificado, em diversos estudos com animais, que este substituto do açúcar evidenciava elevada capacidade para ser cancerígeno ⁸.

3.2.2 Adoçantes nutritivos

Os adoçantes nutritivos incluem o açúcar refinado, mel, altos teores de frutose, xarope de milho, dextrose e polióis ²². Como os polióis são os mais importantes para este trabalho, apenas irei aprofundar este tópico.

Polióis

Os polióis são compostos químicos que não são considerados nem açúcares nem álcoois, mas sim carboidratos que provêm da hidrogenação da sua fonte de açúcar em que o grupo carbonilo do aldeído ou da cetona é reduzido a um grupo hidroxilo primário ou secundário (figura 2) usando um catalisador de Níquel ^{7, 22}. A sua fórmula química difere da dos açúcares, pois os polióis têm a fórmula geral $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$ enquanto que a fórmula química geral dos açúcares é $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_n\text{CHO}$ ou $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_{n-1}\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$ ²⁰.

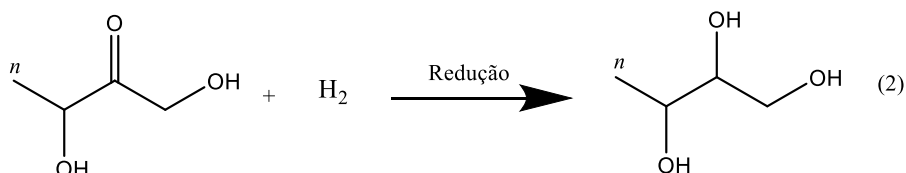
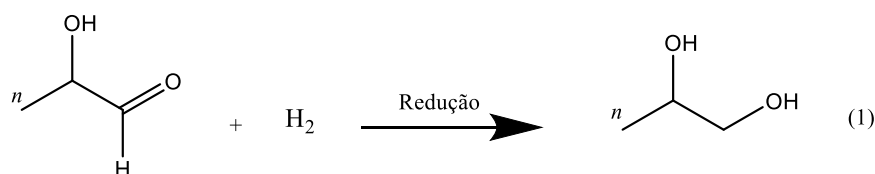


Figura 3: Representação da reação (1)- Redução de um aldeído a um grupo hidroxilo primário. Representação da reação (2)- Redução de uma cetona a um grupo hidroxilo secundário.

Fazem parte do grupo dos carboidratos de baixa digestão e contém um poder calórico que oscila entre 0,2 a 3,0 Kcal/ g. Carboidratos de baixa digestão tratam-se de compostos que são digeridos e absorvidos de uma forma incompleta no intestino delgado e são parcialmente fermentados no intestino grosso (tabela 3), pelo que produzem menos energia do que aqueles que possuem uma absorção completa, tal como a sacarose, sendo por isso considerados uma fonte de substrato para um cólon saudável ^{23, 24, 25}.

Os carboidratos mais conhecidos que possuem este tipo de absorção incompleta são as fibras e os polióis. Tal como as fibras, os polióis podem ter efeitos positivos no que concerne à normalização do funcionamento do intestino ²³. No entanto, quando este tipo de carboidratos é consumido em excesso, fatores gastrointestinais evidenciam-se, como flatulência, diarreia, desconforto abdominal, entre outros ²³.

Tabela 3: Apresentação dos valores da absorção e da fermentação em g/100g no organismo humano para cada um dos polióis listados ²⁴.

Polióis	Absorção (g/100g)	Fermentação (g/100g)
Isomaltitol	10	90
Maltitol	40	60
Eritritol	90	10
Lactitol	2	98
Manitol	25	75
Xilitol	50	50
Sorbitol	25	75

(Nota: Com o intuito de esclarecer melhor a relação que existe entre a absorção e a fermentação, consultar o **Anexo I**).

Os polióis tem uma grande aplicabilidade na indústria alimentar e farmacêutica devido às suas propriedades físico- químicas ^{26, 27, 28}. Na indústria alimentar, têm como objetivo principal a substituição do açúcar de mesa, a sacarose, nas formulações dos produtos alimentares, tais como em gelados, gomas, pastilhas elásticas, produtos de pastelaria e panificação, para garantir que a qualidade e a segurança do produto se mantém ²⁶. Atuam como agentes de corpo/volume, agentes humectantes, conferem textura, não propiciam as reações de Maillard, asseguram a cor, e ainda promovem a diminuição das calorias nos alimentos ²⁶. Resistem às altas temperaturas de confeção e atribuem aos alimentos uma doçura que pode ir dos 30% aos 90% do poder adoçante da sacarose (tabela 2) ^{11,26}.

Ao nível da confeção, as propriedades como higroscopicidade e a solubilidade são fundamentais ¹⁹. A higroscopicidade relaciona-se com a capacidade que estes polióis têm em reter a humidade do ambiente (tabela 4). A maioria é não ou pouco higroscópica, pelo que é uma vantagem no que toca à capacidade de preservar o alimento por mais tempo, pelo facto de não aumentar a atividade da água no mesmo. Através do observado na tabela 4, é possível verificar que o poliól que proporciona uma maior preservação do alimento é o eritritol.

Já a solubilidade é muito importante para o seu processamento. Uma baixa solubilidade significa que se trata de um poliól que cristaliza facilmente. É de salientar que os polióis que possuem uma solubilidade baixa são o isomaltitol, o eritritol e o manitol; pelo contrário os que possuem uma solubilidade elevada são o xilitol e o sorbitol, sendo que apenas estes dois últimos, possuem uma solubilidade superior à da sacarose em água, a uma $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹⁹.

Também o seu poder refrescante confere-lhes capacidade de serem inseridos em alimentos que procuram essa condição, proporcionando ao consumidor uma sensação de frescura. É de salientar que o poliól com menor poder de frescura é o isomaltitol e o que é detentor de um maior poder refrescante é o eritritol ¹⁹. A sensação de frescura é obtida a energias inferiores a - 20 Kcal/g (tabela 4) ¹⁹.

Tabela 4: Classificação, em forma de lista, da higroscopicidade de cada um dos polióis e apresentação dos valores do calor de solução dos polióis (Kcal/g) ¹⁹.

Polióis	Higroscopicidade	Calor de solução (Kcal/ g)
Isomaltitol	Baixa	-9
Maltitol	Média	-19
Eritritol	Muito baixa	-43
Lactitol	Baixa	-14
Manitol	Baixa	-29
Xilitol	Média	-36
Sorbitol	Alta	-26

A sua utilização em alimentos para diabéticos e em alimentos *light* tem sido cada vez maior, uma vez que não têm influência nos níveis de insulina no sangue (tabela 5) e possuem um baixo índice calórico ^{22, 23}. Comparativamente à sacarose, os polióis não são metabolizados ou são muito pouco metabolizados pelos microrganismos orais e deste modo não contribuem para o aparecimento de cáries ⁷. Contribuem, portanto, para a prevenção da diabetes, obesidade, doenças inflamatórias crónicas e cáries ^{24, 27, 28}.

Tabela 5: Apresentação dos valores de índice glicémico no sangue, para os polióis ²².

Polióis	Índice glicémico no sangue (glicose =100)
Isomaltitol	9
Maltitol	35
Eritritol	0
Lactitol	6
Manitol	0
Xilitol	13
Sorbitol	9

Nota: O índice glicémico no sangue e os níveis de insulina estão relacionados.

Os polióis podem ser encontrados na natureza, em alguns frutos e vegetais, como é o caso do eritritol, manitol, xilitol e sorbitol e são produzidos por algumas bactérias, fungos, leveduras e algas ²⁷. No entanto, para estarem disponíveis nas formulações dos diversos alimentos, a quantidade que é encontrada na natureza não é suficiente e por isso mesmo, têm de ser produzidos industrialmente. De momento, estão a ser estudadas estratégias para originar estes carboidratos hidrogenados, como é o caso da utilização de bactérias lácticas ²⁴.

Os polióis destacados e de maior relevância para este trabalho são o isomaltitol (E953), o maltitol (E965), o eritritol (E968), o lactitol (E966), o manitol (E421), o xilitol (E967) e o sorbitol (E420) ²⁹. O eritritol, o manitol, o xilitol e o sorbitol são monossacáridos hidrogenados, já o isomaltitol, o maltitol e o lactitol são dissacáridos hidrogenados ²⁵.

3.2.2.1 Isomaltitol (E953)

Formação e produção: O isomaltitol (figura 4) obtém-se a partir da sacarose, pela transformação da sacarose em maltose (duas moléculas de glicose unidas por uma ligação glicosídica) e a sua consequente hidrogenação, originando o isomaltitol. O isomaltitol é o resultado de uma mistura equimolar de dois dissacáridos. O primeiro é a junção entre a glicose e o manitol e o segundo provém da união entre a glicose e o sorbitol, glicose (50%), manitol (25%) e sorbitol (25%) ²².

Características: Possui características semelhantes às da sacarose, apenas com exceção de não ser higroscópico, é inodoro, cristalino e não contém gosto residual ³⁰. O seu poder adoçante situa-se entre os 45% e os 60% do poder adoçante da sacarose ³⁰.

Sabor: Puramente doce, não conferindo deste modo poder refrescante ²⁵.

Utilização nos alimentos: Este carboidrato hidrogenado é adicionado aos alimentos pois trata-se de um agente anti aglomerante, agente de corpo/volume, agente de vitrificação, estabilizador, adoçante e espessante ²². Pela sua capacidade de mascarar sabores residuais de outros adoçantes, como é o caso dos não nutritivos, é largamente utilizado em combinação com estes ²².

Exemplos de produtos em que é usado: Rebuçados, pastilhas elásticas, chocolates, suplementos nutricionais, pastilhas para a tosse e dor de garganta ²². Também pode ser aplicado em produtos dentífricos, com o intuito de melhorar a remineralização dos dentes ²².

Saúde: Como não é metabolizado pelas bactérias orais, não se trata de um composto cariogénico. Influencia muito pouco o índice de glicose no sangue, possui um baixo valor calórico e contém um efeito parecido com o das fibras no intestino ²².

Metabolismo: A sua digestão é lenta e incompleta e apenas cerca de 10% é absorvido no trato gastrointestinal superior. A restante parte não absorvida, é fermentada pela microflora intestinal presente no cólon ^{19,22}.

Efeitos: Pode originar efeitos laxativos, no entanto se for consumido em excesso, entre 20 g/ dia a 30 g/ dia, pode originar efeitos mais adversos como flatulência e diarreia ³¹. A sua intolerância pode-se dever a muitos fatores, como a frequência com que o indivíduo consome produtos alimentares que possuam o isomaltitol nas suas formulações e a sua sensibilidade para este tipo de carboidratos hidrogenados ²².

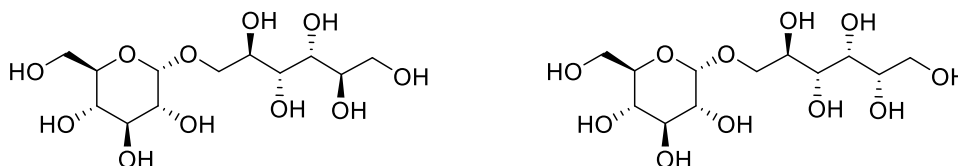


Figura 4: Estrutura química do Isomaltitol (mistura equimolar do dissacárido glicose+ manitol e do dissacárido: glicose+ sorbitol).

3.2.2.2 Maltitol (E965)

Formação e produção: O maltitol (figura 5) trata-se de um dissacárido resultante da hidrogenação catalítica da D-maltose presente no amido ^{22, 32}. É formado pela união de duas moléculas, a glicose e o sorbitol, em proporções idênticas. Pode ser encontrado na natureza, normalmente em frutas e vegetais e, ainda que em menor quantidade, no malte torrado e nas folhas de chicória ^{30, 32}.

Características: É o poliól com características mais semelhantes às da sacarose, mas difere na higroscopicidade. De entre todos os polióis, este é o que tem a curva de solubilidade em água mais próxima da sacarose: 220 g de sacarose dissolvem-se em 100 mL de água a 37 °C, por outro lado, 200 g de maltitol são dissolvidos em 100 mL de água a 37 °C ³². Possui um poder adoçante, que se situa entre 75% e 90% relativamente à sacarose.

Sabor: Contém um poder refrescante mínimo comparando com os demais e não confere qualquer sabor residual. Tem uma doçura semelhante à sacarose ²⁵.

Utilização nos alimentos: Trata-se de um agente de corpo/volume, é emulsionante, humectante, estabilizador, adoçante e espessante, não sofre reações de escurecimento nem caramelização ³³. Para além de poder substituir o açúcar, é também utilizado para substituir gorduras, pois confere aos alimentos uma textura cremosa ²².

Exemplos de produtos em que é usado: Devido ao facto de este ser pouco higroscópico e estável a altas temperaturas, pode ser usado em produtos de panificação, em produtos de pastelaria, como bolos e bolachas, alimentos pouco

calóricos e com baixo nível de gordura ^{7, 22}. Pode ser também aplicado em produtos farmacêuticos e dentífricos ³².

Saúde: Não é cariogénico. Pelo facto de ser absorvido lentamente, os níveis de insulina não são influenciados. Possui um baixo poder calórico ²².

Metabolismo: A sua absorção deve ser precedida pela hidrólise do dissacárido, obtendo-se uma molécula de glicose e uma molécula de sorbitol. É lentamente digerido no intestino delgado e a parte que não foi absorvida, é transferida para o cólon onde é fermentado pelas bactérias existentes ²².

Efeitos: Por dia, um adulto pode ingerir 40 g, enquanto que uma criança apenas 15 g. Se consumido em excesso, este pode produzir efeitos adversos como diarreia e desconforto abdominal ^{22, 32}.

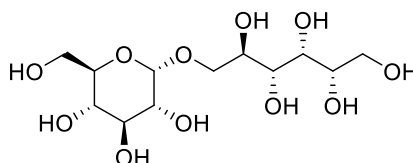


Figura 5: Estrutura química do Maltitol.

3.2.2.3 Eritritol (E968)

Formação e produção: O eritritol (figura 6), trata-se de um monossacárido produzido através de processos fermentativos ²². Pode ser encontrado em frutas, algas, cogumelos, e em alguns alimentos fermentados como é o caso da cerveja e do vinho ^{22, 25}. De fontes naturais, estima-se que haja um consumo por pessoa de 25 mg/ dia, nos EUA ²².

Características: Trata-se de um monossacárido que é estável a temperaturas elevadas e em ambientes, quer ácidos, quer alcalinos. Não participa em reações de Maillard, é não higroscópico, possui um baixo valor calórico e um poder adoçante de 70% relativamente ao da sacarose ²².

Sabor: Contém um forte sabor refrescante e de doçura semelhante à sacarose. Pode ser utilizado juntamente com o acesulfame-K ou o aspartame e também com outros polióis para aumentar o seu poder adoçante em 30% e conferir ao alimento o sabor doce que a sacarose atribui ²².

Utilização nos alimentos: É um agente de corpo/volume, promove textura e estabilização microbiológica em produtos alimentares. Uma outra função deste poliól é

a possibilidade de mascarar o sabor residual que os adoçantes de elevada intensidade deixam na boca ^{22, 25}.

Exemplos de produtos em que é usado: Pastilhas elásticas, doces, gelados e bebidas. Pode ser adicionado a alimentos como o chocolate, substituindo na totalidade o açúcar presente, reduzindo o poder calórico em 30% do chocolate, preservando a textura e o sabor ²⁵.

Saúde: Tem uma elevada tolerância digestiva, não influencia os níveis de glicemia no sangue e não promove o aparecimento de cáries. Aliás, o eritritol inibe o crescimento das bactérias responsáveis pela formação de cáries e em conjunto com o xilitol, pode ser capaz de prevenir a cárie ^{22, 25}.

Metabolismo: A sua absorção é feita de forma rápida e quase completa no intestino delgado e excretado na urina passadas 24 h, sendo que apenas uma pequena parte (10%) sofre fermentação no intestino ^{20, 22, 25}.

Efeitos: É improvável que surjam efeitos secundários associados a um consumo excessivo deste poliól. Apenas ocorrem se forem consumidas quantidades acima de 1000 mg/ Kg ²².

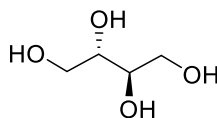


Figura 6: Estrutura química do Eritritol.

3.2.2.4 Lactitol (E966)

Formação e produção: O lactitol (figura 7) trata-se de um dissacárido constituído pela união de duas moléculas, a galactose e o sorbitol. É produzido a partir da hidrogenação catalítica da lactose, através de um catalisador de Níquel ^{22, 25}.

Características: Trata-se de um adoçante com 40% do poder adoçante da sacarose, é não higroscópico, estável a altas temperaturas, bem como em condições ácidas e alcalinas, possui uma boa solubilidade em alimentos, é um agente espessante, bem como um emulsionante ^{16, 22, 19, 29}.

Sabor: Contém um sabor suavemente adocicado e não adiciona qualquer sabor residual. O seu poder refrescante é bastante baixo ^{22, 35}.

Utilização nos alimentos: Não participa nas reações de Maillard e pode ser armazenado por períodos longos. Pelo facto de ter um sabor suave permite que se

perceção o sabor real dos alimentos. Também é passível de ser combinado com adoçantes de baixas calorias ¹⁹.

Exemplos de produtos em que é usado: É usado em fármacos, mas também em alimentos para diabéticos, produtos com baixo índice calórico, baixo índice de gordura e “sem açúcar”. Como é o caso de gelados, chocolate, rebuçados, produtos de panificação, conservas com teor de açúcar reduzido e pastilhas elásticas ²².

Saúde: Tem uma influência insignificante nos níveis de glicose no sangue. Não influencia no aparecimento de cáries dentárias. Atua como um pré-biótico, sendo capaz de promover o crescimento de bactérias benéficas no cólon, tais como *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* e elimina outras bactérias que produzem efeitos negativos no organismo. É igualmente usado no tratamento de constipações e encefalopatias ²².

Metabolismo: O lactitol embora seja proveniente da lactose, não é degradado pela enzima lactase, mas sim pela microflora intestinal. O lactitol é metabolizado no intestino grosso, sendo convertido em biomassa, dióxido de carbono, uma pequena quantidade de hidrogénio e ácidos gordos ²².

Efeitos: Pode originar efeitos laxativos, diarreia, se consumido em excesso, mas também fatores como a frequência de ingestão, a idade e a saúde intestinal influenciam na reação do indivíduo a este poliól. ^{22, 34}.

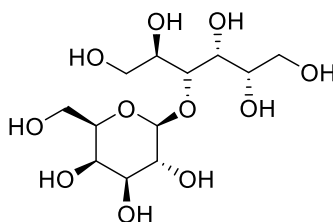


Figura 7: Estrutura química do Lactitol.

3.2.2.5 Manitol (E421)

Formação e produção: O manitol (figura 8) é um monossacárido, obtido a partir da hidrogenação catalítica da frutose/ glicose (1:1), no entanto esta hidrogenação possui um rendimento de 20%, isto é, bastante baixo para fazer face às necessidades. Por este motivo, estão a ser estudadas alternativas a este procedimento, como é o caso de processos fermentativos, utilizando bactérias lácticas heterofermentativas, sendo que existe uma completa conversão da frutose em manitol em condições moderadas, sem ser produzido sorbitol, pois estes dois polióis são isómeros, diferindo na posição grupo -OH no carbono 2 ^{22, 35, 36, 37}. O manitol é o mais abundante na natureza, uma vez

que é produzido por bactérias, fungos, algas, leveduras e muitas plantas, sendo que a sua produção proveniente da extração de fontes naturais é uma das soluções encontradas para a sua obtenção ^{22, 37}.

Características: Trata-se de um poliál que possui entre 50% a 70% do poder adoçante da sacarose, não é higroscópico e é estável mesmo a altas temperaturas ^{22, 36}.

Sabor: Possui um sabor doce e refrescante. O seu poder refrescante possibilita mascarar sabores amargos ²². Combinado com outros adoçantes e ingredientes, pode-se traduzir num efeito sinérgico de doçura e sabor ²².

Utilização nos alimentos: É um agente de corpo/ volume, plastificante, um agente de revestimento com sabor a chocolate e ainda melhora a fluidez de certos alimentos ^{22, 36}.

Exemplos de produtos em que é usado: É usado em comprimidos nutricionais e farmacêuticos, pastilhas elásticas, rebuçados, gelados e outras confeções com sabor a chocolate, em sobremesas instantâneas e ainda em “produtos refrescantes” e “sem açúcar” ^{20, 22, 36}.

Saúde: Pode atuar como um diurético osmótico (atua nos rins para diminuir a concentração de urina) e tem capacidades antioxidantes. É capaz de eliminar radicais hidroxilo (**ver nota**) e estudos afirmam que pode mesmo auxiliar no tratamento do cancro do cólon. Tal como a maioria dos polióis não contribui para o surgimento de cáries e não influencia nos níveis de glicose e insulina no sangue ²².

Nota: O radical livre hidroxilo (HO•) é a espécie mais reativa das formas reativas de oxigénio. Promove o stress oxidativo, sendo que esta espécie de oxigénio livre é capaz de danificar todo o tipo de estruturas celulares, podendo mesmo danificar o ADN ³⁸.

Metabolismo: O manitol é muito pouco absorvido e, consequentemente, os níveis de insulina não são alterados. Apenas 25% é parcialmente absorvido no intestino delgado e não metabolizado, sendo excretado na urina. No cólon, através das bactérias coloniais, a parte que não foi absorvida é lentamente fermentada ^{22, 24}.

Efeitos: Um consumo de 20 g/dia pode provocar efeitos laxativos ^{22, 39}.

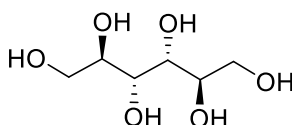


Figura 8: Estrutura química do Manitol.

3.2.2.6 Xilitol (E967)

Formação e produção: O xilitol (figura 9) trata-se de um poliól que é obtido a partir da hidrogenação catalítica da D- xilose. A xilose é obtida através da hidrólise do xilano, isolado primeiramente da madeira. A xilose segue para processos de purificação cromatográfica, sendo que a solução obtida em conjunto com o catalisador de Níquel, origina o xilitol. Este processo é bastante dispendioso e por isso encontram-se em estudo alternativas a esta produção a nível industrial. Pode ser encontrado na natureza em alguns frutos e vegetais, bagas, cogumelos, aveia ameixas, framboesas e couve flor e, embora em pequenas quantidades, no organismo humano ^{20, 22, 25}.

Características: O xilitol é o mais doce de todos os adoçantes nutritivos. É muito semelhante à sacarose, em termos de doçura e agente de corpo/volume, mas com a vantagem de conter metade do poder calórico da sacarose ¹⁷. É levemente higroscópico, pouco solúvel em água e estável a altas temperaturas ¹⁹.

Sabor: Possui um sabor doce e refrescante ¹⁹.

Utilização nos alimentos: É usado como emulsificante, humectante, estabilizante, adoçante e espessante ¹⁹.

Exemplos de produtos em que é usado: Pastilhas elásticas, doces e bolachas, mas também em produtos farmacêuticos e nutracêuticos ^{7,17}.

Saúde: Não é cariogénico e, em conjunto com o Eritritol, inibe o desenvolvimento das bactérias responsáveis pelo surgimento das cáries e aumenta o pH na cavidade oral promovendo uma remineralização dental. Também existem estudos em que se verifica que este poliól pode reduzir a incidência de otites e um efeito positivo antibacteriano na colonização nasal pneumocócica. Está comprovado que é seguro para o uso de crianças ^{17, 28}.

Metabolismo: Da quantidade que é ingerida, 50% é absorvida no intestino delgado, sendo que entre 50% a 70% é fermentada no intestino grosso ^{22, 24, 40}.

Efeitos: O organismo humano é capaz de tolerar 100 g por dia. Se forem consumidas quantidades acima deste valor, efeitos gastrointestinais são sentidos tais como diarreia, e ainda pode provocar o síndrome do intestino irritável ^{17, 28, 41}.

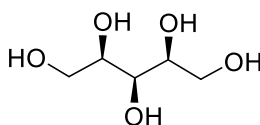


Figura 9: Estrutura química do Xilitol.

3.2.2.7 Sorbitol (E420)

Formação e produção: O sorbitol (figura 10) é obtido através da hidrogenação catalítica da glicose ou da sacarose recorrendo a um catalisador de Níquel, a altas temperaturas. Pode ser encontrado naturalmente em bagas, maçãs, pêras, damascos, nectarinas, em alguns vegetais e ainda em frutos secos, tal como tâmaras, ameixas e passas ^{17, 27, 40}.

Características: Possui entre 50% a 70% do poder adoçante da sacarose e contém um menor poder calórico. A sua solubilidade em água é superior ao seu isómero, o manitol, pode ser fabricado em ambas as formas, cristalina ou líquida. Possui elevada higroscopicidade, é estável, mesmo a altas temperaturas e não participa em reações de Maillard ^{17, 30, 40, 42}.

Sabor: Possui um sabor doce e refrescante. É passível de ser combinado com outros agentes gelificantes, proteínas e gorduras e açúcares, promovendo um efeito sinérgico e aumentar assim a percepção de doçura e um melhor sabor ¹⁷.

Utilização nos alimentos: É utilizado como adoçante, agente humectante, espessante, estabilizador, promove textura e é um agente anti cristalizante ^{17, 40}.

Exemplos de produtos em que é usado: O sorbitol pode ser aplicado em pastilhas elásticas, doces sem açúcar, sobremesas congeladas e também em produtos farmacêuticos e de cosmética. Para além disto, pelo facto de ser higroscópico, é bastante utilizado em produtos de panificação e pastelaria, pois estes produtos têm tendência a secar ou amadurecer durante o seu armazenamento ^{17, 40}.

Saúde: Não promove o aparecimento de cáries e não influencia os níveis de glicose no sangue ¹⁷.

Metabolismo: O sorbitol é lentamente absorvido no trato gastrointestinal e o seu metabolismo ocorre no fígado. A porção que não é absorvida é fermentada pelas bactérias do cólon ¹⁹.

Efeitos: Doses superiores a 50 g/ dia podem-se traduzir em efeitos como diarreia e desconforto abdominal ¹⁹.

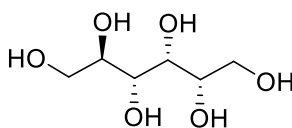


Figura 10: Estrutura química do Sorbitol.

3.2.3 Importância da validação do método para a determinação de polióis

Tendo em conta a utilização de polióis como aditivos em diversos produtos alimentares, é importante possuir uma metodologia analítica que permita determinar com rigor estes polióis nos alimentos. A metodologia que irá ser aplicada neste trabalho de estágio baseia-se na aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detetor de índice de refração (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

4. Notas sobre a validação de métodos analíticos

A validação de um método analítico é fundamental para o estabelecimento de métodos de referência, bem como, na avaliação da capacidade do laboratório produzir resultados analíticos confiáveis ⁴³. Trata-se por isso, de um procedimento com inúmeras etapas de avaliação para poder ser demonstrado que o processo é adequado para o fim a que se destina ⁴³. É, então, uma garantia da conformidade do método. Um método não validado não garante a mesma confiança nos resultados que um método validado ^{44, 45}.

Os resultados analíticos são fundamentais para assegurar a segurança dos produtos alimentares. Um método validado gera resultados analíticos confiáveis que podem conceder informações sobre a fabricação do produto, verificar se um alimento cumpre os limites regulamentares, entre outros aspetos ⁴⁶.

A validação deve ser efetuada mesmo quando se efetuam adaptações às metodologias já validadas, quando se incluem novas técnicas no procedimento ou utilizam-se novos equipamentos, ou quando se desenvolve um método analítico de raiz ^{45, 47}. A validação abrange a especificação dos requisitos do método, a determinação das suas características, a demonstração de que os requisitos podem ser alcançados e ainda uma declaração sobre a validação do método ⁴⁴.

Este procedimento procura não só garantir que é possível obter-se resultados semelhantes em condições de repetibilidade, isto é, todos os ensaios estão a ser submetidos aos mesmos fatores externos, como a temperatura, os reagentes, a fase móvel, o equipamento de medição; mas também em condições experimentais diferentes, como a medição ser efetuada em dias diferentes, temperatura, reagentes e fase móvel diferentes, alterações no equipamento de medição, entre outros fatores. É igualmente exigido que o método seja capaz de quantificar quantidades muito baixas do analito ⁴⁶.

Instituições analíticas internacionais desenvolveram estratégias que permitem garantir a qualidade dos resultados sob determinadas condições. Este sistema de garantia de qualidade está sempre em constante renovação para assim se adaptar à evolução natural das exigências do consumidor ⁴⁶. Os laboratórios que produzam resultados analíticos devem operar sob princípios de garantia de qualidade. Para tal, é necessário que os laboratórios sejam acreditados na norma ISO/IEC 17025. Igualmente os laboratórios devem participar em circuitos que permitam comparar os seus resultados com outros laboratórios que possuam o mesmo método, permitindo-lhes mostrar que efetuam um controlo interno rigoroso aos seus processos, e ainda demonstrar a sua eficiência comparando o seu desempenho com outros laboratórios semelhantes ⁴⁶. Tal

como foi dito anteriormente, a Silliker Portugal, S.A. trata-se de uma empresa acreditada na norma acima mencionada e, como tal, participa nestes circuitos.

O processo de validação global envolve uma avaliação indireta e direta dos parâmetros característicos do método. A avaliação indireta é realizada por determinação e evidência dos parâmetros característicos. A avaliação direta consiste em determinar se existe concordância entre o valor obtido experimentalmente e o valor de referência aceite como verdadeiro ⁴⁸.

4.1 Avaliação indireta

Os parâmetros relativos à avaliação indireta estão apresentados a baixo em forma de lista.

- Identificação
- Especificidade/ seletividade
- Linearidade
- Gama de trabalho
- Sensibilidade
- Limiares analíticos (LD e LQ)
- Precisão
- Robustez

4.1.1 Identificação

A identificação trata-se de um parâmetro importante que serve para demonstrar que o método em causa é capaz de identificar sem qualquer dúvida a presença ou não de um determinado analito na amostra, demonstrando assim que o método está relacionado com o analito ⁴⁹.

4.1.2 Especificidade/ seletividade

Estes dois termos normalmente estão associados como sinónimos, mas na prática representam situações diferentes que se complementam.

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), o termo «especificidade» é referido como a capacidade que o método possui para detetar o analito em causa, sem qualquer interferente da matriz. Por outro lado, o termo «seletividade» refere-se à capacidade do método quantificar com precisão o analito, na presença de interferentes ⁵⁰. As interferências podem ter origem nos outros

componentes da matriz que intensificam o sinal analítico ou até mesmo interferências que resultam do procedimento, como por exemplo contaminação pelos reagentes utilizados ⁵¹.

Com o intuito de se avaliar a interferência que existe na análise, pode ser realizado um teste de recuperação, utilizando um determinado número de amostras com a mesma matriz, que se foca essencialmente em fortificar a amostra com uma concentração conhecida do analito, onde a concentração é a única que varia em toda a gama de trabalho. A análise deve ser realizada em duplicado e em condições de repetibilidade. A taxa de recuperação (R) (equação 2), trata-se da comparação entre a quantidade exata que foi adicionada e o valor experimental obtido pela metodologia. O valor da taxa de recuperação deve ser próximo dos 100%, para que o método seja considerado apto ⁴⁸. No laboratório, foi estabelecido internamente que o intervalo aceite para as taxas de recuperação seria entre 80% e 120%. Na equação (1), está representado o cálculo para a obtenção da concentração da fortificação, necessária para o cálculo da taxa de recuperação.

$$C_{\text{fortificação}} = \frac{C_{\text{SP}} \times V_{\text{adicionado}}}{V_{\text{diluição}}} \quad (1)$$

$$R (\%) = \frac{C_{\text{obtida}} - C_{\text{inicial}}}{C_{\text{fortificação}}} \times 100 \quad (2)$$

Em que, a C_{sp} representa a concentração da solução padrão de maior concentração, o $V_{\text{adicionado}}$ é o volume adicionado da solução padrão de maior concentração e $V_{\text{diluição}}$ trata-se do volume final da amostra após diluição. A C_{obtida} trata-se da concentração final da amostra após a fortificação; a C_{inicial} indica a concentração inicial da amostra para o respetivo analito, antes da fortificação.

4.1.3 Quantificação

A quantificação é importante para interpretar os resultados obtidos em cada ensaio, fazendo parte os parâmetros da curva de calibração, sensibilidade e os limiares analíticos, como LD e o LQ.

- **Curva de calibração**

A curva de calibração é útil em análises quantitativas para ser possível correlacionar uma concentração de analito conhecida com a resposta dada pelo método. Para isso, realiza-se uma série de soluções padrão com a concentração conhecida e

são analisadas nas mesmas condições que as amostras. Obtém-se deste modo uma curva de calibração, onde o sinal analítico (y) está representado em função da concentração (x) ⁴⁸. A partir desta é possível aferir a concentração do analito através da fórmula de cálculo (3).

A calibração deve ser efetuada diariamente ou num período de tempo estabelecido internamente e deve abranger toda a gama de trabalho de uma forma equitativa ⁴⁸.

A reta de calibração está sob a forma de $y = mx + b$

$$C_{\text{analito}} = \frac{y-b}{m} \quad (3)$$

Onde y é o sinal analítico, b a ordenada na origem e m o declive.

• Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade que o método possui em distinguir pequenas variações na concentração do analito ⁴⁸.

Pela expressão de cálculo (6), é possível obter-se a sensibilidade do método a partir do quociente entre a variação da resposta do método (ΔY) e as pequenas variações de concentração (ΔX) ⁴⁸.

$$s = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (6)$$

A sensibilidade é identificada como sendo a derivada de 1ª ordem da curva de calibração na zona de concentração definida. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, então a sensibilidade é constante em toda a gama de trabalho e igual ao declive da reta de calibração (equação 7) ⁴⁸. Ou seja,

$$s = \frac{\Delta Y}{\Delta X} = m \quad (7)$$

Portanto é possível aferir que a sensibilidade do método está relacionada com o declive em modelos lineares e que quanto maior é o declive da reta, maior é a sua sensibilidade ⁴⁸.

As vantagens de se averiguar a sensibilidade do método englobam o facto de ⁴⁸:

- Ser possível comparar a sensibilidade do método com outros, em modelos lineares;
- Avaliar as alterações da sensibilidade ao longo do método;

- Comparar a sensibilidade com outros analitos.

Um método diz-se sensível quando consegue detetar pequenas variações existentes nas concentrações.

É de notar ainda que este conceito não deve ser confundido com o Limite de Detecção (LD).

- **Desvio padrão do método**

O desvio padrão do método (equação 5) serve para o próprio analista perceber a qualidade do seu trabalho. É determinado com base nos valores do desvio padrão residual ($s_{y/x}$) (equação 4) e do declive das retas de calibração ⁴⁸.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (4)$$

$$s_{\text{método}} = \frac{s_{y/x}}{m} \quad (5)$$

Em que $\hat{y}$ corresponde ao valor de y calculado através da reta de calibração, utilizando a concentração das soluções padrão; n é o número de pontos da reta de calibração e m diz respeito ao declive da reta.

O desvio padrão relativo do método (CV %) é determinado da seguinte forma:

$$CV (\%) = \frac{s_m}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

Onde $\bar{x}$ corresponde à média dos valores de concentração da solução padrão, utilizados para a construção da reta de calibração.

- **Limiares analíticos**

Limite de deteção (LD)

O limite de deteção é referido como o teor mínimo, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável ⁴⁸. Uma leitura inferior a este limite não significa que não esteja presente ⁴⁸.

Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação corresponde à concentração mínima, onde a partir desta é possível quantificar o analito presente na amostra, com uma determinada exatidão e precisão. Neste trabalho, este corresponde à solução padrão de calibração de menor concentração ⁴⁸.

4.1.4 Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade que este possui, numa determinada gama de trabalho, através de uma reta de calibração, de apresentar resultados proporcionais à concentração do analito na matriz da amostra ^{49, 52}.

Uma das formas de poder avaliar a linearidade de uma curva de calibração é através da análise da correlação linear (r) ⁵³. Esta pode ser obtida através da realização de pelo menos 5 curvas de calibração, sendo que o $r \geq 0,995$.

O r estabelece a relação que existe entre o sinal analítico medido e a concentração do padrão. O r^2 , o quadrado do coeficiente de correlação, também denominado, coeficiente de determinação, permite obter informações quanto à adequabilidade do modelo linear face aos valores experimentais ^{51, 53}.

O r pode ser calculado através da expressão de cálculo (7) ⁵⁴:

$$r = \frac{\sum_i^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_i^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_i^N (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (7)$$

Onde, N é o número de pontos que a curva de calibração possui ($N \geq 5$), $\bar{x}$ e $\bar{y}$ correspondem à media dos valores de x e de y respetivamente ⁵⁴.

O valor de r varia entre $-1 \leq r \leq 1$. A título de exemplo, num caso hipotético em que $r = -1$, isto significaria que todos os pontos formariam uma reta perfeita de inclinação negativa; se pelo contrário, $r = 1$, todos os pontos efetuariam uma reta perfeita de inclinação positiva. Um $r = 0$ significa que não existe uma correlação linear entre x e y ⁵⁴.

4.1.5 Gama de trabalho

A gama de trabalho é definida como sendo o intervalo de valores fornecidos pelo método onde a sensibilidade é constante. É expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico ⁵⁵. O estudo deste parâmetro, é efetuado em grande parte através do método da curva de calibração. A extremidade inferior da gama

de trabalho estabelece-se como sendo o LQ e a extremidade superior correspondente à concentração máxima obtida do analito para aquela gama de trabalho ⁴⁸.

4.1.6 Precisão

A precisão trata-se de um parâmetro que mede a dispersão dos resultados, nomeadamente em ensaios de duplicados, independentes, amostras semelhantes ou padrões e em condições definidas, com o intuito de se minimizar o efeito da matriz. É de realçar que a precisão varia com a gama de concentrações ⁴⁸.

Para ser possível determinar este parâmetro, é necessário efetuar o cálculo da repetibilidade, da reprodutibilidade, e ainda, se for requerido, a precisão intermédia ⁴⁸.

- **Repetibilidade**

A repetibilidade indica a precisão de um método de ensaio em condições muito semelhantes entre si, ou seja, a partir de uma mesma amostra e onde as condições tenham sido possíveis de manter ao longo do processo, como é o caso do laboratório, do analista, do equipamento, dos reagentes e períodos de tempo curtos entre medições ⁴⁸.

Quando se trata de um ensaio intralaboratorial, é importante que se realizem 10 ou mais ensaios ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrão em condições de repetibilidade ⁴⁸. No caso deste trabalho, foi estabelecido pela empresa que se efetuariam 7 ensaios por amostra.

Em primeiro lugar, é necessário verificar, através do teste de Grubbs, se nos resultados obtidos para os n ensaios, existem valores anormais, que terão de ser rejeitados do conjunto de dados ⁴⁸.

A repetibilidade é determinada como sendo o desvio padrão associado à média dos resultados obtidos. O limite de repetibilidade (r_r) é definido como o valor máximo permitido para a diferença entre 2 ensaios obtidos em condições de repetibilidade, com um intervalo de confiança de 95% e calcula-se de acordo com a expressão de cálculo (8) ⁴⁸.

$$r_r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (8)$$

Onde 2,8 representa o fator crítico e S_{ri}^2 a variância de repetibilidade associada aos resultados obtidos.

O valor 2,8 advém de $r = t \sqrt{n} \times S_{ri}$, sendo que para um intervalo de confiança de 95%, assumindo uma distribuição normal, o valor tabelado de t para $n=2$ é de 1,96. Portanto, $r = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$ ⁴⁸.

De acordo com o valor de r , os resultados entre duas medições só são aceites desde que a diferença absoluta entre elas seja inferior ou igual a r ⁴⁸. No entanto, em contexto laboratorial, não faz sentido calcular o limite de repetibilidade para cada uma das matrizes alimentares, pois seria necessária uma base de dados enorme. Por este motivo, o limite de repetibilidade é definido por gama de trabalho ⁴⁸.

Através do teste C de Cochran, é possível verificar a homogeneidade das variâncias, num conjunto de resultados provenientes de diferentes amostras com igual número de repetições, sendo possível aferir a gama de trabalho.

O limite de repetibilidade ($r_{\text{gama de trabalho}}$) da gama de trabalho é passível de calcular através da equação (9).

$$r_{\text{gama de trabalho}} = \bar{r} \quad (9)$$

Em que $\bar{r}$ corresponde à média dos limites de repetibilidade obtidos para cada uma das matrizes pertencentes à gama de trabalho.

- **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade trata-se de fazer variar as condições da realização do método, isto é, fazer variar o laboratório, o analista, os equipamentos e/ou a época de análise, e com isto analisar a precisão do método. Esta é determinada por ensaios interlaboratoriais, onde são enviadas para diferentes laboratórios uma série de amostras para serem efetuados ensaios ⁴⁸.

- **Precisão intermédia**

A precisão intermédia trata-se da precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, usando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas que sejam definidas as variáveis do processo, nomeadamente se são diferentes analistas, se são utilizados diferentes equipamentos, em que altura é que são realizadas as análises e se existe ou não verificação da calibração ⁴⁸.

Esta é determinada a partir de vários ensaios replicados, ensaios duplicados ou por um ensaio único, em condições anteriormente referidas para a amostra e pode ser calculada através de diferentes expressões de cálculo dependendo do método utilizado ⁴⁸.

Neste trabalho, o desvio padrão da precisão intermédia (S_{PI}), o coeficiente da precisão intermédia (CV_{PI}) e o limite da precisão intermédia (r_{PI}) para um conjunto de duplicados é efetuado através das equações (10), (11) e (12), respetivamente.

$$S_{PI} = \sqrt{\frac{1}{2 \times n} \times \sum (x_2 - x_1)^2} \quad (10)$$

$$CV_{PI}(\%) = \frac{S_{PI}}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

$$r_{PI}(\%) = 2,8 \times \sqrt{S_{PI}^2} \quad (12)$$

Onde n é o número de resultados que existem para aquela gama de trabalho, $(x_2 - x_1)^2$ diz respeito à diferença ao quadrado entre os valores obtidos no duplicado efetuado, $\bar{x}$ é a média dos resultados obtidos, 2,8 é o fator crítico e S_{PI}^2 corresponde à variância da precisão intermédia associada aos resultados.

4.1.7 Robustez

A robustez de um método mede a suscetibilidade que este possui face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se demonstrar ser insensível a pequenas oscilações nas condições experimentais que possam ocorrer, enquanto o processo está a decorrer ⁴⁸.

4.2 Avaliação direta

A avaliação direta foca-se essencialmente em determinar a exatidão de um método de ensaio ⁴⁸. A exatidão trata-se de um parâmetro utilizado para comparar o resultado obtido num ensaio com o valor verdadeiro. Pode ser avaliada através da utilização de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, testes comparativos e ensaios de recuperação, sendo que apenas este último foi utilizado para a análise da exatidão ^{44, 48}.

4.2.1 Materiais de referência certificados (MRC)

Os materiais de referência certificados têm de ser adquiridos em empresas certificadas e reconhecidas. Estes são avaliados segundo o erro relativo, teste de hipóteses (teste t), fator de desempenho Z (Z score) e o erro normalizado. Possuem uma concentração ou outra grandeza, com uma incerteza associada a um determinado parâmetro e utilizam-se para averiguar o desempenho do laboratório.

O valor obtido na análise deve ser comparado com o do MRC determinando-se assim, a exatidão e o erro da análise. Este valor deve ser encontrado dentro do intervalo da incerteza estabelecido pelo material de referência certificado ⁴⁸.

- **Erro relativo**

O erro relativo revela a componente dos erros sistemáticos do laboratório, sendo o próprio laboratório que estabelece o grau de exigência relativo à exatidão para o método estudado, suportando-se pela bibliografia existente ⁴⁸. Pode ser calculado através da seguinte expressão de cálculo:

$$Er = \frac{(X_{lab} - X)}{X} \quad (13)$$

Onde, X_{lab} é considerado o valor obtido experimentalmente ou a média aritmética dos valores obtidos e X o valor considerado verdadeiro ⁴⁸.

- **Teste de hipóteses (teste t)**

A deteção de erros sistemáticos relativos à metodologia estudada, também pode ser averiguada segundo o teste de hipóteses, através da expressão de cálculo (14) ⁴⁸.

$$t_{calc} = \frac{(X_{lab} - X) \times \sqrt{n}}{SX_{lab}} \quad (14)$$

Onde, X_{lab} trata-se da média dos valores obtidos experimentalmente pelo laboratório aquando da análise do material de referência certificado, n o número de amostras ensaiadas e SX_{lab} o desvio padrão associado à média dos valores obtidos pelo laboratório (X_{lab}) ⁴⁸.

De seguida, o valor de t calculado em módulo é comparado com o valor t tabelado com n-1 graus de liberdade, para um intervalo de confiança ⁴⁸.

Se:

$t_{\text{tab}} > |t_{\text{calc}}|$: o ensaio é satisfatório, pois não há evidência estatística, para intervalo de confiança definido, de que existem erros sistemáticos.

$t_{\text{tab}} \leq |t_{\text{calc}}|$: o ensaio não é satisfatório, pois há evidência estatística, para o intervalo de confiança definido, de que existem erros sistemáticos.

• Fator de desempenho Z

O laboratório pode igualmente optar por verificar o seu desempenho na análise do MRC, através do cálculo do fator de desempenho, através da expressão seguinte ⁴⁸:

$$Z = \frac{(X_{\text{lab}} - X)}{S} \quad (15)$$

Em que, X_{lab} é o valor obtido pelo laboratório, X o valor aceite como verdadeiro para o MRC e S a unidade de desvio, que poderá ser a incerteza do valor do MRC ou outra unidade de desvio interna ⁴⁸.

A avaliação pode ser efetuada segundo a seguinte escala:

$|Z| \leq 2$: o ensaio é aceitável

$2 < |Z| \leq 3$: o ensaio é questionável

$|Z| > 3$: o ensaio está incorreto.

• Erro normalizado

O erro normalizado é utilizado caso o laboratório calcule a incerteza do resultado obtido (U_{lab}). Sendo que o valor verdadeiro (X) deve se situar dentro do intervalo de incerteza do valor obtido pelo laboratório (X_{lab}) ⁴⁸. O erro normalizado (E_n) pode ser estimado segundo a expressão de cálculo (16) ⁴⁸.

$$E_n = \frac{(X_{\text{lab}} - X)}{\sqrt{U_{\text{lab}}^2 + U_{\text{ref}}^2}} \quad (16)$$

Sendo U_{ref} a incerteza associada ao valor verdadeiro. Se $|E_n| \leq 1$ então U_{lab} está bem estimada ⁴⁸.

4.2.2 Ensaios interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais são importantes para quando um laboratório pretende ser acreditado, avaliando desse modo a sua exatidão ou pretende avaliar as características do método, no que diz respeito aos parâmetros da repetibilidade e da reprodutibilidade. Por este motivo, está igualmente a demonstrar que possui uma precisão semelhante aos outros laboratórios, no estudo em concreto ⁴⁸.

4.2.3 Testes comparativos

Este parâmetro consiste em comparar os resultados obtidos pelo método que está a ser validado com os resultados obtidos a partir de um método considerado de referência. Este estudo pode ser efetuado em toda a gama de concentração ou apenas numa gama restrita, sendo o objetivo deste estudo avaliar a proximidade dos resultados do método a validar com o método de referência. Para isso, efetuam-se análises em replicado sobre a mesma amostra, para ambos os métodos em separado e no fim avaliam-se os resultados obtidos ⁴⁸.

4.2.4 Ensaios de recuperação

Os ensaios de recuperação são utilizados com o intuito de verificar se o método é ou não exato, através das taxas de recuperação. Se as taxas de recuperação estiverem compreendidas entre 80 % e 120 %, o método é considerado exato. Primeiramente é analisada a amostra sem qualquer fortificação, através de um ensaio em duplicado, e de seguida, após a fortificação, verifica-se se o método permitiu obter a mesma quantidade daquela que foi colocada na amostra.

5. Parte experimental

O objetivo da empresa Silliker Portugal, S.A. é validar e implementar um método que permita detetar a presença dos polióis numa determinada matriz alimentar.

Para a implementação deste método, os reagentes necessários, bem como o material e a instrumentação utilizados estão apresentados nas secções 5.1. e 5.2. Os reagentes Isomaltitol, Maltitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol foram utilizados para a realização da solução padrão conjunta. Já os reagentes Eritritol e Lactitol foram utilizados para a realização da solução padrão E+L.

A validação do método no laboratório MIA seguiu o protocolo fornecido pela delegação da Espanha, seguindo a norma ISO/IEC 17025.

5.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para a validação e implementação do método dos polióis estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Reagentes utilizados no procedimento dos polióis, bem como a fórmula química de cada um, a massa molar, a marca dos reagentes e o seu grau de pureza.

Reagentes	Fórmula química	Massa molar (g/mol)	Marca	Grau de pureza (%)
Isomaltitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	344,31	Sosa Ingredients S.L	95
Maltitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	344,31	TCI	> 98
Eritritol	$C_4H_{10}O_4$	122,12	TCI	> 99
Lactitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	344,31	Alfa aesar	98
Manitol	$C_6H_{14}O_6$	182,17	Alfa aesar	99
Xilitol	$C_5H_{12}O_5$	152,15	Alfa aesar	99
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	182,17	Sigma- aldrich	≥ 99,5
Acetato de Zinco dihidratado	$C_4H_6O_4Zn \cdot 2 H_2O$	219,50	VWR	≥ 98
Hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado	$K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$	422,39	VWR	≥ 99
Ácido acético glacial	CH_3COOH	60,05	VWR	≥ 99,8
Água ultra pura	H_2O	18,02	Sistema ATS , com controlador EC (HI 983322) HANNA	

5.2 Material e Instrumentação

- ✓ Trituradora
- ✓ Balões volumétricos de 10 mL e de 100 mL, Linex e Normax
- ✓ Micropipeta de 50 μ L, 1000 μ L, 5 mL e 10 mL, Eppendorf Research Plus
- ✓ Balança analítica com capacidade para pesar com uma incerteza de 0,0001 g, Sartorius
- ✓ Gobelés de plástico de 100 mL
- ✓ Placa de agitação, Cimatec i multipoint
- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Magnete
- ✓ Cafeteira, Philips
- ✓ Sensor de temperatura
- ✓ Papel de filtro com tamanho de 150 mm, com partículas de retenção com diâmetro de 5 μ m a 13 μ m, VWR
- ✓ Copos de plástico com tampa vermelha
- ✓ Filtros de membrana hidrofílicos de 47 mm, com diâmetro da partícula de 0,45 μ m, Agela Technologies
- ✓ Bomba de vácuo
- ✓ Kitasato
- ✓ Aparelho de ultrassons, VWR
- ✓ Vials de 2 mL para análise em HPLC, Phenomenex
- ✓ HPLC com detetor de índice de refração, Agilent Technologies 1260 Infinity
- ✓ Coluna e pré- coluna para análise dos polióis, Phenomenex

5.3 Procedimento

É de ressaltar que o método para os polióis trata-se de um método interno e por isso vão ser ocultados alguns pontos do procedimento, tais como, as massas, os volumes, a temperatura, as rotações por minuto e o tempo de agitação.

▪ Preparação das soluções padrão para as retas de calibração

Neste trabalho são preparadas duas soluções- mãe, pois alguns polióis possuem tempos de retenção muito próximos, pelo que a leitura dos picos cromatográficos seria muito dificultada. Assim, uma solução é constituída por 5 polióis, são eles o Isomaltitol, o Maltitol, o Manitol, o Xilitol e o Sorbitol; e a outra abrange os restantes 2 polióis, o Eritritol e o Lactitol.

Primeiramente é necessário obter-se o padrão de maior concentração (solução-mãe) e a partir dele, obtêm-se os restantes padrões.

❖ **Solução padrão conjunta:** Isomaltitol, Maltitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol.

Preparação da solução- mãe padrão conjunta

Numa balança analítica, para um balão volumétrico pesa-se uma determinada massa de cada um dos padrões acima enunciados.

A seguir à pesagem e anotação das massas, coloca-se um determinado volume de água ultrapura a uma determinada temperatura tendo em vista a sua dissolução, rolha-se e agita-se a solução. Após o seu arrefecimento, perfaz-se o volume com água ultrapura e agita-se novamente a solução no final do processo para homogeneizar a solução.

É a partir desta solução-mãe padrão conjunta que se retira o volume necessário para formar as restantes soluções padrão necessárias para a reta de calibração.

Após ser adicionado o volume correspondente da solução-mãe padrão conjunta a cada balão volumétrico, perfaz-se o volume com água ultra pura, rolha-se e agita-se.

Por fim, cada uma destas soluções é transferida para vials de HPLC de 2 mL para ser possível analisar no aparelho de HPLC com detetor de índice de refração. Após obter-se o cromatograma correspondente, avaliou-se individualmente cada pico cromatográfico, sendo as alturas dos picos de cada um considerados para a elaboração das curvas de calibração. Obtêm-se 5 retas de calibração, correspondentes a cada um dos polióis em diferentes concentrações.

O cromatograma corresponde a esta solução está representado no Anexo II.

❖ **Solução padrão (E+L):** Eritritol e Lactitol.

Preparação da solução-mãe padrão (E+L)

O procedimento para a preparação desta solução-mãe é igual à preparação da solução- mãe descrita anteriormente, apenas com a alteração dos reagentes, sendo estes o Eritritol e o Lactitol.

Tal como anteriormente, são avaliados os picos, sendo as alturas consideradas. Com isto, obtêm-se duas retas de calibração, correspondentes a cada um dos polióis.

O cromatograma correspondente a esta solução está representado no Anexo II.

Matrizes alimentares

Com o intuito de tornar o método amplo e fiável para diversos alimentos, as matrizes alimentares utilizadas estão relacionadas com produtos açucarados que possam conter nas suas formulações polióis.

Na tabela 7 estão apresentados os grupos e as matrizes alimentares utilizadas para a validação do método, em conformidade com o que foi estabelecido pela empresa.

Tabela 7: Listagem do conjunto de produtos alimentares e matrizes alimentares utilizadas na validação do método.

Conjunto de produtos alimentares	Matriz alimentar utilizada
Cereais, leguminosas, pseudo-cereais e derivados	Bolacha
	Cereais
	Barras de cereais
Açúcar, produtos açucarados e derivados	Chocolate
	Doce
Alimentos dietéticos, suplementos alimentares, produtos de alimentação especial	Suplemento alimentar
Bebidas não alcoólicas	Sumo
Leite, produtos lácteos e derivados	Gelado
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	Tâmara

Preparação da amostra

Inicialmente a amostra é triturada e homogeneizada com o intuito de se obter uma amostra representativa. É de notar que esta primeira etapa é fundamental para se alcançar resultados com confiança.

Ensaio de recuperação

Numa balança analítica, a amostra é pesada para um gobelé de plástico, em condições de repetibilidade, sendo realizados 7 ensaios para serem fortificados com a solução-mãe padrão conjunta, outros 7 ensaios para serem fortificados pela solução-mãe padrão (E+L) e ainda 2 ensaios sem contaminação, para cada uma das matrizes alimentares.

Estes gobelés são colocados numa placa de agitação, insere-se um determinado volume de água a uma determinada temperatura e agitadores magnéticos. Passado algum tempo, ainda em agitação, adiciona-se um determinado volume de solução de Carrez I e solução de Carrez II, posteriormente é colocada em repouso, para ser verificada a existência da separação das fases. Se esta se verificar, pode-se avançar no processo, se não, voltam-se a repetir os passos a partir da adição das soluções de Carrez I e II.

As soluções são transferidas para balões volumétricos, sendo retirado o agitador com a ajuda de um magnete. O gobelé é passado várias vezes por água ultra pura para diminuir as perdas por transferência e por fim perfaz-se o volume do balão.

Após rolar e agitar os balões, o conteúdo é passado por um papel de filtro para um copo de plástico e do copo para vials de 2 mL para serem analisados no HPLC.

Soluções de Carrez I e II

As soluções de Carrez I e II são utilizadas para clarificar as soluções. A solução de Carrez I é preparada através da pesagem de acetato de zinco dihidratado, dissolvido com água ultrapura e transferido para um balão volumétrico. A esta solução, é adicionado ácido acético glacial, sendo o volume do balão completado com água ultra pura. A solução de Carrez II é preparada através da pesagem de uma determinada massa de hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado, sendo dissolvido e transferido para um balão volumétrico e o volume completado com água ultrapura.

Preparação da fase móvel

A fase móvel é constituída apenas por água ultra pura. No entanto, antes de ser usada no aparelho, é necessário que esta seja submetida a uma filtração a vácuo e a uma desgaseificação no aparelho de ultrassons.

5.4 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8: Apresentação das condições cromatográficas para o procedimento dos polióis.

Coluna cromatográfica	Rezex RPM monosaccharide, Pb ²⁺ (8%) Phenomenex
Pré- coluna	Carbo- Pb Phenomenex
Dimensões da coluna (mm)	300 x 7,8
Dimensões da pré- coluna (mm)	30 x 4
Detetor	IR
T_{forno para colunas} (°C)	80
Fase móvel	Água
Fluxo (mL/min)	0,6
Pressão (psi)	400
T_{interna} detetor IR (°C)	35
V_{injeção} (µL)	20
Tempo de análise (min)	63

Esta coluna utilizada é uma coluna de exclusão molecular. Este tipo de colunas possuem uma fase estacionária sólida, onde a fase móvel, neste caso, é uma solução aquosa e, portanto, a técnica é denominada filtração em gel.

Os tempos de retenção aproximados de cada um dos polióis estão apresentados em forma de lista.

- ❖ **Isomaltitol** (2 picos): **Isomaltitol 1** → 17,2 min
 Isomaltitol 2 → 22,6 min
- ❖ **Maltitol**: 19,6 min
- ❖ **Eritritol**: 20,1 min
- ❖ **Lactitol**: 21,4 min
- ❖ **Manitol**: 25,6 min
- ❖ **Xilitol**: 32,2 min
- ❖ **Sorbitol**: 35,4 min

É de notar que estes valores podem sofrer algumas alterações ao longo do tempo devido ao desgaste da coluna, no entanto estas alterações apenas poderão ser relativas a diferenças de +/- 1 min.

6. Resultados e Discussão

Nesta secção vão ser apresentados os resultados obtidos para a validação do método dos polióis e sua consequente interpretação.

6.1 Curva de calibração e Linearidade

Para o método dos polióis são obtidas 7 retas de calibração, correspondentes aos 7 polióis, dotadas de 6 pontos, correspondentes às 6 soluções padrão de diferentes concentrações.

Primeiramente, as soluções são injetadas no HPLC, nas mesmas condições em que as amostras vão ser injetadas, onde é possível obter-se um cromatograma correspondente a cada uma das soluções. Destes cromatogramas, é retirada a altura de cada um dos picos cromatográficos (sinal analítico) correspondentes a cada poliól na concentração pretendida.

A curva de calibração correspondente a cada poliól é constituída pela concentração da solução (g/ L) no eixo das abcissas, e no eixo das ordenadas o sinal analítico. Deste modo, é possível aferir a concentração das amostras, através de interpolação. A concentração em g/L é obtida através das expressões (17) e (18). Na equação 19, é possível observar a fórmula utilizada para o cálculo da concentração em g/100g.

$$y = m \times C_{g/L} + b \quad (17)$$

$$C_{g/L} = \frac{y-b}{m} \quad (18)$$

$$C(g/100g) = \frac{\frac{C(g/L) \times V_{final}(mL)}{massa(g)}}{10} \quad (19)$$

Em que a expressão (17) representa a equação da reta, a expressão (18) o cálculo para a obtenção da concentração das amostras em g/L, sendo o m o declive da reta e b a ordenada na origem e na expressão (19) o V_{final} corresponde ao volume final da solução.

Considera-se que as curvas de calibração seguem um modelo linear se o coeficiente de correlação (r) for maior que 0,995. Estes valores estão apresentados nas tabelas 9 a 13 referentes a cada um dos polióis relativos às diferentes curvas de calibração efetuadas nos diversos dias da realização deste trabalho. As curvas da calibração estão apresentadas graficamente nas figuras 11 a 17 com o intuito de ser observada a linearidade para cada um dos polióis.

No gráfico seguinte, representado na figura 11, estão apresentadas as diversas curvas de calibração, conseguidas nos diferentes dias referentes à realização deste trabalho, relativas ao Isomaltitol.

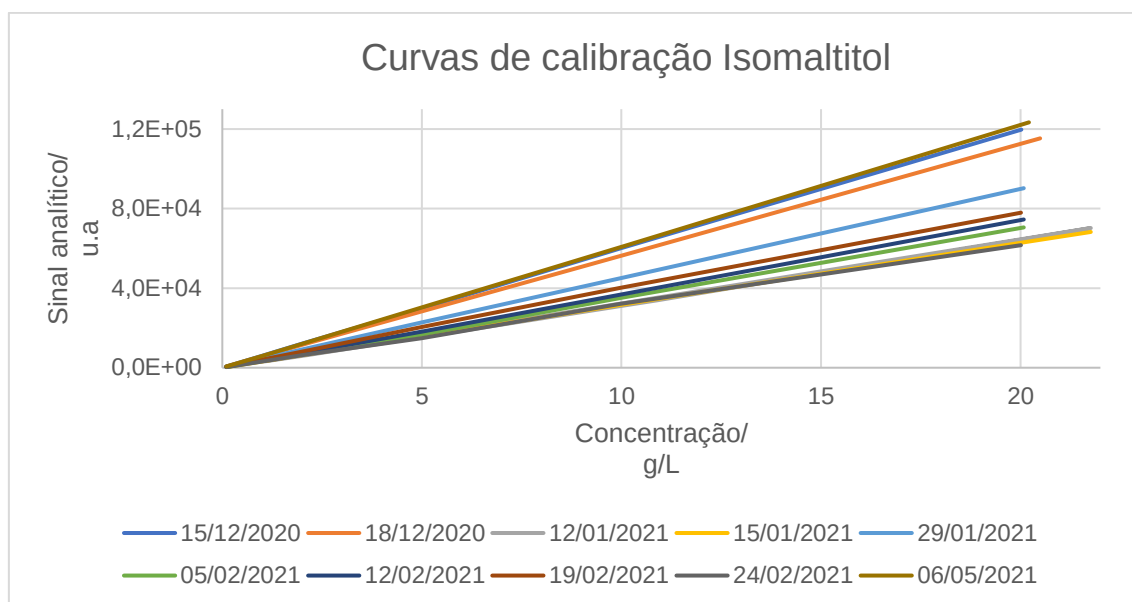


Figura 11: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Isomaltitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Na tabela 9 estão apresentados os valores da correlação linear com o intuito de verificar se as curvas de calibração, observadas graficamente na figura 13, seguem de facto o modelo linear.

Tabela 9: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Isomaltitol.

Isomaltitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	1,000
12/02/2021	1,000
19/02/2021	1,000
24/02/2021	1,000
06/05/2021	1,000

Com base no gráfico apresentado na figura 11 e na tabela 9, é possível concluir que o método segue um modelo linear para o Isomaltitol, pois todos os valores de r são superiores a 0,995.

Na figura 12, estão apresentadas as curvas de calibração e os valores de r obtidos para o Maltitol, para os diferentes dias.

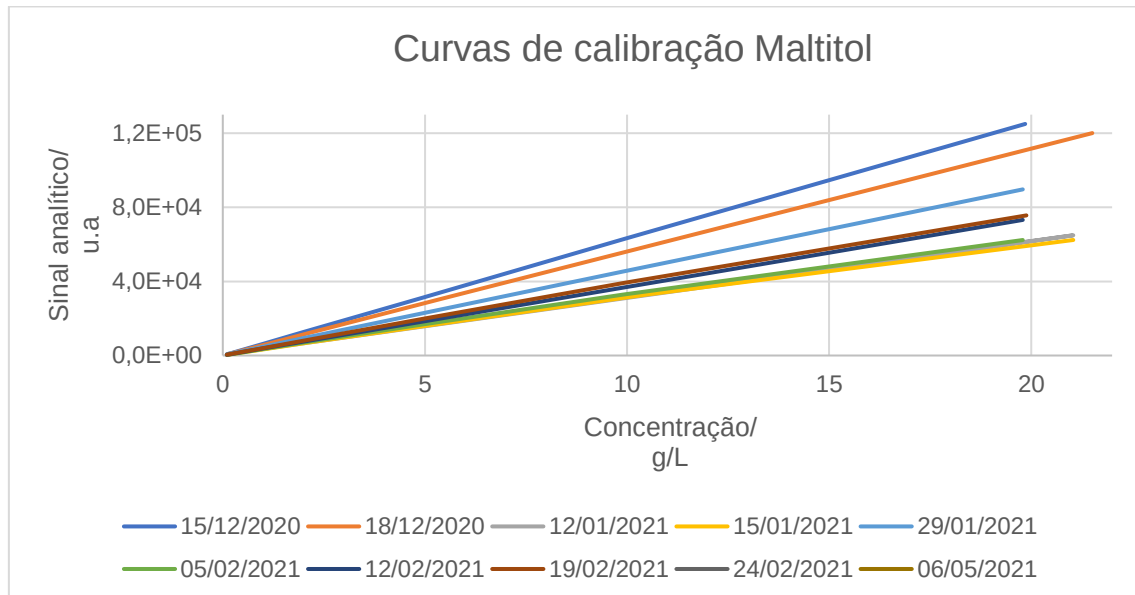


Figura 12: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Maltitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Na tabela 10, estão apresentados os valores de da correlação linear para se provar que o método segue o modelo linear.

Tabela 10: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Maltitol.

Maltitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	1,000
12/02/2021	1,000
19/02/2021	1,000
24/02/2021	0,999
06/05/2021	1,000

Com base na representação gráfica das curvas de calibração referentes ao Maltitol na figura 12 e a análise da tabela 10, as curvas de calibração seguem o modelo linear.

O gráfico, representado na figura 13, que se segue é referente às curvas de calibração obtidas para o Eritritol nos diferentes dias .

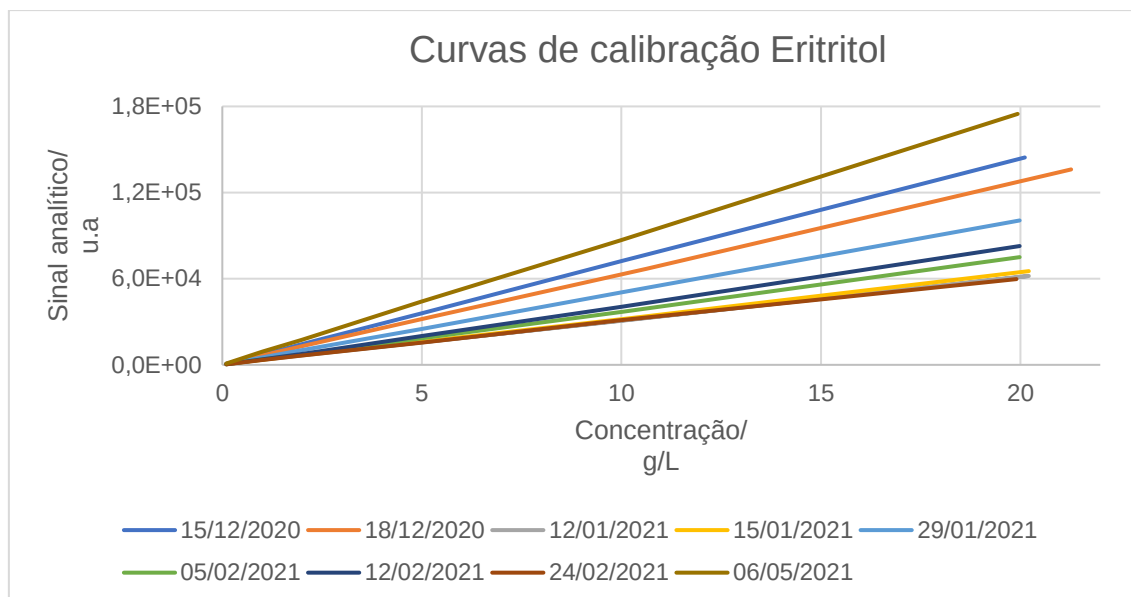


Figura 13: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Eritritol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).

A tabela 11 refere os valores do coeficiente de correlação para assim ser comprovado que o método segue o modelo linear para este poliól.

Tabela 11: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Eritritol.

Eritritol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	1,000
12/02/2021	1,000
24/02/2021	1,000
06/05/2021	1,000

Através da análise da tabela 11, é possível determinar que as curvas de calibração seguem um modelo linear, pois $r > 0,995$, bem como pela representação gráfica das curvas de calibração referentes ao Eritritol.

O gráfico apresentado na figura 16 representa as curvas de calibração obtidas para o Lactitol nos diferentes dias da realização do trabalho.

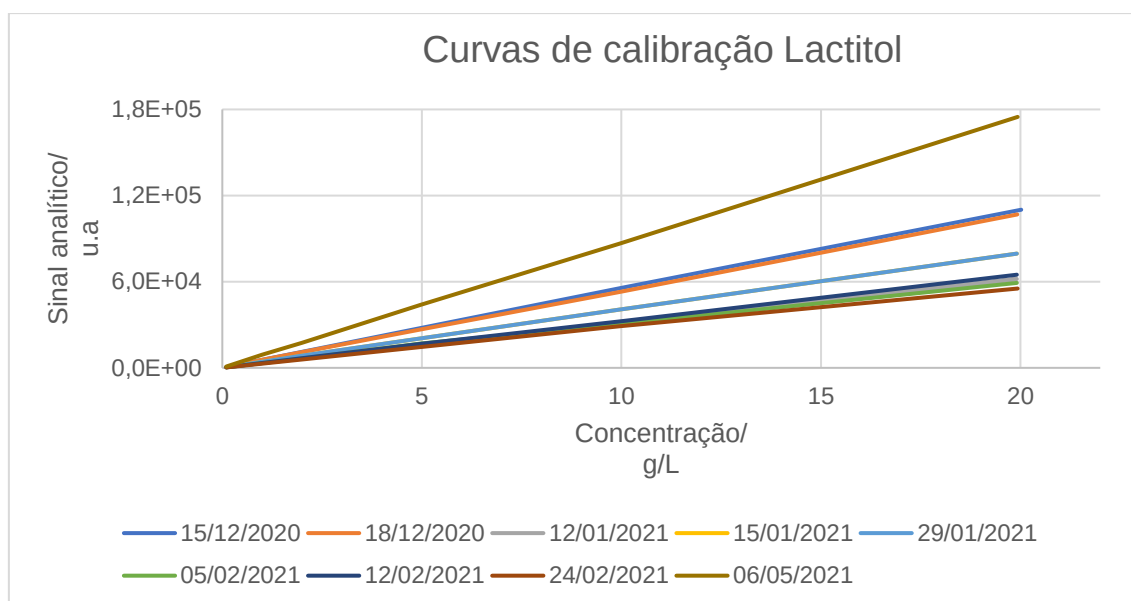


Figura 14: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Lactitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Na tabela 12 estão apresentados os valores referentes ao coeficiente de correlação das diversas retas representadas no gráfico acima.

Tabela 12: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Lactitol.

Lactitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	0,999
12/02/2021	1,000
24/02/2021	1,000
06/05/2021	1,000

Com base nos dados apresentados na figura 14 e na tabela 12, é possível concluir que o método possui um modelo linear para o Lactitol, pois a representação gráfica assim o demonstra e com base na tabela 12 denota-se que todos os valores de r estão acima de 0,995.

Para o Manitol, a representação gráfica das curvas de calibração está apresentada na figura 15.

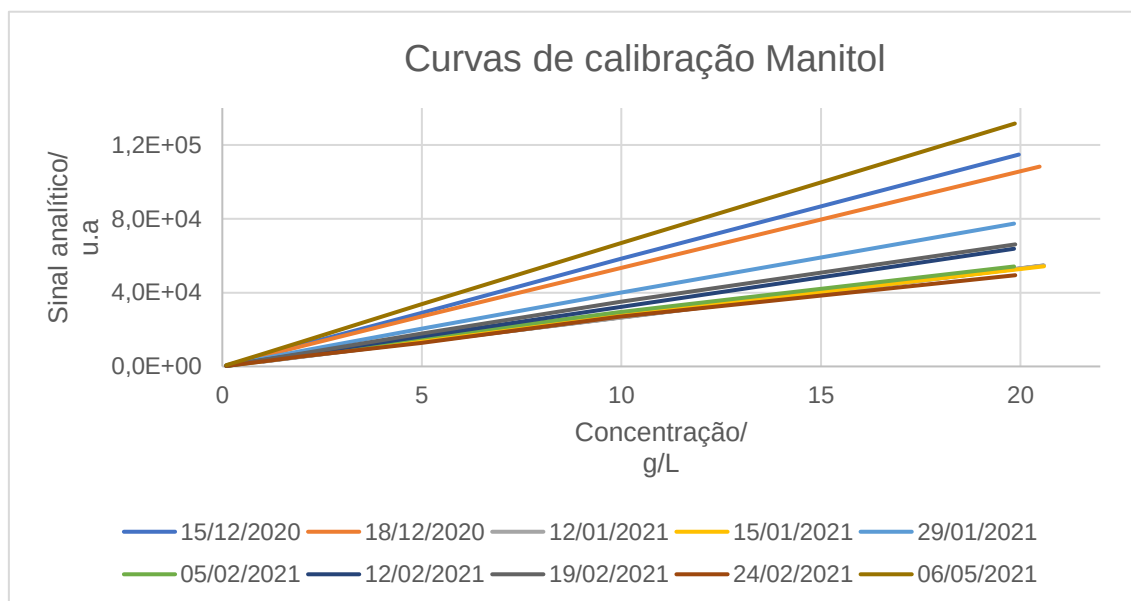


Figura 15: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Manitol, com o sinal analítico (u.a) representado em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Na tabela 13 estão apresentados os valores dos coeficientes de correlação, com o intuito de se verificar que as retas apresentadas na figura 15 são de facto lineares.

Tabela 13: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Manitol.

Manitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	0,999
12/02/2021	1,000
19/02/2021	1,000

24/02/2021	0,999
06/05/2021	1,000

Para o Manitol também é possível verificar que todas as curvas de calibração seguem um modelo linear, pois $r > 0,995$.

Para o Xilitol, a representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias de realização deste trabalho, estão apresentadas na figura 16.

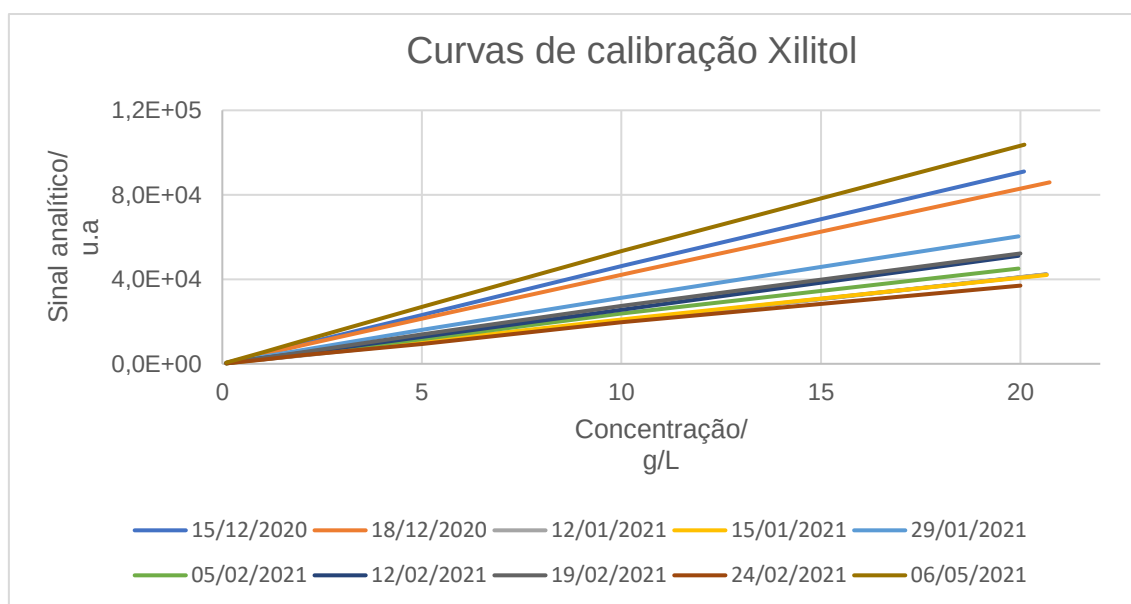


Figura 16: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Xilitol, com o sinal analítico (u.a) em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Os valores do coeficiente de correlação referentes às curvas de calibração estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Xilitol.

Xilitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	1,000
12/02/2021	1,000

19/02/2021	1,000
24/02/2021	0,999
06/05/2021	1,000

O método também segue um modelo linear para este poliól, uma vez que o r é maior que 0,995, pelo que também é possível ser observado no gráfico da figura 16.

Por último, para o Sorbitol as curvas de calibração estão representadas graficamente na figura 17.

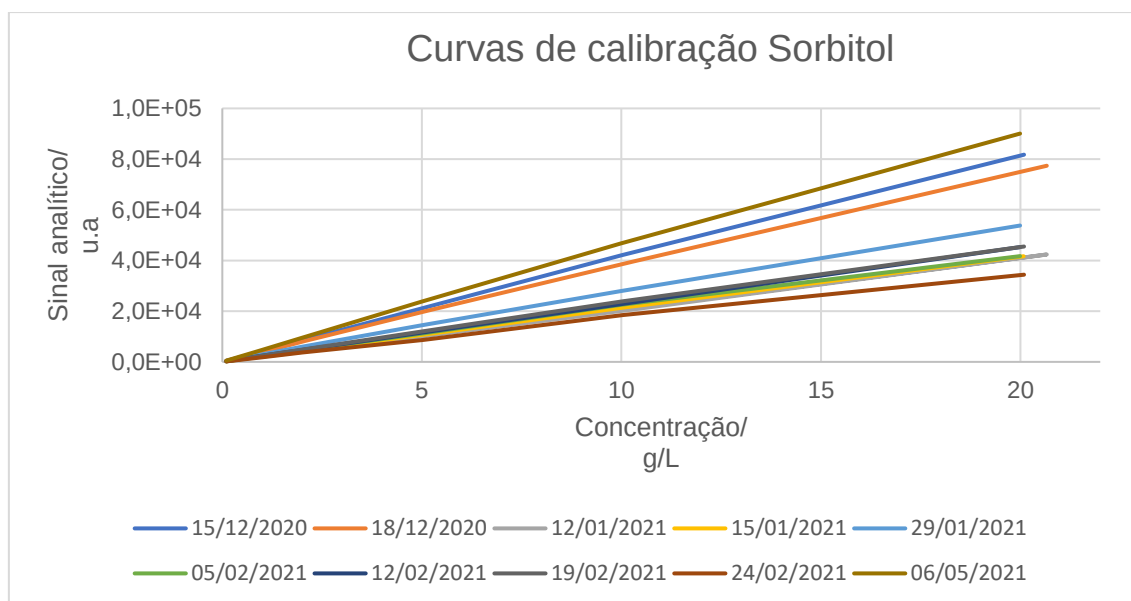


Figura 17: Representação gráfica das curvas de calibração obtidas nos diferentes dias para o Sorbitol, com o sinal analítico (u.a) em função da concentração das soluções padrão (g/L).

Na tabela 15, estão apresentados em forma de lista o coeficiente de correlação para as diferentes retas obtidas, referentes ao Sorbitol.

Tabela 15: Listagem dos valores de r para cada uma das retas de calibração conseguidas nos diferentes dias de trabalho, relativos ao Sorbitol.

Sorbitol	
Data	r
15/12/2020	1,000
18/12/2020	1,000
12/01/2021	1,000
15/01/2021	1,000
29/01/2021	1,000
05/02/2021	0,999

12/02/2021	1,000
19/02/2021	1,000
24/02/2021	0,999
06/05/2021	1,000

Para o Sorbitol, verifica-se o mesmo cenário tal como o que aconteceu para os restantes, sendo que o método segue um modelo linear.

Portanto, para todos os polióis o método segue um modelo linear pois todos os coeficientes de correlação são superiores a 0,995, pelo que também pode ser observado pelos gráficos apresentados nas diferentes figuras.

6.2 Sensibilidade do método

A sensibilidade do método pode ser calculada através da relação que existe entre o sinal analítico e a concentração do analito, pelo que depende das condições instrumentais ⁵⁶. Se o aparelho de medição estiver bem calibrado, se todas as condições para a análise estiverem asseguradas, é possível verificar se o método é ou não sensível a pequenas variações de concentração na amostra. A sensibilidade do método pode ser verificada com base nos declives das retas, uma vez que já se confirmou que todas as curvas de calibração para os polióis analisados seguiam um modelo linear.

Nas tabelas seguintes (16 a 22) irão ser apresentados os valores de sensibilidade (declives das retas) do método referente a cada dia de realização do trabalho, bem como os desvios padrão associados aos valores de sensibilidade. O desvio padrão do método (s) foi obtido através da equação (22), onde o erro padrão do declive obteve-se pela opção presente no Excel “Análise de dados → Regressão” para um intervalo de confiança de 95 %.

$$s = \text{erro padrão} \times \sqrt{n} \quad (22)$$

Onde a $\sqrt{n}$ representa a raiz quadrada do conjunto de dados necessários para a construção da reta, sendo $n=6$.

Na tabela 16, estão referidos os valores para o Isomaltitol, relativamente à sensibilidade do método, nos diferentes dias, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 16: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Isomaltitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Isomaltitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	5982 $\pm$ 25
18/12/2020	5621 $\pm$ 18
12/01/2021	3223 $\pm$ 73
15/01/2021	3139 $\pm$ 21
29/01/2021	4487 $\pm$ 12
05/02/2021	3525 $\pm$ 51
12/02/2021	3712 $\pm$ 36
19/02/2021	3896 $\pm$ 83
24/02/2021	3099 $\pm$ 109
06/05/2021	6105 $\pm$ 23

Através da tabela 16, é possível verificar que a sensibilidade do método vai diminuindo à medida que aumentam as utilizações sobre a mesma coluna cromatográfica, atingindo o valor mínimo de sensibilidade com um desvio padrão elevado, 3099 $\pm$ 109, no dia 24/02/2021, pelo que a medição ocorrida no dia 06/05/2021 foi efetuada com uma coluna nova, onde a sensibilidade do método volta novamente a subir com um desvio padrão baixo (6105 $\pm$ 23).

Na tabela 17, apresentam-se os valores obtidos para a sensibilidade do método nos diferentes dias para o Maltitol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 17: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Maltitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Maltitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	6300 $\pm$ 28
18/12/2020	5576 $\pm$ 25
12/01/2021	3054 $\pm$ 39
15/01/2021	2962 $\pm$ 110
29/01/2021	4520 $\pm$ 25
05/02/2021	3148 $\pm$ 113
12/02/2021	3694 $\pm$ 9

19/02/2021	3803 $\pm$ 89
24/02/2021	2816 $\pm$ 119
06/05/2021	6295 $\pm$ 11

Tendo em conta a tabela 17, é possível observar que os valores de sensibilidade têm uma tendência decrescente à medida que a coluna cromatográfica é utilizada, pelo que o valor mínimo de sensibilidade associado a um desvio padrão elevado, atinge-se no dia 24/02/2021 com um valor de sensibilidade de 2816 $\pm$ 119. Com uma coluna cromatográfica nova, no dia 06/05/2021, o valor de sensibilidade é novamente elevado, com um desvio padrão associado baixo (6295 $\pm$ 11).

Na tabela 18, estão listados os valores obtidos para a sensibilidade do método nos diferentes dias referentes ao Eritritol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 18: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Eritritol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Eritritol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	7189 $\pm$ 35
18/12/2020	6383 $\pm$ 66
12/01/2021	3025 $\pm$ 29
15/01/2021	3210 $\pm$ 40
29/01/2021	5031 $\pm$ 18
05/02/2021	3752 $\pm$ 51
12/02/2021	4147 $\pm$ 64
24/02/2021	2996 $\pm$ 61
06/05/2021	8749 $\pm$ 64

Tendo em conta os valores dos declives das retas obtidas nos diferentes dias para o Eritritol, apresentados na tabela 18, é possível observar uma tendência decrescente dos valores atingindo-se o valor mínimo de sensibilidade, 2996 $\pm$ 61, no dia 24/02/2021. No dia 06/05/2021, quando se voltou a efetuar o procedimento novamente, já com uma coluna cromatográfica nova, o valor de sensibilidade do método cresceu novamente, possuindo um valor de 8749 $\pm$ 64. Isto deve-se ao facto da coluna cromatográfica ficar desgastada com o número de utilizações, sendo necessário substituir-se a valores de sensibilidade inferiores aos do dia 24/02/2021.

Na tabela 19, estão listados os valores correspondentes à sensibilidade do método nos diferentes dias para o Lactitol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 19: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Lactitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Lactitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	5504 $\pm$ 46
18/12/2020	5351 $\pm$ 43
12/01/2021	3100 $\pm$ 14
15/01/2021	3193 $\pm$ 31
29/01/2021	3990 $\pm$ 53
05/02/2021	2952 $\pm$ 127
12/02/2021	3250 $\pm$ 31
24/02/2021	2777 $\pm$ 81
06/05/2021	5676 $\pm$ 38

Para o Lactitol é possível observar na tabela 19, que existe uma tendência decrescente nos valores de sensibilidade, até atingir um mínimo, no dia 24/02/2021, com um valor de 2777 $\pm$ 81. Na medição seguinte, dia 06/05/2021, a sensibilidade volta a subir, 5676 $\pm$ 38, isto deve-se ao facto de se ter utilizado uma coluna cromatográfica nova.

Na tabela 20, estão representados os valores correspondentes à sensibilidade do método nos diferentes dias para o Manitol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 20: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Manitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Manitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	5756 $\pm$ 53
18/12/2020	5281 $\pm$ 49
12/01/2021	2657 $\pm$ 9
15/01/2021	2637 $\pm$ 88
29/01/2021	3891 $\pm$ 74
05/02/2021	2730 $\pm$ 159

12/02/2021	3209 $\pm$ 23
19/02/2021	3334 $\pm$ 122
24/02/2021	2501 $\pm$ 132
06/05/2021	6627 $\pm$ 49

Com base na tabela 20, é possível observar que existe uma tendência decrescente da sensibilidade atingindo um mínimo no dia 24/02/2021, com um desvio padrão associado elevado, 2501 $\pm$ 132. Após a substituição desta coluna cromatográfica por uma nova, no dia 06/05/2021, os valores de sensibilidade do método voltam novamente a subir estando associado um desvio padrão baixo (6627 $\pm$ 49).

Na tabela 21, apresentam-se os valores referentes à sensibilidade do método nos diferentes dias para o Xilitol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 21: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Xilitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Xilitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	4534 $\pm$ 55
18/12/2020	4140 $\pm$ 50
12/01/2021	2051 $\pm$ 23
15/01/2021	2036 $\pm$ 39
29/01/2021	3016 $\pm$ 66
05/02/2021	2266 $\pm$ 78
12/02/2021	2560 $\pm$ 10
19/02/2021	2619 $\pm$ 89
24/02/2021	1858 $\pm$ 75
06/05/2021	5165 $\pm$ 109

Tendo em conta a tabela 21, é possível observar que os valores de sensibilidade vão diminuindo até ao valor de 1858 $\pm$ 75, obtido no dia 24/02/2021. Após a substituição da coluna cromatográfica por uma nova, o valor de sensibilidade volta novamente a subir (5165 $\pm$ 109).

Por fim, na tabela 22, estão representados os valores correspondentes à sensibilidade do método nos diferentes dias para o Sorbitol, bem como os desvios padrão associados a cada uma das retas.

Tabela 22: Listagem dos dias em que foram realizadas as curvas de calibração, os valores de sensibilidade do método para o Sorbitol, juntamente com os desvios padrão correspondentes.

Sorbitol	
Data	Sensibilidade do método
15/12/2020	4072 $\pm$ 84
18/12/2020	3743 $\pm$ 71
12/01/2021	2013 $\pm$ 9
15/01/2021	2077 $\pm$ 38
29/01/2021	2683 $\pm$ 73
05/02/2021	2087 $\pm$ 122
12/02/2021	2258 $\pm$ 18
19/02/2021	2270 $\pm$ 74
24/02/2021	1723 $\pm$ 82
06/05/2021	4508 $\pm$ 117

Relativamente ao Sorbitol, tal como foi acontecendo com os outros polióis, os valores de sensibilidade do método possuem uma tendência decrescente à medida que a coluna cromatográfica é utilizada, pelo que se obtém um valor mínimo de 1723 $\pm$ 82, no dia 24/02/2021. Após a substituição desta coluna cromatográfica por uma nova, o valor de sensibilidade do método volta novamente a crescer, obtendo-se o valor de sensibilidade de 4508 $\pm$ 117, no dia 06/05/2021.

Para um melhor esclarecimento visual das variações que ocorrem entre os declives nos diferentes dias para cada um dos polióis, estão colocadas figuras com as representações gráficas dos declives e as suas variações ao longo do tempo no Anexo III.

O declive é constituído pela variação do sinal analítico e pela variação das concentrações das soluções padrão. Minimizando o erro associado às concentrações das soluções, por serem soluções padrão, apenas o responsável pelas variações ocorridas no declive é o sinal analítico. O sinal analítico corresponde à altura do pico cromatográfico. Logo, quando a coluna possui um maior desgaste, existe um arrastamento do pico, pelo que a altura contabilizada será menor.

6.3 Desvio padrão do método

Para o cálculo do desvio padrão médio do método ($\bar{s}_{\text{método}}$), é necessário primeiramente conhecer o desvio padrão residual ($s_{y/x}$). Para tal, através da opção do Excel “Análise de dados → Regressão”, foi possível obter o valor de $s_{y/x}$ para cada uma das retas, correspondentes a cada um dos polióis.

Os valores de $\bar{s}_{\text{método}}$ (g/L) e de $\overline{CV}$ (%) estão apresentados na tabela 23, para cada um dos polióis. Estes valores foram obtidos a partir da média de cada um dos valores do $s_{\text{método}}$ para cada uma das retas em cada um dos polióis.

Tabela 23: Apresentação dos valores de $\bar{s}_{\text{método}}$ e de $\overline{CV}$, para cada um dos polióis.

Poliól	$\bar{s}_{\text{método}}$ (g/L)	$\overline{CV}$ (%)
Isomaltitol	0,087	1,4
Maltitol	0,11	1,9
Eritritol	0,076	1,2
Lactitol	0,10	1,6
Manitol	0,16	2,6
Xilitol	0,15	2,3
Sorbitol	0,18	2,8

Os valores de $\bar{s}_{\text{método}}$, apresentados na tabela anterior, estão em g/L.

Com base na análise da tabela anterior, é possível verificar que o desvio padrão do método é baixo e que o desvio padrão relativo é inferior a 10 %, por este motivo, o método foi bem efetuado para cada um dos polióis.

6.4 Limiares analíticos

O limite de deteção corresponde à concentração mínima de analito que é detetada, não sendo necessariamente possível de quantificar, já o limite de quantificação corresponde à concentração mínima em que é possível quantificar o analito com confiança.

É de salientar que de acordo com o procedimento interno da empresa, quando se efetuam validações de métodos, apenas é do seu interesse validar o limite de quantificação (LQ), não sendo relevante validar o limite de deteção (LD).

Para tal, a empresa considerou o LQ como sendo o padrão de menor concentração, ou seja, o padrão com concentração de 0,01 g/L que corresponde a

0,5 g/100g. Para a sua validação, efetuaram-se testes de recuperação, através da fortificação da amostra de suplemento alimentar com 0,5 mL do padrão de maior concentração. Os ensaios de recuperação servem para demonstrar que o método é capaz de quantificar esta concentração, podendo ser usada como o limite mínimo para a quantificação de cada um dos polióis em matrizes alimentares.

Primeiramente, efetuou-se a verificação da possível existência de polióis num duplicado de uma amostra de suplemento alimentar, através da obtenção do cromatograma correspondente a cada um dos ensaios obtidos pela técnica de HPLC. Os resultados referentes à concentração inicial de cada um dos polióis, em g/100g, na amostra estão apresentados na tabela 24. As unidades apresentadas são em g/100g, pois tratam-se de amostras sólidas e por sua vez nos relatórios para os clientes, estas são as unidades adotadas. Em virtude disto, é obtida a concentração em g/L através da curva de calibração, sendo posteriormente convertida em g/100g através da equação (19).

Tabela 24: Valores de concentração inicial (C_{inicial}) de cada um dos polióis no duplicado efetuado para uma amostra de suplemento alimentar, e ainda os valores médios ($\bar{C}_{\text{inicial}}$) de concentração inicial para cada um dos polióis.

Poliól	Ensaio	C_{inicial} (g/100g)	$\bar{C}_{\text{inicial}}$ (g/100g)
Isomaltitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Maltitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Eritritol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Lactitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Manitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Xilitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	
Sorbitol	Ensaio 1	0,00	0,00
	Ensaio 2	0,00	

Portanto, pela análise da tabela 24 é possível observar que nenhum poliól está presente na amostra de suplemento alimentar e por isso, quando se efetuarem os cálculos para a taxa de recuperação, a concentração inicial será igual a 0,00 g/100g.

De seguida, em condições de repetibilidade, efetuaram-se 7 replicados da amostra suplemento alimentar para serem fortificados com um volume de 0,5 mL da solução padrão- mãe conjunta, e outros 7 replicados para serem fortificados com um volume de 0,5 mL da solução padrão- mãe E+L. Isto para serem verificadas as taxas de recuperação obtidas pelo método. Se os valores referentes às taxas de recuperação estiverem compreendidos entre 80 % e 120 %, o LQ está validado.

Nas tabela 25 estão apresentados os valores de concentração correspondentes aos 7 ensaios após fortificação da amostra em g/100g obtidos pela equação (19), bem como a concentração teórica, o volume adicionado de solução- mãe padrão conjunta, as taxas de recuperação para cada ensaio e a respetiva média, referentes ao Isomaltitol.

Tabela 25: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Isomaltitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Isomaltitol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,51	102	100
		Ensaio 2	0,50	99	
		Ensaio 3	0,49	97	
		Ensaio 4	0,49	99	
		Ensaio 5	0,50	100	
		Ensaio 6	0,50	100	
		Ensaio 7	0,50	99	

Com base nos valores obtidos, na tabela 25, para a taxa de recuperação e a sua consequente média (100 %), pode-se concluir que o método possui uma taxa de recuperação para o Isomaltitol dentro do intervalo considerado aceitável e, por este motivo, o LQ para o poliól está a corroborar o valor estabelecido pela empresa como sendo o padrão de menor concentração.

Na tabela 26, estão apresentados os valores quer de concentração teórica quer de concentração obtida, bem como do volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, para cada um dos 7 ensaios, para ser possível obter-se a taxa de recuperação média, referente ao Maltitol.

Tabela 26: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Maltitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Maltitol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,56	112	102
		Ensaio 2	0,55	111	
		Ensaio 3	0,54	109	
		Ensaio 4	0,53	106	
		Ensaio 5	0,50	100	
		Ensaio 6	0,44	88	
		Ensaio 7	0,43	87	

Tendo em conta os dados da tabela 26, é possível concluir que o LQ para o Maltitol é de 0,5 g/100g, uma vez que as taxas de recuperação e, consequentemente, a sua média (102 %) situam-se dentro do intervalo considerado aceitável.

Na tabela 27, estão apresentados os resultados obtidos para ser possível concluir sobre o LQ, relativamente ao Eritritol.

Tabela 27: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão E+L de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Eritritol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Eritritol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,53	107	108
		Ensaio 2	0,53	106	
		Ensaio 3	0,52	105	
		Ensaio 4	0,54	108	
		Ensaio 5	0,54	109	
		Ensaio 6	0,54	109	
		Ensaio 7	0,55	111	

Para o Eritritol, também é possível comprovar que o valor do LQ é de 0,50 g/100g uma vez que a taxa de recuperação média (108 %) se situa dentro do intervalo considerado aceitável.

Na tabela 28, estão apresentados os valores correspondentes ao Lactitol, da concentração obtida após a fortificação pela a adição de 0,5 mL da solução padrão E+L de maior concentração.

Tabela 28: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão E+L de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Lactitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Lactitol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,44	88	88
		Ensaio 2	0,42	84	
		Ensaio 3	0,47	93	
		Ensaio 4	0,42	83	
		Ensaio 5	0,45	90	
		Ensaio 6	0,44	87	
		Ensaio 7	0,43	87	

Tendo em conta os dados da tabela 28, a média das taxas de recuperação para o Lactitol foi de 88 % pelo que se comprova o valor do LQ inicialmente proposto pela empresa.

Na tabela 29, estão listados os valores obtidos para cada um dos ensaios, referentes ao Manitol, com o intuito de ser possível concluir acerca do LQ.

Tabela 29: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Manitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Manitol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,55	110	109
		Ensaio 2	0,55	109	
		Ensaio 3	0,54	109	
		Ensaio 4	0,55	110	
		Ensaio 5	0,55	110	
		Ensaio 6	0,55	110	
		Ensaio 7	0,54	107	

Para o Manitol, o LQ é de 0,5 g/100g uma vez que a média das taxas de recuperação (109 %) se situa dentro do intervalo que é considerado para a validação do LQ através das taxas de recuperação, isto é, entre 80% e 120%.

Na tabela 30, é possível concluir, através dos valores apresentados da concentração obtida após fortificação, acerca do LQ, relativamente ao Xilitol.

Tabela 30: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Xilitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Xilitol					
$C_{teórica}$ (g/100g)	$V_{adicionado\ SP}$ (mL)	Ensaio	C_{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,41	82	82
		Ensaio 2	0,40	80	
		Ensaio 3	0,40	80	
		Ensaio 4	0,40	81	
		Ensaio 5	0,43	87	
		Ensaio 6	0,41	82	
		Ensaio 7	0,39	78	

Para o Xilitol, o método possui um LQ de 0,5 g/100g, sendo que a taxa de recuperação média é de 82%.

Por último, na tabela 31, estão apresentados os valores de concentração obtidos após a fortificação com a solução padrão de maior concentração. E ainda as taxas de recuperação obtidas para cada um dos ensaios e a taxa de recuperação média para o Sorbitol.

Tabela 31: Apresentação dos valores de concentração teórica, de volume adicionado de solução padrão conjunta de maior concentração, bem como de concentração obtida, para os 7 ensaios efetuados relativos ao Sorbitol, e ainda os valores das taxas de recuperação e a sua média.

Sorbitol					
C _{teórica} (g/100g)	V _{adicionado SP} (mL)	Ensaio	C _{obtida} (g/100g)	R (%)	$\bar{R}$ (%)
0,50	0,50	Ensaio 1	0,41	81	81
		Ensaio 2	0,40	80	
		Ensaio 3	0,40	81	
		Ensaio 4	0,41	81	
		Ensaio 5	0,41	81	
		Ensaio 6	0,40	81	
		Ensaio 7	0,40	79	

Com base na análise da tabela 31 é possível verificar que para o Sorbitol, o método possui igualmente um LQ de 0,5g/100g pelo que corresponde ao padrão de menor concentração.

Portanto, para todos os polióis mencionados neste trabalho o LQ do método é de 0,5 g/100g e corresponde ao padrão de menor concentração.

6.5 Precisão

6.5.1 Repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade, foram efetuados 7 ensaios para cada amostra, sendo determinada a média ($\bar{x}$), o desvio padrão (s) e a variância (s^2), com o intuito de ser conhecido o desvio padrão relativo (CV) e o limite de repetibilidade (r).

Primeiramente, é necessário averiguar a possível existência de valores aberrantes, através do teste de Grubbs. Os valores considerados suspeitos foram o maior e o menor do conjunto de 7 ensaios para a mesma amostra, para cada um dos polióis. O G calculado é obtido através da expressão (23). O valor de G tabelado, para $n=7$ e um intervalo de confiança de 95%, é de 2,02. A tabela para este teste está apresentada no Anexo IV.

$$G = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \quad (23)$$

Onde x^* corresponde ao valor suspeito, $\bar{x}$ à média dos valores de concentração obtida e s ao desvio padrão dos valores obtidos.

Se:

- $G_{\text{tabelado}} \geq G_{\text{calculado}}$: A hipótese nula é aceite, isto é, o valor suspeito não é rejeitado, para um intervalo de confiança de 95%.
- $G_{\text{tabelado}} < G_{\text{calculado}}$: A hipótese alternativa é aceite, ou seja, o valor suspeito é rejeitado e por isso deve ser retirado do conjunto de dados, com um intervalo de confiança de 95%.

Inicialmente, as amostras foram analisadas sem qualquer volume adicionado de solução-mãe padrão, para se ficar a conhecer se a matriz continha ou não algum destes polióis na formulação. De seguida, as amostras foram fortificadas com a solução-mãe padrão conjunta e a solução-mãe padrão (E+L).

O volume das fortificações realizadas para cada uma das amostras foi:

- ✓ Bolacha → 5 mL
- ✓ Cereais → 5 mL
- ✓ Barra de cereais → 10 mL
- ✓ Chocolate → 2,25 mL
- ✓ Doce → 1 mL
- ✓ Suplemento Alimentar → 0,5 mL
- ✓ Sumo → 2,25 mL
- ✓ Gelado → 1,75 mL
- ✓ Tâmara → 4 mL

É de notar que estes volumes foram tanto da solução-mãe padrão conjunta, como da solução-mãe padrão E+L, mas para diferentes grupos de 7 ensaios. Ao todo foram realizados 14 ensaios para todas as amostras, sendo que 7 foram fortificados com a solução-mãe padrão conjunta, e os restantes 7 com a solução-mãe padrão E+L.

Com base nos resultados obtidos da concentração (g/100g), realizou-se o teste de Grubbs, para cada uma das matrizes e para cada um dos polióis.

Na tabela 32, estão apresentados em forma de lista os resultados referentes ao teste de Grubbs para uma amostra de bolacha, para cada um dos polióis.

Tabela 32: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para a matriz alimentar bolacha, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/ 100 g) obtidos nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Bolacha						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	5,07	1,59	Aceite	5,23	1,63	Aceite
Maltitol	21,1	1,91	Aceite	21,5	1,14	Aceite
Eritritol	15,5	1,65	Aceite	15,7	0,854	Aceite
Lactitol	4,71	1,90	Aceite	4,91	1,30	Aceite
Manitol	4,88	1,85	Aceite	5,04	1,49	Aceite
Xilitol	4,84	1,39	Aceite	5,00	1,65	Aceite
Sorbitol	4,98	1,54	Aceite	5,14	1,63	Aceite

Nota: G tabelado ($g.l = 7$, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 32, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são considerados aberrantes, uma vez que G tabelado é superior a G calculado, e por isso, a hipótese nula é aceite, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 33, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de cereais.

Tabela 33: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de cereais, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Cereais						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	12,7	1,40	Aceite	13,9	0,88	Aceite
Maltitol	4,76	1,08	Aceite	4,98	1,88	Aceite
Eritritol	4,68	1,54	Aceite	5,03	1,43	Aceite
Lactitol	4,50	1,19	Aceite	4,89	1,90	Aceite
Manitol	4,89	1,00	Aceite	5,37	1,43	Aceite

Xilitol	5,27	1,04	Aceite	5,69	1,42	Aceite
Sorbitol	5,07	0,51	Aceite	5,36	1,69	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Para a amostra de cereais, nenhum valor suspeito de concentração obtido necessitará de ser rejeitado. Sendo assim, todos os valores são utilizados para o cálculo do limite de repetibilidade.

Na tabela 34, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referentes a uma amostra de barras de cereais.

Tabela 34: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de barras de cereais, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Barras de cereais						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	11,1	1,53	Aceite	11,6	1,23	Aceite
Maltitol	11,5	1,52	Aceite	12,0	1,12	Aceite
Eritritol	10,8	1,41	Aceite	11,3	1,25	Aceite
Lactitol	9,56	1,41	Aceite	9,90	1,28	Aceite
Manitol	10,2	1,47	Aceite	10,7	1,13	Aceite
Xilitol	10,2	1,47	Aceite	10,7	1,11	Aceite
Sorbitol	10,3	1,45	Aceite	10,8	1,11	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 34, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são rejeitados, uma vez que G tabelado é superior a G calculado, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 35, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de chocolate.

Tabela 35: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de chocolate, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Chocolate						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	3,34	0,971	Aceite	3,47	1,97	Aceite
Maltitol	29,7	1,46	Aceite	29,9	1,35	Aceite
Eritritol	2,46	1,43	Aceite	2,54	1,45	Aceite
Lactitol	2,38	1,51	Aceite	2,47	1,33	Aceite
Manitol	1,76	1,82	Aceite	1,81	1,01	Aceite
Xilitol	1,65	1,06	Aceite	1,70	1,66	Aceite
Sorbitol	1,69	1,18	Aceite	1,74	1,79	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Para amostra de chocolate, também se verificou que nenhum valor é aberrante, e como tal o limite de repetibilidade pode ser calculado com todos estes valores.

Na tabela 36, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de doce.

Tabela 36: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de doce, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Doce						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	2,19	1,32	Aceite	2,22	1,81	Aceite
Maltitol	0,972	1,62	Aceite	0,989	0,526	Aceite
Eritritol	0,903	1,43	Aceite	0,944	1,28	Aceite
Lactitol	0,921	0,942	Aceite	0,982	1,72	Aceite
Manitol	1,14	1,58	Aceite	1,16	1,46	Aceite

Xilitol	0,761	1,60	Aceite	0,786	1,33	Aceite
Sorbitol	56,5	1,66	Aceite	57,4	1,02	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 36, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são considerados aberrantes, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 37, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de suplemento alimentar.

Tabela 37: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de suplemento alimentar, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Suplemento alimentar						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	0,487	1,50	Aceite	0,509	1,67	Aceite
Maltitol	0,433	1,41	Aceite	0,560	0,968	Aceite
Eritritol	0,523	1,42	Aceite	0,554	1,62	Aceite
Lactitol	0,415	1,24	Aceite	0,466	1,64	Aceite
Manitol	0,527	1,88	Aceite	0,550	0,881	Aceite
Xilitol	0,389	1,46	Aceite	0,409	1,14	Aceite
Sorbitol	0,395	1,67	Aceite	0,406	0,912	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 37, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são rejeitados, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 38, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referentes a uma amostra de sumo.

Tabela 38: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de sumo, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Sumo						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	22,5	1,43	Aceite	23,1	1,70	Aceite
Maltitol	19,4	1,19	Aceite	20,7	1,26	Aceite
Eritritol	19,5	1,63	Aceite	20,6	0,99	Aceite
Lactitol	20,6	1,21	Aceite	21,1	1,64	Aceite
Manitol	19,2	1,09	Aceite	20,1	1,33	Aceite
Xilitol	19,4	1,07	Aceite	20,2	1,37	Aceite
Sorbitol	19,3	1,03	Aceite	20,1	1,47	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 38, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são considerados valores aberrantes, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 39, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de gelado.

Tabela 39: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de gelado, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Gelado						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão	x^* (g/100g)	G calc	Conclusão
Isomaltitol	2,01	1,18	Aceite	2,14	1,59	Aceite
Maltitol	1,40	1,52	Aceite	1,48	1,74	Aceite
Eritritol	1,68	1,37	Aceite	1,71	1,57	Aceite
Lactitol	1,56	1,09	Aceite	1,59	1,66	Aceite

Manitol	1,39	1,80	Aceite	1,45	1,33	Aceite
Xilitol	1,34	0,903	Aceite	1,41	1,99	Aceite
Sorbitol	1,30	1,56	Aceite	1,36	1,29	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Tendo em conta a análise da tabela 39, é possível afirmar que todos os valores suspeitos não são rejeitados, com um intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 40, estão dispostos os resultados obtidos para o teste de Grubbs, referente a uma amostra de tâmara.

Tabela 40: Apresentação dos resultados do teste de Grubbs para uma amostra de tâmara, considerando os valores suspeitos (x^*), isto é, o valor mínimo e o valor máximo de concentração (g/100g) obtida nos 7 ensaios efetuados, referentes a cada um dos polióis.

Tâmara						
Poliól	Mínimo			Máximo		
	$x^*(g/100g)$	G calc	Conclusão	$x^*(g/100g)$	G calc	Conclusão
Isomaltitol	19,7	0,898	Aceite	20,7	1,41	Aceite
Maltitol	3,55	0,836	Aceite	3,76	1,87	Aceite
Eritritol	4,51	0,99	Aceite	4,74	1,53	Aceite
Lactitol	3,54	1,60	Aceite	3,81	1,22	Aceite
Manitol	3,48	1,30	Aceite	3,77	1,46	Aceite
Xilitol	3,62	1,11	Aceite	3,84	1,31	Aceite
Sorbitol	3,95	1,03	Aceite	4,20	1,44	Aceite

Nota: G tabelado (g.l = 7, 95%) = 2,02

Para a amostra de tâmara, também nenhum valor obtido de concentração é rejeitado, pelo que todos os valores vão ser usados nos cálculos seguintes.

O limite de repetibilidade pode ser calculado para cada matriz, no entanto, em termos empresariais, não é viável. Como tal, é necessário agrupar as matrizes por gamas de trabalho, através do teste C de Cochran, para assim ser possível contabilizar o maior número de matrizes, e com isto calcular o limite de repetibilidade para o método referente a cada gama de trabalho, para cada poliól.

6.5.2 Gama de trabalho

A gama de trabalho trata-se de um parâmetro fundamental no que concerne à validação de métodos, uma vez que em contexto empresarial é inviável ter uma base de dados com todos os valores aceites para cada matriz. Portanto, o objetivo das gamas de trabalho, é agrupar as matrizes que, segundo o teste da homogeneidade das variâncias, isto é, através do teste C de Cochran (equação 24), não indica diferenças significativas entre as mesmas e com isto a eliminação de diversas matrizes.

$$C = \frac{s_{\text{máx}}^2}{\sum s_i^2} \quad (24)$$

Em que $s_{\text{máx}}^2$ corresponde ao valor maior referente à variância obtida para um determinado conjunto de resultados e $\sum s_i^2$ corresponde ao somatório de todas as variâncias para o conjunto de dados considerados.

Se:

- C tabelado $\geq$ C calculado: A hipótese nula é aceite, isto é, não existem valores discrepantes no conjunto de matrizes consideradas e, por isso, existe homogeneidade das variâncias, para um intervalo de confiança de 95%.
- C tabelado $<$ C calculado : A hipótese alternativa é aceite, ou seja, existem valores discrepantes no conjunto de matrizes consideradas e, por isso, não existe homogeneidade das variâncias, para um intervalo de confiança de 95%.

O valor de C tabelado está relacionado com o número de matrizes consideradas no conjunto e o número de ensaios efetuados por matrizes, isto é, $l = n^\circ$ matrizes consideradas e $n=7$. A tabela correspondente ao teste C tabelado está apresentada no Anexo IV.

As gamas de trabalho foram divididas em gamas baixa, intermédia e alta, de acordo com a concentração obtida após a fortificação. Primeiramente realizou-se o teste C de Cochran, para verificar, se no conjunto considerado, não seria necessário eliminar alguma matriz. Após isto, analisou-se a concentração obtida de cada ensaio em cada matriz, estabelecendo-se assim o limite máximo da respetiva gama de trabalho.

Na lista seguinte, está apresentado o esquema das gamas de trabalho para cada um dos polióis. A título de exemplo, para o Isomaltitol existem duas gamas de trabalho, pois através do teste C de Cochran, verificou-se que as matrizes com concentrações mais baixas possuíam variâncias que as permitiam permanecer no mesmo grupo

daquelas com resultados até concentrações de 6,9 g/100g, uma vez que o C tabelado era superior ao C calculado, para intervalo de confiança de 95%.

- ✓ Isomaltitol: 2 gamas de trabalho
 - Baixa: < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 25 g/100g

- ✓ Maltitol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g até < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 30 g/100g

- ✓ Eritritol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g até < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 25 g/100g

- ✓ Lactitol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g a < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 25 g/100g

- ✓ Manitol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g a < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 25 g/100g

- ✓ Xilitol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g a < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 25 g/100g

- ✓ Sorbitol: 3 gamas de trabalho
 - Baixa: < 2 g/100g
 - Intermédia: ≥ 2 g/100g a < 7 g/100g
 - Alta: ≥ 7 g/100g até ≤ 60 g/100g

O limite mínimo para as gamas de trabalho baixas é igual ao limite de quantificação (0,5 g/100g).

Os valores superiores de limite estabelecidos, estão de acordo com a concentração máxima obtida na repetibilidade, sendo a título de exemplo, o limite superior da gama de trabalho alta para o sorbitol de 60 g/100g uma vez que o obtido para o doce, atinge valores próximos de 60 g/100g.

Primeiramente, com vista a ser confirmada a necessidade das matrizes serem associadas em grupos com concentrações mais restritas, na tabela 41 estão apresentados os resultados para o teste C de Cochran, na eventualidade de as matrizes não serem agrupadas em gamas.

Tabela 41: Apresentação dos valores da variância máxima ($s_{\text{máx}}^2$) para cada um dos polióis, obtidos por comparação com todos os valores das variâncias obtidas, o valor do somatório de cada variância e ainda os valores do C calculado e do C tabelado, para um intervalo de confiança de 95%.

Poliól	Matrizes	$s_{\text{máx}}^2$	$\sum s_i^2$	C calculado	Conclusão
Isomaltitol	todas	0,257	0,520	0,494	C _{tab} < C _{calc}
Maltitol	todas	0,243	0,479	0,506	
Eritritol	todas	0,184	0,253	0,728	
Lactitol	todas	0,0392	0,0863	0,455	
Manitol	todas	0,165	0,263	0,628	
Xilitol	todas	0,117	0,195	0,602	
Sorbitol	todas	0,126	0,298	0,424	

Nota: C tabelado (n=7, l=9)= 0,307.

De acordo com o observado na tabela 41, é possível verificar que o valor de C tabelado é inferior ao valor de C calculado, respetivo a cada poliól, pelo que seria necessário haver a eliminação de diversas matrizes para que num intervalo de confiança de 95%, o teste fosse aceite. Portanto, denota-se a necessidade de criar gamas de trabalho para que não seja necessário eliminar diversas matrizes e tornar o método amplo.

Os valores apresentados do limite de repetibilidade bem como do desvio padrão relativo, resultam da média dos resultados obtidos de cada um, para as diferentes matrizes, presentes nas gamas de trabalho indicadas.

Na tabela 42 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho,

com confiança de 95 %, referentes ao Isomaltitol, e ainda o valor obtido para o desvio padrão relativo médio ($\overline{CV}_r$, %) da repetibilidade, em percentagem, bem como o limite de repetibilidade médio ($\bar{r}_r$, g/100g) por gama de trabalho.

Tabela 42: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Isomaltitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\bar{r}_r$).

Isomaltitol		
Gama de trabalho	< 7 g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=5, 95%)= 0,478	(n=7, l=4, 95%)=0,560
C calc	0,359	0,513
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	-Bolacha -Chocolate -Doce -Suplemento alimentar -Gelado	- Barras de cereais -Cereais -Sumo -Tâmara
$\overline{CV}_r$ / %	1,29	2,08
$\bar{r}_r$ / g/100g	0,0914	0,918

Com base na tabela 42, é possível afirmar, com uma confiança de 95 %, que as matrizes pertencem à gama em que estão inseridas. Verifica-se ainda que, para o Isomaltitol, o método possui para a gama de trabalho baixa, um $\overline{CV}_r$ de 1,29 % e um $\bar{r}_r$ de 0,0914 g/100g. De acordo com o definido pelo laboratório, a repetibilidade é considerada satisfatória, se o $\overline{CV}_r$ for inferior a 10 %. Portanto, para esta gama de trabalho, a repetibilidade foi aceite e os erros aleatórios ocorridos não afetam a confiança nos resultados. Pode se ainda concluir que num duplicado efetuado em condições de repetibilidade, a diferença absoluta entre os dois valores não pode ser superior a 0,0914 g/100g.

Para a gama de trabalho alta, o método possui um $\overline{CV}_r$ de 2,08 % e um $\bar{r}_r$ de 0,918 g/100g. A repetibilidade para esta gama de trabalho também é aceite e os erros aleatórios ocorridos não justificam a perda de confiança nos resultados. Mais se adianta que a diferença absoluta entre dois ensaios efetuados em condições de repetibilidade não pode ser superior a 0,918 g/100g, para esta gama de trabalho.

Na tabela 43 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho,

com confiança de 95%, relativos ao Maltitol. E ainda os valores que permitem concluir acerca da repetibilidade.

Tabela 43: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Maltitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\overline{r}_r$).

Maltitol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=2, 95%)= 0,853	(n=7, l=4, 95%)= 0,560
C calc	0,668	0,526	0,523
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Doce -Suplemento alimentar -Gelado	- Cereais -Tâmara	- Bolacha -Barras de cereais - Chocolate -Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	4,38	1,87	1,27
$\overline{r}_r$ / g/100g	0,0814	0,216	0,640

Tendo em conta os dados obtidos na tabela 43, é possível afirmar, para um intervalo de confiança de 95%, as matrizes alimentares pertencem à gama de trabalho em que estão inseridas. Verifica-se ainda que, os valores de $\overline{CV}_r$ (4,38 %; 1,87 % e 1,27 % referentes às gamas de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente) permitem afirmar que a repetibilidade do método para o Maltitol, nas gamas de trabalho referidas, é satisfatória, pois é inferior a 10 %. E ainda que os erros aleatórios não interferem na confiança empregue nos resultados.

Para a gama de trabalho baixa, a diferença absoluta entre os duplicados obtidos em condições de repetibilidade não pode ser superior a 0,0814 g/100g; já para a gama de trabalho intermédia, esta diferença não pode exceder os 0,216 g/100g; e por último, para a gama de trabalho alta, a diferença absoluta entre os duplicados não pode ser acima de 0,640 g/100g.

Na tabela 44 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho, com confiança de 95 %, relativos ao Eritritol. E ainda os valores importantes para concluir acerca da repetibilidade do método em cada gama de trabalho, para cada poliól.

Tabela 44: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Eritritol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\overline{r}_r$).

Eritritol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=3, 95%)= 0,677
C calc	0,486	0,623	0,670
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Doce -Suplemento alimentar -Gelado	- Cereais -Chocolate -Tâmara	- Bolacha -Barras de cereais -Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	1,42	1,83	1,49
$\overline{r}_r$ / g/100g	0,0348	0,222	0,669

Através da análise da tabela 44, é possível verificar que as matrizes alimentares agrupadas pertencem à mesma gama de trabalho, com um intervalo de confiança de 95 %.

Mais se adianta que o valor de $\overline{CV}_r$ para a gama e trabalho baixa é de 1,42 %, o que significa que a repetibilidade para esta gama de trabalho é satisfatória e que os erros aleatórios não interferem na confiança os resultados. E que o $\overline{r}_r$ obtido para esta gama indica que a diferença absoluta dos ensaios efetuados em duplicado, em condições de repetibilidade, não pode exceder os 0,0348 g/100g.

Para a gama de trabalho intermédia, o valor de $\overline{CV}_r$ é de 1,83 % pelo que pode se afirmar que a repetibilidade nesta gama de trabalho é satisfatória e que os erros aleatórios não colocam em causa a confiança nos resultados. O $\overline{r}_r$ corresponde a 0,222 g/100g, o que se significa que a diferença absoluta entre 2 ensaios efetuados em condições de repetibilidade não pode ser superior a este valor.

Por fim, para a gama de trabalho alta, o $\overline{CV}_r$ é de 1,49 %, o que significa que a repetibilidade também é aceite e os erros aleatórios não interferem na confiança face aos resultados obtidos. O $\overline{r}_r$ é de 0,669 g/100g, pelo que a diferença absoluta registada num duplicado tem de ser inferior a este valor.

Na tabela 45 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho, com confiança de 95%, referentes ao Lactitol, bem como os valores que permitem concluir acerca da repetibilidade do método nas gamas de trabalho, para este poliól.

Tabela 45: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Lactitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\overline{r}_r$).

Lactitol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=4, 95%)= 0,560	(n=7, l=2, 95%)= 0,853
C calc	0,539	0,540	0,708
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Doce - Suplemento alimentar - Gelado	- Bolacha - Cereais - Chocolate - Tâmara	- Barras de cereais - Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	2,41	1,97	1,13
$\overline{r}_r$ / g/100g	0,0489	0,222	0,456

A partir da análise da tabela 45, é possível observar que todas as matrizes pertencem à gama de trabalho em que estão inseridas, com um intervalo de confiança de 95 %.

Também é possível verificar que para a gama de trabalho baixa, o $\overline{CV}_r$ corresponde a 2,41 %. Como este valor é inferior a 10 %, pode se afirmar que a repetibilidade é satisfatória nesta gama para o Lactitol. E ainda que os erros aleatórios não influenciam a confiança no resultado final. O valor de $\overline{r}_r$ corresponde a 0,0489 g/100g, o que significa que a diferença absoluta entre um duplicado tem de ser inferior a este valor para ser considerado aceite.

Na gama de trabalho intermédia, o $\overline{CV}_r$ é de 1,97 %, e por este motivo, também a repetibilidade é satisfatória e os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados obtidos. A diferença absoluta entre os ensaios não pode exceder o valor de 0,222 g/100g, pois corresponde ao limite de repetibilidade para esta gama de trabalho, referente ao Lactitol.

Por último, na gama de trabalho alta, o $\overline{CV}_r$ é de 1,13 % e o $\bar{r}_r$ é de 0,456 g/100g. Por este motivo, a repetibilidade é considerada satisfatória e os erros aleatórios não influenciam a confiança depositada nos resultados. É ainda possível afirmar que a diferença absoluta entre 2 ensaios obtidos em condições de repetibilidade não pode exceder o valor de 0,456 g/100g.

Na tabela 46 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho, com confiança de 95%, referentes ao Manitol, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\bar{r}_r$).

Tabela 46: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Manitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\bar{r}_r$).

Manitol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=4, 95%)= 0,560	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=2, 95%)= 0,853
C calc	0,550	0,650	0,822
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Chocolate - Doce - Suplemento alimentar - Gelado	- Bolacha - Cereais - Tâmara	- Barras de cereais - Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	0,989	2,61	1,94
$\bar{r}_r$ / g/100g	0,0353	0,330	0,835

Com base na análise da tabela 46, pode se verificar que todas as matrizes pertencem à gama de trabalho em que estão inseridas, uma vez que C tab > C calc, num intervalo de confiança de 95 %.

Denota-se ainda que, o valor de $\overline{CV}$ para a gama de trabalho baixa é de 0,989 %, para a gama de trabalho intermédia é de 2,6 % e para a gama de trabalho alta corresponde a 1,94%. Portanto, para todas as gamas de trabalho a repetibilidade é satisfatória e os erros aleatórios existentes não influenciam a confiança nos resultados.

O $\bar{r}$ para a gama de trabalho baixa corresponde a 0,0353 g/100g, para a gama de trabalho intermédia corresponde a 0,330 g/100g e para a gama de trabalho alta é de 0,835 g/100g. O que significa que, aquando da realização de duplicados em condições de repetibilidade, a diferença absoluta entre os 2 ensaios não pode exceder o valor correspondente ao limite de repetibilidade da gama de trabalho em que está inserido.

Na tabela 47 estão apresentados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho, com confiança de 95%, referentes ao Xilitol, bem como os valores alusivos ao desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e ao limite de repetibilidade ($\bar{r}_r$).

Tabela 47: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Xilitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\bar{r}_r$).

Xilitol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=4, 95%)= 0,560	(n=7, l=2, 95%)= 0,853	(n=7, l=2, 95%)= 0,853
C calc	0,497	0,759	0,763
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Chocolate - Doce - Suplemento alimentar -Gelado	- Bolacha - Tâmara	- Barras de cereais -Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	1,82	1,82	1,78
$\bar{r}_r$ / g/100g	0,0456	0,210	0,747

Pela análise da tabela 47, é possível verificar a ausência da matriz de cereais, na gama de trabalho intermédia. Isto deveu-se ao facto de aquando da realização do teste C de Cochran o C tab (n=7, l=3, 95%)= 0,677, considerando a maior variância (corresponde à matriz dos cereais), isto é, o valor de 0,0291, o C calc era de 0,730, pelo que C tab < C calc, com um intervalo de confiança de 95%. Portanto, o teste da homogeneidade das variância não era aceite. Porém, através da ausência desta matriz, o C tab (0,853) possuiu um valor superior ao C calc (0,759) e por este motivo, o teste C de Cochran, foi aceite, comprovando a homogeneidade das variâncias nesta gama de trabalho.

É possível igualmente observar os valores, com base na análise da tabela anterior, os valores de $\overline{CV}_r$ e de $\overline{r}_r$. Para a gama de trabalho baixa, os valores são 1,82 % e 0,0456 g/100g, respetivamente. Pelo que a repetibilidade é considerada satisfatória e os erros aleatórios não influenciam a confiança dos resultados. E ainda, a diferença absoluta entre dois ensaios, obtidos em condições de repetibilidade, tem de possuir um valor inferior ao $\overline{r}_r$ obtido para esta gama de trabalho, isto é, 0,0456 g/100g.

Para a gama de trabalho intermédia, os valores de $\overline{CV}_r$ e de $\overline{r}_r$ são 1,82 % e 0,210 g/100g, respetivamente. O que quer dizer que a repetibilidade é satisfatória e os erros aleatórios não interferem na confiança nos resultados. E ainda, que para os duplicados efetuados em condições de repetibilidade serem aceites, o valor da diferença entre os 2 ensaios tem de ser inferior ao $\overline{r}_r$ para esta gama de trabalho, ou seja, a 0,210 g/100g.

Na gama de trabalho alta, os valores de $\overline{CV}$ e de $\overline{r}$ correspondem a 1,78 % e 0,747 g/100g, respetivamente. Isto significa que para esta gama de trabalho, a repetibilidade também é considerada satisfatória e os erros aleatórios não influenciam a confiança nos resultados. E, também, que a diferença absoluta entre 2 ensaios efetuados em condições de repetibilidade só são aceites se esta for inferior a 0,747 g/100g.

Na tabela 48 estão representados os resultados obtidos do teste C de Cochran realizado para aceitação das matrizes alimentares numa determinada gama de trabalho, com confiança de 95%, referentes ao Sorbitol, e ainda os valores referentes ao desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e ao limite de repetibilidade ($\overline{r}_r$).

Tabela 48: Apresentação das gamas de trabalho (g/100g), para o Sorbitol, corroborada pelo teste C de Cochran, bem como o desvio padrão relativo ($\overline{CV}_r$) e o limite de repetibilidade ($\overline{r}_r$).

Sorbitol			
Gama de trabalho	< 2,0 g/100g	(2,0 – 6,9) g/100g	≥ 7,0 g/100g
C tab	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=3, 95%)= 0,677	(n=7, l=3, 95%)= 0,677
Ccalc	0,516	0,492	0,457
Resultado	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > Ccalc: Aceite	Ctab > C calc: Aceite
Matrizes	- Chocolate - Suplemento alimentar - Gelado	- Bolacha - Cereais - Tâmara	- Barras de cereais - Doce - Sumo
$\overline{CV}_r$ / %	1,18	1,78	1,40
$\overline{r}_r$ / g/100g	0,0378	0,231	0,824

Tendo em conta a tabela 48, é possível verificar que as matrizes pertencem à gama de trabalho que lhes diz respeito, pois a partir do teste C de Cochran, pode-se afirmar que existe homogeneidade das variâncias dentro de cada gama de trabalho, para um intervalo de confiança de 95%.

É ainda possível observar que o valor de $\overline{CV}_r$ é de 1,18 % e o valor de $\overline{r}_r$ é de 0,0378 g/100g, para a gama de trabalho baixa. Relativamente à gama de trabalho intermédia, os valores são 1,78 % e 0,231 g/100g, respetivamente. E para a gama de trabalho alta, o $\overline{CV}_r$ é de 1,40 % e o $\overline{r}_r$ corresponde a 0,824 g/100g. Portanto, é possível afirmar que para as 3 gamas de trabalho, a repetibilidade é satisfatória e os erros aleatórios não influenciam a confiança nos resultados. E ainda que em duplicados efetuados em condições de repetibilidade, a diferença absoluta entre os 2 ensaios, não pode exceder os valores de limite de repetibilidade mencionados, referentes à gama de trabalho em que estão inseridos.

6.5.3 Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi obtida através das gamas de trabalho estabelecidas na secção anterior.

Foram efetuados 6 duplicados de cada amostra, pelo que a diferença entre cada um dos duplicados tem de ser inferior ao limite de repetibilidade (g/100g) estabelecido

para cada gama de trabalho, relativamente a cada poliól, apresentado na secção anterior.

Para cada um dos duplicados, calculou-se a diferença entre os dois ensaios, bem como o quadrado desta diferença, e ainda a média. Através do quadrado da diferença, sabendo o número de ensaios total (n) efetuados para a gama de trabalho considerada, foi possível calcular o desvio padrão da precisão intermédia (S_{PI}), através da expressão de cálculo (10). Com a média e sabendo o valor de S_{PI} é possível calcular o desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e o limite da precisão intermédia (r_{PI}), através das expressões (11) e (12), respetivamente.

Na tabela 49, estão apresentados os resultados obtidos para se poder concluir acerca da precisão intermédia.

Tabela 49: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Isomaltitol.

Isomaltitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n_{total}	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 7,0	30	1,61	0,132
≥ 7,0	24	2,09	0,936

Com base nos valores apresentados na tabela 49, é possível de afirmar que a gama de trabalho baixa possui um CV_{PI} de 1,61% e um r_{PI} de 0,132 g/100g. Já a gama de trabalho alta possui um valor de CV_{PI} de 2,09 % e um r_{PI} de 0,936 g/100g. Tendo em conta o estabelecido pelo laboratório, a precisão intermédia só é considerada satisfatória se o CV_{PI} for inferior a 10%, e de facto, é isso que se observa. Também é possível afirmar que os erros aleatórios não afetam a confiança do conjunto de resultados obtidos em cada gama de trabalho.

A diferença absoluta entre valores obtidos para uma mesma amostra em condições de precisão intermédia não pode ser superior a 0,132 g/100g ou a 0,936 g/100g, consoante a gama a que pertencem.

Na tabela 50, estão apresentados os valores referentes à precisão intermédia do método em relação à gama de trabalho, para o Maltitol.

Tabela 50: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Maltitol.

Maltitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n total	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	18	3,15	0,0847
2,0 – 6,9	12	2,67	0,352
≥ 7,0	24	1,63	0,737

Tendo em conta os resultados obtidos apresentados na tabela 50, é possível verificar que para a gama de trabalho baixa, o CV_{PI} é de 3,15 % o que quer dizer que a precisão intermédia é satisfatória e os erros aleatórios não interferem na confiança dos resultados. O r_{PI} possui um valor de 0,0847 g/100g, para esta gama, o que significa que a diferença absoluta entre 2 ensaios efetuados em condições de precisão intermédia, não pode exceder este valor.

Para a gama de trabalho intermédia, o valor de CV_{PI} é de 2,67 % e o valor de r_{PI} é de 0,352 g/100g. Tendo em conta estes valores, é possível afirmar que a precisão intermédia é satisfatória e os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados. O valor de r_{PI} indica que a diferença absoluta entre ensaios efetuados em condições de precisão intermédia não pode ser exceder o valor de 0,352 g/100g.

O mesmo acontece para a gama de trabalho alta, em que o valor de CV_{PI} é de 1,63 % e o valor de r_{PI} é de 0,737 g/100g.

Na tabela 51, estão apresentados os valores correspondente à precisão intermédia para o Eritritol.

Tabela 51: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Eritritol.

Eritritol			
Gama de trabalho (g/100g)	n total	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	18	1,36	0,0396
2,0 – 6,9	18	2,26	0,262
≥ 7,0	18	1,89	0,730

Tendo em conta a tabela 51, os valores de CV_{PI} são 1,36 %, 2,26 % e 1,89%, relativamente à gama de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente. Estes

valores indicam que a precisão intermédia para cada gama de trabalho é satisfatória e os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados.

Relativamente ao valor de r_{PI} , para a gama de trabalho baixa corresponde a 0,0396 g/100g; para a gama de trabalho intermédia, é de 0,262 g/100g e para a gama de trabalho alta é de 0,730 g/100g. O que quer dizer que ensaios efetuados em condições de precisão intermédia, a diferença absoluta entre os valores obtidos não pode ser superior a um destes resultados, consoante a gama a que pertencem.

Na tabela 52, estão apresentados os valores alusivos à precisão intermédia referente ao Lactitol.

Tabela 52: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Lactitol.

Lactitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n _{total}	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	18	1,97	0,0515
2,0 – 6,9	24	2,12	0,224
≥ 7,0	12	1,14	0,486

Relativamente aos valores apresentados na tabela 52 de CV_{PI} , isto é, para a gama de trabalho baixa corresponde a 1,97 %, para a gama de trabalho intermédia corresponde a 2,12 % e para a gama de trabalho alta corresponde a 1,14 %, pode-se concluir que a precisão intermédia é considerada satisfatória e os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados.

Mais se adianta que os valores de r_{PI} , são 0,0515 g/100g , 0,224 g/100g e 0,486 g/100g, correspondentes às gamas baixa, intermédia e alta, respetivamente. O que quer dizer que, os resultados obtidos a partir de ensaios efetuados em condições de precisão intermédia, a diferença entre eles não pode exceder um destes valores, consoante a gama a que pertençam.

Na tabela 53, apresentam-se os resultados obtidos da precisão intermédia referentes ao Manitol.

Tabela 53: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Manitol.

Manitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n total	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	24	1,04	0,0379
2,0 – 6,9	18	3,98	0,362
≥ 7,0	12	2,12	0,882

Na tabela 53, é possível verificar que os valores de CV_{PI} para as 3 gamas de trabalho são 1,04 %, 3,98% e 2,12 %, o que indica que a precisão intermédia é considerada satisfatória e, por conseguinte, os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados obtidos.

De acordo com os valores obtidos para o r_{PI} , isto é, 0,0379 g/100g, 0,362 g/100g e 0,882 g/100g, para a gama de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente, pode-se afirmar que para ensaios efetuados em condições de precisão intermédia, a diferença entre os resultados não pode ser superior a um destes valores, consoante a gama de trabalho a que pertençam.

Na tabela 54, estão referidos os valores obtidos para se poder concluir acerca da precisão intermédia do método, para o Xilitol.

Tabela 54: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Xilitol.

Xilitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n total	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	24	1,54	0,0479
2,0 – 6,9	12	3,21	0,232
≥ 7,0	12	1,19	0,491

Na tabela 54, referente ao Xilitol, os valores de CV_{PI} são 1,54 %, 3,21% e 1,19% para a gama de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente. Como estes valores são inferiores a 10 %, considera-se que a precisão intermédia é satisfatória e os erros aleatórios associados à dispersão dos resultados, não influenciam a confiança depositada nos resultados.

Mais se adianta que diferenças entre os resultados obtidos em condições de precisão intermédia, não podem exceder um destes valores, 0,0479 g/1000g, 0,232

g/100g e 0,491 g/100g, consoante a gama de trabalho a que pertencem, ou seja, a gama de trabalho baixo, intermédia ou alta, respetivamente.

Por fim, na tabela 55, estão apresentados os valores referentes à precisão intermédia, para o Sorbitol.

Tabela 55: Apresentação do número total de duplicados (n) efetuados para o cálculo do desvio padrão relativo da precisão intermédia (CV_{PI}) e do limite da precisão intermédia (r_{PI}), referentes ao Sorbitol.

Sorbitol			
Gama de trabalho (g/100g)	n _{total}	CV_{PI} (%)	r_{PI} (g/100g)
< 2,0	18	3,40	0,223
2,0 – 6,9	18	2,65	0,255
≥ 7,0	18	1,10	0,885

Para o Sorbitol, a precisão intermédia é considerada satisfatória pois os valores de CV_{PI} são inferiores a 10%, isto é, para a gama de trabalho baixa o valor é de 3,40 %, para a gama de trabalho intermédia é de 2,65 % e para a gama de trabalho alta, é de 1,10%. Perante isto, também se pode afirmar que os erros aleatórios não afetam a confiança nos resultados.

Relativamente ao valor de r_{PI} , para a gama de trabalho baixa é de 0,223 g/1000g, para a gama de trabalho intermédia é de 0,255 g/100g e para a gama de trabalho alta é de 0,885, o que indica que ensaios efetuados em condições de precisão intermédia, a diferença entre eles não pode exceder um destes valores, consoante a gama de trabalho a que pertençam.

6.6 Exatidão

A exatidão trata-se de um parâmetro que mede a proximidade entre um valor obtido ou a média dos valores obtidos com o valor verdadeiro (de referência). Devido ao facto de para os diferentes polióis não existirem materiais de referência certificados (MRC), optou-se por calcular este parâmetro através de ensaios de recuperação. Se a taxa de recuperação estiver compreendida num intervalo entre 80 % a 120 %, o método é considerado exato. Também, foram efetuados cálculos para determinar a incerteza da exatidão, referente às taxas de recuperação obtidas para cada um dos triplicados. A incerteza permite saber se os valores obtidos entre os triplicados estão próximos uns dos outros.

Para o cálculo das taxas de recuperação, foi necessário conhecer a concentração verdadeira adicionada de solução padrão de maior concentração (g/L), através da curva de calibração, e transformá-la em g/100g; também foi necessário saber se a amostra continha algum poliól na sua formulação, através da realização de um duplicado sem contaminação. Ao todo, realizaram-se 2 triplicados em dias diferentes.

O cálculo dos erros sistemáticos foi realizado conforme a equação (26), no entanto, esta advém da equação (25).

$$\mu_{\text{exatidão}}(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\frac{s_{\text{final}}^2 + s_{\text{inicial}}^2}{(\bar{C}_f - \bar{C}_i)^2} + \left(\frac{\mu_{\text{(C fortificação)}}}{C_{\text{fortificação}}} \right)^2} \quad (25)$$

Em que o $\bar{R}$ representa a taxa de recuperação média de cada um dos triplicados, a $\bar{C}_f$ indica a média das concentrações obtidas após a fortificação, isto é, a concentração final; a $\bar{C}_i$ representa a média das concentrações iniciais, isto é, sem qualquer concentração adicionada, e a $C_{\text{fortificação}}$ diz respeito à concentração adicionada para fortificar as amostras.

Os s^2 inicial e final representam as variâncias das concentrações obtidas, quer seja antes da fortificação (duplicado), quer seja após a fortificação (triplicado) e a $\mu_{\text{(C fortificação)}}$ diz respeito à incerteza da concentração da solução padrão usado para a fortificação.

Como se trata de uma solução padrão, a incerteza desta solução é considerada tão baixa, pelo que se considera desprezável. Logo, o cálculo para a incerteza da exatidão passa a ser calculada através da equação (27).

$$\mu_{\text{exatidão}}(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\frac{s_{\text{final}}^2 + s_{\text{inicial}}^2}{(C_{\text{final}} - C_{\text{inicial}})^2}} \quad (26)$$

Portanto, nas próximas tabelas, estão apresentados os valores médios referentes à taxa de recuperação obtida em cada triplicado efetuado para cada matriz e os valores da incerteza. É de referir ainda que, em alguns casos, num dos triplicados não foi possível obter-se valores aceites no intervalo entre 80 % e 120 %, pelo que não foram contabilizados no cálculo da taxa de recuperação por gama de trabalho. Até à data de conclusão deste trabalho, não foram repetidos os triplicados em falta e, por isso, as taxas de recuperação nestes casos são meramente representativas.

Para o Isomaltitol, as taxas de recuperação média correspondentes a cada um dos 2 triplicados ($\bar{R}$), bem como as incertezas da exatidão ($\mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$) e as taxas de recuperação médias para as diferentes gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), estão apresentadas na tabela 56.

Tabela 56: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Isomaltitol.

Isomaltitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 7,0 g	Bolacha	1º	102,3 $\pm$ 0,0	98,8
		2º	91,2 $\pm$ 0,0	
	Chocolate	1º	122,7 $\pm$ 0,0	
		2º	103,2 $\pm$ 0,0	
	Doce	1º	90,1 $\pm$ 0,0	
		2º	97,7 $\pm$ 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	98,7 $\pm$ 0,0	
		2º	75,2 $\pm$ 0,0	
	Gelado	1º	110,4 $\pm$ 0,0	
		2º	90,1 $\pm$ 0,1	
$\geq$ 7,0 g	Barras de cereais	1º	114,5 $\pm$ 0,0	104,8
		2º	115,7 $\pm$ 0,2	
	Cereais	1º	129,9 $\pm$ 0,2	
		2º	104,5 $\pm$ 0,2	
	Sumo	1º	101,3 $\pm$ 0,1	
		2º	114,9 $\pm$ 0,1	
	Tâmara	1º	91,4 $\pm$ 0,1	
		2º	69,4 $\pm$ 0,1	

Com base na tabela 56, é possível verificar que em alguns triplicados efetuados, os valores não estão abrangidos pelo intervalo estabelecido pela empresa. Tal é verificado no 1º triplicado efetuado para as amostras de chocolate (122,7 %) e de cereais (129,9 %) e no 2º triplicado para as amostras de suplemento alimentar (75,2 %) e da

tâmara (69,4 %). Estes triplicados não foram repetidos e por isso para o cálculo da taxas de recuperação referentes a cada uma das gamas de trabalho, apenas se consideraram os resultados que estão dentro dos limites considerados (80% e 120%). É ainda possível concluir que os erros de medição não são elevados.

Tendo em conta que as taxas de recuperação média obtidas para ambas as gamas de trabalho (98,8 % para a gama de trabalho baixa e 104,8 % para a gama de trabalho alta), é possível concluir que o método possui uma boa exatidão, pois encontram-se dentro do intervalo estabelecido pela empresa.

Para o Maltitol, as taxas de recuperação média de cada um dos triplicados e incerteza associada a cada um, bem como a média obtida das taxas de recuperação para as gamas de trabalho, estão apresentadas na tabela 57.

Tabela 57: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Maltitol.

Maltitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Doce	1º	99,7 $\pm$ 0,0	95,1
		2º	100,9 $\pm$ 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	112,7 $\pm$ 0,0	
		2º	92,9 $\pm$ 0,0	
	Gelado	1º	84,2 $\pm$ 0,0	
		2º	76,8 $\pm$ 0,0	
2,0 – 6,9	Cereais	1º	98,6 $\pm$ 0,1	96,9
		2º	105,7 $\pm$ 0,2	
	Tâmara	1º	90,3 $\pm$ 0,0	
		2º	93,1 $\pm$ 0,0	
$\geq$ 7,0	Bolacha	1º	102,7 $\pm$ 0,1	104,5
		2º	75,4 $\pm$ 0,0	
	Barras de cereais	1º	120,4 $\pm$ 0,2	
		2º	117,0 $\pm$ 0,0	
	Chocolate	1º	72,8 $\pm$ 0,0	
		2º	100,8 $\pm$ 0,0	
	Sumo	1º	88,1 $\pm$ 0,0	
		2º	103,3 $\pm$ 0,1	

Pela análise da tabela 57, pode ser verificado que os segundos triplicados obtidos para a amostra de gelado (76,8 %) e para a amostra de bolacha (75,4 %), bem como o primeiro triplicado efetuado para o chocolate (72,8 %), encontram-se a baixo de 80 % e por isso foram descartados aquando do cálculo da taxas de recuperação médias por gama. É ainda possível verificar que os erros observados das medições são baixos.

Para a gama de trabalho baixa, a taxa de recuperação média é de 95,1 %, para a gama intermédia é de 96,9 % e para a gama alta é de 104,5 %. Por isso, é possível afirmar que o método para o Maltitol, possui uma boa exatidão.

Na tabela 58, é possível observar os valores das taxas de recuperação obtidas para cada matriz nos triplicados efetuados e a sua incerteza associada, bem como as taxas de recuperação médias para 3 gamas de trabalho, referentes ao Eritritol.

Tabela 58: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Eritritol.

Eritritol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Doce	1º	91,8 ± 0,0	92,1
		2º	80,2 ± 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	106,7 ± 0,0	
		2º	79,3 ± 0,0	
	Gelado	1º	83,5 ± 0,0	
		2º	72,5 ± 0,0	
2,0 – 6,9	Cereais	1º	95,5 ± 0,1	95,7
		2º	93,7 ± 0,0	
	Chocolate	1º	101,1 ± 0,0	
		2º	100,4 ± 0,0	
	Tâmara	1º	93,0 ± 0,0	
		2º	90,3 ± 0,0	
≥ 7,0	Bolacha	1º	61,1 ± 0,0	98,4
		2º	101,4 ± 0,0	
	Barras de cereais	1º	109,1 ± 0,1	
		2º	91,0 ± 0,1	
	Sumo	1º	90,2 ± 1,0	
		2º	97,1 ± 0,7	

Com base na tabela 58, é possível verificar que para a gama de trabalho baixa a taxa de recuperação é de 92,1 %, para a gama de trabalho intermédia, a taxa de recuperação é de 95,7 % e para a gama de trabalho alta, a taxa de recuperação é de 98,4 %. Estes valores derivam da média das médias obtidas para a taxa de recuperação obtida em cada um dos triplicados para as matrizes alimentares.

As taxas de recuperação para um dos triplicados para as amostras de suplemento alimentar, gelado e bolacha, foram 79,3 %, 72,5 % e 61,1 %, respetivamente, pelo que se situam abaixo do limite mínimo para serem aceites, isto é, 80 %. Por este motivo, não foram contabilizados aquando da realização da média das taxas de recuperação obtidas nos triplicados.

É possível aferir ainda, com base nos resultados obtidos na tabela anterior, que os erros observados associados às medições são baixos.

Portanto, o método possui uma boa exatidão para o Eritritol.

Na tabela 59, estão apresentados os valores referentes à exatidão do método para o Lactitol.

Tabela 59: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Lactitol.

Lactitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Doce	1º	93,3 $\pm$ 0,0	86,9
		2º	84,8 $\pm$ 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	84,6 $\pm$ 0,0	
		2º	86,4 $\pm$ 0,0	
	Gelado	1º	90,5 $\pm$ 0,0	
		2º	81,9 $\pm$ 0,0	
2,0 – 6,9	Bolacha	1º	97,7 $\pm$ 0,0	91,9
		2º	85,0 $\pm$ 0,0	
	Cereais	1º	90,7 $\pm$ 0,1	
		2º	88,5 $\pm$ 0,0	
	Chocolate	1º	98,5 $\pm$ 0,0	
		2º	90,9 $\pm$ 0,0	
	Tâmara	1º	93,0 $\pm$ 0,0	
		2º	91,0 $\pm$ 0,0	
$\geq 7,0$	Barras de cereais	1º	96,8 $\pm$ 0,0	95,6
		2º	88,3 $\pm$ 0,0	
	Sumo	1º	93,1 $\pm$ 0,1	
		2º	104,0 $\pm$ 0,1	

Tendo em conta os valores obtidos, na tabela 59, para as taxas de recuperação (86,9 %, 91,9 % e 95,6 %, referentes às gamas de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente), encontram-se dentro dos limites estabelecidos, e por isso o método é considerado exato para o Lactitol.

Também é possível verificar que os erros de medição associados à exatidão do método são baixos.

Na tabela 60, estão apresentados os valores referentes à exatidão do método para o Manitol.

Tabela 60: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Manitol.

Manitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Chocolate	1º	73,0 $\pm$ 0,0	98,9
		2º	106,1 $\pm$ 0,0	
	Doce	1º	98,0 $\pm$ 0,0	
		2º	136,9 $\pm$ 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	110,4 $\pm$ 0,0	
		2º	106,0 $\pm$ 0,0	
	Gelado	1º	81,9 $\pm$ 0,0	
		2º	84,7 $\pm$ 0,0	
2,0 – 6,9	Bolacha	1º	100,1 $\pm$ 0,0	98,1
		2º	108,3 $\pm$ 0,0	
	Cereais	1º	101,4 $\pm$ 0,2	
		2º	92,5 $\pm$ 0,1	
	Tâmara	1º	88,6 $\pm$ 0,0	
		2º	97,5 $\pm$ 0,1	
$\geq 7,0$	Barras de cereais	1º	106,5 $\pm$ 0,0	99,1
		2º	95,2 $\pm$ 0,2	
	Sumo	1º	86,0 $\pm$ 0,0	
		2º	108,8 $\pm$ 0,1	

Segundo a tabela 60, a taxa de recuperação obtida para o 1º triplicado efetuado para o chocolate é de 73,0 % e por este motivo, não foi contabilizado aquando da realização do cálculo para a taxa de recuperação para a gama de trabalho baixa.

Para este poliól, o método é considerado exato, uma vez que as taxas de recuperação para as gamas de trabalho (98,9 %, 98,1 % e 99,1 %, relativamente à gama de trabalho baixa, intermédia e alta, respetivamente), estão dentro do intervalo considerado. Também é possível afirmar que os erros sistemáticos são baixos.

Na tabela 61, os valores apresentados referentes às taxas de recuperação, dizem respeito ao Xilitol.

Tabela 61: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Xilitol.

Xilitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Chocolate	1º	67,3 $\pm$ 0,0	87,8
		2º	96,2 $\pm$ 0,0	
	Doce	1º	78,6 $\pm$ 0,0	
		2º	78,7 $\pm$ 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	81,3 $\pm$ 0,0	
		2º	88,8 $\pm$ 0,0	
	Gelado	1º	77,2 $\pm$ 0,0	
		2º	82,3 $\pm$ 0,1	
2,0 – 6,9	Bolacha	1º	98,7 $\pm$ 0,0	92,2
		2º	81,6 $\pm$ 0,0	
	Tâmara	1º	93,1 $\pm$ 0,0	
		2º	92,0 $\pm$ 0,0	
$\geq$ 7,0	Barras de cereais	1º	106,5 $\pm$ 0,0	97,3
		2º	97,2 $\pm$ 0,2	
	Sumo	1º	86,6 $\pm$ 0,0	
		2º	99,0 $\pm$ 0,1	

Com base na tabela 61, é possível verificar que para o 1º triplicado e uma amostra de chocolate (67,3 %), para os dois triplicados para uma amostra do doce (78,6 % e 78,7 %) e para o 1º triplicado efetuado de uma amostra de gelado (77,2 %), as taxas de recuperação ficaram aquém do valor mínimo estabelecido pelo laboratório. Portanto, estes valores não foram contabilizados para a obtenção da taxa de recuperação para a gama de trabalho baixa.

É possível denotar também, pela a análise da tabela, que os erros observados de medição para este poliól são baixos.

Considerando os valores das taxas de recuperação para as gamas de trabalho, isto é, 87,8 % para a gama de trabalho baixa, 92,2 % para a gama de trabalho intermédia e 97,3 % para a gama de trabalho alta, pode se afirmar que o método possui uma boa exatidão para as 3 gamas de trabalho, referentes ao Xilitol.

Na tabela 62, encontram-se os valores obtidos para a exatidão do método, referentes ao Sorbitol.

Tabela 62: Listagem das taxas de recuperação médias obtidas para cada triplicado e a sua respetiva incerteza ($\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$), referente a cada matriz, bem como a taxa de recuperação média referente a cada uma das gamas de trabalho ($\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$), para o Sorbitol.

Sorbitol				
Gama de trabalho (g/100g)	Matriz	Triplicado	$\bar{R} \pm \mu_{\text{exatidão}}(\bar{R})$ (%)	$\bar{R}_{\text{gama de trabalho}}$ (%)
< 2,0	Chocolate	1º	68,8 ± 0,0	90,2
		2º	94,6 ± 0,0	
	Suplemento alimentar	1º	80,8 ± 0,0	
		2º	88,9 ± 0,0	
	Gelado	1º	76,0 ± 0,0	
		2º	76,2 ± 0,0	
2,0 – 6,9	Bolacha	1º	101,2 ± 0,0	96,0
		2º	81,6 ± 0,0	
	Cereais	1º	104,8 ± 0,1	
		2º	95,1 ± 0,1	
	Tâmara	1º	95,0 ± 0,0	
		2º	98,5 ± 0,0	
≥ 7,0	Barras de cereais	1º	107,4 ± 0,0	97,6
		2º	95,0 ± 0,2	
	Doce	1º	-	
		2º	-	
	Sumo	1º	85,8 ± 0,0	
		2º	99,5 ± 0,1	

Tendo em conta os dados obtidos na tabela 62, é possível afirmar que não foram contabilizados, para o cálculo das taxas de recuperação referentes às gamas, o 1º triplicado para uma amostra de chocolate (68,8 %) e os triplicados obtidos de uma amostra de gelado (76,0 % e 76,2 %), pois situam-se a baixo do limite mínimo do intervalo aceite (80 %).

É de referir ainda que, não foram efetuados triplicados para uma amostra de doce e é por este motivo que aparecem os traços na tabela.

Os valores de incerteza, indicam que os erros observados de medição são baixos.

Denota-se ainda, que o método para todas as gamas de trabalho possui uma boa exatidão, pois as taxas de recuperação obtidas (90,2 % para a gama de trabalho baixa, 96,0 % para a gama de trabalho intermédia e 97,6 % para a gama de trabalho alta) encontram-se dentro do intervalo estabelecido (80 % a 120 %).

7. Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo a validação de um método que permitisse à empresa realizar análises, com um grau de confiança adequado, a produtos alimentares que possuíssem ou não nas suas formulações, polióis.

Este objetivo foi concretizado, uma vez que todos os parâmetros realizados asseguraram a validação.

Comprovaram-se que as curvas de calibração obtidas em diferentes dias, para cada um dos polióis (Isomaltitol, Maltitol, Eritritol, Lactitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol), eram lineares, com valores de r próximos de 1 e, por isso, a sensibilidade do método foi determinada a partir dos declives das retas. Os valores de sensibilidade do método variaram conforme o desgaste da coluna, havendo uma tendência decrescente destes valores até ao dia 24/02/2021, sendo obtido o valor mínimo de sensibilidade. Na medição seguinte, no dia 06/05/2021, os valores de sensibilidade do método para cada um dos polióis aumentou, uma vez que a coluna cromatográfica foi substituída por uma nova. Associado ao desgaste da coluna, também o facto de o sinal analítico ser a altura do pico cromatográfico, quando existe um arrastamento do pico, a altura deste será consequentemente menor.

Relativamente ao desvio padrão do método, os valores obtidos foram baixos, pelo que se pode concluir que o método foi bem executado.

Quanto ao limite de quantificação, este foi possível de comprovar, através de ensaios de recuperação, em condições de repetibilidade, que se tratava do padrão de menor concentração, isto é, 0,5 g/100g.

O limite de deteção não foi validado, pois apenas interessava à empresa, a concentração a partir da qual é possível quantificar cada um dos polióis na amostra.

As gamas de trabalho do método para o Isomaltitol foram $< 7,0$ g/100g e $\geq 7,0$ g/100g; para o Maltitol, Eritritol, Lactitol, Manitol, Xilitol e Sorbitol, foram $< 2,0$ g/100g, (2,0-6,9) g/100g e $\geq 7,0$ g/100g. Sendo o limite mínimo da gama de trabalho mais baixa, o limite de quantificação. O limite máximo da gama de trabalho mais alta é referente à maior concentração obtida de uma amostra que pertence à gama de trabalho.

Para a repetibilidade por gama de trabalho, os valores de $\overline{CV}_r$, foram inferiores a 10 %, pelo que a repetibilidade foi considerada satisfatória, e os erros aleatórios verificados não influenciavam os resultados obtidos. Os valores de $\bar{r}_r$ permitiram perceber qual o valor máximo da diferença obtida entre 2 ensaios efetuados em condições de repetibilidade.

Na precisão intermédia, também todos os valores de CV_{PI} foram inferiores a 10 %, pelo que esta foi considerada satisfatória e os erros aleatórios não tinham influência nos resultados obtidos. Também o valor de r_{PI} indicou qual a diferença máxima permitida para ensaios efetuados em condições de precisão intermédia.

No estudo da exatidão, foi possível comprovar que as gamas de trabalho eram dotadas de valores de taxas de recuperação compreendidos no intervalo entre 80 % e 120 %, pelo que também a exatidão foi considerada satisfatória. A incerteza associada à exatidão, isto é, os erros sistemáticos, não foram elevados, pelo que foi possível concluir que os erros de medição não influenciavam as medições.

8. Referências Bibliográficas

1. NutriSciences, M. Scientific Roots.
<https://www.merieuxnutrisciences.com/corporate/en/article/scientific-roots> (accessed 30-06-2021).
2. NutriSciences, M. Silliker Portugal, S.A.
<https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal> (accessed 30-06-2021).
3. IPAC Certificado de Acreditação.
https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/sites/merieux_nutrisciences_pt/files/atoms/files/merieux_nutrisciences_portugal_-_certificado_acreditacao_e_anexo_tecnico_edicao_25.pdf (accessed 30-06-2021).
4. Peri, C., The universe of food quality. *Food quality and preference* **2006**, 17 (1-2), 3-8.
5. *Global Report on Diabetes*; World Health Organization: 2016.
6. Gulati, S.; Misra, A., Sugar intake, obesity, and diabetes in India. *Nutrients* **2014**, 6 (12), 5955-5974.
7. Ghosh, S.; Sudha, M. L., A review on polyols: new frontiers for health-based bakery products. *International journal of food sciences and nutrition* **2012**, 63 (3), 372-379.
8. Shankar, P.; Ahuja, S.; Sriram, K., Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutrition* **2013**, 29 (11-12), 1293-1299.
9. Martins, F.; Pinho, O.; Ferreira, I., Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. **2004**, 10, 67-78.
10. Pennington, N. L.; Baker, C. W., *Sugar: user's guide to sucrose*. Springer Science & Business Media: 1990.
11. Fitch, C.; Keim, K. S., Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* **2012**, 112 (5), 739-758.
12. Duffy, V. B.; Anderson, G. H., Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association* **1998**, 98 (5), 580-587.
13. Pereira, J. M. G.; Formigoni, M.; Viell, F. L. G.; Pante, G. C.; Bona, E.; Vieira, A. M. S., Aditivos Alimentares Naturais Emergentes: Uma revisão. In *Realidades e Perspetivas em Ciência dos Alimentos*, Editora, P., Ed. 2020; pp 46-84.
14. Codex Alimentarius, General Standard for food additives 1995.
15. European, C., Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Off J Eur Union* **2008**, 354, 16-33.

16. Martins, F. C. O. L.; Sentanin, M. A.; De Souza, D., Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food chemistry* **2019**, 272, 732-750.
17. Association, A. D., Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association* **2004**, (104), 255-275.
18. Chattopadhyay, S.; Raychaudhuri, U.; Chakraborty, R., Artificial sweeteners—a review. *Journal of food science and technology* **2014**, 51 (4), 611-621.
19. Mérillon, J.-M.; Ramawat, K. G., Sugar alcohols as sugar substitutes in food industry. In *Sweeteners- Pharmacology, Biotechnology and Applications*, Springer, Ed. 2018.
20. Godswill, A. C., Sugar alcohols: chemistry, production, health concerns and nutritional importance of mannitol, sorbitol, xylitol, and erythritol. *Int. J. Adv. Acad. Res* **2017**, 3, 31-66.
21. de Mira, N. V. M.; Marquez, U. M. L., Importância do diagnóstico e tratamento da fenilcetonúria. *Revista de Saúde Pública* **2000**, 34, 86-96.
22. Grembecka, M., Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology* **2015**, 241 (1), 1-14.
23. Grabitske, H. A.; Slavin, J. L., Low-digestible carbohydrates in practice. *Journal of the American Dietetic Association* **2008**, 108 (10), 1677-1681.
24. Livesey, G., Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Research Reviews* **2003**, 16 (2), 163-191.
25. Gerhardt, U., Polióis aplicação e metabolismo. In *Aditivos & Ingredientes*, ACRIBIA, Ed. p 150.
26. Warshaw, H.; Franz, M.; Powers, M. A.; Wheeler, M., Fat replacers: their use in foods and role in diabetes medical nutrition therapy. *Diabetes Care* **1996**, 19 (11), 1294-1301.
27. Ortiz, M. E.; Bleckwedel, J.; Raya, R. R.; Mozzi, F., Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, 97 (11), 4713-4726.
28. Benahmed, A. G.; Gasmi, A.; Arshad, M.; Shanaida, M.; Lysiuk, R.; Peana, M.; Pshyk-Titko, I.; Adamiv, S.; Shanaida, Y.; Bjørklund, G., Health benefits of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2020**, 1-13.
29. Martínez-Monteagudo, S. I.; Enteshari, M.; Metzger, L., Lactitol: Production, properties, and applications. *Trends in Food Science & Technology* **2019**, 83, 181-191.

30. Ho, L. H.; Pulsawat, M. M., Effects of partial sugar replacement on the physicochemical and sensory properties of low sugar cookies. *International Food Research Journal* **2020**, 27 (3).
31. E953- Isomalte. <https://world.openfoodfacts.org/additive/en:e953-isomalt> (accessed 27-12-2020).
32. Saraiva, A.; Carrascosa, C.; Raheem, D.; Ramos, F.; Raposo, A., Maltitol: Analytical determination methods, applications in the food industry, metabolism and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, 17 (14), 5227.
33. E965- Maltitol. <https://pt.openfoodfacts.org/aditivo/pt:e965-maltitol> (accessed 27-12-2020).
34. E966: Lactitol. <http://www.food-info.net/uk/e/e966.htm> (accessed 27-12-2020).
35. von Weymar, N.; Hujanen, M.; Leisola, M., Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry* **2002**, 37 (11), 1207-1213.
36. Ghoreishi, S. M.; Shahrestani, R. G., Innovative strategies for engineering mannitol production. *Trends in food science & technology* **2009**, 20 (6-7), 263-270.
37. Song, S. H.; Vieille, C., Recent advances in the biological production of mannitol. *Applied microbiology and biotechnology* **2009**, 84 (1), 55-62.
38. Bianchi, M. d. L. P.; Antunes, L. M. G., Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* **1999**, 12 (2), 123-30.
39. E421: Manitol. <http://www.food-info.net/uk/e/e421.htm> (accessed 23-12-2020).
40. Sheet, B. S.; Artik, N.; Mahmoud, A. A.; Abdulaziz, O. F., Some alternative sweeteners xylitol, sorbitol, sucralose and stevia. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* **2014**, 4 (1), 63-70.
41. E967: Xilitol. <http://www.food-info.net/uk/e/e967.htm> (accessed 24-12-2020).
42. E420: Sorbitol. <http://www.food-info.net/uk/e/e420.htm> (accessed 22-12-2020).
43. Rao, T. N., Validation of analytical methods. In *Calibration and Validation of Analytical Methods—A Sampling of Current Approaches*, 2018.
44. de Barros, C. B., Validação de métodos analíticos. *Biológico, São Paulo* **2002**, 64 (2), 175-177.
45. Valentini, S. R.; Sommer, W. A.; Matioli, G., Validação de métodos analíticos. *Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar* **2007**, 11 (2), 26-31.
46. Boqué, R.; Maroto, A.; Riu, J.; Rius, F. X., Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites* **2002**, 53 (1), 128-143.

47. Brito, N. M.; Junior, O. P. D. E. A.; Polese, L.; Ribeiro, M. L., Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* **2003**, 13.
48. Guia Relacre 13- Validação de métodos internos de ensaio em análise química. 2000.
49. Sousa, P. A. M. d. Implementação e validação de um método para análise do colesterol em matrizes alimentares- tese de mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar. Universidade do Porto, 2018.
50. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry* **2002**, 74 (5), 835-855.
51. Rodrigues, J. A. M. *Introdução à Química Analítica- Apontamentos da unidade curricular Introdução ao Processo Analítico*; Faculdade de Ciências da Universidade do Porto: 2017.
52. Guideline, I. C. H. H. T., Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)* **2005**, 1 (20), 05.
53. Martins, A. F. S. Implementação e validação de métodos analíticos- tese de mestrado em Química. Universidade de Coimbra, 2016.
54. Miller, J. N., Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst* **1991**, 116 (1), 3-14.
55. Calçada, S. R. R. Validação de Métodos Físico-Químicos. Universidade do Porto, 2017.
56. Rodríguez, L. C.; Campa Ta, A. M. G.; Linares, C. J.; Ceba, M. R., Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical letters* **1993**, 26 (6), 1243-1258.
57. Ellison, S. L. R.; Barwick, V. J.; Farrant, T. J. D., *Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide*. Royal Society of Chemistry: 2009.

9. Anexos

Anexo I

Este esquema, representado na figura 18 , foi adaptado do livro “*Sweeteners- Pharmacology, Biotechnology and Applications*” da referência 19.

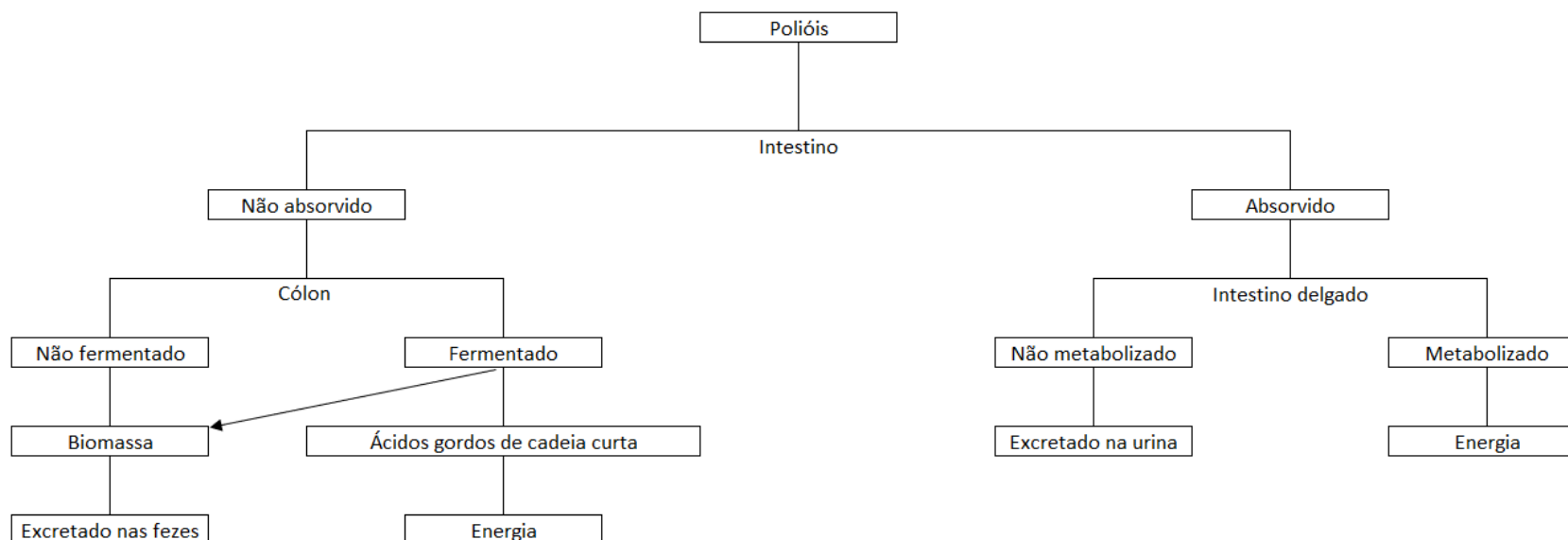


Figura 18: Representação esquemática do metabolismo dos polióis no organismo, adaptada do livro “*Sweeteners- Pharmacology, Biotechnology and Applications*” da referência 19.

Anexo II

Na figura 19 está representado o cromatograma correspondente à solução padrão conjunta de maior concentração.

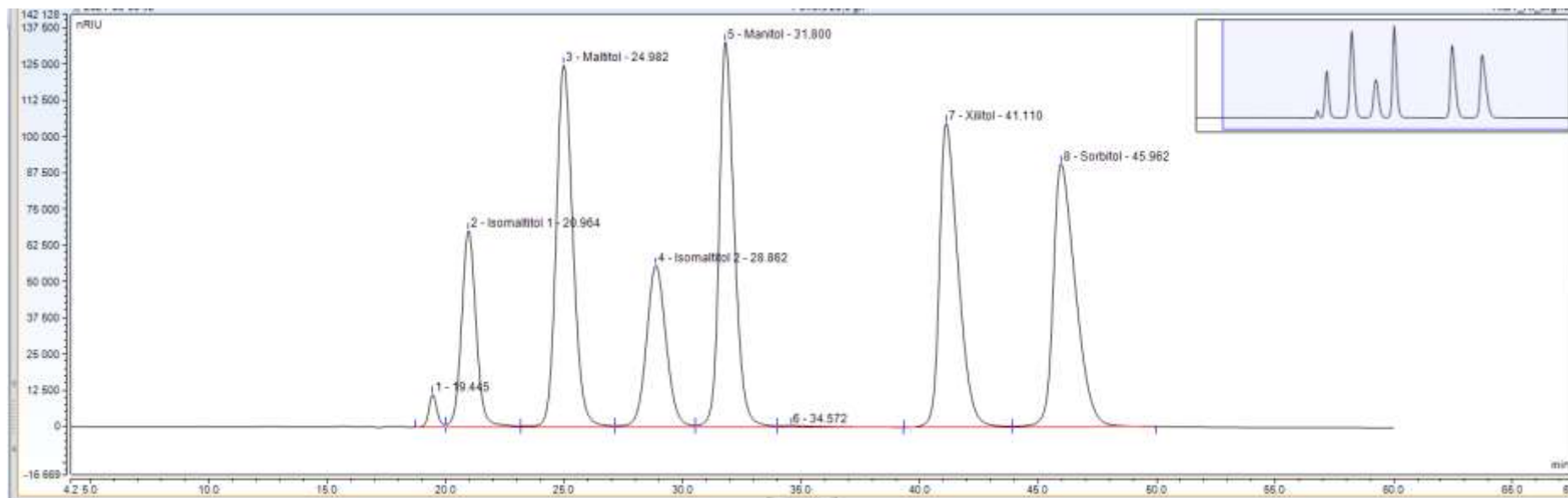


Figura 19: Representação do cromatograma correspondente à solução padrão conjunta de maior concentração.

Nota: O tempo de retenção (min) para cada um dos polióis representados no cromatograma acima é:

- Isomaltitol: 1º pico cromatográfico: 20,964 min; 2º pico cromatográfico: 28,862 min
- Maltitol: 24,982 min
- Manitol: 31,800 min
- Xilitol: 41,110 min
- Sorbitol: 45,962 min

Na figura 20 está representado o cromatograma correspondente à solução padrão E+L de maior concentração.

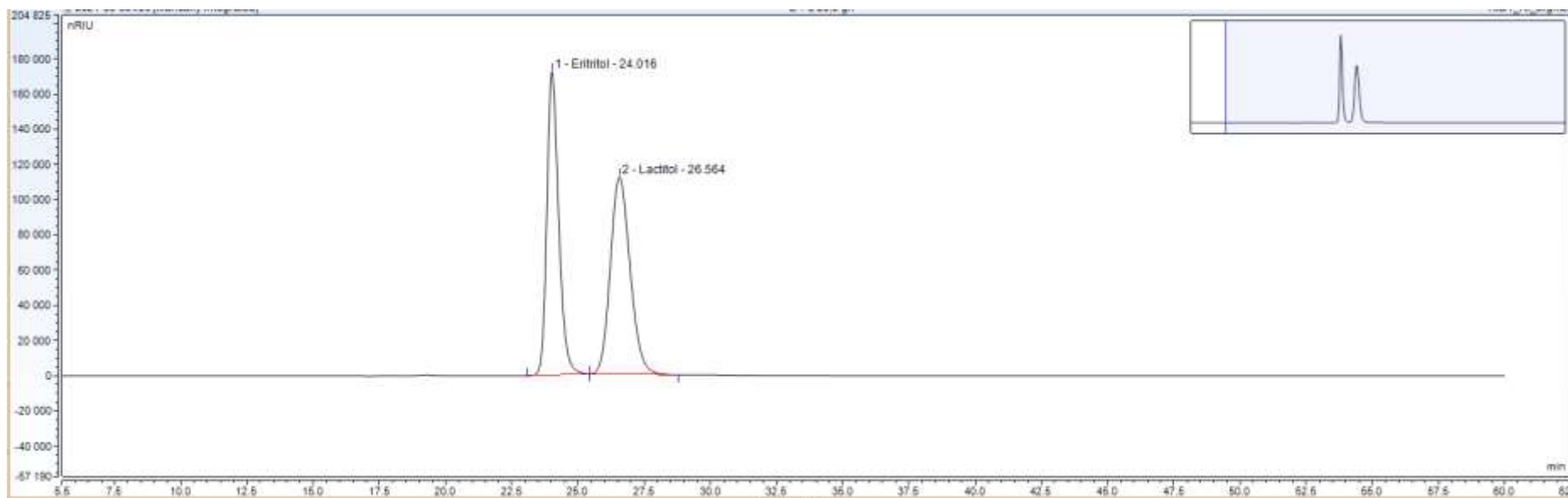


Figura 20: Representação do cromatograma correspondente à solução padrão E+L de maior concentração.

Nota: O tempo de retenção (min) para cada um dos polióis representados no cromatograma acima é:

- Eritritol: 24,016 min
- Lactitol: 26,564 min

Anexo III

As figuras que se seguem têm o objetivo de esclarecer a nível visual as alterações que ocorreram entre os declives das retas de calibração, nos diferentes dias em que o método foi realizado.

Na figura 21 estão representados os declives das retas obtidas para o Isomaltitol.

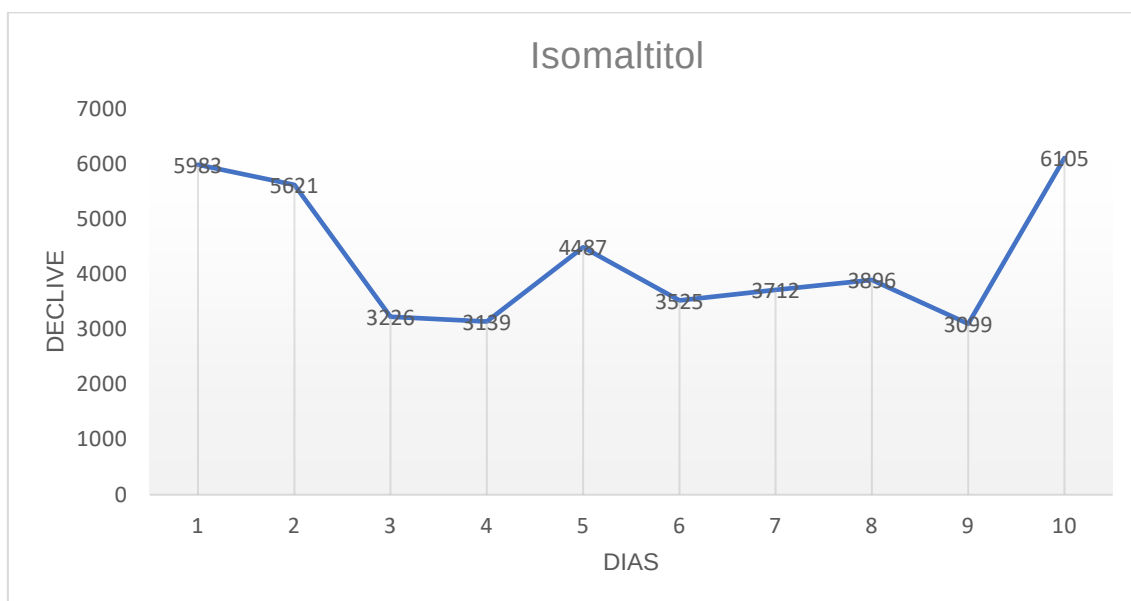


Figura 21: Representação gráfica dos declives para o Isomaltitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 16.

Na figura 22, estão representados os declives das retas obtidas para o Maltitol.

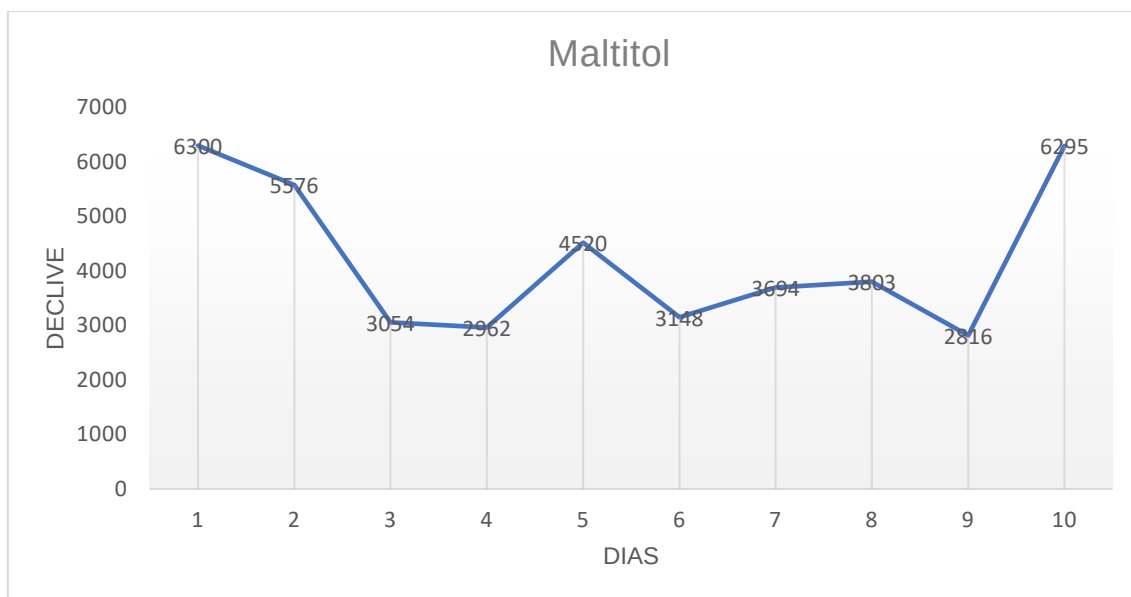


Figura 22: Representação gráfica dos declives para o Maltitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 17.

Na figura 23, estão representados os declives das retas obtidas para o Eritritol.

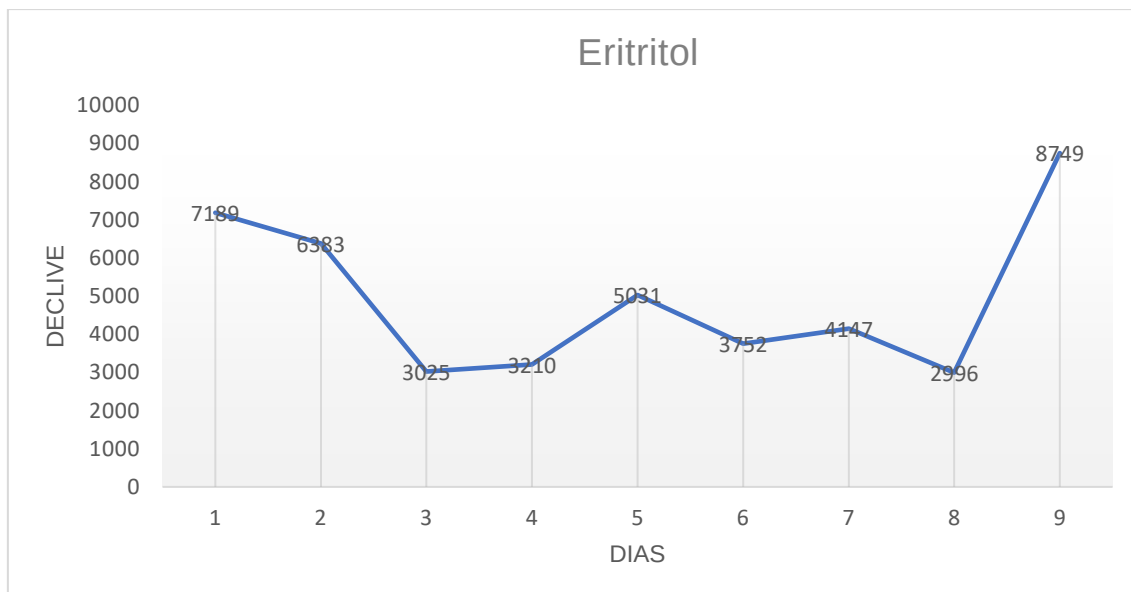


Figura 23: Representação gráfica dos declives para o Eritritol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 18.

Na figura 24, estão representados os declives das retas obtidas para o Lactitol.

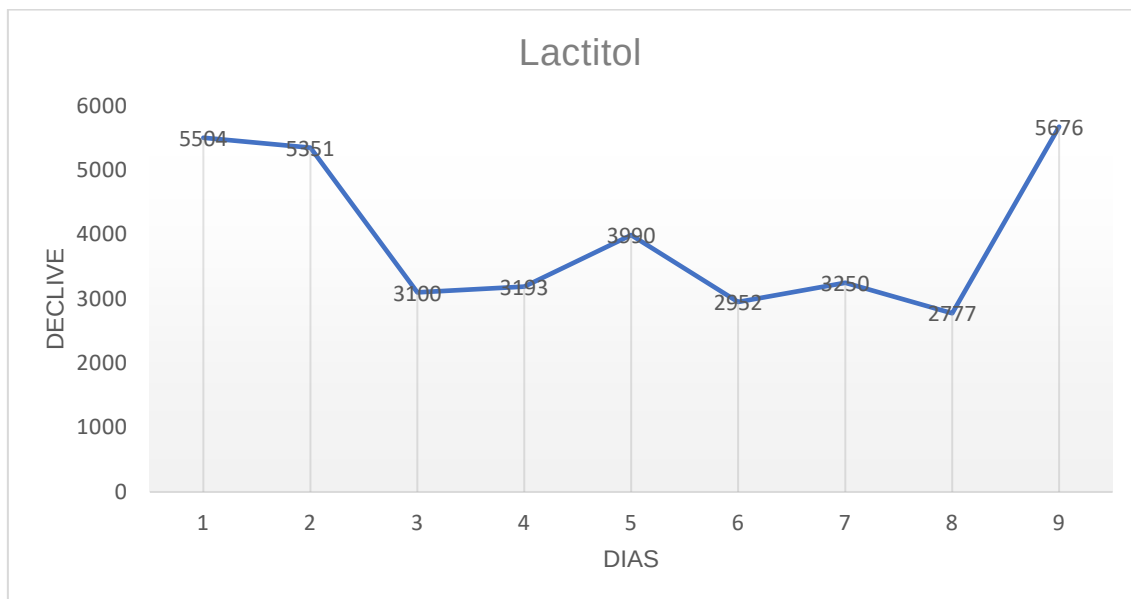


Figura 24: Representação gráfica dos declives para o Lactitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 19.

Na figura 25, estão representados os declives das retas obtidas para o Manitol.

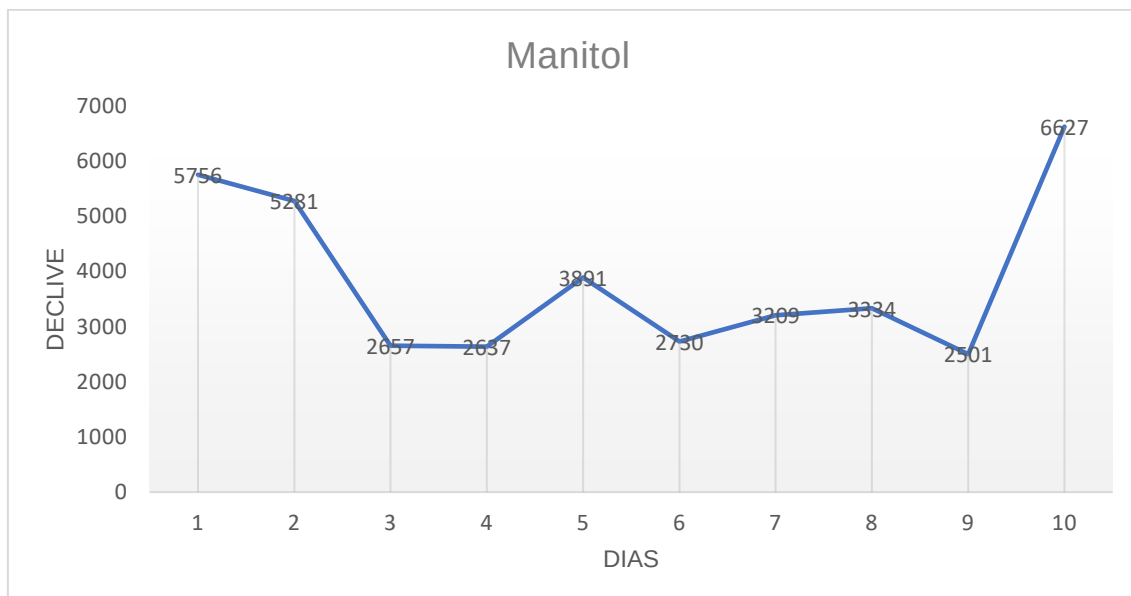


Figura 25: Representação gráfica dos declives para o Manitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 20.

Na figura 26, estão representados os declives das retas obtidas para o Xilitol.

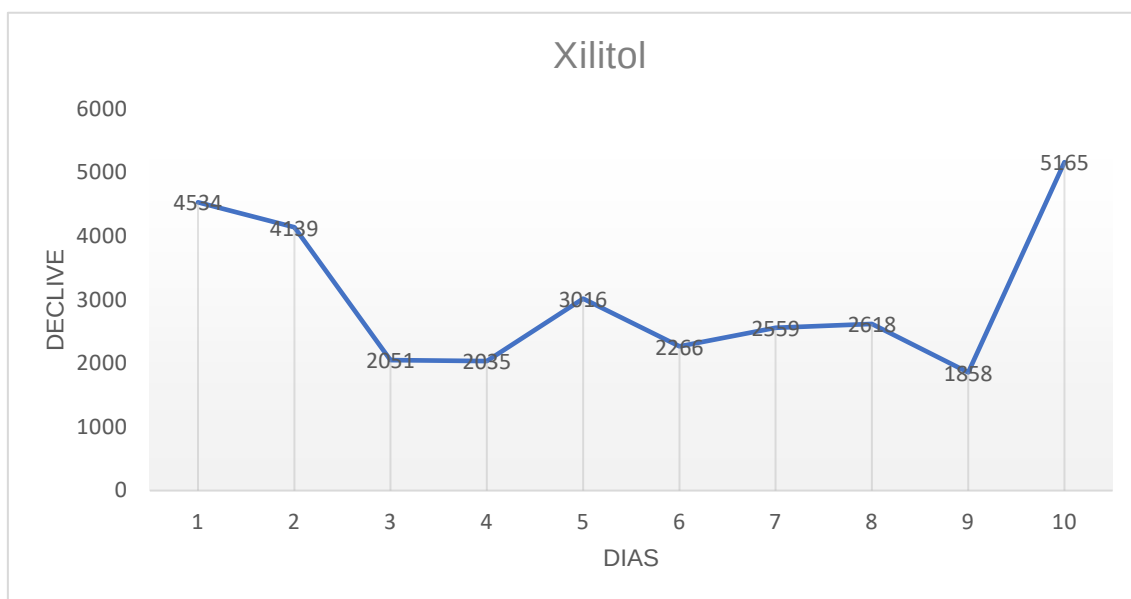


Figura 26: Representação gráfica dos declives para o Xilitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 21.

Por último, na figura 27, estão representados os declives das retas obtidas para o Sorbitol.

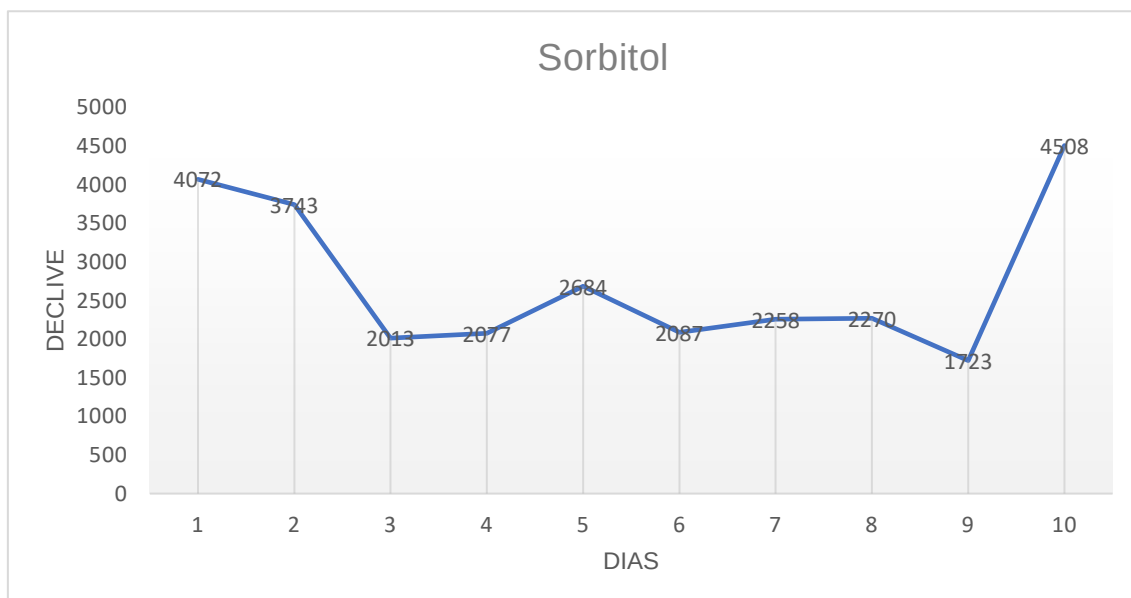


Figura 27: Representação gráfica dos declives para o Sorbitol, nos diferentes dias.

Nota: Os dias representados em baixo, correspondem à ordem em que foram realizados e estão apresentados na tabela 22.

Anexo IV

A tabela com o valor de G tabelado, onde estão apresentados os valores para os diferentes intervalos de confiança em função do número de dados, está apresentada na figura 28⁵⁷. Para este trabalho, considera-se o valor para $n=7$ e o intervalo de confiança= 95% G' , uma vez que os valores suspeitos considerados são ou o valor mais baixo ou o valor mais alto, do conjunto de dados.

n	95% G'	95% G''	95% G'''	99% G'	99% G''	99% G'''
3	1.154	1.993	—	1.155	2.000	—
4	1.481	2.429	0.0002	1.496	2.445	0.0000
5	1.715	2.755	0.0090	1.764	2.803	0.0018
6	1.887	3.012	0.0349	1.973	3.095	0.0116
7	2.020	3.222	0.0708	2.139	3.338	0.0308
8	2.127	3.399	0.1101	2.274	3.543	0.0563
9	2.215	3.552	0.1492	2.387	3.720	0.0851
10	2.290	3.685	0.1864	2.482	3.875	0.1150
11	2.355	3.803	0.2213	2.564	4.012	0.1448
12	2.412	3.909	0.2537	2.636	4.134	0.1738
13	2.462	4.005	0.2836	2.699	4.244	0.2016
14	2.507	4.093	0.3112	2.755	4.344	0.2280
15	2.548	4.173	0.3367	2.806	4.435	0.2530
16	2.586	4.247	0.3603	2.852	4.519	0.2767
17	2.620	4.316	0.3822	2.894	4.597	0.2990
18	2.652	4.380	0.4025	2.932	4.669	0.3200
19	2.681	4.440	0.4214	2.968	4.737	0.3398
20	2.708	4.496	0.4391	3.001	4.800	0.3585
21	2.734	4.549	0.4556	3.031	4.859	0.3761
22	2.758	4.599	0.4711	3.060	4.914	0.3927
23	2.780	4.646	0.4857	3.087	4.967	0.4085
24	2.802	4.691	0.4994	3.112	5.017	0.4234
25	2.822	4.734	0.5123	3.135	5.064	0.4376
26	2.841	4.775	0.5245	3.158	5.109	0.4510
27	2.859	4.814	0.5360	3.179	5.151	0.4638
28	2.876	4.851	0.5470	3.199	5.192	0.4759
29	2.893	4.886	0.5574	3.218	5.231	0.4875
30	2.908	4.921	0.5672	3.236	5.268	0.4985
40	3.036	5.201	0.6445	3.381	5.571	0.5862
50	3.128	5.407	0.6966	3.482	5.790	0.6462
60	3.200	5.568	0.7343	3.560	5.960	0.6901
70	3.258	5.700	0.7630	3.622	6.098	0.7236
80	3.306	5.811	0.7856	3.673	6.213	0.7501
90	3.348	5.906	0.8040	3.716	6.311	0.7717
100	3.384	5.990	0.8192	3.754	6.397	0.7896

Figura 28: Representação da tabela para o valor de G tabelado, retirado do livro da referência 57.

A tabela para os valores de C tabelados foi retirada da referência 59, para o intervalo de confiança de 95%, sendo $n=7$ e l = número de matrizes consideradas, sendo apresentada na figura 29 ⁵⁷.

l	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$	$n = 5$	$n = 6$	$n = 7$	$n = 8$	$n = 9$	$n = 10$	$n = 11$
2	0.998	0.975	0.939	0.906	0.877	0.853	0.833	0.816	0.801	0.788
3	0.967	0.871	0.798	0.746	0.707	0.677	0.653	0.633	0.617	0.603
4	0.906	0.768	0.684	0.629	0.589	0.560	0.536	0.518	0.502	0.488
5	0.841	0.684	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.439	0.424	0.412
6	0.781	0.616	0.532	0.480	0.445	0.418	0.398	0.382	0.368	0.357
7	0.727	0.561	0.480	0.431	0.397	0.373	0.354	0.338	0.326	0.315
8	0.680	0.516	0.438	0.391	0.359	0.336	0.318	0.304	0.293	0.283
9	0.638	0.477	0.403	0.358	0.328	0.307	0.290	0.277	0.266	0.257
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.303	0.282	0.267	0.254	0.244	0.235
11	0.570	0.417	0.348	0.308	0.281	0.262	0.247	0.235	0.225	0.217
12	0.541	0.392	0.326	0.288	0.262	0.244	0.230	0.219	0.210	0.202
13	0.515	0.371	0.307	0.271	0.246	0.229	0.215	0.205	0.196	0.189
14	0.492	0.352	0.291	0.255	0.232	0.215	0.202	0.192	0.184	0.177
15	0.471	0.335	0.276	0.242	0.220	0.203	0.191	0.182	0.174	0.167
16	0.452	0.319	0.262	0.230	0.208	0.193	0.181	0.172	0.164	0.158
17	0.434	0.305	0.250	0.219	0.198	0.183	0.172	0.163	0.156	0.150
18	0.418	0.293	0.240	0.209	0.189	0.175	0.164	0.156	0.149	0.143
19	0.403	0.281	0.230	0.200	0.181	0.167	0.157	0.149	0.142	0.136
20	0.389	0.270	0.221	0.192	0.174	0.160	0.150	0.142	0.136	0.130
21	0.377	0.261	0.212	0.185	0.167	0.154	0.144	0.136	0.130	0.125
22	0.365	0.252	0.204	0.178	0.160	0.148	0.138	0.131	0.125	0.120
23	0.354	0.243	0.197	0.171	0.155	0.142	0.133	0.126	0.120	0.116
24	0.343	0.235	0.191	0.166	0.149	0.137	0.129	0.122	0.116	0.111
25	0.334	0.228	0.185	0.160	0.144	0.133	0.124	0.117	0.112	0.107
26	0.325	0.221	0.179	0.155	0.139	0.128	0.120	0.114	0.108	0.104
27	0.316	0.215	0.174	0.150	0.135	0.124	0.116	0.110	0.105	0.100
28	0.308	0.209	0.168	0.146	0.131	0.121	0.113	0.106	0.101	0.097
29	0.300	0.203	0.164	0.142	0.127	0.117	0.109	0.103	0.098	0.094
30	0.293	0.198	0.159	0.138	0.124	0.114	0.106	0.100	0.095	0.092
31	0.286	0.193	0.155	0.134	0.120	0.111	0.103	0.097	0.093	0.089
32	0.279	0.188	0.151	0.130	0.117	0.108	0.100	0.095	0.090	0.086
33	0.273	0.184	0.147	0.127	0.114	0.105	0.098	0.092	0.088	0.084
34	0.267	0.179	0.144	0.124	0.111	0.102	0.095	0.090	0.086	0.082
35	0.262	0.175	0.140	0.121	0.108	0.100	0.093	0.088	0.083	0.080
36	0.256	0.171	0.137	0.118	0.106	0.097	0.091	0.085	0.081	0.078
37	0.251	0.168	0.134	0.116	0.103	0.095	0.088	0.083	0.079	0.076
38	0.246	0.164	0.131	0.113	0.101	0.093	0.086	0.082	0.078	0.074
39	0.241	0.161	0.128	0.111	0.099	0.091	0.085	0.080	0.076	0.073
40	0.237	0.158	0.126	0.108	0.097	0.089	0.083	0.078	0.074	0.071
41	0.233	0.154	0.123	0.106	0.095	0.087	0.081	0.076	0.073	0.069
42	0.228	0.151	0.121	0.104	0.093	0.085	0.079	0.075	0.071	0.068
43	0.224	0.149	0.118	0.102	0.091	0.083	0.078	0.073	0.070	0.067
44	0.221	0.146	0.116	0.100	0.089	0.082	0.076	0.072	0.068	0.065
45	0.217	0.143	0.114	0.098	0.087	0.080	0.075	0.070	0.067	0.064
46	0.213	0.141	0.112	0.096	0.086	0.079	0.073	0.069	0.065	0.063
47	0.210	0.138	0.110	0.094	0.084	0.077	0.072	0.068	0.064	0.061
48	0.206	0.136	0.108	0.093	0.083	0.076	0.070	0.066	0.063	0.060
49	0.203	0.134	0.106	0.091	0.081	0.074	0.069	0.065	0.062	0.059
50	0.200	0.131	0.104	0.089	0.080	0.073	0.068	0.064	0.061	0.058

Figura 29: Representação da tabela para o teste C de Cochran, retirada do livro da referência 57.