



• U

• C

• 2012

Tânia Margarida Pereira Figueiredo

Validação de Métodos Analíticos: determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar.



Tânia Margarida Pereira Figueiredo

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinação do Teor de Açúcar numa amostra de produto alimentar

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Tânia Margarida Pereira Figueiredo

**VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS**

**Determinação do teor de açúcar numa amostra de
produto alimentar.**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente**

Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira

Julho de 2012

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Ao longo do nosso processo de crescimento como pessoas, vamos deparando-nos com novas realidades até então desconhecidas, é preciso percorrer um longo caminho para atingir os nossos objectivos, mas tudo isto não seria possível sem que haja intervenção de todos aqueles que nos rodeiam.

Este trabalho representa o fim de um ciclo e o início de outro. No ciclo que agora se fecha, muitas foram as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que esta caminhada fosse menos cansativa, com palavras de incentivo, com conversas e ideias que me ajudaram a ver a vida de uma forma diferente. A todas elas agradeço e dedico-lhes este trabalho.

Ao Doutor Jorge Costa Pereira, por ter aceitado ser meu orientador e, desta forma, me ensinar a usar, de uma forma mais adequada e proveitosa, as ferramentas analíticas que se encontram ao nosso dispor e que, nem sempre as usamos ou porque não sabemos que elas existem, ou então porque não sabemos como usa-las. Agradeço-lhe, ainda, por ter acreditado nas minhas capacidades para a realização deste trabalho, encorajando-me e dando-me ânimo para continuar e não desistir.

À Dra. Cátia Vaz e à Dra. Rita Oliveira pela paciência e inestimável apoio prestados durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela oportunidade de muito aprender com a experiência e conhecimento científico que lhes pertence.

Agradeço ao meu namorado, Fábio, por todos os momentos fantásticos que me proporcionaste, mas, acima de tudo, pela paciência que tiveste comigo, especialmente este ano que não foi nada fácil, pelo teu carinho, amor e dedicação, mesmo nos momentos mais complicados da minha vida. Sem Ti nada disto era possível. Muito Obrigado!

Agradeço a todos os meus amigos por todo o seu apoio, carinho, paciência durante estes anos, com períodos bons e outros menos bons e ainda aos meus colegas de curso que estiveram por perto na minha vida académica.

Obrigada a toda a minha família, em especial à minha avó e à minha madrinha, pela paciência, carinho, disponibilidade e apoio. Por último o meu muito obrigado ao meu pai, o meu anjo da guarda.

Prefácio

Este trabalho encontra-se desenvolvido sob a forma de cinco capítulos. No primeiro capítulo procurou-se transmitir e resumir, sob a forma de uma perspectiva global o tema do trabalho e o objectivo do mesmo. No segundo capítulo pretendeu-se abordar os fundamentos teóricos essenciais para a execução do mesmo enquanto no terceiro capítulo apresenta-se a secção experimental onde se descreve os métodos e materiais necessários. No quarto capítulo apresenta-se os resultados obtidos no decorrer do trabalho, bem como o seu tratamento estatístico e discussão dos mesmos. No quinto capítulo apresenta-se as conclusões finais do trabalho realizado. Por fim, no sexto e último capítulo, apresentam-se as referências bibliográficas consultadas na elaboração do presente trabalho.

Para facilitar a transferência de dados e permitir manter a coerência dessa informação, optou-se por representar os números reais sob a forma exponencial com a notação utilizada nos programas de cálculo onde, por exemplo, 3,201E-08 representa o valor $3,201 \times 10^{-8}$ escrito correctamente no formato científico.

Sempre que possível e adequado, os valores estimados estão representados com a sua incerteza associada, respectivo erro padrão, indicada entre parêntesis, seguida das respectivas unidades, de forma a conferir maior significado estatístico aos resultados obtidos.

Resumo

A recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de que o consumo de açúcar não ultrapasse os 10% das calorias na dieta e, para tal, é necessário ter conhecimento da quantidade de açúcar que se ingere em cada porção de alimento confeccionado e a rotulagem é muito importante para este conhecimento.

Deste modo, no presente trabalho, pretendeu-se validar o método de doseamento simultâneo de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose, por HPLC-RI, de forma a ser possível determinar a quantidade (percentagem) total e individual de açúcares numa amostra de pastelaria. Na validação foram avaliados os parâmetros: especificidade, gama de trabalho, sensibilidade, limites analíticos, precisão e exactidão.

Abstract

The recommendation of the World Health Organization (WHO) is that sugar consumption does not exceed 10% of the calories in the diet, and for this it is necessary to know the amount of sugar you eat in each serving of cooked food and labeling is very important for this knowledge. Thus, in this study was intended to validate the method of simultaneous determination of fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose, by HPLC-RI to be able to determine the quantity (percent) and individual total sugar in a sample pastry. In the validation parameters were evaluated: specificity, working range, sensitivity, analytical limits, precision and accuracy.

Abreviaturas

ANOVA – Analysis Of Variance

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

CE – Cromatografia por Exclusão

CG – Cromatografia Gasosa

CSC – Cromatografia com Fluido Supercrítico

CLC – Cromatografia Líquida Clássica

CLFL – Cromatografia Líquida com Fase Ligada

CLL – Cromatografia Líquido-Líquido

CLS – Cromatografia Líquido-Sólido

CV – Coeficiente de Variação

ER – Erro Relativo

EUA – Estados Unidos da América

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

FR – Fase Reversa

GFC – Cromatografia com Filtração em Gel

GPC – Cromatografia com Permeação em Gel

HCl – Ácido Clorídrico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-RI - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Índice de Refracção

ISO – Organização Internacional para a Padronização (do inglês International Organization for Standardization)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês International Union of Pure and Applied Chemistry)

MRC – Material de Referencia Certificado

NIST - National Institute of Standards and Technology

ODS – Octadecilsilano

OMS – Organização Mundial de Saúde

R – Coeficiente de Correlação

RI – Índice de Refracção

RSD – Desvio Padrão Relativo

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos da América (do inglês United States Pharmacopoeia)

X_d – Limite de decisão

X_{LD} – Limite de detecção

X_{LQ} – Limite de quantificação

Y_d – Sinal instrumental referente ao limite de decisão

Y_{LD} – Sinal instrumental referente ao limite de detecção

Y_{LQ} – Sinal instrumental referente ao limite de quantificação

Índice

1. Introdução.....	2
1.1 DanCake	2
2. Fundamentação Teórica.....	5
2.1 Hidratos de carbono.....	5
2.1.1 Origem	5
2.1.2 Refinação.....	7
2.1.3 Monossacarídeos.....	10
2.1.3.1 Glucose.....	10
2.1.3.2 Frutose.....	11
2.1.4 Dissacarídeos	12
2.1.4.1 Sacarose.....	13
2.1.4.2 Maltose	13
2.1.4.3 Lactose	14
2.1.5 Açúcar no organismo	14
2.2 Cromatografia	16
2.2.1 Mecanismos de separação	17
2.2.2 Tipos de cromatografia	23
2.2.2.1 Cromatografia planar	23
2.2.2.2 Cromatografia em coluna.....	25
2.2.3 HPLC	26
2.2.3.1 Fases	30
2.2.3.2 Detectores.....	34
2.2.4 Identificação e quantificação.....	35
2.3 Quantificação de hidratos de carbono.....	36
2.3.1 Variantes.....	36
2.3.2 Equipamento.....	37

2.3.3	Teste de Conformidade do sistema de HPLC	46
2.4	Validação de procedimentos analíticos (ICH)	48
2.4.1	Parâmetros de desempenho	48
2.4.1.1	Especificidade e selectividade	50
2.4.1.2	Gama de trabalho e linearidade da curva de calibração	50
2.4.1.3	Sensibilidade.....	51
2.4.1.4	Limiares analíticos	51
2.4.1.5	Precisão	52
2.4.1.6	Exactidão	54
2.4.1.7	Robustez.....	57
2.4.1.8	Coerência.....	57
2.5	Tratamento estatístico de dados	58
2.5.1	Distribuições estatísticas relevantes	58
2.5.1.1	<i>t-student</i>	58
2.5.1.2	Fisher	59
2.5.2	Teste de hipóteses.....	60
2.5.2.1	Diagnóstico de valores discrepantes	62
2.5.2.2	Escolha do modelo	63
2.5.3	Análise de variância	64
3.	Secção experimental	67
3.1.	Reagentes.....	67
3.1.1.	Fase móvel (HPLC)	67
3.1.2.	Solução-mãe padrão de glucose, frutose, sacarose, lactose e maltose	67
3.1.2.1.	Preparação das soluções padrão de açúcares.....	67
3.1.3.	Preparação das soluções de Carrez	68
3.2.	Equipamento	68

3.3. Métodos	68
3.3.1. Preparação da amostra.....	68
3.3.2. Condições de operação	69
4. Resultados e discussão	71
4.1. Linearidade e gama de trabalho.....	71
4.2. Limiares analíticos.....	79
4.3. Precisão	80
4.3.1. Repetibilidade	80
4.3.2. Precisão intermédia	80
4.4. Exactidão	86
5. Conclusões	91
6. Bibliografia	94
Anexo I - As aplicações do açúcar na área da produção alimentar.....	98
Anexo II – Cromatogramas obtidos na leitura dos padrões e amostra.....	100

1. Introdução

1. Introdução

Os hidratos de carbono, também conhecidos por glícidos, devem representar a principal fonte de energia da nossa alimentação, entre 55 e 75%. São constituídos por unidades básicas denominadas oses. Todos os hidratos de carbono são decompostos no organismo através da acção de enzimas específicas até à sua forma básica, o monómero, sendo então absorvidos e metabolizados.

Consoante o número de unidades básicas pode-se agrupar os hidratos de carbono em monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos.

Uma vez que os açúcares estão frequentemente presentes nos hábitos alimentares, sobretudo dos consumidores mais jovens, e tendo em vista que o doseamento dos açúcares deve ser precisa para o controlo de qualidade, pretendeu-se com este trabalho efectuar a validação do método de doseamento simultâneo de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Índice de refacção.

Neste trabalho, foi desenvolvido e implementado, de acordo com as necessidades do laboratório Físico-químico e de Controlo de Qualidade da empresa DanCake, um método que permite quantificar o teor de açúcar total ou o teor individual de cada mono e dissacarídeo, presente nos alimentos da sua linha de produção.

1.1 DanCake

A DanCake é uma empresa portuguesa fundada em 1978 que desenvolve a sua actividade no sector alimentar. É conhecida nacional e internacionalmente pela sua oferta de bolos e produtos de confeitaria.

Um negócio assegurado por uma gestão familiar, a DanCake tem vindo a apostar no desenvolvimento sustentado que representa, actualmente, uma capacidade produtiva de



Figura 1.1 – Imagem aérea da DanCake Coimbra.

45 mil toneladas, com uma margem de crescimento adicional de cerca de 40%. A empresa tem duas unidades de produção (Coimbra e Lisboa), sendo um dos maiores fabricantes de biscoitos de manteiga a nível mundial.

Mais de 600 colaboradores asseguram o funcionamento da empresa portuguesa que representa o maior volume de exportação neste sector. A qualidade dos produtos DanCake é reconhecida internacionalmente, tendo sido certificada com o 'Nível Superior' ("Higher Level") pelo British Retail Consortium (BRC) e International Food Standard (IFS).

O investimento tecnológico e o alargamento da sua oferta de produtos para ir ao encontro das necessidades do consumidor têm sido as suas preocupações principais.

Com 30 anos de actividade e uma posição solidificada nacional e internacionalmente, a DanCake é uma empresa sempre atenta aos desafios que o mercado lhe tem colocado. Numa época em que as preocupações com a saúde e nutrição tem pautado a vida dos consumidores, a DanCake procura adaptar-se e contribuir para um estilo de vida mais equilibrado, numa tendência transversal a todas as suas marcas e que procura influenciar especialmente as escolhas dos mais jovens.

A redução de açúcares, gorduras e sal em produtos DanCake já existentes e o lançamento de novos *snacks*, mais saudáveis, são caminhos que esta empresa apontou para se desenvolver, respondendo e antecipando as necessidades de um mercado sempre em mudança e crescentemente exigente.

2. Fundamentação Teórica

2. Fundamentação Teórica

Neste capítulo procede-se a uma revisão bibliográfica, na literatura existente, de factos e conceitos essenciais ao desenvolvimento do restante trabalho.

2.1 Hidratos de carbono

Os hidratos de carbono são aldeídos poli-hidroxilados, cetonas poli-hidroxiladas ou compostos que, por hidrólise, se podem transformar nos anteriores. Os hidratos de carbono que não se podem hidrolisar para compostos mais simples designam-se por monossacarídeos. Os hidratos de carbono que se podem hidrolisar em duas moléculas de monossacarídeos designam-se por dissacarídeos. Aos hidratos de carbono que, por hidrólise, originam várias moléculas de monossacarídeos dá-se a designação de polissacarídeos. [1]

Os monossacarídeos podem, ainda, subdividir-se em aldoses no caso de conterem o grupo aldeído, ou cetoses quando possuem o grupo cetona.

Os hidratos de carbono que reduzem o reagente de Fehling (ou o de Benedict) ou o reagente de Tollens conhecem-se por açúcares redutores. Todos os monossacarídeos, quer aldoses quer cetoses, são açúcares redutores, assim como a maioria dos dissacarídeos, constituindo a sacarose uma excepção.

2.1.1 Origem

Antes de existir açúcar, tal como hoje o conhecemos, existiam apenas duas fontes de sabor doce no mundo: o mel e a cana. [2]

A cana é cultivada já desde a Antiguidade. Terão sido os povos das ilhas do Sul do Pacífico, por volta do ano 20.000 a.C., a descobrir as propriedades desta planta, que crescia espontaneamente nas suas terras. Foi na Nova Guiné que a cana foi pela primeira vez cultivada. A partir desta zona, a cultura estendeu-se depois a outras ilhas vizinhas, como as Fiji ou a Nova Caledónia. Mais tarde, a cana-de-açúcar terá chegado a outros países, como as Filipinas, a Indonésia, a Malásia ou a Índia. Foram os Indianos o primeiro povo a extrair o suco da cana e a produzir, pela primeira vez, açúcar “em bruto”, baptizado com o nome *gur*, por volta de 500 a.C..

A técnica da produção de açúcar disseminou-se aos poucos por toda a região do Médio Oriente. Os Árabes aprenderam com os Persas a produzir açúcar sólido e foi desta forma que, por volta do século III a.C., se estabeleceram as “rotas do açúcar”, com caravanas a fazer o transporte entre os países asiáticos e africanos.

Mais tarde os Europeus viajaram até países longínquos, descobriram a cultura da cana-de-açúcar e introduziram-na na Grécia, em Itália e em algumas regiões da França. No entanto, o sucesso não foi grande pois o clima não era o mais adequado e o oriente continuou a ser o maior fornecedor de açúcar do mundo ocidental.

Nesta altura, eram os mercadores venezianos os principais intermediários deste comércio: em Alexandria compravam o açúcar proveniente da Índia, fazendo-o depois chegar ao resto da Europa. Durante centenas e centenas de anos o açúcar foi, assim, considerado uma especiaria extremamente rara e valiosa. Apenas nos palácios reais e nas casas nobres era possível consumir açúcar. Vendido nos boticários (as farmácias de então), o açúcar atingia preços altíssimos, sendo apenas acessível aos mais poderosos.

No início do século XV deu-se uma viragem importante na história do açúcar: o infante D. Henrique resolveu introduzir na Madeira a cultura da cana. Com a passagem do cabo da Boa Esperança, os Portugueses passaram a viajar para a Índia com bastante regularidade e, nesta época, tornaram-se os maiores negociantes de açúcar.

Normalmente associa-se o açúcar a um produto de origem sul-americana, no entanto, terá sido apenas na altura dos Descobrimentos que Cristóvão Colombo terá levado alguns exemplares de cana-de-açúcar provenientes das Canárias para plantar em S. Domingos, a actual República Dominicana.

A cultura de cana encontrou no novo continente excelentes condições para se desenvolver, e não foram precisos muitos anos para que, em praticamente todos os países recém-colonizados, os campos se cobrissem de cana-de-açúcar. Os navegadores portugueses apostaram nos solos férteis das terras brasileiras para instalar plantações de cana. Os solos eram férteis, o clima o mais adequado e o sucesso foi elevado e, por volta de 1580, existiam no Brasil cerca de 115 engenhos, a funcionar com a mão-de-obra de 10 000 escravos. Nesta época, na Europa, o

açúcar era um produto de tal maneira cobiçado que foi apelidado de “ouro branco”, tal era a riqueza que gerava.

Em 1747, o químico alemão Andreas Marggraf desenvolveu uma alternativa ao açúcar de cana conseguindo produzir açúcar cristalizado a partir de suco extraído de raízes de beterraba. O discípulo de Marggraf, Franz Carl Achard, instala, em 1796, a primeira refinaria de açúcar de beterraba da Europa. O açúcar obtido não tinha, no entanto, a qualidade desejável, sendo ainda bastante caro.

A Primeira Guerra Mundial trouxe graves problemas. Os bombardeamentos destruíram muitas das refinarias de açúcar de beterraba europeias e foram grandes as dificuldades em obter mão-de-obra e matérias-primas. No entanto, bastaram alguns anos para a produção recuperar. Em 1920, a produção de açúcar de beterraba corria tão bem que se gerou uma crise e os preços acabaram por cair. Em 1937 realizou-se um acordo para regular o mercado de açúcar e foi criado o Conselho Internacional do Açúcar, e em 1968 viria a nascer o mercado comum do açúcar, que tornou a Comunidade Europeia o maior produtor de açúcar de beterraba do mundo.

Hoje, entre 131 países produtores de açúcar, 79 produzem açúcar de cana-de-açúcar e fornecem 3/4 da produção mundial de açúcar. O maior produtor é o Brasil, seguido pela Índia. O açúcar tornou-se um alimento comum à dieta de todos os países, constituindo uma fonte de energia de fácil e rápida assimilação. Consumido com moderação contribui para uma dieta equilibrada, proporcionando um sabor agradável aos alimentos. Para além disso, o sabor doce é um dos mais apreciados pelo ser humano, o que torna o açúcar um dos alimentos capazes de oferecer momentos de bem-estar e de prazer. [2]

2.1.2 Refinação

O produto obtido nas fábricas de açúcar de cana, açúcar bruto, não apresenta uma qualidade suficiente, sob o ponto de vista químico e microbiológico, para ser comercializado directamente para consumo humano.

Assim, o açúcar bruto deve ser purificado para obter a qualidade desejada. Esta purificação é efectuada num processo denominado Refinação.

O açúcar bruto é transportado a granel das fábricas de açúcar para as refinarias. Nas refinarias o açúcar bruto é armazenado em silos, normalmente na forma de capela. Dos silos o açúcar é transportado por tapetes de banda para a secção de Afinação. [3]

Na Afinação o açúcar bruto é misturado com xarope de afinação (inicialmente com água) a 76 °C, produzindo-se o magma de afinação. Este magma é então centrifugado em centrífugas descontínuas de alta velocidade. Na centrifugação o açúcar separado nas redes é lavado com água quente. O açúcar obtido na centrifugação, o açúcar afinado, é dissolvido com água quente ou águas doces obtendo-se o licor de afinação.

O xarope separado nas centrífugas, o xarope de afinação, é usado para formação do magma de afinação. O excesso de xarope de afinação é enviado para a secção de Recuperação.

Devido ao alto teor de substâncias em suspensão no licor de afinação, este deve ser clarificado antes das etapas de Descoloração e Cristalização. Esta clarificação pode ser efectuada usando um de três processos:

- Filtração;
- Carbonatação;
- Fosfatação.

No primeiro processo, adiciona-se ao licor de afinação um auxiliar de filtração e é efectuada uma filtração através e uma pré-camada de auxiliar de filtração em filtros de placas, membranas ou rotativos. Este processo não é económico para grandes capacidades e grandes conteúdos de substâncias em suspensão no licor.

Na Carbonatação a filtração do licor de afinação é efectuada através de um precipitado de carbonato de cálcio. O precipitado é obtido fazendo reagir hidróxido de cálcio, adicionado ao licor de afinação, com anidrido carbónico obtido das caldeiras de produção de vapor. Durante a precipitação algumas impurezas de alto peso molecular existentes no licor são co-precipitadas com o carbonato de cálcio. Depois da formação do precipitado, este é filtrado em filtros de placa, membrana ou rotativos.

Na fosfatação obtém-se um precipitado fazendo reagir o hidróxido de cálcio, misturado ao licor de afinação, com ácido fosfórico. O fosfato de cálcio formado é misturado com ar favorecendo a sua flutuação no licor. Para aumentar a separação de corantes aniônicos são usualmente adicionados polímeros catiónicos. A separação do precipitado formado é efectuada em clarificadores.

O licor clarificado é então descolorado antes de ser concentrado e cristalizado. Os principais sistemas de descoloração são:

- Por resinas de permuta iónica;
- Por carvões adsorventes (em pó ou granulados);
- Por oxidação (peróxido de hidrogénio ou ozono).

O licor final é então concentrado em evaporadores de múltiplo efeito (normalmente dois efeitos). O licor obtido, licor concentrado, é então cristalizado para se obter o açúcar branco.

Para se obter o açúcar branco o licor concentrado é normalmente cristalizado em três etapas (três cozeduras).

As massas cozidas obtidas nestas cristalizações são centrifugadas em centrífugas de alta velocidade onde os cristais de açúcar são separados do xarope mãe da cristalização.

O açúcar saído das centrífugas, com uma humidade de cerca de 1,5%, é seco em secadores com uma corrente de ar quente. O açúcar seco é então condicionado em silos para libertar a humidade ligada. Depois do condicionamento, o açúcar é peneirado e/ou classificado antes de ser comercializado a granel, em contentores de 1 tonelada, em sacos de 50 kg, em pacotes de 1 ou 2 kg, em saquetas ou noutra forma. [3]

2.1.3 Monossacarídeos

Os monossacarídeos (oses) são os açúcares simples, sendo geralmente cristalinos, doces e solúveis em água, de fórmula estrutural geral $[CH_2O]_n$, sendo o número de carbonos superior a 2 ($n > 2$). Quimicamente estes compostos possuem diversos grupos hidroxilo (-OH), podendo ser poli-hidroxialdeídos (aldoses) ou poli-hidroxicetonas (cetoses), dependendo do grupo funcional que contêm, aldeído ou cetona, respectivamente.

São moléculas não hidrolisáveis e redutoras (grupos aldeído e cetona podem sofrer oxidação), sendo classificadas de acordo com o número de átomos de carbono. O gliceraldeído (aldotriose) e a di-hidroxiacetona (cetotriose) são os monossacarídeos mais pequenos com apenas 3 átomos de carbono ($C_3H_6O_3$).

No entanto, as oses mais comuns e importantes nos seres vivos são as aldopentoses e as aldo-hexoses com 5 e 6 átomos de carbono, respectivamente. As hexoses que se destacam pela sua importância são a glicose e frutose, que obedecem à fórmula de estrutura geral $C_6H_{12}O_6$ e são as principais fontes de energia dos seres vivos. Estas biomoléculas são ricas em energia, constituindo os principais combustíveis celulares. O monossacarídeo mais abundante é a glicose, que se encontra presente no mel, uvas e outros frutos, assim como no sangue. [4]

2.1.3.1 Glucose

A glicose, glucose ou dextrose, um monossacarídeo, é o hidrato de carbono mais importante na biologia. As células usam a glucose como fonte de energia e intermediário metabólico. [5]

A glucose é um dos principais produtos da fotossíntese e inicia a respiração celular em procariontes e eucariontes. É um cristal sólido de sabor adocicado, de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, encontrado na natureza na forma livre ou combinada.

No metabolismo, a glucose é uma das principais fontes de energia e fornece 4 calorias de energia por grama. A glucose hidratada (como no soro glicosado) fornece

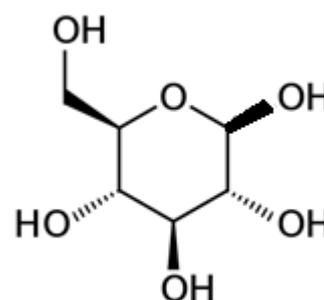


Figura 2.1 – Estrutura da Glucose.

3,4 calorias por grama. A sua degradação química durante o processo de respiração celular dá origem a energia química (armazenada em moléculas de ATP - aproximadamente 30 moléculas de ATP por moléculas de glucose), gás carbónico e água.

A glicose contém seis átomos de carbono e um grupo aldeído e é, conseqüentemente, referida como uma aldohexose. A molécula de glicose pode existir numa forma de cadeia aberta (acíclica) e anel (cíclica). Em solução aquosa as duas formas estão em equilíbrio, e em pH 7 a forma cíclica é predominante. Como o anel contém cinco átomos de carbono e um átomo de oxigénio, o que lembra a estrutura do pirano, a forma cíclica da glucose também é referida como glucopiranoose. Neste anel, cada carbono está ligado a um grupo hidroxilo lateral com excepção do quinto átomo, que se liga ao sexto átomo de carbono fora do anel, formando um grupo CH_2OH .

2.1.3.2 Frutose

Frutose, também conhecida como açúcar das frutas, é um monossacarídeo ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), com os carbonos dispostos em anel. [6]

É também conhecida como levulose, pois uma solução saturada é capaz de transformar luz linearmente polarizada em luz circularmente polarizada, com rotação óptica para esquerda. É mais doce que a sacarose, que é o açúcar refinado comum, encontrado na cana-de-açúcar.

Como possui um grupo cetona como grupo característico, a frutose é considerada uma cetose. Como possui 6 carbonos, é considerada uma hexose. É, portanto, uma ceto-hexose. Tem uma estrutura em anel pentagonal com dois grupos hidroxi-metilo.

No organismo humano, a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato pela hexocínase, seguindo, posteriormente, para a glicólise onde é metabolizada a ATP. No fígado, contudo, a frutose é transformada em gliceraldeído-3-fosfato e só depois

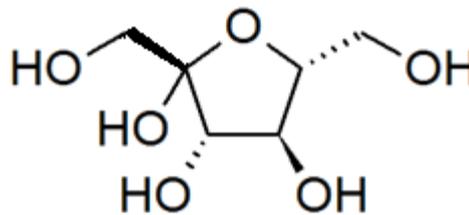


Figura 2.2 – Estrutura da Frutose.

entra na via glicolítica. Desta forma, entra depois do maior ponto de regulação da actividade glicolítica, a reacção catalisada pela cínase da frutose fosforilada. Assim, um consumo excessivo de frutose leva a uma saturação da via glicolítica, o que leva à formação de elevadas quantidades de acetil-CoA o que aumenta a biossíntese de ácidos gordos, provocando acumulação de gorduras no tecido adiposo.

A frutose e a glicose estão fortemente presentes nas uvas, e são a base química do vinho. A acção de leveduras sobre estes açúcares (e nunca sobre sacarose) faz a transformação dos açúcares em álcool etílico e gás carbónico.

Assim como a glucose, a frutose também se apresenta em duas formas: cadeias abertas (acíclicas) e cadeias fechadas (hemiacetal).

Em solução aquosa, a forma tautomérica predominante é a beta-D-frutopiranosose (73% a 20 °C), seguida da forma beta-D-frutofuranose (20%).

Em forma cristalina, a análise de raio X mostra que a forma adoptada é a beta-D-frutopiranosose. [7]

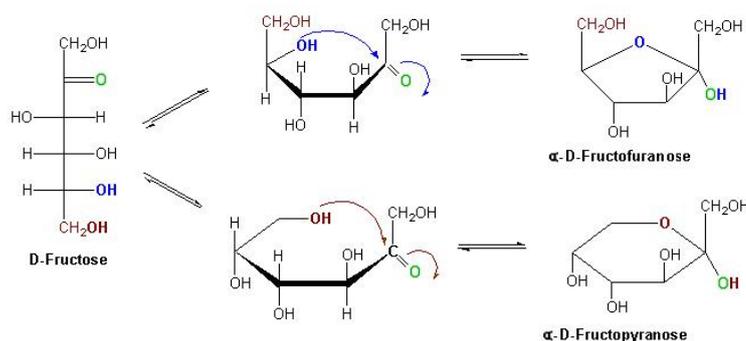


Figura 2.3 - Relação entre os isómeros da frutose em forma acíclica e cíclica (hemiacetal).

2.1.4 Dissacarídeos

As moléculas de dissacarídeo são relativamente pequenas e solúveis em água, podendo alterar o equilíbrio osmótico das células. São também a principal forma de transporte dos hidratos de carbono.

Exemplos de dissacarídeos importantes e comuns são a sacarose, maltose e a lactose.

2.1.4.1 Sacarose

É um dissacarídeo formado pela união de uma molécula de glicose e uma de frutose através de uma ligação glicosídica,. Encontra-se em abundância na cana-de-açúcar, frutas e beterraba. [8]

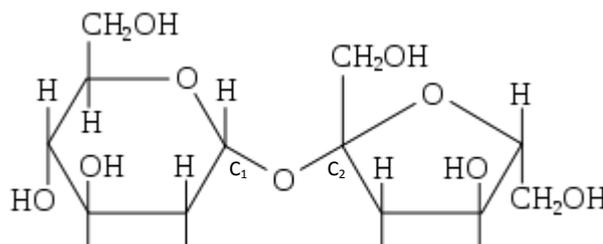


Figura 2.4 – Estrutura da Sacarose.

A sacarose, o açúcar comum comercial, é hidrolisada com grande facilidade por ácidos diluídos, resultando de uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, que é levogira, porque a frutose possui rotação específica negativa ($-92,4^{\circ}$) mais alta do que a rotação específica positiva da glicose ($+52,7^{\circ}$). A reacção é chamada de inversão e é estritamente monomolecular, isto é, a fracção da sacarose presente, cindida por unidade de tempo, é constante. Assim, a velocidade da reacção depende exclusivamente da concentração de sacarose.

A sacarose não é um açúcar redutor. Isso significa que os dois grupos redutores dos monossacarídeos que a formam estão envolvidos na ligação glicosídica, ou seja, o átomo de carbono C_1 da glicose e C_2 da frutose devem participar da ligação.

2.1.4.2 Maltose

A maltose é a principal substância de reserva da célula vegetal, é também a junção de duas moléculas de glicose. Ao realizar a digestão o amido passa a ser primeiramente maltose e depois glicose. A maltose é

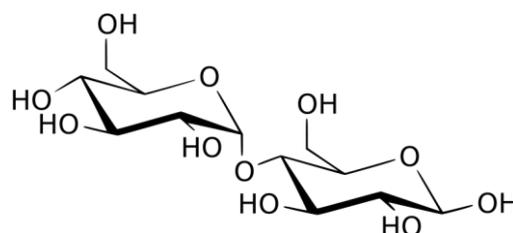


Figura 2.5 – Estrutura da Maltose.

encontrada em vegetais, e tem função energética. [9]

2.1.4.3 Lactose

Lactose (galactose β -1,4 glucose) é um tipo de glicídio que possui ligação glicosídica. É o açúcar presente no leite e seus derivados. A lactose é formada por dois hidratos de carbono menores, chamados monossacarídeos, a glicose e a galactose, sendo, portanto, um dissacarídeo. [10]

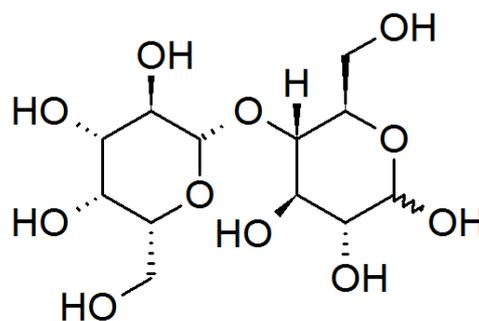


Figura 2.6 – Estrutura da Lactose.

O leite humano contém de 6-8% de lactose e, o de vaca, de 4-6%.

É fracamente doce. As leveduras não a fermentam, mas podem ser adaptadas para fazê-lo. Lactobacilos transformam a lactose em ácido láctico.

2.1.5 Açúcar no organismo

Juntamente com o oxigênio, os açúcares são a principal fonte de energia da células do corpo, indispensável a todas as reações metabólicas que fazem o corpo funcionar. O açúcar da cana é uma fonte de energia rápida, de utilização imediata. O consumo de açúcar, em doses adequadas, também favorece a liberação de substâncias que produzem sensação de bem estar. [11]

No entanto, o açúcar não usado pelo organismo será armazenado no corpo, criando depósitos de gordura e aumentando o nível de açúcar no sangue. Por isso, o consumo excessivo do alimento está relacionado ao aumento da obesidade, da diabetes e da síndrome metabólica, um conjunto de distúrbios que aumenta o risco de doenças cardíacas.

Um ponto negativo do excesso de consumo de açúcares é a sobrecarga no pâncreas para produção de insulina¹, que mantém os níveis de glicose controlados no sangue. Esta deficiência pode levar à diabetes tipo 2. O consumo exagerado de

¹ O pâncreas é órgão responsável pela produção de insulina.

açúcar pode contribuir para elevar o nível de triglicéridos, gordura perigosa, que ao se acumular pode obstruir as artérias. O resultado pode ser a maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares.

A figura 2.7 mostra, esquematicamente, a regulação da concentração de glicose no sangue, face a uma elevada ou a uma reduzida taxa de glicose.

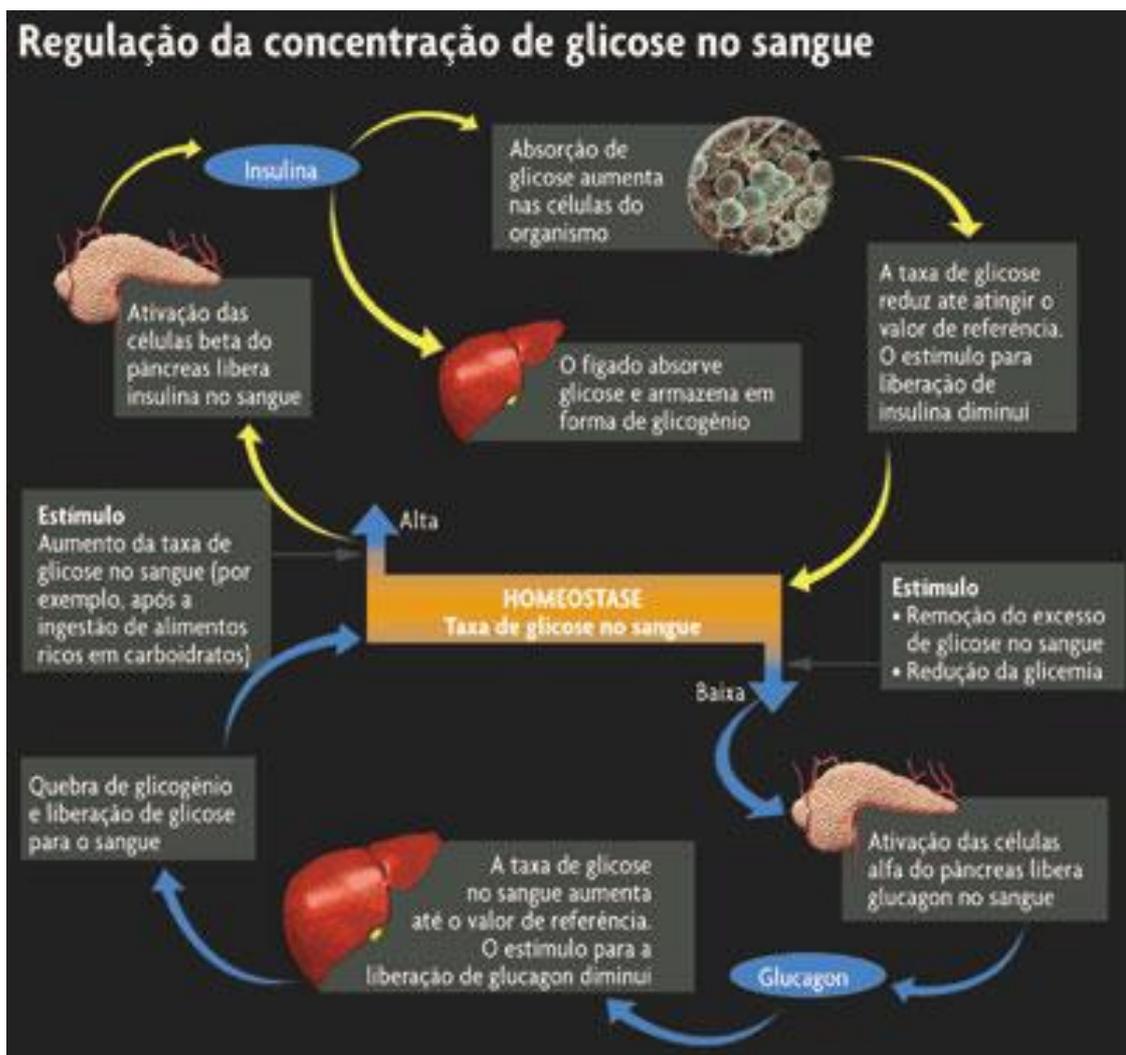


Figura 2.7 – Regulação da concentração de glicose no sangue, face a uma elevada ou a uma reduzida taxa de glicose. Figura adaptada de [<http://revistaescola.abril.com.br/ensino-medio>].

2.2 Cromatografia

Devido a facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise. [12]

Sendo a cromatografia um método físico-químico, ela fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária, designada por fase móvel. [13, 14]

Atribuída ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, a descoberta da cromatografia como técnica analítica ocorreu em 1906, quando este descreveu a sua experiência na separação dos componentes de extrato de folhas. Neste estudo o botânico conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas, onde usou uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação de componentes em faixas coloridas, este fato deu origem ao nome de cromatografia (*chrom* = cor e *grafie* = escrita) embora o processo não dependa da cor. Apesar de estudos semelhantes terem sido desenvolvidos, Tswett foi o primeiro a compreender e interpretar este processo como é aceite atualmente, utilizando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna. [14]



Figura 2.8 – Botânico russo Mikhael Semenovich Tswett.

A técnica cromatográfica foi praticamente ignorada até a década de 30 quando foi redescoberta por Kuhn e Lederer que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, utilizando uma montagem semelhante à de Tswett, com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. A partir daí a cromatografia foi aperfeiçoada e, em conjunto com os avanços tecnológicos, foi levada a um alto grau de sofisticação que resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. [12, 13]

2.2.1 Mecanismos de separação

A separação em cromatografia líquida de alta eficiência pode ocorrer por partição, absorção, troca iónica, fase ligada ou por exclusão.

Líquido-líquido ou partição

Com a finalidade de obter a separação de aminoácidos, Martin e Synge, em 1941 desenvolveram a cromatografia líquido-líquido (CLL), utilizando como fase estacionária água em sílica e como fase móvel clorofórmio. Este método é preferencialmente utilizado na separação de compostos não-iónicos, polares e que apresentem baixo a moderado peso molecular. [15]

O método consiste de uma fase estacionária líquida que por adsorção física é retida na superfície da coluna empacotada, geralmente com sílica, e de uma fase móvel, também líquida, que passa sobre esta fase estacionária sendo uma destas polar e a outra apolar. A separação baseia-se na solubilidade da amostra em relação ao solvente (fase móvel) e à fase estacionária, sendo assim os componentes da amostra que são mais solúveis na fase móvel são eluídos primeiro enquanto os que têm maior afinidade com a fase estacionária são selectivamente retidos por ela. [15, 16, 18]

A desvantagem da cromatografia liquido-liquido, que pode acarretar a deterioração da coluna, é a solubilidade da fase estacionária na fase móvel, ocasionando a não reprodutibilidade nas separações repetitivas. A fim de solucionar este problema pode-se saturar a fase móvel com a fase estacionária através de uma pré-coluna que contenha um percentual elevado da substância que compõe a mesma, disposta antes do injector; ou também ligar a fase estacionária quimicamente ao material de suporte. [16]

A CLL pode ser dividida em cromatografia líquido-líquido normal (onde a fase estacionária é polar e a fase normal é apolar) e em cromatografia com fase reversa (fase estacionária apolar e fase móvel polar). As fases móveis e estacionárias mais utilizadas nestes métodos estão descritas na tabela 2.1. [18]

Tabela 2.1 - Fases móveis e estacionárias mais utilizadas na CLL

Fases estacionárias	Fases móveis
	<i>Normal</i>
β , β' -oxidipropionitrila Carbowax (400, 600, 750, etc.) Glicóis (etileno, dietileno) Ciano-etil-silicone	Hidrocarbonetos saturados: hexano e heptano; solventes aromáticos: tolueno e xileno; hidrocarbonetos saturados misturados (até 10%) com dioxano, metanol, etanol, clorofórmio, cloreto de metileno.
	<i>Fase reversa</i>
Esqualano Zipax-HCP Ciano-etil-silicone	Água e misturas álcool-água; acetonitrilo e misturas acetonitrilo-água

Cromatografia Líquida com Fase Ligada

Tendo por objectivo solucionar o problema da perda da fase estacionária da CLL surgiu a cromatografia líquida com fase ligada (CLFL), na qual a fase estacionária está quimicamente ligada à superfície de um suporte eliminando, assim, o problema da solubilidade desta na fase móvel. [16]

Nesta forma de cromatografia as fases monoméricas e poliméricas ligam-se a uma vasta gama de materiais de suporte. As fases ligadas são geralmente preparadas por reacções de silanização. Na superfície da sílica que foi completamente hidrolisada, por aquecimento com HCl 0,1M por um dia ou dois, forma-se grupos silanóis, estes grupos, posteriormente, irão reagir com cloro-silanos substituídos formando as fases estacionárias quimicamente ligadas (sendo cloro-metil-silano amplamente utilizado), como pode ser visto na figura 2.9. [18]

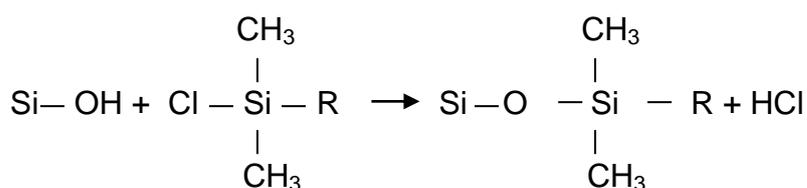


Figura 2.9 - Reacção de silanização de um cloro-silano substituído com silanol.

De acordo com o grupo funcional que está ligado ao radical R é que se classifica quanto a fase normal, quando este é de natureza polar, e fase reversa quando este é de natureza apolar. Na tabela 2.2 estão descritas as principais substâncias utilizadas como radical R tanto em fase normal como em fase reversa. [15]

Tabela 2.2 - Principais radicais R utilizados nas fases estacionárias de cromatografia líquida com fase ligada

Fase normal	Fase reversa
- C ₂ H ₄ CN (ciano)	Cadeia C ₈ (- octil)
-C ₃ H ₆ OCH ₂ CHOHCH ₂ OH (diol)	Cadeia C ₁₈ (-octildecil)
-C ₃ H ₆ NH ₂ (amina)	
-C ₃ H ₆ N(CH ₃) ₂ (dimetilamina)	

Os grupos silanóis que não reagiram podem absorver moléculas polares, levando a mudanças nas propriedades cromatográficas da fase ligada na cromatografia com fase reversa, já que esta apresenta a fase estacionária apolar, ou também pode ocorrer a formação de caudas nos picos cromatográficos, particularmente com solutos básicos. Estes efeitos podem ser reduzidos pela inactivação de grupos silanóis que são funcionalizados pela reacção com trimetilcloro-silano, que em função do seu tamanho menor, tem a capacidade de se ligarem a muitos grupos silanóis. [18,15]

Líquido-sólido ou adsorção

Sendo introduzida inicialmente por Stwett no início do século XX, a cromatografia líquido-sólido (CLS) é a forma mais clássica da cromatografia líquida e devido a recentes adaptações tornou-se a mais importante técnica de separação dos métodos de HPLC. [15]

Este tipo de cromatografia baseia-se na competição entre as moléculas do soluto e do solvente pelos sítios activos do adsorvente, estando relacionada com a

interacção entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto. [19] Primeiramente uma molécula da fase móvel passa a ser deslocada da superfície para que possa ser adsorvida pela fase estacionária, levando em consideração que esta possui uma superfície polar, terá pouca afinidade com grupos apolares que não serão retidos por não terem sido deslocados da fase móvel. [16]

As fases estacionárias devem permitir a interacção diferencial com os componentes da amostra a serem separadas. Os grupos que são capazes de formar pontes de hidrogénio serão fortemente retidos pela superfície do adsorvente assim como as moléculas polarizáveis que irão apresentar a interacção dipolo dipolo-induzido, portanto o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional, sendo que compostos que contêm grupos funcionais polares serão fortemente retidos pelo adsorvente polar e, portanto, eluídos por último, enquanto que com os solutos apolares ocorrerá o contrário. [15, 16, 19]

Geralmente usa-se como adsorvente, um sólido activo com grande área superficial, os mais comumente usados são a sílica e a alumina. Um aspecto que deve ser considerado é que adsorventes muito activos podem adsorver irreversivelmente o soluto sendo que a sílica que é ligeiramente ácida pode reter fortemente solutos básicos e a alumina que é básica não deveria ser usada em cromatografia de compostos sensíveis a bases. [18]

A escolha do solvente é de extrema importância neste método devido ao facto deste competir com o soluto pelos sítios activos do adsorvente, pois quanto mais forte a interacção da fase móvel com a estacionária, menor a adsorção do soluto. Os solventes são classificados de acordo com sua série eluotrópica, ou seja, a sua capacidade de absorção, que são utilizadas na escolha do melhor solvente a ser utilizado para uma determinada separação. Este também deve ser puro, pois impurezas podem afectar tanto a eficiência da coluna como a detecção. [18]

Cromatografia por troca iónica

A cromatografia por troca iónica é um método de absorção que se baseia na interacção electrostática entre o soluto e a fase estacionária, buscando o equilíbrio de troca entre iões em solução e iões de mesmo sinal na superfície de um sólido que deve ser insolúvel e de alto peso molecular. A amostra a ser separada é geralmente uma solução aquosa contendo iões orgânicos e inorgânicos. Na superfície da fase estacionária catiões e aniões são covalentemente ligados e iões são trocados com a fase móvel, separando assim os iões que não interagem com a resina daqueles que se ligam com os grupos carregados. [15, 19]

A fase estacionária utilizada neste método, geralmente, é uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno à qual são ligados os grupos iónicos. As trocas podem ser catiónicas ou aniónicas o que depende da natureza da fase estacionária. Os sítios activos mais comuns para as resinas permutadoras de catiões são o grupo ácido sulfónico $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, um ácido forte, e o grupo ácido carboxílico $-\text{COO}^-\text{H}^+$, um ácido fraco. E para os trocadores de aniões são os que contêm grupos amina terciárias $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$, base forte, e amins primárias $-\text{N}^+\text{OH}^-$, base fraca. Os grupos iónicos possuem contra-íões que são deslocados por iões de carga similar da fase móvel. Nas trocas catiónicas, as resinas possuem sítios activos negativos e contra-íões com carga positiva, de forma que os catiões da resina sejam trocados pelos catiões da amostra. Nas trocas aniónicas, ocorre o contrário, os sítios activos da resina têm carga positiva e o contra-íão tem carga negativa permitindo a troca destes com a fase móvel. O esquema das trocas catiónicas e aniónicas pode ser visualizado na figura 2.10. [15, 16, 19]



Figura 2.10 - Esquema de troca iónica da Cromatografia por Troca Iónica

Através da alteração do pH ou aumento da troca iónica, que leva ao enfraquecimento das interacções electrostáticas, a fase móvel deve ser modificada, a fim de eluir o soluto da resina. [19]

Geralmente os compostos que são separados por este método são ácidos carboxílicos, bases orgânicas, peptídeos e aminoácidos, que podem ionizar-se em soluções com pH devidamente tamponado, bem como aniões inorgânicos e catiões metálicos ou complexos. [20]

Cromatografia por exclusão

Geralmente utilizada na separação de componentes de alto peso molecular, a cromatografia por exclusão (CE) baseia-se na separação de acordo com o tamanho efectivo das moléculas. Este método é subdividido em cromatografia por filtração em gel (GFC) e cromatografia com permeação em gel (GPC). A GFC é utilizada na separação de espécies solúveis água (polares) sendo a fase estacionária hidrofílica, na GFC os solventes utilizados são orgânicos apolares e fases estacionárias hidrofóbicas, o que torna o método complementar, sendo que podem ser analisadas substâncias polares e apolares. [15, 18]

Pelo facto de não haver interacções físicas ou químicas entre o soluto e a fase estacionária, a CE difere dos demais métodos cromatográficos. O principal mecanismo de retenção das moléculas do soluto é a penetração diferenciada destas no interior das partículas do gel. A coluna é empacotada com matéria inerte com poros de tamanho controlado, ao entrar em contacto com a fase estacionária as moléculas pequenas ficam retidas no interior dos seus poros apresentando maior tempo de retenção e sendo eluídas mais lentamente pela fase móvel, enquanto que as moléculas maiores, que não conseguiram penetrar nos poros, são carregadas pela fase móvel, tendo, portanto, menor tempo de retenção. [15, 16, 18]

Utiliza-se este método na separação de materiais orgânicos e inorgânicos, mas a sua maior utilidade é no estudo de biomoléculas ou de compostos com alto grau de polimerização. O material utilizado no empacotamento da coluna deve ter estrutura rígida a fim de facilitar o empacotamento, e que sejam capazes de suportar as pressões elevadas da cromatografia líquida de alta eficiência. Geralmente o empacotamento da coluna para este método é feito por polímeros e partículas de sílica, ambos com diâmetro de 5 a 10 μ m. [15, 18]

2.2.2 Tipos de cromatografia

A classificação dos métodos cromatográficos pode ser quanto ao mecanismo de separação, quanto a técnica utilizada, e em relação ao tipo de fase utilizada. No entanto, a classificação mais popular é a que leva em consideração o tipo de superfície na qual ocorre a separação (figura 2.10), sendo dividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. [13]

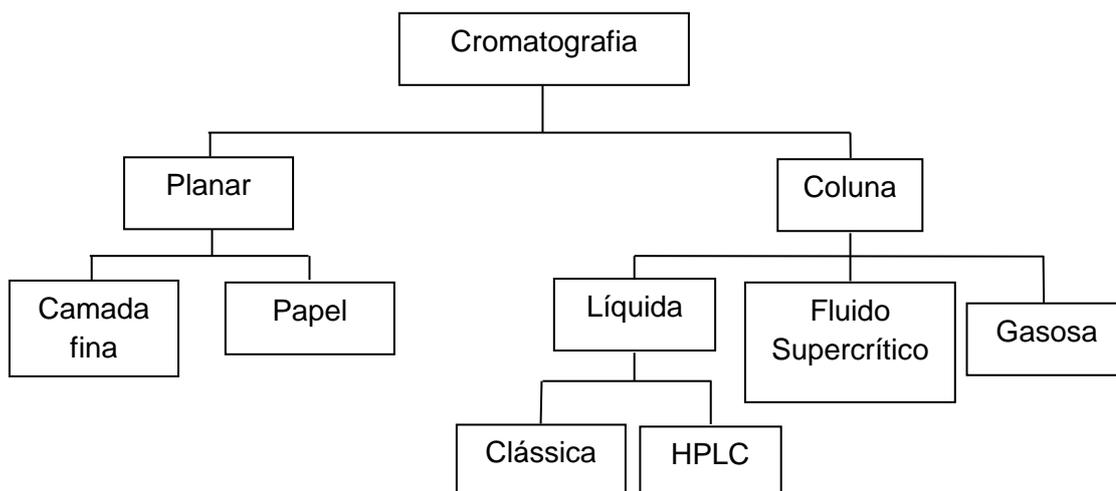


Figura 2.10 – Diagrama resumo dos tipos de cromatografia.

2.2.2.1 Cromatografia planar

A separação ocorre numa superfície plana, geralmente uma placa de vidro ou metal, impregnado com a fase estacionária ou então numa folha de papel embebida com um solvente apropriado. Este método divide-se em cromatografia em camada fina e cromatografia em papel. [13]

Cromatografia em camada fina

A cromatografia em camada fina é uma ferramenta para análises qualitativas rápidas e extremamente efectiva e conveniente para esse propósito. É também conveniente para o isolamento de pequenas quantidades de fracções de misturas complexas ou na purificação de substâncias. A fase estacionária é constituída de um sólido finamente dividido que reveste um material de suporte rígido e inerte de modo

que o processo de separação ocorre numa superfície plana, essencialmente bidimensional, ao conjunto denomina-se placa de cromatografia.

A cromatografia desenvolve-se com a fase móvel migrando através da fase estacionária por acção da capilaridade e a este processo chama-se corrida. Como a amostra interage com a fase móvel e a fase estacionária, à medida, que o solvente vai ascendendo na placa a amostra vai sendo arrastada pelo solvente numa velocidade que depende da atracção do soluto pela fase estacionária. Assim, diferentes solutos com diferentes interacções com a fase estacionária seriam arrastados a velocidades diferentes e, a partir de uma única mancha seria obtido um cromatograma com várias manchas, tantas quanto os componentes de mistura. [21]

A separação consiste no deslocamento diferencial sobre uma camada fina de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação fundamenta-se na adsorção, mas quando são utilizadas fases estacionárias tratadas pode ocorrer partição ou troca iónica, podendo então ser utilizada tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas. [22]

Cromatografia em papel

Classificada como cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a separação dos componentes está relacionada com as diferentes solubilidades relativas destes componentes nas fases móveis e estacionária. Os componentes que têm maior solubilidade na fase estacionária são selectivamente retidos e movimentam-se mais lentamente ao longo do papel, enquanto que os componentes com maior solubilidade na fase móvel movem-se mais rapidamente. [23]

É um método de separação em função do deslocamento diferencial de solutos arrastados por uma fase móvel, sendo retirados selectivamente por uma fase estacionária líquida, na cromatografia com fase normal. Uma mancha de amostra é depositada perto da base de um pedaço de papel filtro e este é colocado numa câmara de desenvolvimento. O solvente migra por capilaridade e os componentes movem-se a diferentes velocidades. [21]

Esta técnica utiliza pequena quantidade de amostra, tem boa capacidade de resolução e é preferencialmente aplicada na separação e identificação de componentes polares. [23]

2.2.2.2 Cromatografia em coluna

A separação ocorre no interior de um tubo de vidro ou metal. De acordo com o estado físico da fase móvel distingue-se a cromatografia gasosa, a cromatografia de fluido supercrítico e cromatografia líquida. [13]

Embora nas demais modalidades a unidade de separação possa ser preparada pelo usuário para fins de pesquisa ou redução de custos, não é prática aconselhável para aqueles que desejam executar experiências reprodutíveis. Nestes casos, produtos comerciais produzidos em série apresentam maior homogeneidade, o que se traduz em maior confiabilidade nos resultados.

Cromatografia gasosa

Neste método a fase estacionária pode ser sólida, com uma grande área superficial, ou líquida, onde uma película delgada líquida recobre um sólido inerte; e a fase móvel é um gás denominado gás de arraste, sendo este inerte tem a finalidade de transportar as moléculas a serem separadas. Assim, uma corrente de gás elui continuamente pela coluna e quando a amostra é vaporizada ela introduz-se nesta corrente sendo arrastada através da coluna. [13, 24]

Cromatografia com fluido supercrítico (CSC)

Neste método um gás ou um líquido no estado supercrítico é utilizado como fase móvel, possuindo propriedades do solvente que se situam entre as de um líquido e de um gás. Existe uma pressão na qual o líquido e o vapor estão como fases separadas, acima do ponto crítico, independente da pressão, existirá apenas uma fase que é chamada de fluido supercrítico. Quando comparada com a cromatografia líquida este método proporciona um aumento na resolução e na velocidade, pois o coeficiente de difusão do soluto é maior em fluidos supercríticos. Em relação à cromatografia gasosa este tem menor resolução e velocidade, mas é capaz de dissolver solutos não-voláteis. [13, 25]

Cromatografia líquida

A fase estacionária utilizada neste método, como na cromatografia gasosa, pode ser um sólido ou um líquido e como fase móvel utiliza-se um líquido no qual o soluto está dissolvido, assim, enquanto a fase móvel elui sobre a fase estacionária os solutos são separados de acordo com a interação destes com as fases, sendo eluído primeiro os que têm maior afinidade com a fase móvel e posteriormente os que têm maior afinidade com a fase estacionária. A cromatografia líquida pode ser dividida em:

Cromatografia líquida clássica (CLC): este método utiliza colunas com diâmetros relativamente grandes, empacotadas com fases estacionárias finamente divididas, pelas quais passam as fases móveis sob ação da gravidade. Separa misturas bastante complexas, porém é demorada e necessita que seja feito exame químico ou espectroscópico das frações colhidas.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): Utiliza colunas fechadas que contêm partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes, são utilizadas altas pressões para forçar a passagem do solvente e assim diminuir o tempo da análise.

2.2.3 HPLC

Sendo um dos mais novos e mais importantes membros das técnicas de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência tem aplicação indispensável em vários laboratórios. Ela utiliza equipamentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados.

Neste método são utilizadas pequenas colunas, nas quais uma fase móvel líquida elui sobre a fase estacionária que está em seu interior. Emprega-se alta pressão na separação dos componentes da amostra de forma a ser capaz de completar a análise em alguns minutos. [16, 26]

Inicialmente a cromatografia líquida utilizava colunas de vidro com diâmetro de 1 a 5 cm e comprimento de 50 a 500 cm, sendo o diâmetro das partículas das fases estacionárias sólidas geralmente entre 150 a 200µm, nestas condições o fluxo era muito baixo, da ordem de alguns décimos de milímetros por minuto, tornando os tempos de separação muito longos. Na tentativa de acelerar o processo foi utilizado bombeamento e aplicadas bombas de vácuo, o que não foi eficiente, pois o aumento do escoamento fazia com que aumentasse também a altura dos pratos teóricos. Alguns cientistas já haviam percebido, no início do desenvolvimento da cromatografia, que a diminuição das partículas da fase estacionária poderia aumentar a eficiência da coluna, mas somente nos anos 60 foi possível recheiar as colunas com partículas pequenas, necessárias para aumentar a resolução, e também, adquirir equipamentos que funcionam a alta pressão, o que é necessário para uma boa velocidade de eluição. [15, 16]

O avanço considerável da cromatografia líquida deu-se por volta de meados dos anos 60, sendo o primeiro cromatógrafo líquido de uso prático construído em 1964 por Csaka Horvath na Universidade de Yale. Este operava em pressões de até 1000psi (6897kPa ou 6897bar), com fase móvel em água tamponada passando por colunas de 1mm de diâmetro interno e com detector de espectrómetro de ultravioleta. As primeiras misturas separadas continham ácidos nucleicos. [18]

Diferenças entre a CLC e a HPLC

A cromatografia líquida clássica utiliza-se de um equipamento barato no qual o empacotamento da coluna é descartado, pois parte da amostra pode se adsorver de forma irreversível; a coluna deve ser cheia a cada separação acarretando desperdício de material e de mão-de-obra. O analista deve ser experiente e a eluição é feita pela acção da gravidade tornando o processo moroso. A quantificação e detecção são feitas pela análise manual das fracções individuais, o que requer muito tempo devido ao grande número de fracções colhidas, também pode ser usada alguma técnica que auxilie neste processo, como, espectrofotometria, análise química ou registo gravimétrico, e os resultados são registrados em forma de cromatograma, um gráfico da concentração da amostra versus o número da fracção. Estas etapas podem ser vistas na figura 2.11. [16, 26]

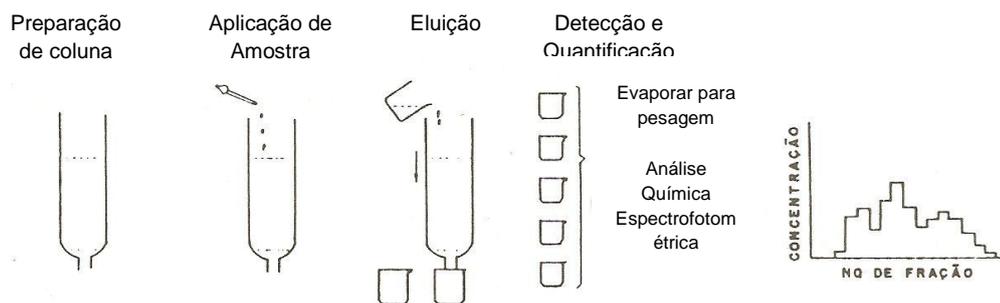


Figura 2.11 - Etapas da cromatografia líquida clássica

Na cromatografia líquida de alta eficiência (figura 2.12) o circuito é fechado, podendo ser utilizada inúmeras vezes. As colunas utilizadas são bastante eficientes, mas oferecem resistência à vazão da fase móvel necessitando a aplicação de sistemas de bombas de alta pressão, que fazem com que a velocidade da eluição aumente. As análises são mais precisas, pois a vazão da fase móvel é facilmente controlada. A injeção é feita com microsseringas ou através de válvulas de injeção e podem ser utilizados diversos tipos de detectores. Este método não necessita de tanta experiência do operador, tem alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade, mas dispõe de equipamentos caros e de alto custo de manutenção e operação. [16, 19]

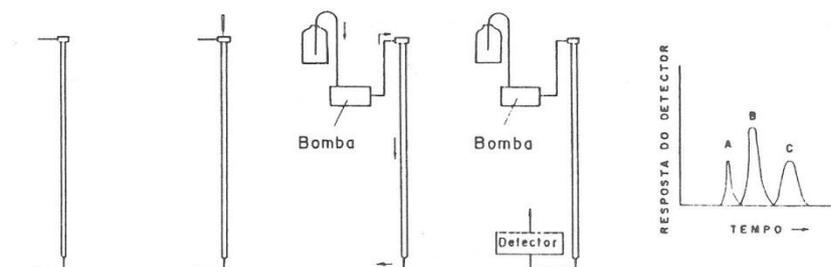


Figura 2.12 - Etapas da cromatografia líquida de alta eficiência

Comparação da CG com a HPLC

Na cromatografia gasosa as amostras devem ser voláteis, para que possam passar pela coluna na forma de vapor, e termicamente estáveis, a fim de que não se decomponham nas condições da separação. Isso faz com que somente gases e cerca de 20% dos compostos orgânicos possam ser analisados por este método

sem que suas estruturas sejam modificadas para aumentar a sua volatilidade. A amostra não deve interagir com a fase móvel, é por este motivo que a fase móvel é um gás inerte tendo como função somente carregar a amostra volatilizada. Neste método os equipamentos são mais baratos e o tempo de análise é reduzido. [16, 19, 26]

Na HPLC as amostras não precisam ser voláteis nem termicamente estáveis, basta que sejam solúveis na fase móvel, por isso tem uma maior aplicação. A amostra interage com as duas fases, o que faz com que tenha maior variedade de mecanismos de separação, enquanto que na CG a amostra só interage com a fase estacionária. Este método possui maior versatilidade, pois pode ocorrer a variação tanto na fase móvel como na fase estacionária, o que não ocorre na CG, pois a fase móvel é sempre um gás inerte. As principais características de ambos os métodos estão descritas na tabela 2.3. [19, 26]

Tabela 2.3 - Principais características da CG e HPLC

Parâmetros	CG	HPLC
Fase móvel	Gás inerte	Líquida
Fase estacionária	Líquida ou sólida	Líquida ou sólida
Tamanho da coluna	1,0 a 100,0m	Menor que 30,0cm
Fase do composto		
- Injectado	Gás ou líquido	Líquido
- Detectado	Gás	Líquido
Temperatura da coluna	100 a 300°C	De ambiente a 65°C
Identificação dos sinais cromatográficos	Tempo de retenção	Tempo de retenção
Quantidade mínima detectável	10 ⁻¹² g	10 ⁻⁹ g
Detectores mais usados	Ionização em chama ou captura de electrões	Absorbância do UV-VIS
Pratos teóricos por coluna	2.000 a 3000.000	500 a 25.000

2.2.3.1 Fases

Em HPLC pode-se distinguir fase móvel e fase estacionária. De seguida procede-se à classificação de cada uma das fases mencionada.

Fases Móveis

Para que um solvente possa ser utilizado como fase móvel na HPLC este deve apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação. Deve dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, para que estes sejam transportados pela coluna sem que haja modificação. Não deve dissolver a fase estacionária e deve ser compatível com o detector.

A fase móvel deve ter baixa viscosidade, pois isso irá interferir directamente na eficiência da separação, devido ao facto de solventes viscosos além de dificultarem a transferência de massa entre a fase móvel e a fase estacionária, também influenciarem na intensidade da vazão. [16]

Se durante a separação for utilizado um único solvente de composição constante a eluição é chamada de isocrática. Mas algumas amostras que são formadas de componentes que necessitam de uma separação por gradiente, para que esta seja mais eficiente, requerem mudança na composição da fase móvel durante a análise, com a variação da proporção entre os solventes, que geralmente diferem entre si na polaridade. A separação por gradiente tem as vantagens de reduzir o tempo de análise, aumentar a resolução e reproduzir sinais cromatográficos mais finos e mais simétricos. Mas também apresenta as desvantagens de aumentar o custo (já que necessita de bomba com misturador), não ser compatível com todos os detectores (como por exemplo, com o detector de índice de refração), ter menor estabilidade da linha de base pela variação da fase móvel e também pode degenerar a coluna, sendo necessário fazer a sua regeneração, pois a mudança na força da fase móvel, no início e no final da cromatografia, é elevada. [15, 26]

Uma fase móvel adequada é indispensável para a HPLC, por isso é necessário examinar factores que determinam a sua escolha, como a polaridade desta, que determina seu poder de eluição juntamente com a polaridade da fase estacionária e com a natureza dos componentes da amostra. Se a separação for com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade, se a

separação for em fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade. Outros factores que também devem ser considerados são o ponto de ebulição, a viscosidade, a compatibilidade com o detector e a toxicidade. [18]

Fases Estacionárias

As fases estacionárias a serem utilizadas na HPLC devem ter alta resolução entre os componentes da amostra, devem ser de fácil introdução na coluna, ter diâmetro uniforme e partículas porosas ou peliculares. [16, 26]

As partículas da fase estacionária podem ser classificadas quanto ao seu tamanho em: macropartículas (quando apresentam diâmetro entre 20 e 40 μ m) intermediárias (quando tem entre 20 e 10 μ m) e micropartículas (de 3 a 10 μ m). Quanto menor for a partícula, maior será a eficiência da separação, melhorando assim o processo de difusão das moléculas da amostra dentro e fora das partículas, pois partículas menores reduzem a distância de contacto do soluto com as fases estacionária e móvel, facilitando o equilíbrio e, conseqüentemente, melhorando a eficiência da coluna.

Elas podem ser de formato esférico, também chamado de regular, e de formato irregular, sendo que as regulares são mais eficientes por oferecerem um enchimento mais uniforme e mais reprodutível da coluna e por esse motivo são mais caras. [19, 26]

De acordo com a natureza das fases móvel e estacionária pode-se classificar o processo como: cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa:

- **Cromatografia em fase normal:** neste método a fase estacionária utilizada é polar e a fase móvel é apolar, em relação à eluição, os solutos mais apolares são eluídos primeiramente, enquanto que os polares são retidos pela fase estacionária e são eluídos por último. [18]
- **Cromatografia com fase reversa (FR):** a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, portanto os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente. [18]

Sendo o material mais utilizado como empacotamento de colunas a sílica, que consiste principalmente em dióxido de silício (SiO_2) com o átomo de silício no centro de um tetraedro, sendo a valência remanescente na superfície ocupada por um hidroxilo (-OH) (figura 2.13). Esta não deve ser utilizada em pH acima de 8,0, pois isso acarretaria a sua dissolução. Então, para a cromatografia de compostos básicos com pH entre 8,0 e 12,0 recomenda-se o uso de compostos poliméricos como poliestireno, ligado covalentemente à fase estacionária. [19, 25]

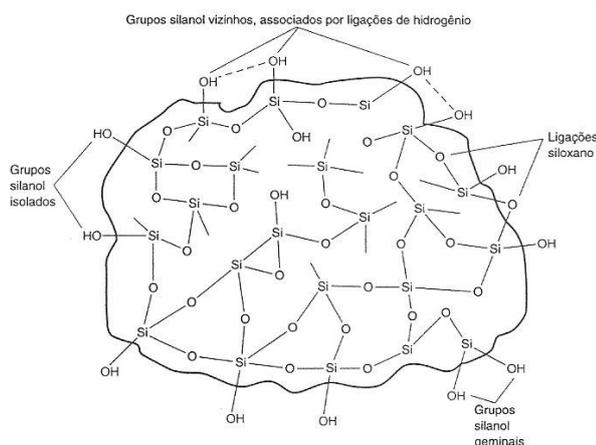


Figura 2.13 - Estrutura esquemática da sílica gel.

Uma superfície de sílica tem cerca de $8\mu\text{mol}$ de grupos silanol (Si-OH) por metro quadrado, em pH entre 2,0 e 3,0 estes encontram-se completamente protonados e numa ampla faixa de pH acima de 3,0 dissociam-se em Si-O^- , que se ficarem expostos podem reter fortemente bases protonadas (como RNH_3^+), provocando a formação de caudas nos sinais cromatográficos. [25]

A sílica sozinha pode ser usada como fase estacionária para a cromatografia de adsorção, já para sua utilização na cromatografia de partição esta deve estar quimicamente ligada, na qual dependendo do radical R esta pode ser utilizada como fase normal ou fase reversa. A fase estacionária de octadecil (C_{18}) é a mais utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência, sendo representada por ODS (octadecilsilano). [25] Alguns tipos de fases estacionárias para HPLC estão descritos na tabela 2.4.

Tabela 2.4 - Tipos de fases estacionárias para HPLC

Descrição	Polaridade/ interação
Octadecil (C ₁₈)	Altamente apolar
Octil (C ₈)	Moderadamente apolar
Etil (C ₂)	Fracamente apolar
Metil (C ₁)	Fracamente apolar
Fenil (PH)	Moderadamente apolar
Cicloexano (CH)	Moderadamente apolar
Cianopropil (CN)	Moderadamente apolar/polar
Diol (2 OH)	Polar
Sílica (Si)	Polar
Ácido Carboxílico (CBA)	Troca catiónica fraca
Ácido Propilsulfónico (PRS)	Troca catiónica forte
Ácido Benzenossulfónico (SCX)	Troca catiónica forte
Aminopropil (NH ₂)	Troca aniónica fraca/polar
Amina Primária/Secundária (PSA)	Troca aniónica fraca/polar
Dietilaminopropil (DEA)	Troca aniónica fraca/polar
Amina Quaternária (SAX)	Troca aniónica forte
Ácido Fenilborônico (PBA)	Covalente

Como fase estacionária, além da sílica, podem ser utilizados sólidos semi-rígidos, que geralmente são constituídos de partículas porosas de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno. Estes podem ser usados em HPLC por exclusão com fase móvel orgânica e ainda são muito utilizados na cromatografia por troca iónica. [20]

Na cromatografia líquido-sólido pode ser utilizada a alumina, além da sílica, podendo esta também ser utilizada na cromatografia líquido-líquido, assim como o vidro de porosidade controlada, carbono grafitizado, titânio, zircónio e sílica recoberta com zircónio.

2.2.3.2 Detectores

Tendo como função monitorizar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, o detector mede de forma contínua propriedades físicas ou físico-químicas da amostra, ou da solução que a contém enviando um sinal para registo que é, geralmente, directamente proporcional à concentração do componente na amostra. O detector ideal é aquele que apresenta as seguintes características:

- Possuir alta sensibilidade para detectar pequenas quantidades de amostra;
- Ser estável e insensível a variações de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- O sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra;
- Deve efectuar uma leitura contínua; [20, 27]

Os detectores dividem-se em duas grandes classes:

- Detectores de propriedades macroscópicas, que são aqueles que medem as alterações de propriedades físicas provocadas pelo soluto na fase móvel;
- Detectores de propriedades do soluto, que são aqueles que respondem a uma dada propriedade química ou física do soluto e são, idealmente, independentes da fase móvel.

Os tipos de detectores estão descritos na tabela 2.5. Em HPLC os detectores mais utilizados são os espectrofotométricos (UV ou fluorescência), condutométricos e refractométricos. [18, 28]

Tabela 2.5 – Detectores utilizados em HPLC

<i>Detector</i>	<i>Limite de detecção (ng)</i>	<i>Gradiente</i>	<i>Aplicação</i>
Ultravioleta	0,1-1	Sim	Selectivo
Índice de refração	100-1000	Não	Universal
Espalhamento de luz	0,1-1	Sim	Alta massa molar
Electroquímico	0,01-1	Não	Selectivo
Fluorescência	0,0001-0,01	Sim	Selectivo
Espectrometria de massas	0,1-1	Sim	Universal
Infravermelho com transformada de Fourier	1000	Sim	Selectivo

2.2.4 Identificação e quantificação

A identificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos com padrões.

Nestes padrões o componente em questão é eluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, tendo a formação de um pico num determinado tempo chamado de tempo de retenção, sendo assim os componentes são identificados pelo tempo de retenção. Os cromatogramas são gráficos do tempo em minutos pela resposta do detector.

Os padrões são obtidos comercialmente e são analisados em diferentes concentrações, formando assim uma curva de calibração. Esta trata-se de um gráfico da concentração do componente pela área do pico obtido. Através desta pode-se quantificar os componentes da amostra quando se obtém a área dos sinais cromatográficos.

2.3 Quantificação de hidratos de carbono

Para se estimar o teor de açúcares redutores e açúcares redutores totais em alimentos, existem vários métodos químicos não selectivos que fornecem resultados, com elevado grau de confiabilidade, quando utilizados correctamente após eliminação de interferentes.

Os métodos químicos clássicos conhecidos para a análise de açúcares redutores são na sua maioria fundamentados na redução de iões cobre em soluções alcalinas (solução de Fehling), mas também existem métodos fundamentados na desidratação dos açúcares, por uso de ácidos concentrados, com posterior coloração com compostos orgânicos, além da simples redução de compostos orgânicos, formando outros compostos de coloração mensurável na região do visível. [29]

2.3.1 Variantes

Entre os vários métodos quantitativos disponíveis para determinação de açúcares totais e de açúcares redutores estão: Musson-Walker; Lane-Eynon; Somogy e Nelson; métodos cromatográficos e métodos ópticos. [29]

O método Musson-Walker fundamenta-se na quantificação do precipitado de óxido cuproso formado após a redução de iões cobre bivalentes, em meio básico, pelos açúcares redutores (glicose e frutose). [30]

No método Lane-Eynon os iões cúpricos da solução de Fehling são reduzidos quantitativamente, sob ebulição, a óxido cuproso por titulação com solução de açúcar redutor. O ponto final é alcançado quando um pequeno excesso do açúcar redutor descolora o azul-de-metileno.

No método de Somogy e Nelson a glicose desproteínada da amostra reduz sal de cobre, em meio alcalino e a quente. A forma reduzida do sal de cobre actua sobre o reactivo molíbdico determinando o aparecimento da cor azul, cuja intensidade é proporcional ao teor de glicose da amostra. Sob a acção do calor, os açúcares redutores decompõem-se parcialmente em fragmentos oxidáveis pelo hidróxido cúprico, resultando em ácido oxálico, malónico, etc. Nesta reacção o

hidróxido cúprico (azul) reduz-se a hidróxido cuproso (amarelo). Continuando o aquecimento, o hidróxido cuproso perde uma molécula de água, transformando em óxido cuproso (vermelho). O óxido cuproso assim formado vai reduzir o reactivo molíbdico dando o óxido de molibdénio (Mo_3O_8) de coloração azul, cuja intensidade é proporcional a quantidade de glicose existente na amostra. [30]

No trabalho posteriormente descrito recorreu-se a métodos cromatográficos como meio de separação dos mono e dissacarídeos, e a métodos ópticos, nomeadamente ao índice de refração, como meio de identificação e quantificação dos açúcares.

2.3.2 Equipamento

A instrumentação básica de um cromatógrafo líquido consiste nos seguintes componentes (figura 2.14): Reservatório do solvente, bomba de alta pressão, misturador de solventes, injetor, microseringas, loop, coluna, detector, coletor de solvente, registador e sistema computadorizado para colheita de dados. [19]

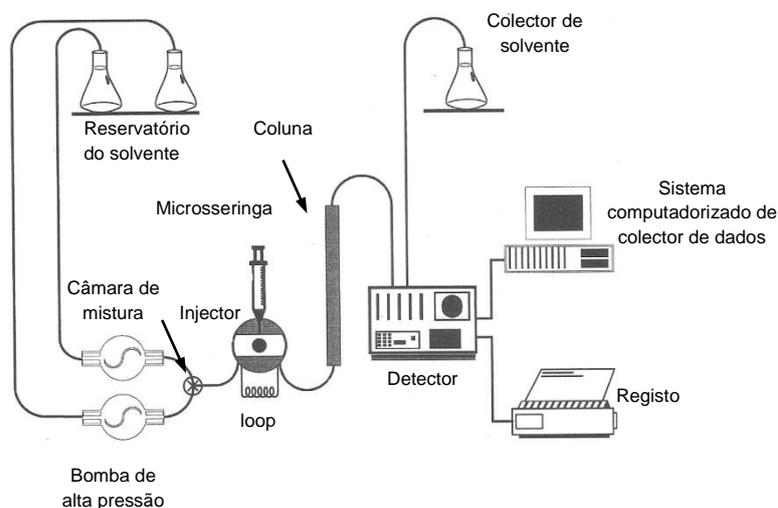


Figura 2.14 - Esquema do cromatógrafo líquido.

Sistema de abastecimento da fase móvel

O abastecimento da fase móvel é equipado com um ou mais reservatórios que podem ser de vidro (o próprio recipiente do solvente), de plástico (desde que este seja inerte), ou de aço inoxidável, sendo que este não é apropriado para fases

móveis tamponadas em pH baixo, pois poderá ocorrer a corrosão do recipiente. [15, 26, 31]

Fases móveis como a água e outros solventes polares têm tendência em dissolverem gases como oxigénio e nitrogénio e, se estes gases forem libertados dentro do equipamento, podem formar bolhas na coluna e, no sistema de detecção, estas bolhas podem causar o alargamento da banda e interferir na eficiência do detector. Por este motivo, os solventes devem ser desgaseificados, o que pode ser feito através de sistemas de bomba de vácuo, de sistemas de destilação, de dispositivos de aquecimento e agitação do solvente, sob a ação de ultra-som e também através do sistema de borbulhamento que geralmente é feito com gás hélio, por ser um gás inerte e de baixa solubilidade. [15, 31, 32]

Alguns sistemas contem também filtros com a finalidade de impedir que a poeira e partículas no solvente causem danos no sistema de bombeamento e de injeção e entupimento da coluna. Não necessariamente os desgaseificadores e filtros devem fazer parte do equipamento, um método bastante eficiente é passar os solventes em filtros “milipore” sob vácuo, antes de introduzi-los no recipiente, o que ocasiona a remoção dos gases e materiais em suspensão. [15, 16]

Programadores de fase móvel

Quando se utiliza a eluição por gradiente é necessária a mudança na composição da fase móvel, que é feita por programadores de fase móvel. Os solventes utilizados apresentam diferentes polaridades variando a percentagem destes em mistura binária, ternária ou quaternária, aumentando a força cromatográfica da fase móvel, fazendo assim, com que os sinais cromatográficos retidos eluam mais rapidamente. Também podem ser utilizados em misturas isocráticas, em que a fase móvel apesar de ter uma concentração contínua, é formada por mais de um solvente. Para que a programação seja automática são utilizados microcomputadores. Existem dois tipos de programadores: a baixa e a alta pressão. [20]

Nos programadores de baixa pressão (figura 2.15) os reservatórios de solventes estão dispostos em ordem crescente de polaridade e os solventes são misturados antes da bomba. O gradiente faz-se através de uma válvula ligada ao

reservatório do solvente, sendo que esta é programada para ficar aberta até que saia o volume desejado dos solventes, que serão misturados à pressão atmosférica numa câmara com agitação magnética, posteriormente são enviados a uma bomba de alta pressão, passando pelo injector, coluna e detector. [20]

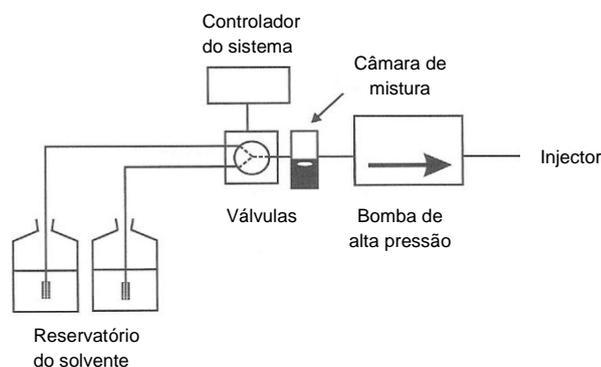


Figura 2.15 - Programador de fase móvel a baixa pressão

Nos programadores de alta pressão (figura 2.16) diferentes solventes alimentam diferentes bombas. A vazão de cada bomba é modificada para produzir os mais variados tipos de gradientes. Os solventes são liberados pelas bombas estando estes a alta pressão e vão para uma câmara de pequeno volume onde são misturados por agitação magnética, sendo encaminhados posteriormente ao injetor, coluna e detector. [20]

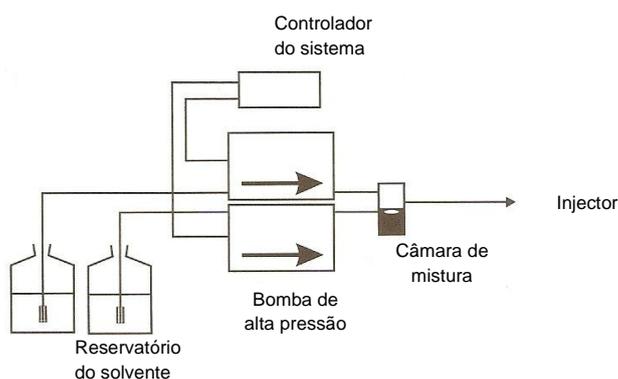


Figura 2.16 - Programador de fase móvel a alta pressão

Sistema de bombeamento

Devido ao facto de trabalhar com colunas de partículas muito reduzidas, a cromatografia líquida de alta eficiência necessita que o fluxo da fase móvel seja constante e a alta pressão o que se consegue através de um sistema de bombeamento eficaz. A utilização de alta pressão é necessária, pois as partículas exercem alta resistência ao fluxo da fase móvel e, se não fosse utilizada, a análise

seria muito lenta. O fluxo deve ser constante para garantir a reprodutibilidade, sensibilidade e resolução da análise. Utiliza-se também o sistema de bombeamento para fazer gradiente de eluição quando os compostos apresentam factor de separação muito próximo. [26]

Alguns aspectos importantes para o sistema de bombeamento são: pressão máxima de 600bars, vazão contínua, intervalos de vazão de 0,1 a 1mL/min, reprodutibilidade e constância da vazão de 1%. [16]

Tendo em consideração o desempenho e características de funcionamento, existem basicamente dois tipos de bombas, as pneumáticas e as mecânicas. [16]

Bombas pneumáticas

Neste tipo de bombas um gás inerte exerce uma pressão deslocando o líquido de forma contínua, a pressão pode ser directamente sobre o líquido ou sobre um recipiente onde o mesmo está contido. Estas bombas são baratas e fornecem um fluxo que não é sujeito a pulsações, sendo que o fluxo total depende do fluxo do gás e a pressão depende do gás usado e do recipiente. Ela pode ser vista na figura 2.17. [27]

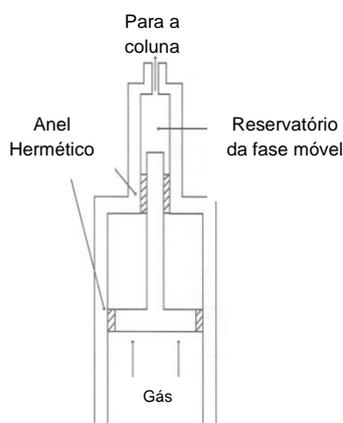


Figura 2.17 - Bomba pneumática.

Bombas mecânicas

As bombas mecânicas podem ser divididas em bombas recíprocas e bombas tipo seringa:

- **Bombas recíprocas:** Consiste de uma pequena câmara na qual o solvente é bombeado pelo deslocamento de um pistão controlado por um motor, desloca

fluxos de volume constante, porém de forma descontínua, ou seja, em pulsos. Esse tipo de bomba pode ser visto na figura 2.18. [15, 27]

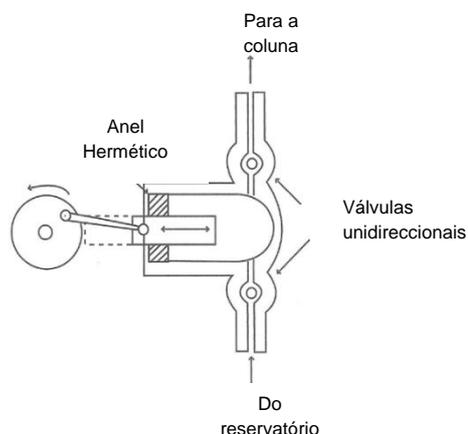


Figura 2.18 - Bomba recíproca.

- **Bombas do tipo seringa:** Também chamadas de bombas de deslocamento contínuo (figura 2.19), estas bombas são formadas por um pistão que se move por acção de um mecanismo de rosca, sustentado por um motor, o fluxo é contínuo e sem pulsações, porém tem capacidade total limitada, devendo parar para o enchimento após o fornecimento de uma quantidade relativamente baixa de solvente. [15, 32]

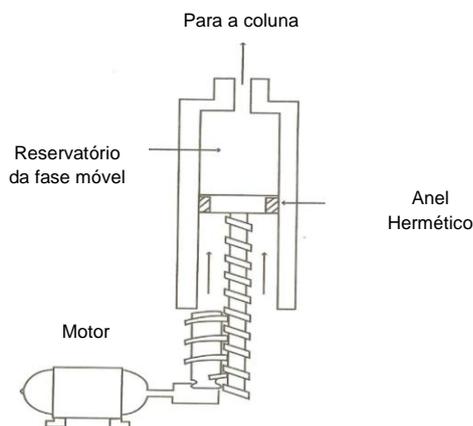


Figura 2.19 - Bomba do tipo seringa.

Medidores e controladores de pressão

Problemas no equipamento, como entupimentos ou vazamentos, podem ser diagnosticados pelos monitores de pressão, que também podem ser utilizados para

aperfeiçoar a separação. Podem ser utilizados dois tipos de medidores de pressão: Bourbon ou diafragma (figura 2.20) e transdutor de pressão (figura 2.21).

- **Bourbon ou diafragma:** no qual um tubo de aço inoxidável flexível preenchido com um líquido viscoso a baixa pressão, se expande com o aumento da pressão da fase móvel que vai da bomba para a coluna, essa expansão desloca o ponteiro acusando o aumento da pressão.

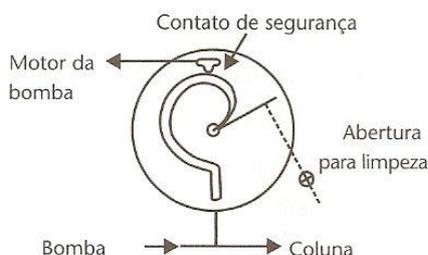


Figura 2.20 - Medidor de pressão Bourbon

- **Transdutor de pressão:** Ao ir da bomba para a coluna a fase móvel exerce uma pressão numa membrana, que é sentida no transdutor convertendo a pressão em corrente eléctrica, cujo valor é medido.

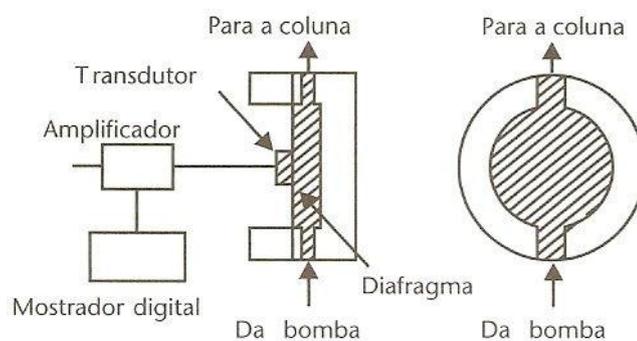


Figura 2.21 - Medidor de pressão do tipo transdutor de pressão.

Sistema de injeção da amostra

Para se obter uma boa eficiência em análises cromatográficas, um factor muito importante a se considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna. A injeção deve ser reproduzível e ter grandes variedades de volumes, assim como não deve introduzir bolhas. Esta parte do instrumento necessita de um cuidadoso desenho, pois devem resistir a altas pressões e as suas cavidades devem ser

completamente lavadas pela fase móvel. São duas as formas de injeção da amostra: com microseringas e com válvula rotatória, sendo esta de injeção automática. [20, 27]

O injetor do tipo seringa apresenta a vantagem de ser mais barato, porém é de baixa reprodutibilidade e necessita de um septo para evitar o retorno da amostra e do êmbolo para fora do injetor. O sistema de injeção mais utilizado é o da válvula rotatória, pois além de ser reprodutível, elimina o problema de retorno da amostra. Neste sistema o volume injectado não necessita ser preciso, pois a válvula rotativa tem um capilar de amostragem de volume fixo (*loop*) capaz de seleccionar volumes de 1 a 100 μL de amostra, sendo o excesso levado para fora do equipamento. Na figura 2.22 pode ser visualizado o método de injeção da amostra com a válvula rotatória. Na posição de carregar (figura 2.22 a) um determinado volume de amostra é carregado enquanto a fase móvel vai directa para a coluna, a rotação da posição geralmente é feita manualmente, assim na posição injectar (figura 2.22 b), mudam-se as conexões, fazendo com que a fase móvel passe pela alça de amostragem e arraste a amostra para a coluna. [20, 26]

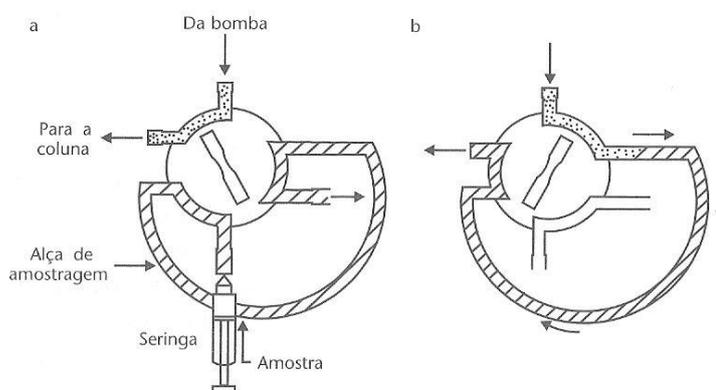


Figura 2.22 - Válvula rotatória de amostragem para HPLC: a) posição para carregar e b) posição para injectar.

Coluna

Num cromatógrafo líquido podem existir três tipos de colunas, a coluna de saturação, a coluna de guarda e a coluna analítica, como pode ser visto na figura 2.23.

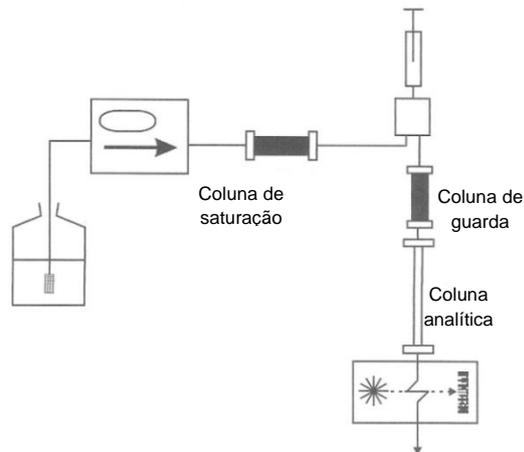


Figura 2.23 - Tipos de colunas utilizadas em HPLC.

Coluna de saturação

Também chamada de pré-coluna, é colocada entre a bomba e o injetor sendo usada para condicionar a fase estacionária. Muito empregue no passado quando se utilizava a cromatografia líquido-líquido com a finalidade de saturar a fase móvel com o líquido da fase estacionária, não sendo tão necessária actualmente devido ao grande desempenho das fases estacionárias quimicamente ligadas. Mas ainda pode ser utilizada quando se usam recheios à base de sílica e uma fase móvel que dissolve este material, tendo este efeito aumentado com o aumento da temperatura, polaridade, força iónica e pH da fase móvel, de modo que a fase móvel estando saturada com fase estacionária, não irá reagir com a fase estacionária contida na coluna. Pode ser usada também para reter impurezas da fase móvel a fim de preservar a coluna. [20, 26]

Coluna de guarda

Colocada entre o injetor e a coluna analítica, esta possui normalmente de 2 a 5cm e tem o mesmo diâmetro interno e fase estacionária da coluna analítica. É utilizada para prevenir que impurezas e compostos fortemente retidos, contaminem a coluna de separação, aumentando assim o seu tempo de uso, portanto a coluna de guarda deve ser renovada com certa frequência, pois satura rapidamente. Devido ao seu pequeno tamanho, em relação ao tamanho da coluna analítica, o custo das diversas trocas desta ainda é muito menor do que uma nova analítica, que é deteriorada rapidamente quando não se usa a coluna de guarda. [20, 26]

Coluna analítica

Esta deve ser constituída de algum material inerte, de diâmetro uniforme, capaz de resistir às pressões que serão usadas. O material mais utilizado é o aço inoxidável, mas também podem ser constituídas de vidro reforçado e sílica fundida, sendo esta última mais utilizada na confecção de colunas capilares. As mais usadas apresentam diâmetro interno de 4,6mm, comprimento de 250mm e são recheadas com partículas porosas com diâmetro de 5 μ m. A escolha da coluna é feita em função da sua capacidade, que é determinada pelas suas dimensões, material de empacotamento, comprimento e diâmetro interno. Dependendo do diâmetro interno as colunas podem ser classificadas de diferentes formas, como descreve a tabela 2.6. [20, 26]

Tabela 2.6 - Classificação das colunas de separação

Nome	Comprimento (cm)	Diâmetro interno (mm)	Vazão (μl min⁻¹)	Tamanho de partícula (μm)
Colunas Rápidas	3-10	2-6	1.000-5.000	3
Convencional ou analítica	5-30	2-6	1.000-3.000	3; 5; 10
<i>Small bore</i> ou <i>microbore</i>	10-100	1-2	5-200	1; 3; 5
Capilar recheada	20-200	0,1-0,5	0,1-20	1; 3
Capilar semipermeável	10-10.000	0,02-0,1	0,1-2	1; 3
Capilar aberto	100-10.000	0,01-0,075	0,05-2	a
Preparativa	>20	>10	>1.000	>10

a: Filme líquido ligado nas paredes.

Registo de dados

Os dados obtidos pelos detectores, podem ser registados ou manipulados através de um registador, um integrador ou um microcomputador. O integrador fornece o tempo de retenção de cada pico, a área de cada um e a área total de

todos eles. Para aumentar a versatilidade, exactidão e precisão da cromatografia líquida de alta eficiência utilizam-se microcomputadores, que além de processar os dados obtidos pelo detector, armazenando-os, podem controlar a composição da fase móvel, a vazão que sai da bomba, a injeção da amostra, a temperatura da coluna, podendo diagnosticar possíveis problemas. [20]

2.3.3 Teste de Conformidade do sistema de HPLC

A execução de um teste de conformidade do sistema é uma parte necessária em cada determinação cromatográfica quantitativa. Num teste de conformidade de sistema, verifica-se se o sistema cromatográfico no seu todo se encontra num estado satisfatório para a aplicação do método de HPLC específico para um dado produto e com eficiência suficiente. [33]

Distingue-se do teste de rotina de conformidade do sistema, a efectuar em cada análise, o teste alargado de conformidade do sistema, a realizar com uma periodicidade pré-estabelecida e o teste completo de conformidade do sistema que só é usado em algumas ocasiões. [33]

Teste de rotina de conformidade do sistema

Este teste é realizado em cada análise cromatográfica que seja efectuada no HPLC. O teste de qualificação visual do sistema, a precisão do sistema cromatográfico, a resolução e a simetria são os parâmetros verificados em cada análise. [33]

Teste alargado de conformidade do sistema

Este teste realiza-se quando se verificar uma das seguintes situações: cada 500 injeções, de seis em seis meses, sempre que for necessário comprovar o desempenho do método e quando se coloca uma coluna nova a uso. [33]

Teste completo de conformidade do sistema

Este teste é realizado sempre que se verificar uma das seguintes situações: de dois em dois anos, o método de análise é efectuado pela primeira vez no equipamento, no caso de pequenas alterações das características do equipamento. Quando é feita qualquer alteração nos métodos cromatográficos, o método deve ser revalidado de acordo com procedimentos válidos. [33]

Além dos pontos verificados no teste alargado de conformidade do sistema, é ainda feita uma linearidade completa e uma avaliação do limite de quantificação. [33]

2.4 Validação de procedimentos analíticos (ICH²)

Este texto apresenta uma discussão sobre as características a serem consideradas durante a validação dos procedimentos analíticos incluindo a parte de pedidos de registo apresentados na Comunidade Europeia, Japão e EUA. [34]

O objectivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que é adequado para a sua finalidade pretendida

A discussão da validação de procedimentos analíticos é dirigida para os quatro tipos mais comuns de procedimentos analíticos:

- Testes de identificação: são destinados a assegurar a identidade de um analíto numa amostra. Isto é normalmente conseguido por comparação de uma propriedade da amostra (por exemplo, do espectro, comportamento cromatográfico, a reactividade química, etc) com a de um padrão de referência;
- Testes para o conteúdo de impurezas; podem ser tanto um teste quantitativo ou um teste de limite para a impureza numa amostra. Este teste destina-se a reflectir com precisão as características de pureza da amostra. São necessárias características diferentes de validação para um teste quantitativo do que para um teste de limite;
- Testes quantitativos da fracção activa em amostras de substância de fármaco ou medicamento, ou outro componente seleccionado no produto. [34]

2.4.1 Parâmetros de desempenho

O objectivo do procedimento analítico deve ser claramente entendido uma vez que irá governar as características de validação que precisam ser avaliadas. Os parâmetros de desempenho do método, necessários avaliar, são:

- Especificidade e selectividade
- Gama de trabalho e linearidade da curva de calibração

² International Conference on Harmonisation

- Sensibilidade
- Limites: decisão, detecção e quantificação
- Precisão: repetibilidade, intermédia e reprodutibilidade
- Exactidão
- Robustez
- Coerência

A tabela seguinte lista as características de validação consideradas como as mais importantes para a validação de diferentes tipos de procedimentos analíticos. Esta lista deve ser considerada típica para os procedimentos de análise citados, mas as excepções ocasionais devem ser tratadas numa base caso a caso. Deve notar-se que a robustez não está listada na tabela, mas deve ser considerada numa fase adequada no desenvolvimento do processo analítico. [34]

Além disso a revalidação pode ser necessária nas seguintes circunstâncias: quando se verificam alterações na síntese do composto que constitui a amostra; aquando alterações na composição do produto acabado; e na presença de mudanças no procedimento analítico. O grau de revalidação necessário depende da natureza das alterações.

Tabela 2.7 – Características de validação de diferentes procedimentos analíticos.

Tipo de procedimento analítico	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantificação	Limite	
Exactidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intermédia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidade (2)	+	+	+	+
Limite de detecção	-	- (3)	+	-
Limite de quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+
Gama de trabalho	-	+	-	+

- Significa que esta característica não é normalmente avaliada

+ Significa que esta característica é normalmente avaliada

(1) nos casos em que a reprodutibilidade (ver glossário), foi realizada, precisão intermediária não é necessário verificar

(2) a falta de especificidade de um procedimento analítico pode ser compensada por apoio a outros procedimento(s) analítico (s)

(3) Pode ser necessária em alguns casos

2.4.1.1 Especificidade e selectividade

A especificidade foi considerada como a capacidade do método analítico em detectar o(s) analíto(s) de interesse na presença de outros componentes da matriz. [35, 36]

É a capacidade que o método possui de quantificar exclusivamente um composto específico independente da matriz da amostra e das suas impurezas. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de selecção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analíto, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analíto, contendo estruturas semelhantes. [36]

A especificidade e a selectividade estão relacionadas com o evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analíto e a selectividade refere-se a um método utilizado para vários analítos com capacidade de distinção entre eles. [36]

Em HPLC estes parâmetros são avaliados geralmente através da capacidade de resolução cromatográfica, da eficiência da separação e do factor de assimetria.

2.4.1.2 Gama de trabalho e linearidade da curva de calibração

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analíto no qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores da faixa podem ser dos valores dos limites de detecção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. [37]

A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e são normalmente expressas nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. [38]

Para escolher a faixa de trabalho procede-se da seguinte maneira: quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve situar-se no meio da faixa de trabalho e quando a concentração do analíto é desconhecida utiliza-se a faixa de trabalho estudada para amostras diversificadas. Os valores medidos têm

que estar dentro da faixa de trabalho, e os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho ter que ser diferente dos brancos dos métodos.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são directamente proporcionais à concentração do analíto na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa, e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) que vai ser utilizada o cálculo da concentração do analíto a ser determinado na amostra real.

O coeficiente de correlação (r) é um indicador da interdependência entre o sinal medido e as concentrações dos respectivos padrões. Contudo, o coeficiente de determinação (r^2) é que deve ser utilizado para traduzir a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais.

2.4.1.3 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analíto. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analíto e da técnica de detecção utilizada. [38]

2.4.1.4 Limiars analíticos

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de detecção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração. Estes são estimados com base na incerteza da quantificação do analíto e podem ser obtidos através de:

- Réplicas do branco,
- Incerteza dos parâmetros da curva de calibração,
- Incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração.

Sempre que possível deve-se estimar os limites inferiores com base em leituras de réplicas de branco de padrão. No caso de não se dispor de brancos de

padrão ou algum destes limites conduzir a uma concentração sem significado físico deve-se utilizar os parâmetros da recta de calibração. [38]

A capacidade de detecção ou limite de decisão (x_d) é a concentração mínima do analíto que corresponde a um sinal dúbio, com probabilidade de cometer um erro do tipo α de 5% e um erro do tipo β de 50%, o que equivale a

$$y_D = b_o + t_{0.05(n-2)}^u \times \sigma_{b_o} \quad (2.1)$$

O limite de detecção (x_{LD}) é a concentração que corresponde ao menor sinal instrumental que é estatisticamente distinto do valor obtido pelo branco para o nível de significância de 5%, assumindo um erro do tipo $\alpha = 0.05$ e um erro do tipo $\beta = 0.05$. Assim, o sinal instrumental referente ao limite de detecção (y_{LD}) deve corresponder a

$$y_{LD} = b_o + 2 \times t_{0.05(n-2)}^u \times \sigma_{b_o} \quad (2.2)$$

O limite de quantificação (x_{LQ}) é a concentração mínima acima da qual há confiança estatística na quantificação da concentração ($\alpha \approx 0, \beta \approx 0$). Este limite corresponde ao sinal

$$y_{LQ} = b_o + 6 \times t_{0.05(n-2)}^u \times \sigma_{b_o} \quad (2.3)$$

Nas equações anteriores, b_o é o parâmetro de ajuste obtido para a recta de calibração, $t_{0.05(n-2)}^u$ é o valor crítico obtido da distribuição t-student com um nível de significância de 0,05 e com n-2 graus de liberdade, σ_{b_o} corresponde ao desvio padrão do parâmetro da recta.

2.4.1.5 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos numa série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, onde as duas

formas mais comuns de expressá-la são por meio de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo. Ambas repetibilidade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações.

A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efectuadas sob as mesmas condições de medição. Todas as medições são efectuadas com o mesmo procedimento, mesmo analista, mesma instrumentação, no menor intervalo de tempo possível.

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco de várias concentrações da gama de trabalho.

A repetibilidade é dada pelo desvio padrão s_r associado à média dos resultados assim obtidos. O limite de repetibilidade (r) é o valor máximo permitido para a diferença absoluta entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança a 95 %, onde m corresponde ao número de réplicas do ensaio.

$$\Delta r = \sqrt{2} \times t_{0.05(m-1)}^b \times \frac{s_r}{\sqrt{m}} \quad (2.4)$$

Reprodutibilidade avalia a imprecisão ao nível mundial, reflectindo as diferenças aleatórias esperadas para a comparação dos mesmos resultados entre laboratórios distintos. Embora a reprodutibilidade não seja uma componente de validação do método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório procura a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação inter-laboratorial. A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade “R”, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da cópia das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa. [38]

Precisão intermédia refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermédia recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. Esta medida de imprecisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados do laboratório. Segundo a norma ISO 5725:3, a precisão intermédia pode ser avaliada de três formas distintas: através de cartas de controlo de amplitudes aplicadas a réplicas, a duplicados da amostra e a padrões, quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões ou quando se realizam n medições sobre uma mesma amostra, amostras supostamente idênticas ou o mesmo padrão. De acordo com esta norma o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação for inferior a 2.0 %.

2.4.1.6 Exactidão

A exactidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido em relação ao valor esperado, estipulado ou verdadeiro. Um método diz-se exacto se o erro sistemático (módulo do erro absoluto) é inferior ao intervalo de confiança estimado. É calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro, acrescida dos intervalos de confiança. [38]

A exactidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações inter-laboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

Os materiais de referência certificados são utilizados no processo de validação de um método de ensaio para avaliar o desempenho do laboratório, por isso o fornecimento de materiais de referência certificados (MRC) é realizado por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo o NIST. Na avaliação da

exactidão utilizando um material de referência, os valores médios obtidos pelo laboratório e o desvio padrão de uma série de ensaios em duplicado, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para esta comparação podem ser utilizados:

- Erro absoluto
- Erro relativo (ER);
- *z Score*;
- Erro normalizado;
- Testes de recuperação.

Erro Absoluto

A exactidão de uma medida é geralmente descrita em termos de erro absoluto, que é definido como a diferença entre o valor observado/obtido (\bar{x}) e o valor aceite como verdadeiro (μ).

$$E = |\bar{x} - \mu| \quad (2.5)$$

Erro relativo

É o quociente entre o erro absoluto e o valor correcto. [38]

$$\%ER = 100 \times \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \quad (2.6)$$

z Score

O factor de desempenho (Z-score) expressa-se em termos de variável reduzida e é estimado através da equação 2.7.

$$Z = \frac{(\bar{x} - \mu)}{S} \quad (2.7)$$

Onde S representa a incerteza associada ao material certificado (MRC) ou o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio inter-laboratorial.

Segundo um protocolo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), International Organization for Standardization (ISO) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) se o factor de desempenho em módulo for menor ou igual a um, o desempenho é bom, se for menor ou igual a dois o desempenho é satisfatório, caso se encontre entre dois e três o desempenho é questionável e por último se for superior ou igual a três o desempenho do método é mau. [38]

Erro normalizado

O erro normalizado é estimado através da equação 2.8 onde U_{lab} corresponde à incerteza associada ao laboratório e U_{CRM} à incerteza associada ao valor de referência. Quando o valor de erro normalizado em valor absoluto é menor ou igual a 2 o ensaio realizado é satisfatório. [38]

$$En = \frac{(\bar{x} - \mu)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{CRM}^2}} \quad (2.8)$$

Testes de recuperação

Os testes de recuperação permitem avaliar a exactidão sem recorrer a materiais certificados, o que é uma excelente vantagem económica para o laboratório, usando somente soluções de padrão e amostras. Este tipo de teste permite testar a resposta na presença da própria matriz da amostra em causa, o que é bastante vantajoso pois não é comum haver materiais certificados com matrizes idênticas ou similar aquele que se está interessado. [38]

Caso se represente a concentração recuperada em função da concentração adicionada obtém-se um gráfico com variação linear que pode ser ajustado por um polinómio de primeiro grau conhecido por função de recuperação:

$$x_{rec} = a + b \times x_{add} \quad (2.9)$$

Com esta função podemos interpretar o tipo de erro sistemático cometido no método. Assim, a ordenada na origem (a) está relacionada com um erro sistemático constante e o declive (b) está relacionado com um erro sistemático proporcional.

2.4.1.7 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. [38]

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao tratamento de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

2.4.1.8 Coerência

A coerência de um método analítico expressa a concordância de valores obtidos quando são introduzidas variações aleatórias nas condições experimentais do método.

De acordo com a USP este parâmetro pode ser medido através da reprodutibilidade dos resultados obtidos sob a variação de diferentes condições (diferenças dentro do laboratório, analistas, instrumentos, reagentes, períodos de trabalho).

2.5 Tratamento estatístico de dados

A estatística é uma ferramenta fundamental na análise qualitativa e quantitativa de um analito numa certa matriz. As medidas são inerentemente variadas [38], isto é, os dados analíticos obtidos apresentam variações em torno de um valor central, regra geral, mais frequente. No entanto, a distribuição normal dos dados pode ser assumida na grande maioria dos resultados de análise físico-química.

2.5.1 Distribuições estatísticas relevantes

As distribuições estatísticas (*t-student* e F de Fisher) estão muito relacionadas com o teste de hipóteses uma vez que estas, devido a serem bem caracterizadas, podem ser utilizadas como termo de comparação em diversas situações reais, providenciando os valores críticos necessários. [38]

2.5.1.1 *t-student*

Quando está em causa a comparação de estimativas de posição, assumindo que se trata de distribuições normais e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \leq t_{\alpha(n-1)} \quad (2.10)$$

Onde \bar{x} é o valor médio observado, μ é o valor tomado como verdadeiro e $\sigma_{\bar{x}}$ é o desvio padrão associado ao valor médio. Compara-se o resultado com o valor crítico da distribuição *t-student* ao nível de confiança de 100.(1 - α) %.

A hipótese nula assume a igualdade de valores e a hipótese alternativa assume a desigualdade:

$$\begin{cases} H_0 : & \bar{x} = \mu \\ H_1 : & \bar{x} \neq \mu \end{cases} \iff \begin{cases} H_0 : & \bar{x} = \mu \\ H_1 : & \bar{x} < \mu \vee \bar{x} > \mu \end{cases}$$

Consequentemente o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral (hipótese centrada assumindo eventual diferença nos extremos). [38]

Caso se procure demonstrar que o valor estimado é superior ao valor correcto, a hipótese nula assume a situação da igualdade (valor inferior ou igual ao tomado como verdadeiro) enquanto que a hipótese alternativa dá conta desta diferença,

$$\begin{cases} H0: & \bar{x} \leq \mu & \sim (1 - \alpha) \\ H1: & \bar{x} > \mu & \sim (\alpha) \end{cases}$$

Os valores críticos correspondem à distribuição cumulativa unilateral (hipótese marginal), onde α corresponde ao nível de significância.

2.5.1.2 Fisher

Quando está em causa a comparação de variâncias de distribuições normais, aleatórias e independentes, calcula-se o valor teste dado pelo quociente entre duas variâncias, σ_1^2 e σ_2^2 :

$$TV = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (2.11)$$

Este deve seguir uma distribuição de Fisher. Assume-se como hipótese inicial (H0) que não há diferença significativa entre as variâncias (diferença puramente aleatória),

$$\begin{cases} H0: & \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H1: & \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2 \end{cases} \iff \begin{cases} H0: & \sigma_1^2 = \sigma_2^2 \\ H1: & \sigma_1^2 < \sigma_2^2 \vee \sigma_1^2 > \sigma_2^2 \end{cases}$$

O que corresponde a efectuar um teste bilateral para o quociente das variâncias. O intervalo de confiança a 95% para este quociente de variâncias é dado por:

$$F_{0,95(v_1, v_2)}^u \leq \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \leq F_{0,05(v_1, v_2)}^u \quad (2.12)$$

Onde v_1 e v_2 correspondem aos graus de liberdade do numerador e denominador, respectivamente.

Por uma questão de simplificação, impõe-se que este quociente seja maior que a unidade (por exemplo: maior número de graus de liberdade para o numerador, divisão da variância pela componente puramente aleatória) o que faz com que se possa converter o teste bilateral num teste unilateral, mais fácil de processar.

Deste modo,

$$\begin{cases} H0: & \sigma_1^2 \leq \sigma_2^2 \\ H1: & \sigma_1^2 > \sigma_2^2 \end{cases}$$

A hipótese nula (H_0) assume que não há diferença significativa entre variâncias e a hipótese alternativa (H_1) assume que se houver diferença significativa, a variância do numerador excede a do denominador.

Contudo, o valor teste deve ser comparado com o valor crítico de F bilateral.

2.5.2 Teste de hipóteses

Devido ao pequeno número de dados normalmente usados, intervalos de confiança largos podem obscurecer diferenças inaceitáveis. Por outro lado, devido a pequenas anomalias que ocorrem por vezes, nas séries analíticas, as diferenças são identificadas como significantes, o que não apresenta qualquer relevância prática.

A componente aleatória intrinsecamente envolvida implica sempre a possibilidade de se cometer um erro de juízo. Atendendo à forma como estes se desviam em relação ao valor tomado como correcto, os erros estatísticos, podem ser classificados em erros por excesso e erros por defeito. Os erros por excesso correspondem a uma falsa rejeição, ou seja, um erro do tipo I (α) onde a hipótese nula estava correcta e foi abusivamente rejeitada por ter sido considerada falsa. Os erros por defeito referem-se a uma falsa aceitação, ou seja, um erro do tipo II (β) onde a hipótese nula estava errada e foi abusivamente aceite como verdadeira.

O nível de significância de teste, designada por α (frequentemente expresso sob a forma percentual $100\% \cdot \alpha$) corresponde à probabilidade máxima com que se pretende proceder à rejeição abusiva (erro tipo I). A probabilidade de aceitação de hipótese correcta designa-se de nível de confiança e corresponde à probabilidade de $(1-\alpha)$ (em termos percentuais $100(1-\alpha)\%$).

Na formulação de hipóteses estatísticas, a hipótese nula (H_0) vai no sentido de não haver diferença significativa, isto é, de pertencer ao grosso da distribuição também designado de $(1 - \alpha)$; a hipótese alternativa (H_1) encontra-se direccionada para a diferença significativa (α), o complemento da hipótese nula. [38]

Procedimento

Os testes estatísticos constituem uma ferramenta para, com critérios estatísticos, auxiliar na tomada de decisões na interpretação de resultados. Cada

teste estatístico depende do nível de confiança para o qual as conclusões são desejadas assim como do número de graus de liberdade para essas circunstâncias. [38]

Os testes estatísticos devem ser efectuados com base num procedimento lógico que passa pelos seguintes passos:

a) Formulação do problema: Deve-se realizar uma análise do evento de forma a racionalizar a questão e poder testar.

b) Escolha do teste: O teste é escolhido de acordo com o objectivo pretendido, ou seja, com base na distribuição estatística que melhor se adequa³.

c) Nível de significância: Nível com o qual se pretende obter conclusões. Deve ser estabelecido previamente o valor do erro máximo admissível para se tirar conclusões erradas por rejeição abusiva (α). Regra geral o nível de significância refere-se a $\alpha = 0,05$ podendo também ser reduzido para $\alpha = 0,01$ para serem tiradas conclusões mais definitivas.

d) Hipóteses de trabalho: As hipóteses devem ser complementares e de forma a abranger o universo do evento. A hipótese nula (H_0) deve ser formulada no sentido de não haver diferença (está tudo correcto, dentro do intervalo de confiança da estimativa, $(1 - \alpha)$). A hipótese alternativa (H_1) incide sobre a diferença significativa (não está conforme, fora do intervalo de confiança da estimativa (α)).

e) Simetria do teste: Esta depende do modo como as hipóteses foram formuladas. Se o que se pretende é um teste de desigualdade (superior a ou inferior a um determinado valor), apenas se está interessado em considerar um extremo da distribuição como referência e por isso o teste estatístico tem uma simetria unilateral. Pelo contrário, se o que se pretende é um teste de igualdade, ou seja, comparar a parte central da distribuição com determinada estimativa, agora o teste estatístico apresenta uma simetria bilateral.

f) Cálculo do teste: Calcula-se com base na expressão da distribuição estatística correspondente.

g) Comparação com valores críticos (X_{crit}): Os valores críticos estão tabelados de acordo com o nível de significância e com o número de graus de liberdade. Estes

³ As distribuições estatísticas mais comuns para efectuar testes estatísticos são a normal, t – student, F-Fisher e qui-quadrado.

valores permitem definir as regiões de aceitação e de rejeição das hipóteses formuladas.

h) Conclusão: No caso do valor experimental ultrapassar os limites tabelados (região de rejeição) diz-se que, ao nível de confiança $100 (1-\alpha) \%$ há diferença significativa e a hipótese nula deve ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa; caso contrário, não existe evidência estatística para rejeitar a hipótese nula. Os testes estatísticos podem ser efectuados a diferentes níveis de significância. As normas ISO recomendam testes de significância aos níveis de 5% ($\alpha=0.05$, probabilidade de efectuar 1 insucesso em cada 20 decisões) e 1% ($\alpha=0.01$, probabilidade de taxa de insucesso de 1/100).

2.5.2.1 Diagnóstico de valores discrepantes

Valores discrepantes são valores que não pertencem a uma determinada distribuição. Dado que as estimativas paramétricas são sensíveis a valores contaminados, estes valores, designados de outliers, produzem em geral erros de estimativa quer na posição (enviesamento) quer na dispersão (aumento da imprecisão). Como tal, para que este efeito de estimativa errada seja evitado tem que se testar inicialmente qualquer conjunto de dados antes de se proceder a qualquer estimativa.

Os resultados experimentais que mais se afastam dos valores previstos pelo modelo podem ser eventuais outliers. Dado a sua insensibilidade a valores discrepantes, a regressão robusta pode ser útil para detectar estes outliers.

Os eventuais valores discrepantes da curva de calibração podem ser testados através de um teste F (similar ao teste de Mandel), o e/ou através de um teste do tipo t-student. [38]

Teste F

O teste baseia-se em comparar o aumento da variabilidade residual ao incluir o valor suspeito da curva de calibração com uma estimativa de erro puramente aleatório. Compara-se o aumento na variância do ajuste ao introduzir o valor dúbio no conjunto dos pontos da curva de calibração com uma estimativa de erro

puramente aleatório que resulta da variância do ajuste com (n-1) valores experimentais, pela equação (2.13).

$$F = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{fit(n-p-1)}^2} \leq F_{\alpha(1,n-1-p)}^u \quad (2.13)$$

Se este valor exceder o valor crítico isso indica que a hipótese nula (H0: o valor em questão também pertence à curva de calibração ou seja, não afecta significativamente a qualidade do ajuste) tem uma probabilidade inferior a 100.α%⁴ de não ser válida sugerindo a rejeição deste valor como precaução estatística no sentido de não cometer erros sistemáticos na calibração e de reduzir a incerteza na estimativa da concentração das amostras. [38]

Teste t-student

A análise de valores discrepantes pode também ser efectuada sob a forma de teste t-student em que se compara a proximidade do valor experimental em causa ($y_?$) com o respectivo valor previsto pela curva de calibração ($\eta(x_?)$) em relação à dispersão dos valores da curva de calibração sobre o modelo, pela equação (2.14).

$$t = \frac{|y_? - \eta(x_?)|}{\sigma_{fit(n-1-p)}} \quad (2.14)$$

Caso sejam detectados outliers na curva de calibração esta deverá ser repetida para evitar que as estimativas obtidas com as amostras não corram risco de erro sistemático. [38]

2.5.2.2 Escolha do modelo

A escolha do modelo deve assentar em diagnósticos simples e estatisticamente fundamentados. Os diagnósticos mais utilizados são: determinação visual da linearidade, teste de Mandel, análise ANOVA do ajuste e a análise de resíduos. [38]

⁴ A rejeição de pontos de uma curva de calibração é um procedimento que vai afectar todas as estimativas subsequentes, razão pela qual o nível de confiança imposto deve ser de 99% ($\alpha = 0.01$).

A determinação visual da linearidade consiste em sobrepor aos valores experimentais um segmento de recta por forma a se aproximar do número máximo de valores experimentais. Esta abordagem não é suficiente e existem diversas situações em que há dúvidas.

O teste de Mandel consiste em ajustar um polinómio de primeiro grau (P_1) e um polinómio de segundo grau (P_2), estimar as respectivas somas de resíduos quadrados e comparar o aumento da variância do ajuste ao baixar o grau do polinómio.

O teste consiste em comparar o incremento da variância do ajuste ao excluir um parâmetro (coeficiente do termo de segundo grau) com uma estimativa de erro puramente aleatório (*pure error*) que pode ser estimado com base na variância do modelo que melhor ajusta os valores experimentais (σ_{fit}^2).

$$F = \frac{\Delta_{ss} / \Delta_v}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(ss_1 - ss_2) / (v_1 - v_2)}{\sigma_{fit}^2} \quad (2.15)$$

Se o aumento na variância do ajuste devida à eliminação de um parâmetro for equiparável à variância aleatória, o parâmetro excluído não é necessário ao modelo. As hipóteses de trabalho são:

$$\begin{cases} H0: \Delta\sigma_{fit}^2 \leq \sigma_{pe}^2 & \Rightarrow \text{parâmetro a excluir} \\ H1: \Delta\sigma_{fit}^2 > \sigma_{pe}^2 & \Rightarrow \text{parâmetro a preservar} \end{cases}$$

Se o valor F calculado não exceder o valor crítico $F_{0,01(1,v_2)}^u$ a hipótese nula deve ser aceite o que indica que o polinómio de primeiro grau é adequado para a curva de calibração.

2.5.3 Análise de variância

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. A ANOVA permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatória e a contribuição sistemática entre amostras. Deste modo permite verificar se as amostras (ou factores) exercem um efeito significativo fazendo com que estes se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si.

A ANOVA permite comparar em simultâneo várias médias (níveis diferentes do factor) e estimar as diversas contribuições de variabilidade: puramente aleatória (estimada dentro de cada amostra), variabilidade entre amostras, etc.

Como pressupostos assume-se que as distribuições em causa são:

- Normais e independentes,
- Há homogeneidade de variância (variabilidade interna)

Se o factor em estudo (factor A) não influi de modo significativo, ambas as dispersões são estimativas da variância da componente aleatória. Já se o factor influi de modo significativo, a dispersão devida ao factor A (s_A) torna-se maior que a componente puramente aleatória (s_0).

A comparação das dispersões é conseguida através do teste F, equação (2.16):

$$F = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{0,05(n-1,n(m-1))} \quad (2.16)$$

3. Secção Experimental

3. Secção experimental

Nesta secção são enumerados os reagentes e equipamentos necessários à realização do trabalho. Encontra-se também nesta secção a descrição da preparação de algumas soluções relevantes.

3.1.Reagentes

Os reagentes utilizados foram: Acetonitrilo e Água para HPLC adquiridos na Fisher Cientific; padrão de glucose, maltose, frutose e lactose, de grau analítico para HPLC adquiridos na Sigma-Aldrich; e padrão de sacarose de grau analítico para HPLC adquirido na Acros-Organics.

Para as soluções Carrez I e II foi utilizado Hexacianoferrato de potássio trihidratado $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ de grau analítico, adquirido na Merck e Sulfato de zinco heptahidratado $ZnSO_4.7H_2O$ de grau analítico, adquirido na Panreac.

3.1.1. Fase móvel (HPLC)

A fase móvel utilizada é constituída de água ultrapura para HPLC e acetonitrilo numa razão de 78:22 (V:V).

3.1.2. Solução-mãe padrão de glucose, frutose, sacarose, lactose e maltose

Pesar rigorosamente cerca de 2,5g de glucose, 2,5g de frutose, 5,0g de sacarose, 2,5g de lactose e 2,5g de maltose para um balão volumétrico de 50,00mL. Dissolver em água e completar o volume.

3.1.2.1. Preparação das soluções padrão de açúcares

Para 7 balões volumétricos de 50,00 ml pipetar 0,7; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00; 15,00 e 25,00mL da solução padrão de açúcares. Completar o volume dos balões com água.

3.1.3. Preparação das soluções de Carrez

Solução de Carrez I: solução 150g/l de $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$

Solução de Carrez II : solução 300g/l de $ZnSO_4.7H_2O$

3.2. Equipamento

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo líquido de alta resolução com injetor, detector de índice de refração e sistema de aquisição de dados.
- Coluna: de sílica ligada a NH_2 com 25 cm x 4 mm x 5 μm , com pré-coluna.
- Filtros de 0,45 μm .
- Filtros S&S 602 1/2.
- Banho ultra-sónico.

3.3. Métodos

De seguida apresentam-se os métodos utilizados no decorrer do trabalho.

3.3.1. Preparação da amostra

Para um balão volumétrico de 100mL pesar rigorosamente cerca de 15g da amostra finamente triturada e adicionar 50 ml de água a 60 °C, mexer bem até obter uma mistura homogénea. Precipitar as proteínas por adição sucessiva com agitação de 3 ml da solução de Carrez I e 3 ml da solução de Carrez II. Arrefecer até à temperatura ambiente. Filtrar por filtro de pregas (S&S 602 1/2) e recolher o filtrado em balão volumétrico de 100 ml e completar ao traço com água. Filtrar por membrana de 0.45 μm . A amostra deve ser analisada imediatamente após a preparação.

3.3.2. Condições de operação

As condições cromatográficas de trabalho para o doseamento dos açúcares em simultâneo na amostra foram:

- Fluxo: 1.0 ml/min;
- Temperatura do forno: 40 °C;
- Volume de injeção: 20,00µl.
- Auto injector: Temperatura ambiente
- Tempo de corrida: 15 minutos
- Detecção: RI

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e discussão

4.1. Linearidade e gama de trabalho

A linearidade foi avaliada por meio da construção de uma curva de calibração para as substâncias a analisar. Para isto preparou-se uma solução padrão mãe, da qual se diluiu, posteriormente, volumes de 0,5mL, 0,7mL, 1,0mL, 5,0mL, 10,0mL, 15,0mL e 25,0mL. De forma a facilitar a escrita e a compreensão dos resultados, às diluições anteriores, passa-se a designar por padrão 0,5, padrão 0,7, padrão 1, padrão 5, padrão 10, padrão 15 e padrão 25, respectivamente.

Na figura seguinte consta um cromatograma obtido para a solução padrão 10, onde se evidenciam os sinais cromatográficos relativos a cada composto em estudo, assim como os respectivos tempos de retenção.

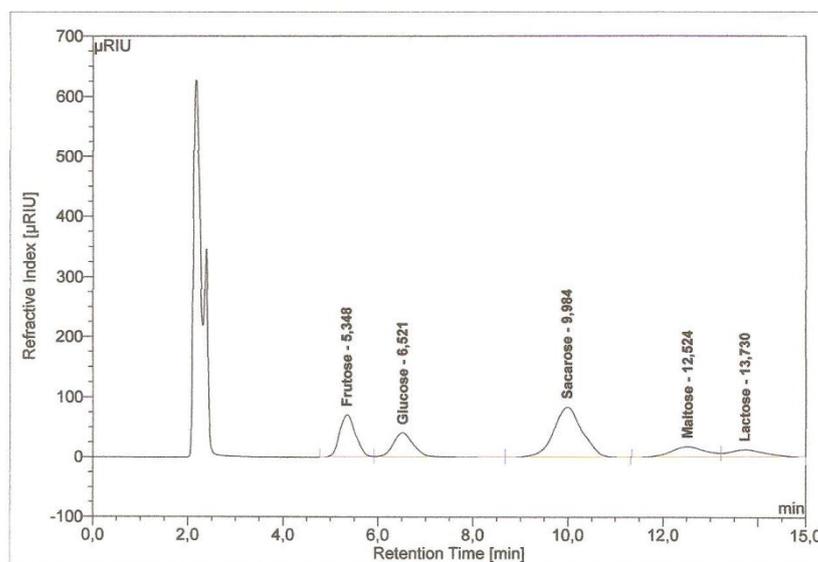


Figura 4.1 – Resposta instrumental ao padrão 10, com respectiva identificação dos sinais cromatográficos e tempos de retenção.

Na Tabela 4.1 encontram-se registados os valores médios obtidos para cada padrão, assim como a incerteza obtida pelo desvio padrão das leituras das áreas.

Tabela 4.1 – Áreas da curva de calibração do doseamento de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose.

Padrão	0,70	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	25,00
Frutose							
Concentração (g/l)	0,70	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	25,00
Área (μRIU)	1,9298	3,10083	5,4231	12,5361	27,6570	40,4095	67,2123
Incerteza	0,0052	0,00065	0,0031	0,0059	0,0032	0,0022	0,0069
Glucose							
Concentração (g/l)	0,70	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	25,00
Área (μRIU)	0,79256	2,2091	3,5259	9,3785	20,8017	31,28600	51,8819
Incerteza	0,00047	0,0077	0,0022	0,0486	0,0050	0,00090	0,0037
Sacarose							
Concentração (g/l)	1,40	2,00	4,00	10,00	20,00	30,00	50,00
Área (μRIU)	3,986	6,5193	11,3080	26,1958	57,686	84,5179	140,6726
Incerteza	0,0053	0,0031	0,007	0,0046	0,013	0,0064	0,0076
Maltose							
Concentração (g/l)	0,70	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	25,00
Área (μRIU)	0,8811	1,592	2,7332	6,4666	14,3757	21,2329	35,458
Incerteza	0,0092	0,0188	0,0032	0,0065	0,007	0,0031	0,0105
Lactose							
Concentração (g/l)	0,70	1,00	2,00	5,00	10,00	15,00	25,00
Área (μRIU)	0,4364	1,1162	1,8419	4,5599	10,5518	15,7385	26,4962
Incerteza	1,0E-04	2,7E-05	2,7E-05	5,5E-05	9,0E-04	1,0E-03	5,9E-05

Na figura 4.2 encontram-se as curvas de calibração da resposta analítica aos padrões.

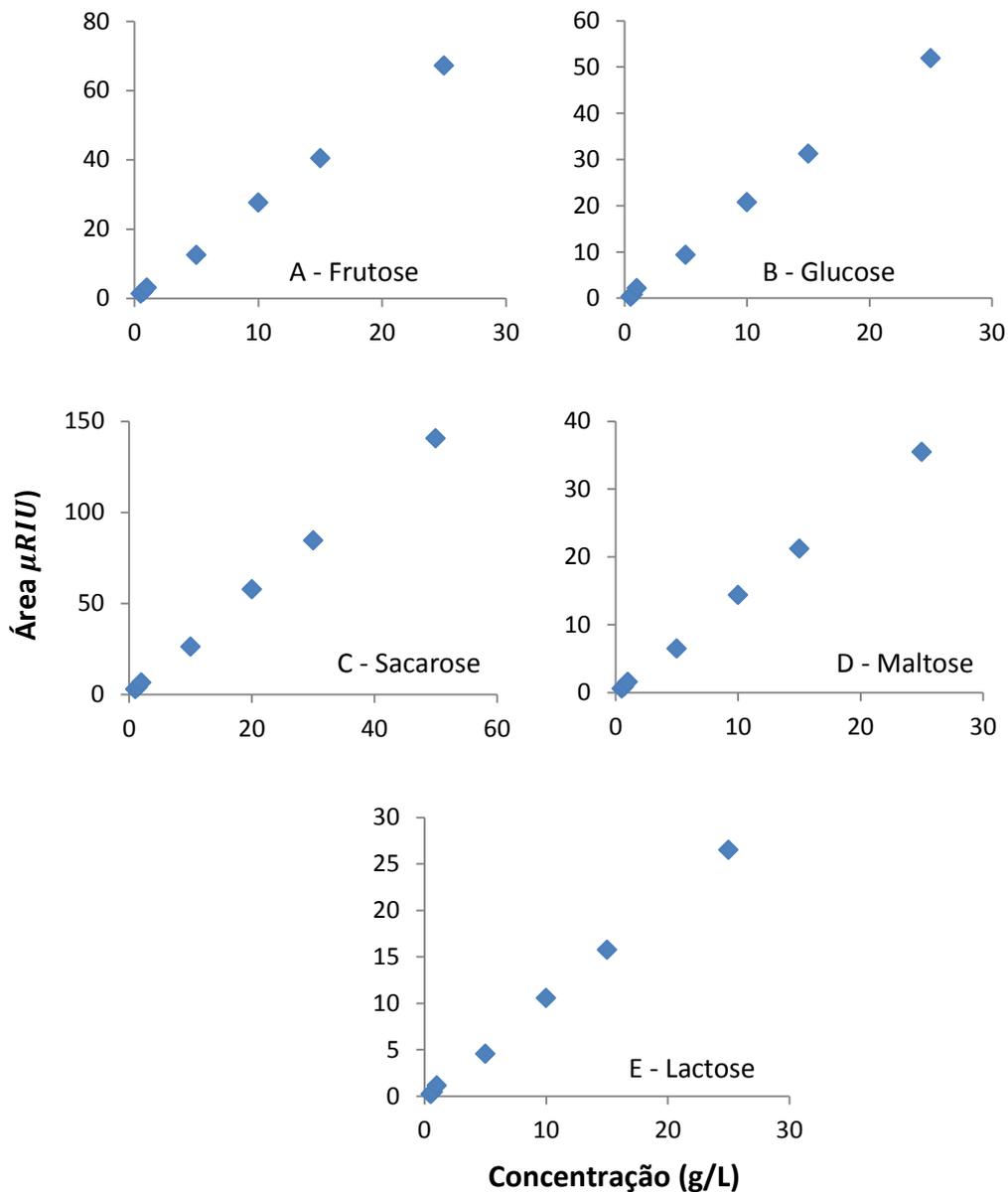


Figura 4.2 – Curvas de calibração da resposta analítica: A) frutose, B) glucose, C) sacarose, D) maltose e E) lactose.

Para um melhor ajuste para cada curva de calibração realizaram-se testes estatísticos adequados referentes às três fases críticas da calibração:

1. Representatividade dos valores na curva de calibração (homogeneidade da variância);
2. Escolha do modelo;
3. Detecção de outliers.

O teste de homogeneidade da variância tem como base a distribuição unilateral F de Fisher, onde o valor experimental obtido é comparado com um valor crítico tabelado a 99% de confiança ($F_{0,01}^b = F_{0,005}^u$). Como hipóteses de trabalho assume-se que a hipótese nula (H_0) indica que a diferença que existe entre as variâncias

não tem significado estatístico. Por sua vez, a hipótese alternativa (H1) indica que as variâncias são estatisticamente diferentes.

Na tabela 4.2 encontram-se os resultados obtidos neste teste.

Tabela 4.2 – Resultados obtidos no teste F de homogeneidade da variância para os padrões em estudo.

	Frutose	Glucose	Sacarose	Maltose	Lactose
$\sigma_{\text{padrão } 25}$	0,0069	0,0037	0,0076	0,0105	5,9E-05
$\sigma_{\text{padrão } 0,7}$	0,0052	0,0047	0,0053	0,0092	1,0E-04
TV	1,76	1,61	2,06	1,30	7,95

Pela análise da tabela, e considerando 11.07 o valor crítico calculado a um nível de confiança de 99%, é possível ver que, para todos os compostos, o valor experimental (TV) é inferior ao valor crítico. Assim, a este nível de confiança, a hipótese nula é aceite, ou seja, verifica-se homogeneidade da variância nos resultados obtidos para a curva de calibração.

Como as variâncias são estatisticamente semelhantes, passa-se à realização de um teste de Mandel para a escolha do melhor modelo de ajuste. Se o aumento na variância do ajuste devida à eliminação de um parâmetro for equiparável à variância aleatória, o parâmetro excluído não é necessário ao modelo. Assumindo como hipóteses de trabalho que a hipótese nula indica que o modelo a usar é o que tem menor número de parâmetros, neste caso P01 (modelo linear), e que a hipótese alternativa indica que o melhor modelo será aquele que possui maior número de parâmetros.

Se o valor F calculado não exceder o valor crítico $F_{0,01(1,\nu_2)}^u$ a hipótese nula deve ser aceite, o que indica que o polinómio de primeiro grau é adequado para a curva de calibração.

Na tabela 4.3 encontram-se os resultados obtidos na realização deste teste.

Tabela 4.3 – resultados do teste de Mandel para a escolha do modelo.

	Modelo	SSqr	ndf	varFit	TV	Fcrit
Frutose	P01	1,57	5	0,31	0,03	21,20
	P012	1,55	4	0,39		
Glucose	P01	1,00	5	0,20	0,12	
	P012	0,98	4	0,24		
Sacarose	P01	6,52	5	1,30	0,01	
	P012	6,51	4	1,63		
Maltose	P01	0,43	5	0,09	0,02	
	P012	0,43	4	0,11		
Lactose	P01	0,39	5	0,08	0,19	
	P012	0,37	4	0,09		

Na tabela, SSqr corresponde à soma de quadrados, ndf corresponde ao número de graus de liberdade do modelo, varFit representa a variância do ajuste, TV é o valor experimental calculado e Fcrit é o valor crítico tabelado a um nível de confiança de 99%.

Pela análise da tabela é possível verificar que os valores experimentais calculados são inferiores ao valor crítico em todos os casos. Assim, para os compostos, o melhor modelo de ajuste será o polinómio de primeiro grau uma vez que a hipótese nula é válida.

O último passo para a construção da curva de calibração foi a verificação da existência de outliers onde, numa primeira fase foram verificados por regressão robusta, através da análise de resíduos.

A análise de resíduos pode ser efectuada com base em cartas de controlo segundo duas perspectivas distintas: a representação dos resíduos em função do índice do valor experimental e representação dos valores com indicação dos limites de aviso e de acção.

Na figura seguinte estão representados os resíduos para todos os compostos.

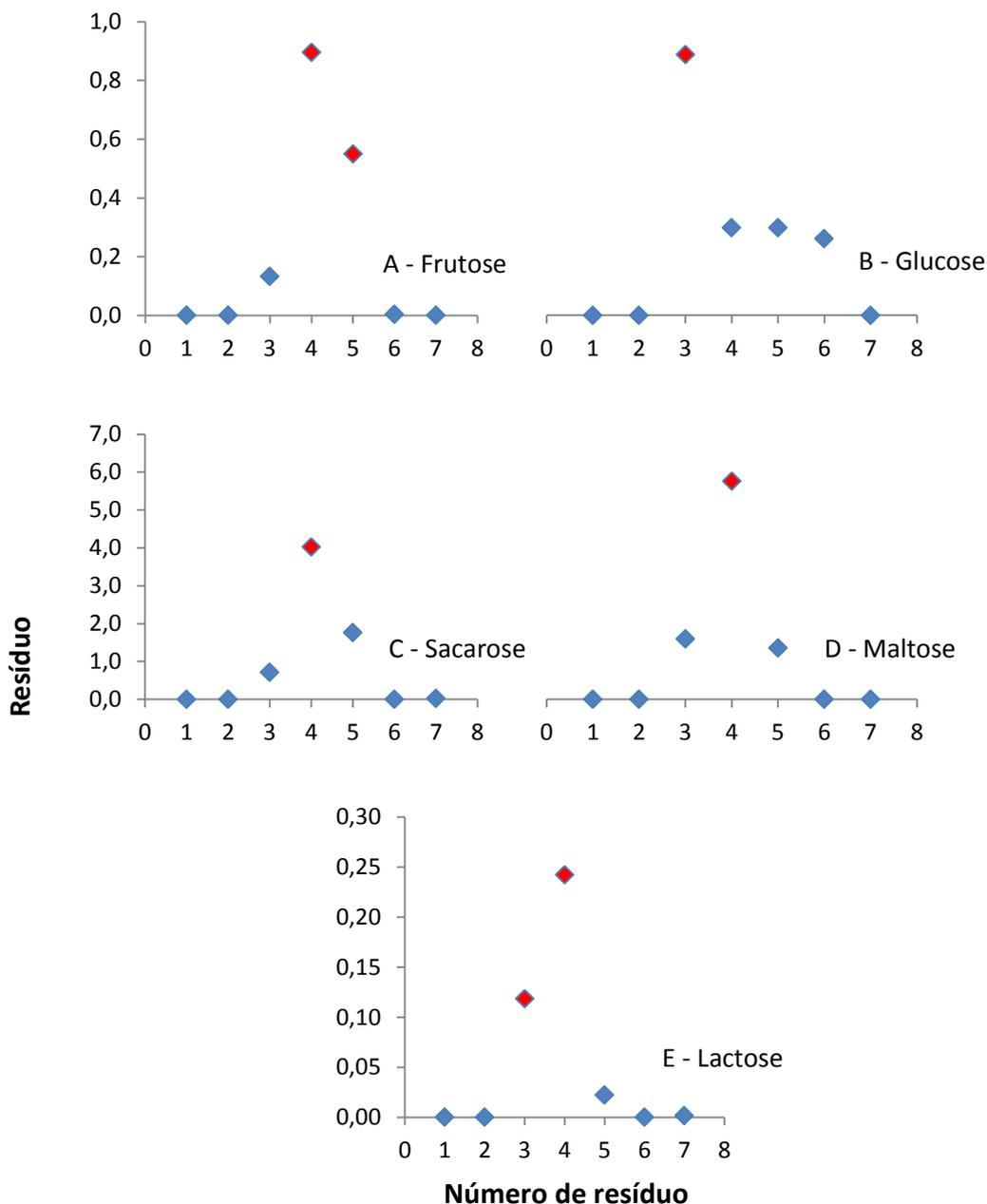


Figura 4.3- Representação gráfica dos resíduos (em valor absoluto) em função do número de resíduo do padrão utilizado: A) Frutose, B) Glucose, C) Sacarose, D) Maltose e E) Lactose.

Atendendo a que o resíduo é obtido pela diferença, em valor absoluto, entre os valores obtidos e os valores previstos, o número de resíduo que possua maior diferença poderá constituir um valor aberrante da distribuição.

No caso da frutose o valor correspondente aos resíduos 4 e 5 devem ser analisados pois constituem possíveis outliers. Para a glucose deve ser analisado o resíduo 3. No caso da sacarose e da maltose, deve se analisado o resíduo 4 de cada conjunto de dados. Para a há dois valores que devem ser analisados, pela possibilidade de serem aberrantes, correspondentes aos resíduos 3 e 4.

O diagnóstico destes valores discrepantes á realizado pelo teste de Mandel considerando os dados com os possíveis outliers e sem eles. A tabela 4.4 resume os resultados obtidos na análise de outliers.

Tabela 4.4 – Resultados do teste de Mandel para verificar a existência de outliers.

	Resíduo	N	SSqr	ndf	varFit	TV	F ^u _{0,01}
Frutose		7	1,57	5	0,31	9,75	21,20
	4	6	0,46	4	0,11		
Glucose		7	1,01	5	0,20	3,76	
	3	6	0,52	4	0,13		
Sacarose		7	6,52	5	1,30	11,22	
	4	6	1,71	4	0,43		
Maltose		7	0,43	5	0,09	14,82	
	4	6	0,09	4	0,02		
Lactose		7	0,39	5	0,08	11,81	
	4	6	0,10	4	0,02		

Pela análise dos valores obtidos no teste estatístico realizado, verifica-se que nenhum dos resíduos analisados em cada padrão corresponde a um outlier, pois o valor obtido através do teste Mandel (TV) é inferior ao valor crítico a 99 % de confiança (F^u_{0,01}).

Uma vez validado o conjunto de dados é possível determinar a equação linear que melhor descreve os resultados obtidos. As figuras 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 mostram as rectas de ajuste obtidas, assim como as respectivas equações e coeficientes de correlação.

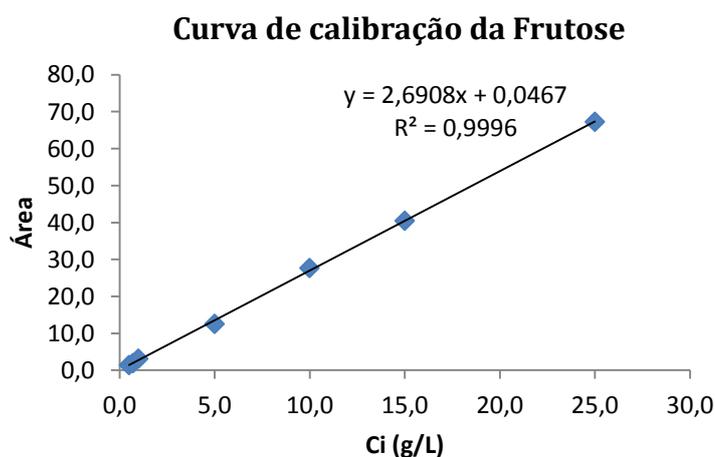


Figura 4.4 – Representação gráfica da curva de calibração obtida para a frutose.

Curva de calibração de Glucose

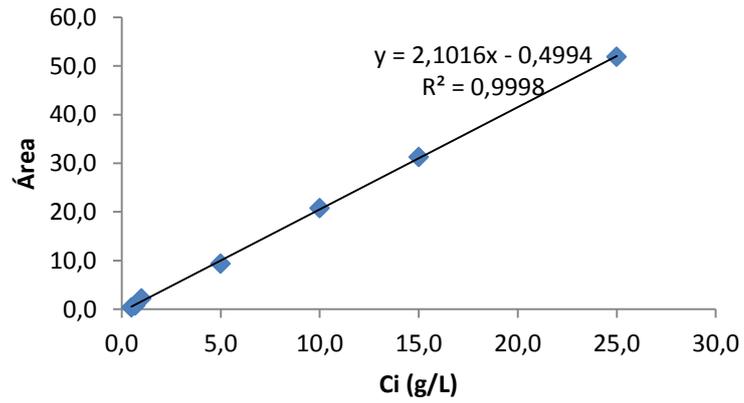


Figura 4.5 – Representação gráfica da curva de calibração obtida para a glucose.

Curva de calibração da Sacarose

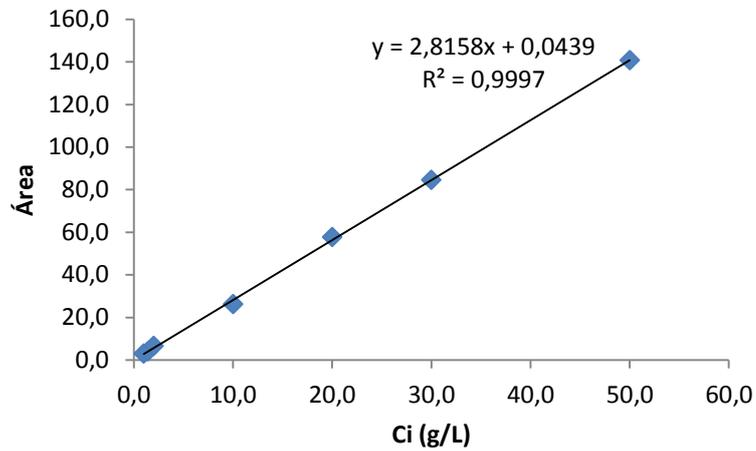


Figura 4.6 – Representação gráfica da curva de calibração obtida para a sacarose.

Curva de calibração da Maltose

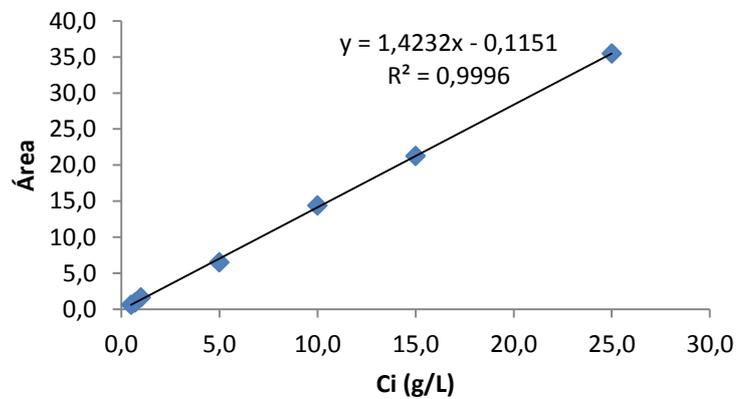


Figura 4.7 – Representação gráfica da curva de calibração obtida para a maltose.

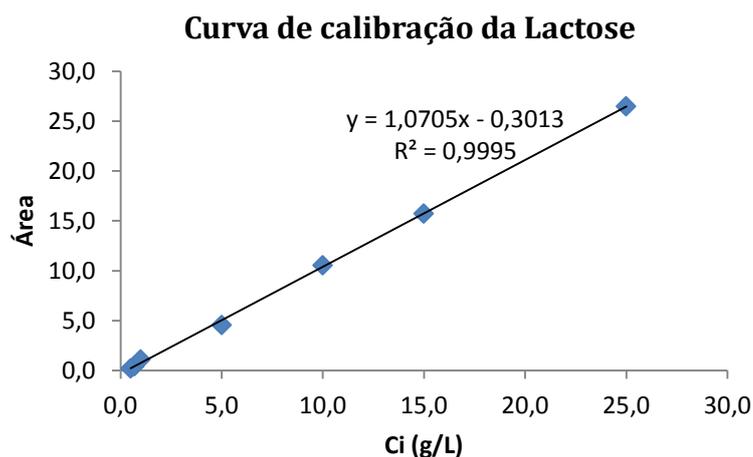


Figura 4.8 – Representação gráfica da curva de calibração obtida para a lactose.

A gama de trabalho linear fica estabelecida com uma faixa de concentrações de 1,4 a 50,0 g/L para a sacarose, e 0,7 a 25,0 g/L para os padrões de frutose, glucose, maltose e lactose.

4.2.Limiaries analíticos

Os limites de decisão (X_d), limites de detecção (X_{LD}) e limites de quantificação (X_{LQ}) foram estimados a partir dos parâmetros das rectas de calibração dos compostos. A tabela 4.5 contém os limiaries analíticos calculados para os compostos.

Tabela 4.5 – Valores dos limiaries analíticos calculados para os açúcares.

	X_D	X_{LD}	X_{LQ}
Frutose	0,11	0,22	0,66
Glucose	0,11	0,23	0,68
Sacarose	0,21	0,43	1,28
Maltose	0,11	0,22	0,65
Lactose	0,11	0,23	0,69

Pela análise da tabela 4.5, e observando os valores da concentração dos padrões mais baixos para ambos os compostos, é possível verificar que o limite de

quantificação é inferior ao valor da concentração do primeiro padrão, o que está em conformidade com os requisitos no estabelecimento deste mesmo limite.

4.3. Precisão

Avaliada em termos de repetibilidade e de precisão intermédia.

4.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade é avaliada através da análise do coeficiente de variação de um conjunto de réplicas consecutivas da mesma amostra. O método considera-se preciso em termos de repetibilidade se o coeficiente de variação for inferior a 1.0 %. Neste caso fizeram-se dez injeções consecutivas de uma solução amostra e da solução padrão no mesmo dia, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista e procedeu-se à análise do coeficiente de variação das áreas obtidas tanto para a amostra como para a solução padrão. Os resultados obtidos encontram-se presentes na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Concentração e coeficientes de variação dos açúcares da amostra.

	Padrão		Amostra	
	Concentração média (desvio padrão) (g/L)	CV (%)	Concentração média (desvio padrão) (g/L)	CV (%)
Frutose	24.96 (5.07x10 ⁻⁰³)	0.02	1.00 (6.43x10 ⁻⁰⁴)	0.06
Glucose	24.94 (1.86x10 ⁻⁰²)	0.07	11.97 (1.34x10 ⁻⁰³)	0.01
Sacarose	49,94 (2.83x10 ⁻⁰³)	0.01	28.80 (8.82x10 ⁻⁰³)	0.03
Maltose	24.99 (1.50x10 ⁻⁰²)	0.06	4.02 (4.81x10 ⁻⁰³)	0.12
Lactose	25.03 (1.92x10 ⁻⁰²)	0.07	5.99 (1.43x10 ⁻⁰³)	0.02

Pela análise dos coeficientes de variação pode-se considerar o método validado em termos de repetibilidade uma vez que os valores obtidos para o coeficiente de variação são inferiores a 1,0 %.

4.3.2. Precisão intermédia

Para estudar a precisão intermédia do método foram realizadas análises de amostras de padrão e de amostra preparadas em diluições de 5mL, 15mL e 25mL

da solução mãe, em dias diferentes, tendo sido avaliado o coeficiente de variação decorrente da injeção de três gamas de concentração diferentes.

O método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação obtido for inferior a 2.0%.

Na tabela 4.7 encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia no doseamento da frutose.

Tabela 4.7- Resultados obtidos na análise da precisão intermédia do método de doseamento para a frutose.

	Amostra (g/L)			Padrão (g/L)		
	5	15	25	5	15	25
1º Dia	0,199	0,412	0,997	4,637	15,000	24,969
	0,197	0,414	1,006	4,638	15,001	24,965
	0,197	0,412	1,002	4,646	14,996	24,955
2º Dia	0,201	0,412	0,995	4,639	15,002	24,974
	0,195	0,417	0,995	4,642	15,002	24,959
	0,204	0,419	1,002	4,646	14,996	24,971
3º Dia	0,201	0,411	0,999	4,648	14,998	24,962
	0,194	0,410	0,997	4,646	15,001	24,965
	0,193	0,411	1,005	4,639	14,996	24,965

Com estes dados foi efectuada uma análise ANOVA para verificar se os valores eram afectados pelo factor dia, ou seja, para verificar se o facto de as análises serem efectuadas em dias diferentes tem influência para a variabilidade total do conjunto de dados.

Para a solução amostra 5 o valor de teste obtido foi de 0,81 que vai ser comparado com o valor crítico, a um nível de confiança de 95%, de 5,14. Como o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, a hipótese nula é aceite, ou seja, o factor “Dia” não afecta os resultados e, por isso, não há interferência para a variabilidade total. Ao mesmo nível de diluição, para o padrão, o valor de teste obtido da análise ANOVA foi de 0,67. A um nível de confiança de 95%, o valor tabelado é superior ao valor de teste, logo a hipótese nula é aceite.

Para a solução amostra 15 o valor de teste foi de 5,57 e, a um nível de confiança de 95% o valor de teste é inferior ao valor crítico, indicando que a hipótese nula (factor não influi) é aceite. Na mesma gama, o factor não afecta os resultados obtidos para o padrão pois o valor de teste (0,38) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Quando se analisa a solução amostra 25 verifica-se que efeito diário não influi na variância total uma vez que o valor de teste (0,61) é inferior ao valor crítico a um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão conclui-se o mesmo uma vez que o valor de teste é de 0,66.

Para as soluções amostra e padrão, preparadas de uma diluição de 5mL, o coeficiente de variação é de 1,8% e 0,1%, respectivamente. Para as soluções de diluição de 15mL, o CV é de 0,5% para a amostra e 0,2% para o padrão. Na gama de diluição de 25 mL, o coeficiente de variação é de 0,4% na amostra e 0,1% no padrão. Com isto, o método de doseamento da frutose encontra-se validado relativamente à precisão intermédia.

Na tabela 4.8 encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia no doseamento da glucose.

Tabela 4.8- Resultados obtidos na análise da precisão intermédia do método de doseamento para a glucose.

	Amostra (g/L)			Padrão (g/L)		
	5	15	25	5	15	25
1º Dia	0,888	7,174	11,974	4,707	15,123	24,935
	0,883	7,182	11,974	4,704	15,130	24,940
	0,898	7,191	11,971	4,703	15,127	24,935
2º Dia	0,898	7,183	11,962	4,691	15,117	24,936
	0,888	7,179	11,973	4,704	15,113	24,940
	0,897	7,180	11,970	4,709	15,116	24,937
3º Dia	0,886	7,184	11,962	4,698	15,123	24,938
	0,894	7,178	11,963	4,703	15,118	24,935
	0,899	7,182	11,971	4,696	15,133	24,946

Para a solução amostra 5 o valor de teste obtido foi de 0,46 que vai ser comparado com o valor crítico, a um nível de confiança de 95%, de 5,14. Como o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, a hipótese nula é aceite, ou seja, não há interferência do factor para a variabilidade total. Na mesma gama, para o padrão, o valor de teste obtido foi de 0,70. A um nível de confiança de 95% é possível afirmar que o factor não influi na variabilidade total, uma vez que, o valor de teste é inferior ao valor tabelado.

O factor não afecta os resultados obtidos na amostra 15 pois o valor de teste (0,07) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%. Para a

solução padrão a 100% o valor de teste foi de 4,72 o que indica que o factor não influi uma vez que o valor crítico é superior.

Na gama das soluções 25 o factor não afecta os resultados obtidos na amostra pois o valor de teste (2,04) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão o mesmo se conclui pois o valor de teste (0,44) é inferior ao valor tabelado.

Para as soluções amostra e padrão, preparadas através da diluição de 5 mL, o coeficiente de variação é de 1,0% e 0,1 %, respectivamente. Para as soluções diluídas de 15 mL o CV é de 0,1% para a amostra e 0,3% para o padrão. Na gama de diluição de 25mL, o coeficiente de variação é de 0, 4% na amostra e 0, 2% no padrão. Com isto, o método de doseamento da glucose encontra-se validado relativamente à precisão intermédia.

Na tabela 4.9 encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia no doseamento da sacarose.

Tabela 4.9- Resultados obtidos na análise da precisão intermédia do método de doseamento para a sacarose.

	Amostra (g/L)			Padrão (g/L)		
	5	15	25	5	15	25
1º Dia	5,769	17,284	28,802	9,289	30,005	49,942
	5,756	17,282	28,800	9,284	29,999	49,937
	5,772	17,283	28,802	9,288	29,995	49,943
2º Dia	5,763	17,283	28,798	9,285	30,002	49,943
	5,767	17,279	28,790	9,286	29,998	49,947
	5,761	17,281	28,802	9,292	30,008	49,948
3º Dia	5,756	17,286	28,799	9,287	29,997	49,948
	5,768	17,281	28,798	9,284	29,998	49,945
	5,761	17,281	28,797	9,287	30,001	49,939

Para a solução amostra 5 o valor de teste obtido foi de 0,28 que vai ser comparado com o valor crítico, a um nível de confiança de 95%, de 5,14. Como o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, a hipótese nula é aceite, ou seja, o factor “Dia” não afecta os resultados e, por isso, não há interferência para a variabilidade total. Ao mesmo nível de diluição, para o padrão, o valor de teste obtido da análise ANOVA foi de 0,71. A um nível de confiança de 95%, o valor tabelado é superior ao valor de teste, logo a hipótese nula é aceite.

Para a solução amostra 15 o valor de teste foi de 0,61 e, a um nível de confiança de 95% o valor de teste é inferior ao valor crítico, indicando que a hipótese nula (factor não influi) é aceite. Na mesma gama, o factor não afecta os resultados obtidos para o padrão pois o valor de teste (0,78) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Quando se analisa a solução amostra 25 verifica-se que efeito diário não influi na variância total uma vez que o valor de teste (1,30) é inferior ao valor crítico a um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão conclui-se o mesmo uma vez que o valor de teste é de 1,82.

Para as soluções amostra e padrão, preparadas de uma diluição de 5mL, o coeficiente de variação é de 0,1% e 0,3%, respectivamente. Para as soluções de diluição de 15mL, o CV é de 0,1% para a amostra e para o padrão. Na gama de diluição de 25 mL, o coeficiente de variação é de 0,2% na amostra e 0,1% no padrão. Com isto, o método de doseamento da sacarose encontra-se validado relativamente à precisão intermédia.

Na tabela 4.10 encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia no doseamento da maltose.

Tabela 4.10- Resultados obtidos na análise da precisão intermédia do método de doseamento para a maltose.

	Amostra (g/L)			Padrão (g/L)		
	5	15	25	5	15	25
1º Dia	0,808	2,426	4,017	4,617	14,999	24,988
	0,803	2,411	4,029	4,622	15,009	24,991
	0,800	2,414	4,011	4,615	15,004	24,995
2º Dia	0,807	2,410	4,023	4,621	14,994	25,001
	0,804	2,404	4,015	4,623	15,005	24,991
	0,809	2,420	4,022	4,630	15,005	24,984
3º Dia	0,814	2,412	4,016	4,625	14,999	24,987
	0,802	2,401	4,020	4,622	14,998	24,989
	0,795	2,411	4,024	4,623	15,009	25,010

Para a solução amostra 5 o valor de teste obtido foi de 0,26 que vai ser comparado com o valor crítico, a um nível de confiança de 95%, de 5,14. Como o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, a hipótese nula é aceite, ou seja, não há interferência do factor para a variabilidade total. Na mesma gama, para o padrão, o valor de teste obtido da foi de 3,23. A um nível de confiança de 95% é

possível afirmar que o factor não influi na variabilidade total, uma vez que, o valor de teste é inferior ao valor tabelado.

O factor não afecta os resultados obtidos na amostra 15 pois o valor de teste (1,17) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão a 100% o valor de teste foi de 0,24 o que indica que o factor não influi uma vez que o valor crítico é superior.

Na gama das soluções 25 o factor não afecta os resultados obtidos na amostra pois o valor de teste (0,02) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão o mesmo se conclui pois o valor de teste (0,17) é inferior ao valor tabelado.

Para as soluções amostra e padrão, preparadas através da diluição de 5mL, o coeficiente de variação é de 0,9% e 0, 7%, respectivamente. Para as soluções diluídas de 15mL o CV é de 0,3% para a amostra e 0, 4% para o padrão. Na gama de diluição de 25mL, o coeficiente de variação é de 0,2% na amostra e 0, 4% no padrão. Com isto, o método de doseamento da maltose encontra-se validado relativamente à precisão intermédia.

Na tabela 4.11 encontram-se os valores obtidos para a análise da precisão intermédia no doseamento da lactose.

Tabela 4.11- Resultados obtidos na análise da precisão intermédia do método de doseamento para a lactose.

	Amostra (g/L)			Padrão (g/L)		
	5	15	25	5	15	25
1º Dia	1,198	3,594	5,991	4,542	14,984	25,034
	1,197	3,595	5,992	4,545	14,984	25,032
	1,199	3,595	5,988	4,541	14,983	25,035
2º Dia	1,198	3,596	5,991	4,541	14,985	25,034
	1,196	3,593	5,992	4,542	14,985	25,032
	1,199	3,595	5,990	4,541	14,983	25,033
3º Dia	1,198	3,593	5,990	4,541	14,984	25,033
	1,199	3,593	5,991	4,542	14,983	25,035
	1,197	3,594	5,988	4,541	14,984	25,033

Para a solução amostra 5 o valor de teste obtido foi de 0,16 que vai ser comparado com o valor crítico, a um nível de confiança de 95%, de 5,14. Como o valor experimental é inferior ao valor crítico tabelado, a hipótese nula é aceite, ou seja, o factor “Dia” não afecta os resultados e, por isso, não há interferência para a variabilidade total. Ao mesmo nível de diluição, para o padrão, o valor de teste obtido

da análise ANOVA foi de 0,65. A um nível de confiança de 95%, o valor tabelado é superior ao valor de teste, logo a hipótese nula é aceite.

Para a solução amostra 15 o valor de teste foi de 2,88 e, a um nível de confiança de 95% o valor de teste é inferior ao valor crítico, indicando que a hipótese nula (factor não influi) é aceite. Na mesma gama, o factor não afecta os resultados obtidos para o padrão pois o valor de teste (0,28) é inferior ao valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95%.

Quando se analisa a solução amostra 25 verifica-se que efeito diário não influi na variância total uma vez que o valor de teste (0,53) é inferior ao valor crítico a um nível de confiança de 95%. Para a solução padrão conclui-se o mesmo uma vez que o valor de teste é de 0,26.

Para as soluções amostra e padrão, preparadas de uma diluição de 5mL, o coeficiente de variação é de 0,2% e 0,1%, respectivamente. Para as soluções de diluição de 15mL, o CV é de 0,3% para a amostra e 0,1% para o padrão. Na gama de diluição de 25 mL, o coeficiente de variação é de 0,3% na amostra e 0,1% no padrão. Com isto, o método de doseamento da lactose encontra-se validado relativamente à precisão intermédia.

4.4.Exactidão

Para avaliar a exactidão do método de doseamento dos açúcares na amostra procedeu-se à preparação de amostras de placebo, fortificadas com padrão, de modo a obter soluções com concentrações diluídas da solução mãe 5mL, 15mL e 25mL, de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose e posteriormente compararam-se os valores obtidos com o padrão de referência, na mesma gama de concentrações.

A exactidão do método de análise foi avaliada pelo erro absoluto através do teste t-student e erro relativo e, posteriormente, procedeu-se à determinação da percentagem de recuperação.

Tabela 4.12- Resultados obtidos no estudo de exactidão dos métodos de quantificação dos doseamentos frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose.

	Gama	Amostra (g/L)	Padrão (g/L)
Frutose	5	4,64	4,64
		4,64	4,64
	15	15,00	15,00
		15,00	15,00
	25	24,96	24,96
		24,96	24,97
Glucose	5	4,76	4,67
		4,72	4,68
	15	15,13	15,12
		15,12	15,12
	25	24,93	24,92
		24,93	24,93
Sacarose	5	9,29	9,29
		9,29	9,29
	15	30,00	30,00
		30,00	30,00
	25	49,94	49,94
		49,94	49,94
Maltose	5	4,62	4,62
		4,62	4,62
	15	15,00	15,00
		15,00	15,00
	25	24,99	24,99
		24,99	24,99
Lactose	5	4,54	4,54
		4,54	4,54
	15	14,98	14,98
		14,98	14,98
	25	25,03	25,03
		25,03	25,03

Do estudo da exactidão, tabela 4.12, obteve-se para a frutose, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 4,64 (1,05E-03), 15,00 (8,67E-04) e 24,96 (7,88E-04) g/L que correspondem ao coeficiente de variação de 0,05, 0,01 e 0,01%, respectivamente. Tendo como valores de referência 4,64 (3,10E-03), 15,00 (1,58E-04) e 24,96 (1,45E-03) g/L, para cada gama de concentrações, a exactidão avaliada através do teste t-student conduz ao valor de teste 0,95, 1,26 e

0,06 que é inferior ao valor previsto pela distribuição t-student bilateral ao nível de confiança de 95% (12,71). Os valores obtidos como estimativas de erro relativo foram de 0,03, 0,01 e 0,01% que se encontram dentro da gama pretendida (inferior a 5,0 %) e as percentagens de recuperação obtidas (100,03, 100,01 e 100,04 %) também se encontram dentro o intervalo pretendido (95,0 a 105,0 %). Pela análise dos valores obtidos podemos afirmar que o método se considera validado em termos de exactidão para a frutose.

No estudo de exactidão para a glucose, tabela 4.12, obteve-se para cada gama de concentrações estimativas médias de 4,74 (2,66E-02), 15,12 (1,01E-03) e 24,93 (1,14E-03) g/L que correspondem ao coeficiente de variação de 0,10, 0,01 e 0,02%, respectivamente. Tendo como valores de referência 4,68 (5,99E-03), 15,12 (2,15E-03) e 24,93 (5,32E-03) g/L, para cada gama de concentrações, a exactidão, avaliada através do teste t-student, conduz ao valor de teste 0,40, 2,06 e 1,20 que é inferior ao valor crítico a um nível de confiança de 95%. O valor obtido como estimativa de erro relativo foi de 1,3, 0,01 e 0,02% que se encontra dentro do pretendido uma vez que é inferior a 5,0%, e a percentagem de recuperação obtida foi 101,32, 100,01 e 100,02% que se encontram compreendidas entre o intervalo de 95,0 e 105,0%. Assim, é possível concluir que o método se encontra validado ao nível de exactidão para a glucose.

Para a sacarose obteve-se, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 9,29 (1,16E-03), 30,00 (1,61E-03) e 49,94 (1,66E-03) g/L que correspondem ao coeficiente de variação de 0,01, 0,01 e 0,02%, respectivamente. Tendo como valores de referência 9,29 (5,32E-03), 30,00 (1,03E-03) e 49,94 (1,41E-03) g/L, para cada gama de concentrações, o teste t-student conduz ao valor de teste de 19,43, 6,57 e 1,39 que é inferior ao valor previsto pela distribuição t student bilateral ao nível de confiança de 95% (12,71) excepto para a gama de diluição de 5mL da solução mãe, e desta forma verificou-se que, ao nível de confiança 99% o valor crítico é de 63.66, sendo o valor de teste inferior. Assim, para esta gama a hipótese nula é considerada dúbia, pelo que ao analisar o valor de prova (a probabilidade de aceitação da hipótese nula) de 3,3% é possível afirmar que o método tende a ser exacto mas encontra-se levemente afectado por um erro sistemático.

Os valores obtidos como estimativas de erro relativo foram de 0,02, 0,01 e 0,01% que se encontram dentro da gama pretendida (inferior a 5,0 %) e as percentagens de recuperação obtidas (100,01, 100,01 e 100,02 %, respectivamente) também se encontram dentro o intervalo pretendido (95,0 a 105,0 %). Pela análise dos valores obtidos podemos afirmar que o método se considera validado em termos de exactidão para sacarose.

Do estudo da exactidão, tabela 4.12, obteve-se para a maltose, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 4,62 (8,40E-05), 15,00 (3,32E-05) e 24,99 (8,93E-05) g/L que correspondem ao coeficiente de variação de 0,01, 0,02 e 0,02%, respectivamente. Tendo como valores de referência 4,62 (2,69E-05), 15,00 (6,46E-05) e 24,99 (5,59E-05) g/L, para cada gama de concentrações, a exactidão, avaliada através do teste t-student, conduz ao valor de teste 1,86, 0,70 e 7,07 que é inferior ao valor crítico a um nível de confiança de 95%. O valor obtido como estimativa de erro relativo foi de 0,01, 0,01 e 0,03% que se encontra dentro do pretendido uma vez que é inferior a 5,0%, e a percentagem de recuperação obtida foi 100,02, 100,03 e 100,03% que se encontram compreendidas entre o intervalo de 95,0 e 105,0%. Assim, é possível concluir que o método se encontra validado ao nível de exactidão para a maltose.

Para a lactose obteve-se, para cada gama de concentrações ensaiadas, as estimativas médias 4,54 (2,53E-05), 14,98 (8,56E-04) e 25,03 (1,58E-03) g/L que correspondem ao coeficiente de variação de 0,01, 0,02 e 0,01%, respectivamente. Tendo como valores de referência 4,54 (2,82E-03), 14,98 (4,83E-04) e 25,03 (1,24E-04) g/L, para cada gama de concentrações, o teste t-student conduz ao valor de teste de 0,92, 0,39 e 0,14 que é inferior ao valor previsto pela distribuição t student bilateral ao nível de confiança de 95% (12,71). O valor obtido como estimativa de erro relativo foi de 0,04, 0,01 e 0,03% que se encontra dentro do pretendido uma vez que é inferior a 5,0%, e a percentagem de recuperação obtida foi 100,04, 100,01 e 99,99% que se encontram compreendidas entre o intervalo de 95,0 e 105,0%. Assim, é possível concluir que o método se encontra validado ao nível de exactidão para a lactose.

5. Conclusões

5. Conclusões

O trabalho desenvolvido visava essencialmente um objectivo – a validação do método de análise de produtos alimentares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para esse efeito preparou-se uma solução padrão mãe contendo 2,5g de frutose, 2,5g de glucose, 5,0g de sacarose, 2,5g de maltose e 2,5g de lactose, para 50,00mL. Desta solução fizeram-se 7 diluições de 0,7mL, 1mL, 2mL, 5mL, 10mL, 15mL e 25mL, de forma a diminuir a concentração inicial. A solução da amostra foi preparada pesando, rigorosamente 15,0g da amostra para um volume final, após o procedimento descrito na secção experimental, de 100,00mL.

Para a avaliação dos parâmetros de validação do método de análise do doseamento simultâneo de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose na amostra em HPLC começou-se por verificar a especificidade/selectividade do método e através dos cromatogramas comprovou-se que não existem interferentes no doseamento dos açúcares.

Pelo parâmetro de linearidade estabeleceu-se para cada composto a respectiva curva de calibração linear com equação de polinómio de primeiro grau. A gama de trabalho construiu-se a partir de sete padrões e definiu-se de 1,4g/L a 50g/L para a sacarose, 0,7 a 25 g/L para os restantes açúcares considerados.

A partir das curvas de calibração estabeleceu-se os limiares analíticos para os cinco compostos a dosear, onde se obteve como limites de quantificação 0,66g/L, 0,68g/L, 1,28/L, 0,65g/L e 0,69g/L, para a frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose, respectivamente.

A precisão do método verificou-se pela repetibilidade e precisão intermédia. Em termos de repetibilidade, os coeficientes de variação obtidos para os açúcares na solução padrão e na solução amostra foram inferiores a 1,0 %, logo o método encontra-se validado em termos de repetibilidade. Quanto à precisão intermédia avaliou-se a solução padrão e amostra em três gamas de concentrações diferentes (diluições de 5mL, 15mL e 25mL) e em três dias diferentes. Em todos os casos os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 2,0 %, logo o método considera-se validado em termos de precisão intermédia, nestas gamas de concentração.

Como os parâmetros indicadores da precisão do método se encontram validados, o método encontra-se também validado no parâmetro precisão.

A exactidão do método avaliou-se pelo erro absoluto através do teste *t-student* a 95 % de confiança, erro relativo e posteriormente procedeu-se à determinação da percentagem de recuperação, como terceiro parâmetro de desempenho do método quanto à exactidão, e em todos os casos verificou-se que o método é exacto, ou seja, não apresenta erro sistemático significativo.

A metodologia testada para doseamento, em simultâneo, de frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose, considera-se validada, uma vez que satisfaz as especificações determinadas para cada parâmetro de validação testado.

Futuramente seria ainda de todo conveniente avaliar a estabilidade das soluções amostra e padrão, ao longo do tempo, enquanto se encontram na bancada de trabalho e também quando se encontram no auto-injector. Após esta avaliação será intenção validar o mesmo método para o restante tipo de amostras produzidas na indústria onde decorreu o trabalho.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

- [1] MORRISON, R.T. BOYD, R. T. **Química Orgânica**. Lisboa: Ed.15 Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.
- [2] Programa de Alimentação e Saúde promovido pela ARAP (Associação dos Refinadores de Açúcar Portugueses) consultado em <http://www.docerar.pt/index.php?id=124> a 07-05-2012
- [3] Riffer R., **Handbook of Sugar Refining**, 2000, Ed. C. C. Chou, Pub. John Wiley & Sons
- [4] T. Lindhorst, **Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, First Edition, Wiley-VCH, 2007, ISBN: 978-3-527-31528-4.
- [5] DUFTY, William – **Sugar Blues: O gosto amargo do açúcar**, 7a. Ed. São Paulo, Editora Ground. 1975. págs 13 a 93.
- [6] FREIRE, Maria do Carmo M., CANNON, Geoffrey & SHEIHAM, Aubrey - **Análise das Recomendações Internacionais Sobre o Consumo de Açúcares** Publicadas entre 1961 e 1991. Rev. Saúde Pública, vol.28, no.3, Jun 1994
- [7] **Thieme Chemistry (Hrsg.): RÖMPP Online - Version 3.5**. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- [8] OLIVEIRA, J.E. Dutra – **Deficiências Energética no Brasil, Word Sugar Research Organisation**, 11-12/10/1989.S
- [9] COLLINS, Carol H. **Princípios básicos de cromatografia**. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27
- [10] LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p
- [11] CARNEIRO, Manuel Sérgio de Sá, **Introdução à Química Orgânica**, disponível em http://educa.fc.up.pt/ficheiros/noticias/70/documentos/107/introducao_quimica_organica.pdf consultado em 24-11-2011
- [12] DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio. Atualidades em Química**, n.7, p.21-25, mai.1998.

- [13] NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins.** Rio de Janeiro, RJ, 2003
- [14] LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Acta, 1993. 254p
- [15] CECCHI, Heloisa Máscia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** 2ª ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, 2003, 207p.
- [16] VOGEL, Arthur. **Análise Química Quantitativa.** 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462p.
- [17] HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa.** 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005. 876p.
- [18] HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa.** 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005
- [19] SKOOG, Douglas A.; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. **Princípios de Análise Instrumental.** 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p
- [20] ARAÚJO, Julio M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática.** 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2004, 416p.
- [21] DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio. Atualidades em Química,** n.7, p.21-25, mai.1998.
- [22] NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins.** Rio de Janeiro, RJ, 2003
- [23] LOPES, João Luis Callegari. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.45-57
- [24] BRAGA, Gilberto Leite. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p. 29-43.
- [25] BONATO, Pierina Sueli. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.141-181.
- [26] GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.183-238.

- [27] POMBEIRO, Armando. **Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial**. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, 1069p
- [28] PIZZOLATO, Tânia. **Apostila da disciplina de Cromatografia do PPG em Química**. Instituto de Química. UFRGS, 2001.
- [29] ANDRADE, Édira Castelo Branco de, **Análise de alimentos: uma visão química da nutrição – São Paulo**: Livraria Varela, 2006
- [30] SPENCER, G.L.; MEADE, G.P. **Special Reagentes. Cane Sugar Handbook**, New York, Wiley, 1945.
- [31] JARDIM, Isabel Cristina Fontes Sales; GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.
- [32] SCOTT, Raymond P. W.: **Liquid Chromatography**. 2003. 101p. Disponível em: <http://www.library4science.com/>. Acesso em: 20 mai. 2012.
- [33] NETO, Francisco R. de A.; NUNES, Denise, da S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.
- [34] Wellings, D. A., **A Practical Handbook of Preparative HPLC**, Elsevier, 2006.
- [35] **Validation of Analytical Procedures: text and Methology** Q2(R1), ICH, november 2005
- [36] Chasin, A.M.; Nascimento, et all., **Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral**, Revista Brasileira Toxicologia, 1998, v.11, n.1, p.1-6
- [37] Guia Relacre 13, **“Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química”**, Relacre, 2000
- [38] Jorge L.G.F.S. Costa Pereira, **Caracterização e Validação de Métodos Analíticos**, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008

Anexos

Anexo I - As aplicações do açúcar na área da produção alimentar

O açúcar, para além de ser o adoçante por excelência, desempenha também outras funções que, embora menos conhecidas, o tornam um ingrediente importante na confeção alimentar.

A sua capacidade para dar cor e paladar, e o seu contributo na textura, consistência, conservação e fermentação dos alimentos, são propriedades que outros adoçantes não conseguem alcançar.

Eis aqui algumas das suas principais funções na cozinha:

- **ADOÇAR** - O açúcar dá um sabor doce imediato aos alimentos. O açúcar é o adoçante de referência.
- **CONSERVAR** - O açúcar ajuda a travar o desenvolvimento de microrganismos, porque imobiliza as moléculas da água que as bactérias, o fermento ou o bolor necessitam para crescer. Esta propriedade faz do açúcar um importante agente na preservação de compotas e outras conservas, mas também de bolos, impedindo que estes sequem e se tornem “velhos”. O açúcar também actua como antioxidante. Protege a fruta em conserva de oxidar e limita a tendência das gorduras usadas na pastelaria ficarem rançosas. O açúcar, em si, conserva-se durante muito tempo, quando em condições normais de ambiente.
- **DAR COR** - O açúcar está na base do processo de caramelização que produz sabores e graus de cor muito específicos em bolos e bombons.
- **MODIFICAR SABORES** - Usado em pequenas quantidades, o açúcar pode atenuar ou intensificar sabores. Os sabores salgado, amargo e ácido são reduzidos com a aplicação de açúcar. É, por exemplo, o caso da maionese, de produtos à base de tomate e de frutos como groselha e toranja.
- **DAR TEXTURA** - Na pastelaria, o açúcar é essencial para dar diferentes texturas aos alimentos confeccionados. O açúcar interage com água, fermento e farinha, desempenhando um papel importante na consistência dos produtos durante a cozedura, na sua densidade, cor e aparência. Dependendo da quantidade utilizada e do tamanho dos cristais (daí haver

açúcar com tamanhos de granulado diferentes) podem obter-se diferentes efeitos no produto final. Na confeitaria, a capacidade do açúcar cristalizar e se dissolver em temperaturas diferentes e com quantidades variáveis de água, permite adquirir uma grande variedade de estruturas. Por exemplo, a textura do chocolate só é possível através da mistura do açúcar com a manteiga de cacau. Nas mousses, é a ligação do açúcar com as claras de ovo que proporciona a estabilidade desta sobremesa.

- **DAR CONSISTÊNCIA-** Nas bebidas e nos gelados, a viscosidade do açúcar dissolvido dá uma consistência agradável na boca. Nos iogurtes, a consistência é promovida através da acção especial do açúcar nas proteínas do leite.
- **INFLUENCIAR PROCESSOS CULINÁRIOS** - O açúcar tem também propriedades que o tornam um agente activo em alguns processos culinários: é um excelente substrato para muitas fermentações, acelerando o seu processo (ex.: a massa dos folares, bebidas); acelera o tempo de cozedura; na congelação, retarda o tempo a que congelam os alimentos, impedindo, por exemplo no caso dos gelados, que se formem demasiados cristais de gelo.

Fora da área alimentar, o açúcar tem ainda uma série de utilizações interessantes:

- Na produção de colas e cimentos;
- No fabrico de tintas;
- No tratamento de peles;
- Na composição de muitos produtos farmacêuticos;
- Ajuda a curar feridas;
- É usado para produzir penicilina.
- Se adicionado à água, ajuda a manter as flores frescas durante mais tempo;
- É o ingrediente que faz o vidro utilizado no cinema nas cenas de duplo;

Anexo II – Cromatogramas obtidos na leitura dos padrões e amostra

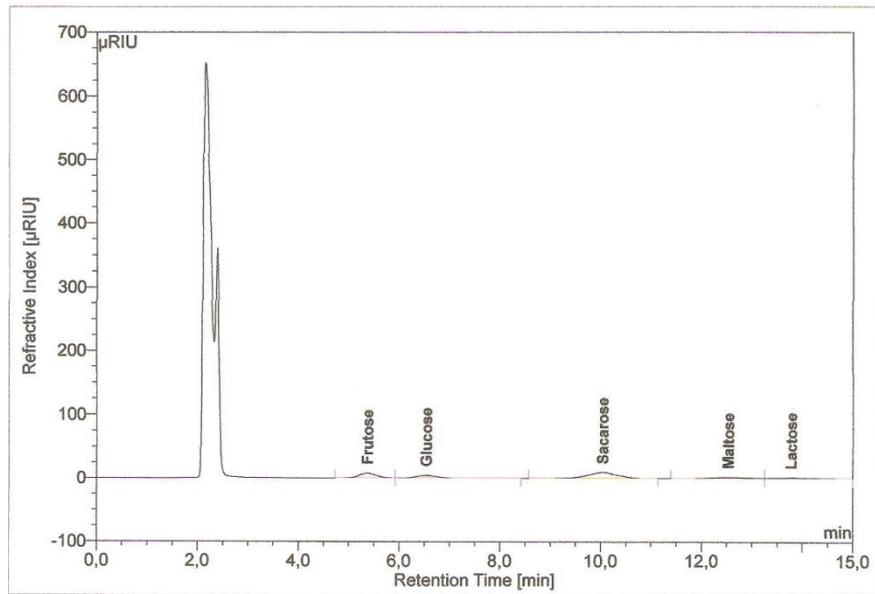


Figura A 2.1 – Cromatograma obtido para o padrão 1.

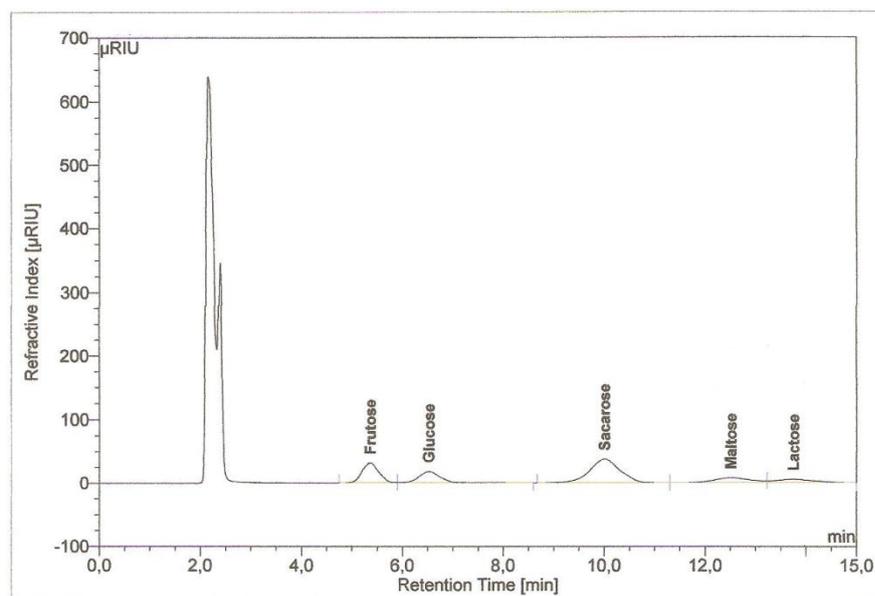


Figura A 2.2 – Cromatograma obtido para o padrão 5.

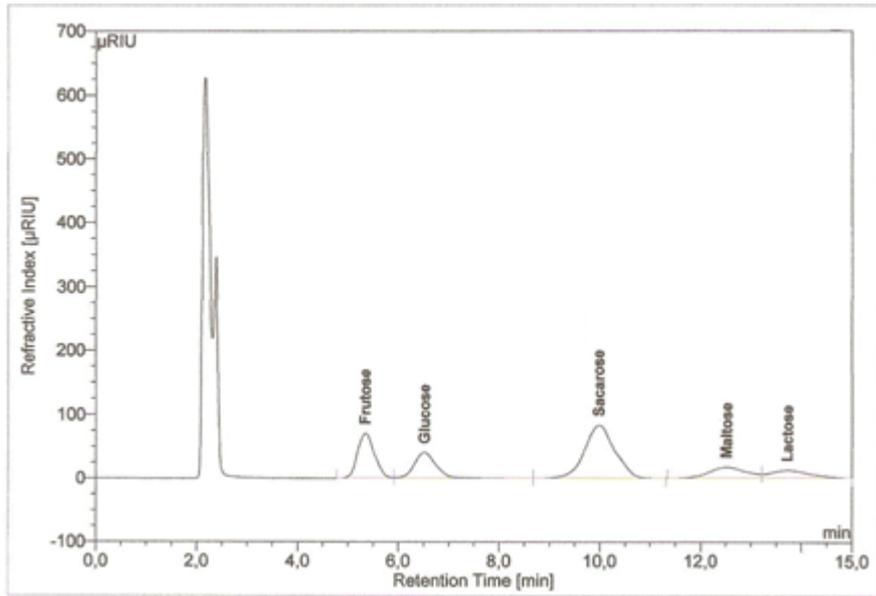


Figura A 2.3 – Cromatograma obtido para o padrão 10.

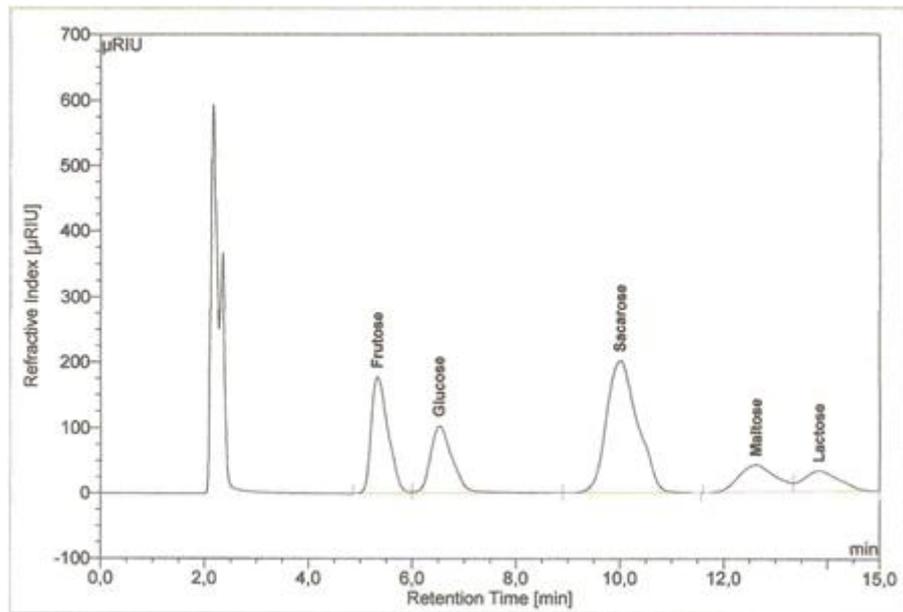


Figura A 2.4 – Cromatograma obtido para o padrão 25.

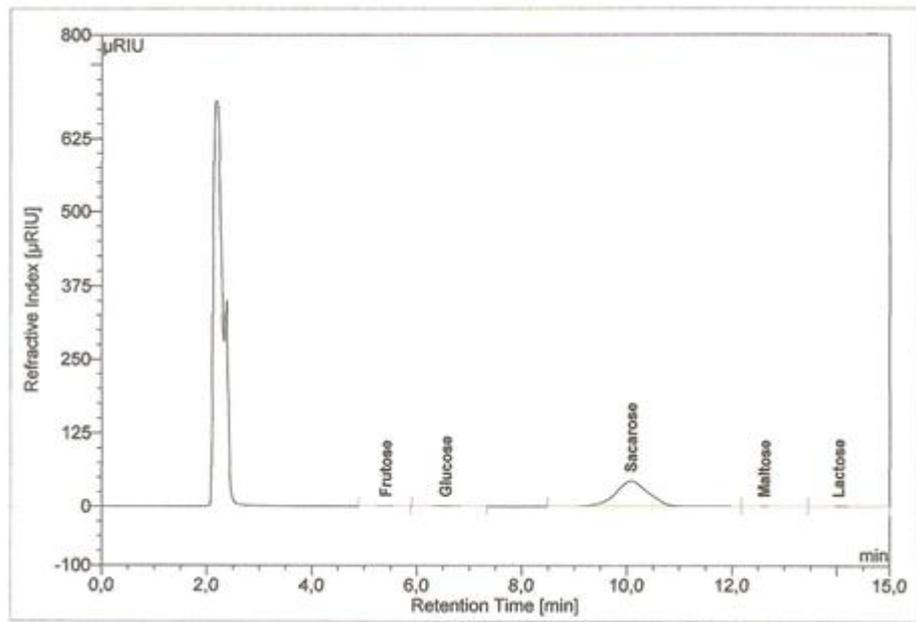


Figura A 2.4 – Cromatograma obtido para a amostra.

Anexo III – Tabelas estatísticas relevantes

Tabela A 3.1 – Valores críticos da distribuição t-student bilateral.

ν	α				ν	α				ν	α			
	0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01
2	2.92	4.30	6.96	9.92	12	1.78	2.18	2.68	3.05	24	1.71	2.06	2.49	2.80
3	2.35	3.18	4.54	5.84	13	1.77	2.16	2.65	3.01	26	1.71	2.06	2.48	2.78
4	2.13	2.78	3.75	4.60	14	1.76	2.14	2.62	2.98	30	1.70	2.04	2.46	2.75
5	2.02	2.57	3.36	4.03	15	1.75	2.13	2.60	2.95	35	1.69	2.03	2.44	2.72
6	1.94	2.45	3.14	3.71	16	1.75	2.12	2.58	2.92	40	1.68	2.02	2.42	2.70
7	1.89	2.36	3.00	3.50	17	1.74	2.11	2.57	2.90	50	1.68	2.01	2.40	2.68
8	1.86	2.31	2.90	3.36	18	1.73	2.10	2.55	2.88	60	1.67	2.00	2.39	2.66
9	1.83	2.26	2.82	3.25	19	1.73	2.09	2.54	2.86	80	1.66	1.99	2.37	2.64
10	1.81	2.23	2.76	3.17	20	1.72	2.09	2.53	2.85	100	1.66	1.98	2.36	2.63
11	1.80	2.20	2.72	3.11	22	1.72	2.07	2.51	2.82	∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Tabela A 3.2 – Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor unilateral ($\alpha=0,05$).

$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.226	2.151	2.071
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.165	2.089	2.007
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.092	2.015	1.932

Tabela A 3.3 – Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor unilateral ($\alpha=0,01$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55