



CATÓLICA  
ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

Validação de um método de cromatografia gasosa para determinação de perfis de ácidos gordos para novas matrizes alimentares

por

Cláudia Filipa Cordeiro Alves Fernandes

Julho de 2023



# CATÓLICA

## ESCOLA SUPERIOR DE BIOTECNOLOGIA

---

PORTO

### VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO DE CROMATOGRAFIA GASOSA PARA DETERMINAÇÃO DE PERFIS DE ÁCIDOS GORDOS PARA NOVAS MATRIZES ALIMENTARES

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Biotecnologia da  
Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia e Inovação

---

por

Cláudia Filipa Cordeiro Alves Fernandes

Orientadora (Empresa): Mestre Laura Sousa

Tutora (Universidade): Doutora Paula Teixeira

Julho de 2023

## **Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do Repositório Veritati da Universidade Católica do Porto.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho

Atribuição

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

## **Declaração de integridade**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade Católica do Porto.

## Resumo

Empresas como a Silliker pretendem responder às necessidades da segurança alimentar, através da utilização de várias técnicas de controlo da qualidade, sendo que estas mesmas também devem ser supervisionadas, através da validação das mesmas.

Neste estágio foi analisado a utilidade de um método de quantificação de ácidos gordos para cinco novas matrizes, com o objetivo de validar se este pode ser utilizado de forma viável nestas matrizes. Para tal, estudou-se a justeza, a repetibilidade, a precisão intermédia e a incerteza do método para cada matriz.

Para a avaliação da justeza e repetibilidade foram utilizados materiais de referência certificados, sendo utilizadas 7 réplicas das amostras criadas num único dia para estas análises. Foi possível observar através da justeza que todos os resultados estavam compreendidos entre os intervalos dos materiais de referência. No estudo da repetibilidade foi possível observar que todas as matrizes também foram aceitáveis. A precisão intermédia foi analisada através de ensaios duplicados em cinco dias diferentes dos mesmos materiais de referência. Após o cálculo do limite de precisão intermédia para todos os grupos de ácidos gordos notou-se que o maior limite corresponde a 1,74%, proveniente do grupo de ácidos gordos saturados.

A incerteza do método determinada estabelece que estes são fidedignos, pelo que pode ser concluído que o método pode ser utilizado para quantificar ácidos gordos nas matrizes em estudo para os intervalos definidos com segurança dos resultados. Futuramente, sugere-se a utilização de outras matrizes para avaliação da aplicabilidade do método noutros alimentos.

Em suma, o trabalho em equipa e o aperfeiçoamento de competências profissionais permitiu uma oportunidade de estar envolvida no meio científico-empresarial e na consciencialização das diversas aplicações da biotecnologia e inovação no contexto de trabalho. Além disso, os resultados obtidos responderam aos objetivos do trabalho e implementação de um método eficiente na deteção de ácidos gordos.

**Palavras-chave:** ácidos gordos, cromatografia gasosa, validação, matrizes

## Abstract

Companies like Silliker aim to meet food safety needs through the use of various quality control techniques, and these must also be supervised, through validation of these techniques.

In this internship the usefulness of a fatty acid quantification method for five new matrices was analyzed, with the objective of validating whether it can be feasibly used in these matrices. To do this, the fairness, repeatability, intermediate precision and uncertainty of the method was studied for each matrix.

Certified reference materials were used to evaluate the fairness and repeatability, and 7 replicates of the samples created in a single day were used for these analyses. It was possible to observe through the fairness that all results were within the ranges of the reference materials. In the repeatability study it was possible to observe that all the matrices were also acceptable. The intermediate precision was analyzed through duplicate tests on five different days of the same reference materials. After calculating the limit of intermediate precision for all fatty acid groups it was noted that the highest limit corresponds to 1.74% from the saturated fatty acid group.

The uncertainty of the determined method establishes that these are reliable, so it can be concluded that the method can be used to quantify fatty acids in the matrices under study for the defined ranges with certainty of the results. In the future, it is suggested that other matrices be used to evaluate the applicability of the method in other foods.

In summary, teamwork and the enhancement of professional skills provided an opportunity to be involved in the scientific-business environment and in the awareness of the various applications of biotechnology and innovation in the work context. In addition, the results obtained met the objectives of the work and implementation of an efficient method for the detection of fatty acids.

**Keywords:** fatty acids, gas chromatography, validation, matrices

# Índice

Resumo.....	5
Abstract.....	6
1. Introdução.....	8
1.1 Silliker Portugal S.A. ....	9
1.2 Objetivos do trabalho.....	10
2. Revisão da literatura.....	11
2.1 Ácidos gordos.....	12
2.1.1 Biossíntese de ácidos gordos.....	12
2.2 Técnicas analíticas de determinação de ácidos gordos - cromatografia gasosa.....	13
2.3 Validação de métodos analíticos .....	15
2.3.1 Parâmetros de validação .....	15
2.3.1.1 Justeza .....	15
2.3.1.2 Precisão intermédia .....	16
2.3.1.3 Repetibilidade .....	17
2.3.1.4 Gama de trabalho .....	18
2.3.1.5 Incerteza .....	19
3. Metodologia .....	22
3.1 Validação do método .....	23
3.2 Extração de ácidos gordos pelo método PAFQ.201 .....	23
3.2.1 Extração de ácidos gordos em leites, iogurtes e bebidas vegetais .....	24
3.2.2 Extração de ácidos gordos em produtos de panificação .....	25
3.2.3 Outras atividades laboratoriais .....	26
4. Resultados.....	27
4.1 Justeza.....	28
4.2 Precisão Intermédia .....	29
4.3 Repetibilidade .....	30
4.4 Gama de trabalho .....	34
4.5 Incerteza .....	34
5. Conclusões .....	36
6. Bibliografia .....	38
7. Anexos .....	43

## **1. Introdução**

## **1.1 Silliker Portugal S.A.**

Formada em julho de 1992, a Silliker surgiu em Vila Nova de Gaia como EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., com o objetivo de prestação de serviços ligados ao setor agro-alimentar. Em virtude do aumento da prevenção da qualidade e segurança alimentar da época, a EGI assume rapidamente a posição de líder nacional no setor.

Após várias modificações estruturais e reformulações nos laboratórios, bem como na integração da acreditação do laboratório no mercado, a empresa é adquirida pela multinacional norte-americana Silliker, atualmente Mérieux NutriSciences, dando origem à Silliker Portugal, S.A. passando a integrar um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar. Sob a supervisão da Mérieux NutriSciences, a Silliker expandiu os seus serviços para os setores do ambiente, consumo, empacotamento, farmacêutica e cosmética (*MerieuxNutrisciences*, n.d.-a; *MerieuxNutrisciences*, n.d.-b); e adicionou as especialidades de análise química, formação, certificação, investigação, rotulagem e avaliação sensorial à sua experiência em microbiologia e consultoria a fim de oferecer um conjunto completo de serviços às necessidades dos seus clientes.

Atualmente, a Mérieux NutriSciences é constituída por mais de 100 laboratórios acreditados através dos 5 continentes e uma equipa de mais de 8.000 colaboradores (*MerieuxNutrisciences*, n.d.-a).

A Silliker apresenta quatro laboratórios complementares e distintos para diferentes setores de análise, nomeadamente, o Laboratório de Química clássica, onde são realizadas as técnicas de análises químicas volumétricas, o Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, onde são realizadas essencialmente as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, o Laboratório de Microbiologia, que fornece as análises microbiológicas e o Laboratório de Análise Sensorial (*MerieuxNutrisciences*, n.d.-b).

Com o intuito de assegurar a competência desejada, a empresa estabelece políticas e procedimentos de trabalho que têm como objetivo garantir a excelência do serviço fornecido aos clientes. Um exemplo disso é a garantia de que todos os testes realizados sejam sempre executados conforme os métodos estabelecidos, atendendo aos requisitos dos clientes e seguindo o padrão normativo NP EN ISO/IEC 17025 (Requisitos gerais de competência para laboratórios de teste e calibração) (Iso, 2005).

## **1.2 Objetivos do trabalho**

Com base nos serviços fornecidos pela empresa e tendo em conta a necessidade de realizar análises rápidas, eficientes e cujos resultados sejam credíveis, este trabalho tem como objetivo, a validação do método de extração de ácidos gordos PAFQ.201, o qual utiliza cromatografia gasosa, em cinco matrizes da Silliker. Para tal serão avaliados os seguintes parâmetros: repetibilidade, precisão intermédia, justeza, gama de trabalho e incerteza. Para além disso, a oportunidade de estagiar nesta empresa permitiu a aquisição de experiência pelo estudante.

## **2. Revisão da literatura**

## 2.1 Ácidos gordos

Os ácidos gordos são o componente primário dos lípidos e apresentam um papel essencial em vários sistemas biológicos. Estes surgem na natureza em diversas formas como, fosfolípidos e colesterol, e podem ter origem animal ou vegetal. Estes apresentam um papel fulcral em diversos processos biológicos, como na reserva de energia, isolamento ou transporte de metabolitos (Bockisch, 2015; Hewavitharana et al., 2020; Roopashree et al., 2021).

Os ácidos gordos são constituídos por um ácido carboxílico e uma cadeia de hidrocarbonetos que pode conter entre 4 a 36 átomos de carbonos. Estes podem ser classificados conforme o número de átomos de carbono da cadeia principal: cadeias com menos de 6 átomos de carbono, entre 6 e 12 átomos e mais de 12 átomos são definidos como ácidos gordos de cadeia curta, média e longa, respetivamente, podendo esta classificação variar de acordo com o autor (Roopashree et al., 2021). Também podem ser agrupados conforme a configuração da molécula em ácidos gordos saturados, monoinsaturados, polinsaturados e *trans* (Hewavitharana et al., 2020; Los, n.d.).

Os ácidos gordos saturados não apresentam ligações duplas entre carbonos enquanto, os ácidos gordos insaturados podem apresentar uma ou mais ligações duplas na sua cadeia carbonada podendo ser classificados em mono, poli ou *trans* de acordo com o número das mesmas. Como enuncia a nomenclatura, os monoinsaturados possuem uma única ligação dupla e os polinsaturados apresentam duas ou mais (Alain Karleskind, 1992; Jonsson et al., 2017; Luick, 2020).

Geralmente, as ligações duplas presentes nas cadeias de ácidos gordos apresentam-se na configuração *cis*, no entanto, quando estas se encontram numa configuração *trans* as suas propriedades bem como a sua estrutura são alteradas. (Alain Karleskind, 1992; Oteng & Kersten, 2020).

### 2.1.1 Biossíntese dos ácidos gordos

A biossíntese de ácidos gordos de cadeia longa ocorre nos seres vivos através de uma sequência de reações repetitivas que ocorre no citoplasma. Esta biossíntese está dependente de um intermediário de 3 carbonos, o malonil-CoA, composto formado pela carboxilação da acetil-CoA (cuja respetiva síntese ocorre na mitocôndria). O processo de

biossíntese, catalisado pelo complexo ácido gordo sintase, inicia-se por uma reação de condensação que forma uma molécula de 4 carbonos cujo comprimento vai aumentando à medida que se segue uma cascata de três reações: redução, desidratação e novamente redução. Este ciclo de 3 reações vai sendo repetido, e a cada ciclo completado são acrescentados 2 carbonos à molécula inicial, até que a cadeia do ácido gordo esteja formada (Heil et al., 2019; Los, n.d.).

## **2.2 Técnicas analíticas de determinação de ácidos gordos – Cromatografia gasosa**

Existem várias técnicas de extração e determinação de ácidos gordos, com diversas vantagens e desvantagens associadas a cada uma (Ecker et al., 2012; Igarashi et al., 2009; Indarti et al., 2005). Na Silliker foi considerado que o processo de cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID) apresentava a melhor relação entre eficiência e custo, sendo algumas das suas vantagens uma maior precisão, resolução, exatidão e separação dos componentes, a necessidade de uma menor quantidade de amostra, juntamente com a sua rapidez e fácil reprodutibilidade de análises (Los, n.d.; Seppänen-Laakso et al., 2002; Tang & Row, 2013). Uma desvantagem de usar o CG-FID é que este apenas consegue analisar compostos voláteis, pelo que é necessário transformar os ácidos gordos em ésteres metílicos (FAME) (Hamano et al., 2020; Tang & Row, 2013).

A cromatografia é uma técnica analítica versátil que pode ser utilizada para a separação e identificação de uma vasta gama de compostos em várias áreas e pode fornecer informações sobre a qualidade e a quantidade de componentes de interesse numa amostra (Braithwaite & Smith, 1999; Etre, 2000; Holcapek, Michal, 2017; Seader et al., 2011; Sievers, 1964).

Na cromatografia gasosa (CG) a amostra é vaporizada e depois separada nos seus componentes com base nas suas propriedades. Geralmente, aplica-se na separação e análise de compostos voláteis, como os compostos orgânicos, numa mistura gasosa ou líquida. Ubiquamente, a amostra é injetada numa coluna que contém um material de suporte sólido que funciona como fase estacionária. A coluna é aquecida a uma temperatura elevada, o que leva à vaporização da amostra e ao seu transporte numa corrente de gás inerte (fase móvel). Quanto maior a compatibilidade dos elementos da amostra com a fase estacionária, maior é o período de tempo que estes ficam retidos na mesma, isto permite separar os diferentes ácidos gordos presentes numa amostra

(Braithwaite & Smith, 1999; Ettre, 2000; Holcapek, Michal, 2017; Lenti et al., 2022; Los, n.d.; Sievers, 1964; Zhang et al., 2015).

Na Siliker, o GC-FID utiliza uma chama de arraste de hidrogénio que ioniza as moléculas em estudo, produzindo um sinal que é detetado e traduzido num cromatograma com diferentes picos. Por questões ecológicas e de facilidade de instalação, preferencialmente usa-se o hidrogénio, porém, o hélio também poderá ser usado para arrastar os iões até ao detetor (Bernardoni et al., 2019). Através de padrões previamente realizados nas mesmas condições, os picos poderão ser associados a ácidos gordos correspondentes e a sua área poderá ser utilizada para aferir a concentração dos compostos na amostra (Los, n.d.).

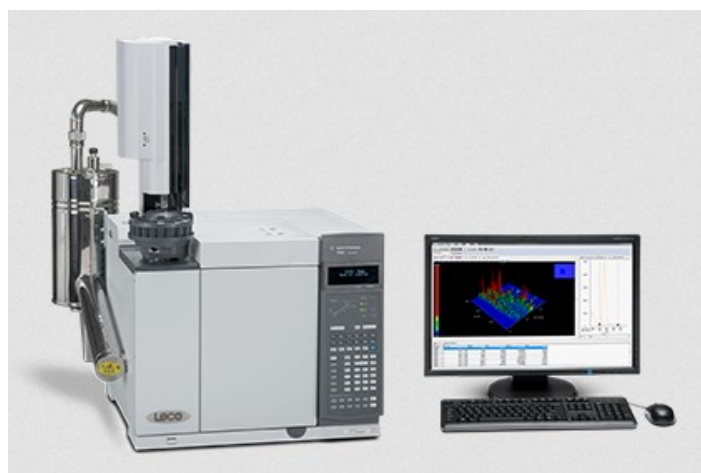


Figura 2.1 - Exemplo de equipamento de cromatografia gasosa (Leco, n.d.)

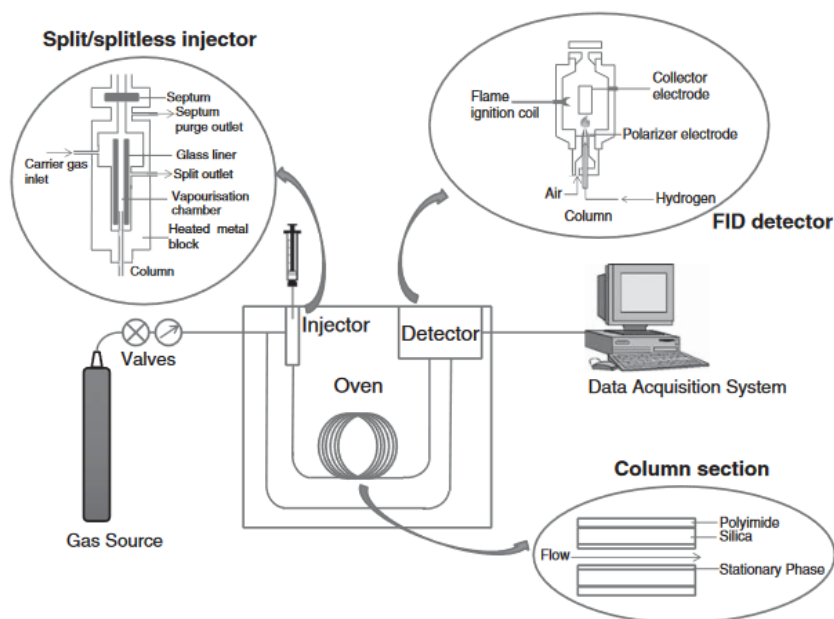


Figura 2.2 - Diagrama de funcionamento do cromatograma com detetor de ionização de chama (Soria et al., 2014)

## **2.3 Validação de métodos analíticos**

Um ensaio é um processo suscetível a erros aleatórios ou sistemáticos que poderão influenciar significativamente o resultado final. Através da validação de métodos de ensaios e otimização dos mesmos permite aos laboratórios a realização de ensaios internos para resultados fidedignos e adequados à matriz analisada.

A validação de um método é definida como um processo que prova que um método analítico é adequado para a finalidade que foi proposta. Isto significa que, o objetivo da validação é fornecer provas que o método em estudo oferece resultados credíveis e reproduzíveis.

Estes resultados podem ser obtidos através de uma validação analítica do método, a qual garante que todas as medições feitas em análises futuras de rotina recorrendo ao mesmo método serão próximas o suficiente do valor verdadeiro da substância a analisar numa amostra (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). Esta validação também ocorre no caso do estudo de uma técnica aplicada a outras matrizes, como é o caso deste relatório.

Segundo a ISO 17025:2018, que é utilizada por várias empresas e laboratórios como meio de acreditação da qualidade dos mesmos, os métodos de ensaio implementados em laboratório podem ser normalizados ou não, ou seja, os não normalizados devem inicialmente ser validados e seguidamente ser sujeitos a uma avaliação periódica para serem reconhecidos pela comunidade laboratorial. Esta norma também define possíveis processos para validar um método, como ensaios inter e intralaboratoriais, métodos estatísticos ou a utilização de materiais de referência ou amostras cegas em ensaios, entre outros.

### **2.3.1 Parâmetros de validação**

#### **2.3.1.1 Justeza**

A justeza, também denominada de veracidade, em teoria corresponde ao grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência. Na prática, como este objetivo não é viável, estima-se este parâmetro através da média do valor dos ensaios realizados e o valor de referência (neste caso proveniente dos materiais de referência (MRC), sendo este o valor do “erro de justeza”.

Além deste método, também se poderiam ter usado ensaios interlaboratoriais ou testes comparativos para obter este valor.

$$Justeza = \frac{\text{valor laboratorial}}{\text{valor MRC}} * 100$$

**Equação 2.3.1.1** - Justeza

### 2.3.1.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia pode ser definida como a precisão avaliada, na mesma amostra, em amostras idênticas, recorrendo ao mesmo método no mesmo laboratório. Ao avaliar este parâmetro podemos incluir outras condições definindo exatamente quais as que vão variar por exemplo, o analista, os equipamentos ou o tempo. Esta medida, que pode também ser referida como reprodutibilidade intralaboratorial é a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório, sendo por isso a mais aconselhável (Augusto et al., 2000).

O cálculo deste parâmetro implica que seja realizado primeiro o desvio padrão da precisão intermédia ( $S_i$ ) cujo valor é obtido através da seguinte fórmula.

$$\text{Desvio padrão da precisão intermédia} = S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum (D1 - D2)^2}$$

**Equação 2.3.1.2.1** – Desvio padrão da precisão intermédia

Na equação 2.3.1.2.1, o  $t$  corresponde ao número de duplicados realizados em análise enquanto o  $D1$  e o  $D2$  correspondem respetivamente, ao ensaio 1 e 2 dos duplicados realizados.

Tendo o valor do desvio padrão da precisão intermédia é possível calcular o limite de precisão intermédio (equação 2.3.1.2.2).

$$\text{Limite de precisão intermédio} = \frac{S_i \times 2,8}{\bar{x}_{\text{duplicados}}}$$

**Equação 2.3.1.2.2** – Limite de precisão intermédio

### 2.3.1.3 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas, ou seja, ensaios realizados sobre a mesma amostra, e em condições tão estáveis quanto seja possível, por exemplo: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, curtos intervalos de tempo etc.

O limite de repetibilidade ( $r$ ) é definido como o valor abaixo do qual se deve situar, com uma determinada probabilidade (geralmente 95%), a diferença absoluta entre 2 resultados de ensaio, obtidos nas condições mencionadas (Augusto et al., 2000).

O cálculo da repetibilidade implica calcular previamente diversos outros parâmetros, dentre eles a média ( $\bar{x}$ ) dos valores obtidos em laboratório, que uma vez calculada permite obter a variância pela seguinte fórmula (equação 2.3.1.3).

$$\text{Variância} = S_{ri}^2 = \frac{\sum(x_{tab} - \bar{x})^2}{n - 1}$$

**Equação 1.5.1.3** – Variância da repetibilidade

Na equação 2.3.1.3.

$S_{ri}^2$  corresponde à variância

$x_{tab}$  é o valor obtido em laboratório

$n-1$  são os graus de liberdade

Para além da variância é depois necessário efetuar o cálculo do desvio padrão ( $S_{ri}$ ) a partir da mesma (equação 2.3.1.4).

$$\text{Desvio padrão} = S_{ri} = \sqrt{S_{ri}^2}$$

**Equação 2.3.1.4** – Desvio padrão da repetibilidade

Por fim, o limite da repetibilidade ( $r$ ), efetuado para um nível de confiança de 95%, é obtido pela equação 2.3.1.5.

$$\text{Limite de repetibilidade} = r = 2,8 \times S_{ri}$$

**Equação 2.3.1.5** – Limite de repetibilidade

O limite de repetibilidade relativo correspondente é calculado pela equação 2.3.1.6.

$$\text{Limite de repetibilidade relativo} = \frac{r}{\bar{x}} \times 100$$

**Equação 2.3.1.6** – Limite de repetibilidade relativo

O C de Cochran é calculado para efetuar o teste de Cochran e é definido pela equação 2.3.1.7.

$$C = \frac{MS_{ri}^2}{\sum S_{ri}^2}$$

**Equação 2.3.1.7** – C de Cochran

Na equação 2.3.1.7:

$MS_{ri}^2$  corresponde à maior variância calculadas das matrizes

$\sum S_{ri}^2$  é a soma de todas as variâncias

Os valores de Gp mínimo e máximo são necessários para o teste de Grubbs, o qual verifica se existe algum valor dentro de uma matriz distancia-se demasiado das outras amostras. São determinados através da equação 2.3.1.8.

$$Gp = \frac{x}{\bar{x}}$$

**Equação 2.3.1.8** – Valor de Gp

Sendo x o menor/maior valor obtido em laboratório para o Gp mínimo e máximo respetivamente.

O Coeficiente de Variação de Repetibilidade ( $CV_r$ ), para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado pela equação 2.3.1.9:

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

**Equação 2.3.1.9** – Coeficiente de variação da repetibilidade

#### **2.3.1.4 Gama de trabalho**

A gama de trabalho corresponde ao intervalo em que o método avaliado produz resultados com uma incerteza aceitável. Neste trabalho a gama de concentrações foi determinada através da concentração mínima apresentada pelo equipamento para o limite inferior e o maior valor registado para as matrizes analisadas para o limite superior.

### 2.3.1.5 Incerteza

Há várias maneiras de calcular a incerteza de medição, com duas principais abordagens distintas: a abordagem "passo a passo" e a abordagem baseada em dados de validação. Em ambos os casos, o principal objetivo é determinar as incertezas combinada ( $u_c$ ) e expandida (U).

As contribuições para a incerteza global são combinadas em conformidade obtendo-se a incerteza padrão combinada  $u_c(y)$ . A incerteza padrão combinada é um desvio padrão cujo valor é estimado através da propagação das incertezas.

A incerteza expandida (U) é obtida através da 2.3.1.10.

$$U(x) = k \times u_c$$

Equação 2.3.1.10 – Incerteza expandida

Na equação supracitada o k corresponde ao fator de expansão que, caso os resultados obtidos sigam uma distribuição normal, é dois assumindo um nível de confiança de 95%.

Para se calcular  $u_c(y)$ , é necessário estimar da incerteza de medição é realizada combinando as incertezas associadas à precisão e à exatidão levando em consideração as componentes dos erros aleatórios e sistemáticos, respetivamente. A incerteza padrão combinada é obtida através da fórmula 2.3.1.11.

$$u_c(y) = \sqrt{(u_{(precisão) relativa})^2 + (u_{(justeza) relativa})^2}$$

Equação 2.3.1.11 – Incerteza padrão combinada

Neste sentido, esta abordagem inicia-se pela determinação, em separado, das componentes da incerteza relativa associada à precisão e à exatidão, representadas por  $u_{(precisão) relativa}$  e  $u_{(justeza) relativa}$ , respetivamente. No entanto, é importante destacar que estas incertezas devem estar na forma de incertezas relativas para que possam ser combinadas.

Para calcular a incerteza relativa associada à precisão, é necessário determinar a incerteza associada à precisão intermediária ( $u_{precisão}$ ), que equivale ao  $S_1$ . Em seguida, deve-se considerar a incerteza associada à precisão intermediária na forma relativa ( $u_{(precisão) relativa}$ ), que é equivalente ao coeficiente de variação intra-ensaio (CVI).

O  $u_{(\text{precisão intermédia})}$  é calculada através da equação seguinte.

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

**Equação 2.3.1.12** – Incerteza relativa associada à precisão

Para calcular a  $u_{(\text{precisão})}$  relativa é necessário verificar se há 1 ou mais materiais de referência inseridos no intervalo.

No caso de existir apenas um material de referência inserido no intervalo:

- O *bias* relativo é calculado da seguinte forma.

$$bias_{relativo} = \frac{(\overline{LV} - CV)}{CV} \times 100$$

**Equação 2.3.1.13** – *Bias* relativo

- $\overline{LV}$  corresponde à média dos ensaios de laboratório da matriz
- $CV$  corresponde ao valor certificado do material de referência certificado

O desvio padrão do *bias*, correspondente ao desvio padrão de todos os valores de MCR obtidos, é calculado pela seguinte forma.

$$S_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n n (LV_i - \overline{LV})^2}{n - 1}}$$

**Equação 2.3.1.14** – Desvio padrão do *bias* relativo

- O  $u(C_{Ref})_{relativo}$  é calculado com a seguinte fórmula.

$$u(C_{Ref})_{relativo} = \frac{u(C_{Ref})}{CV} \times 100$$

**Equação 2.3.1.14** – Desvio padrão do *bias* relativo

- $u(C_{Ref})$  corresponde à componente de incerteza do certificado do material de referência certificado
- $CV$  corresponde ao valor certificado do material de referência certificado

- O  $u_{(justeza) relativa}$  é calculado com a fórmula 2.3.1.15.

$$u_{(justeza) relativa} = \sqrt{bias_{relativo}^2 + \frac{S_{bias\ relativo}^2}{\sqrt{n}} + u(C_{Ref})_{relativo}^2}$$

**Equação 2.3.1.15** – Incerteza relativa associada à exatidão

No caso de existir vários materiais de referência inseridos no intervalo.

- O Root Mean Square do bias relativo ( $RMS_{bias\ relativo}$ ) é calculado com a equação 2.3.1.16.

$$RMS_{bias\ relativo} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias_{relativo})^2}{n_{CRM}}}$$

**Equação 2.3.1.16** – Incerteza relativa associada à exatidão

- $\sum_{i=1}^n (bias_{relativo})$  corresponde à soma dos bias relativos dos materiais de referência
- $n_{CRM}$  corresponde ao número de materiais de referência
- A média de  $u(C_{Ref})_{relativo}$  é calculada com a fórmula seguinte.

$$\overline{u(C_{Ref})_{relativo}} = \frac{\sum_{i=1}^n u(C_{Ref})_{relativo}}{n}$$

**Equação 2.3.1.17** – Média da componente de incerteza dos certificados dos materiais de referência certificados

- O  $u_{(justeza) relativa}$  é calculado com a fórmula 2.3.1.18.

$$u_{(justeza) relativa} = \sqrt{RMS_{bias\ relativo}^2 + \overline{u(C_{Ref})_{relativo}}^2}$$

**Equação 2.3.1.18** – Incerteza relativa associada à exatidão

### **3. Metodologia**

### **3.1 Validação do método**

Para a validação dos métodos utilizados neste trabalho foram realizadas extrações de cinco materiais de referência: caramelo de barrar, chocolate de barrar, salmão, ração animal e pistachio.

Para o estudo de repetibilidade foram realizados oito ensaios no mesmo dia das cinco amostras. Para o estudo da precisão intermédia foram realizados dois duplicados em seis dias diferentes.

### **3.2. Extração de ácidos gordos pelo método PAFQ.201**

Na extração de ácidos gordos dos alimentos ou materiais de referência em estudo, uma quantidade da amostra é pesada copo de 250 (0,5) mL e o volume foi perfazido com uma solução de n-hexano:2-propanol (2:3), de modo a facilitar a extração dos ácidos gordos da amostra. Caso a solução permaneça turva após esta junção, deverá centrifugar-se a solução para separar os sedimentos.

Paralelamente, num balão de fundo plano devidamente identificado, é introduzido um funil com um papel de filtro dobrado, no qual é adicionado sulfato de sódio anidro no interior do mesmo. Toda a solução do solvente no gobelé (ou centrifugada se for necessário) é então transferida para o funil, sendo o filtrado recolhido no balão.

Posteriormente, o balão é levado ao evaporador rotativo de modo a evaporar o solvente completamente. Este depois é seco numa estufa, até a evaporação total do solvente.

Após desligar a bomba de vácuo, a torneira de vácuo é aberta, o balão elevado, desenroscado do suporte é colocado na estufa de secagem até à evaporação total do solvente. Seguidamente, retira-se o balão da estufa com o uso de uma luva.

Parte da gordura da amostra, o sobrenadante, é então transferida para um tubo e é adicionado isoctano e reagente de metilação. A mistura obtida no tubo é agitada vigorosamente e colocada de seguida em repouso até que a solução se torne límpida, com duas fases distinguíveis. Finalmente, a fase superior é transferida para um vial com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e analisada por cromatografia gasosa.

Como as matrizes alimentares são diferentes, a extração de ácidos gordos em alguns grupos envolve outros reagentes e passos, nomeadamente os grupos de leites, iogurtes, bebidas vegetais e produtos de panificação (*Procedimento de Laboratório SILIKER: Determinação de Ácidos Gordos Componentes. Método Por Cromatografia Gasosa Com Detetor FID*, 2022).

### 3.2.1 - Extração de ácidos gordos em leites, iogurtes e bebidas vegetais

Numa Hotte, foi montado o sistema de ampola de decantação, como exemplificado na figura 3.1.



**Figura 3.1-** Montagem da ampola de decantação (*Glassware*, 2017)

Na ampola adiciona-se a amostra, amoníaco, etanol e éter dietílico. A ampola é fechada com uma tampa e a pressão presente na mesma é libertada na totalidade, invertendo a ampola e abrindo a torneira, sendo este procedimento repetido várias vezes. Seguidamente, a ampola é agitada e colocada no suporte inicial, removendo também a tampa. Em ciclos repetitivos adicionou-se n-hexano e, posteriormente, sulfato de sódio duas vezes, sendo que entre cada adição de reagente aguarda-se que ocorra uma separação de fases da amostra e descarta-se a fase inferior, abrindo a torneira.

Tal como no método geral do PAF.201, a amostra extraída é evaporada no evaporador rotativo e estufa de secagem, mas o extrato de gordura é obtido pela adição de n-heptano e reagente de metilação, ao invés de isoctano como descrito anteriormente, sendo esta

mistura depois agitada e colocada em repouso até que se distingam duas fases de solução (*Procedimento de Laboratório SILIKER: Determinação de Ácidos Gordos Componentes. Método Por Cromatografia Gasosa Com Detetor FID, 2022*).

### 3.2.2 Extração de ácidos gordos em produtos de panificação

A amostra é pesada para um balão, ao qual se adiciona ácido clorídrico. De seguida, monta-se o sistema de hidrólise numa Hotte, como presente na figura 3.2, sendo importante mencionar que a fonte de aquecimento é uma manta de aquecimento.

Na hotte, é ligada a manta de aquecimento e monta-se o sistema de hidrólise.

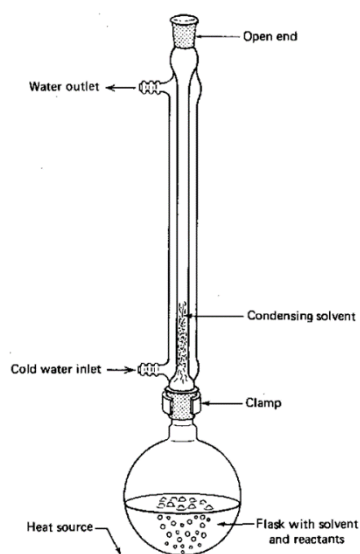


Figura 3.2 - Montagem do sistema de hidrólise (James W Zubrick, 2007)

Depois do início da ebulição, a amostra continua a hidrolisar por 40 minutos, após os quais a manta de aquecimento é desligada e o balão é retirado da mesma para arrefecer.

Após a montagem da ampola, que já foi referenciada no tópico anterior, a amostra é transferida para a mesma e são adicionados etanol e éter dietílico, sendo então repetidos também os ciclos definidos anteriormente, mas com éter de petróleo e etanol adicionados, este último em dois ciclos seguidos.

O procedimento deste ponto adiante é em tudo semelhante ao anteriormente estabelecido, exceto pela adição de éter de petróleo juntamente com o reagente de metilação em vez de

n-heptano (*Procedimento de Laboratório SILIKER: Determinação de Ácidos Gordos Componentes. Método Por Cromatografia Gasosa Com Detetor FID, 2022*).

### **3.2.3 Outras atividades laboratoriais**

Para além da análise dos ácidos gordos por cromatografia, o desenvolvimento de um estágio curricular na Siliker permitiu o desenvolvimento de capacidades de organização, através da organização do material de laboratório. Além disso, também tive oportunidade de preparar amostras e meios de cultura, em adição em auxiliar no processo de determinação de vitaminas, metais, fenóis, amidos e hidroxicolina.

## **4. Resultados**

Nesta validação do método foram analisadas as seguintes matrizes: ração animal, caramelo para barrar, chocolate para barrar, pistacho e salmão.

#### **4.1 Justeza**

A justeza é definida como o grau de concordância entre a média de um número de valores obtidos em laboratório e um valor de referência. A justeza deste método foi obtida através da comparação dos ensaios obtidos em laboratório com os valores presentes nos respectivos certificados dos materiais de referência em estudo. A matriz de ração animal não foi analisada neste parâmetro devido à inexistência dos valores necessários para estes cálculos no certificado de referência correspondente.

Na tabela 1 estão presentes os valores dos ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados em percentagem, para além da média calculada destes mesmos, o intervalo e valor alvo definidos pelo certificado MRC, presente no Anexo C, e a justeza calculada utilizando a Equação 2.3.1.1.

**Tabela 4.1** Resultados da justeza

	M +/- DP (%)	Intervalo (%)	Valor Alvo (%)	Justeza
<b>Caramelo de barrar</b>				
Sat	18,83 +/- 0,061	17,0 - 20,8	18,9	99,63
Mono	57,92 +/- 0,043	54,0 - 61,0	57,5	99,72
Poli	23,00 +/- 0,089	20,8 - 25,4	23,1	99,55
<b>Chocolate de barrar</b>				
Sat	32,82 +/- 0,067	29,2 - 35,8	32,5	99,98
Mono	55,91 +/- 0,070	52,3 - 59,3	55,8	97,21
Poli	11,14 +/- 0,016	10,2 - 12,4	11,3	98,61
<b>Salmão</b>				
Sat	14,92 +/- 0,093	13,8 - 16,8	15,3	97,54
Mono	56,23 +/- 0,073	52,1 - 59,1	55,6	99,13
Poli	28,04 +/- 0,051	25,6 - 31,4	28,5	98,37
<b>Pistachio</b>				
Sat	10,81 +/- 0,031	9,5 - 11,7	10,6	98
Mono	57,33 +/- 0,034	53,3 - 60,3	56,8	99,94
Poli	31,81 +/- 0,009	29,2 - 35,6	32,4	98,17

**Legenda:** M - Média; DP - Desvio Padrão

Pela análise da tabela, pode-se verificar que todos os resultados estão compreendidos dentro do intervalo destacado nos respetivos MRC.

#### 4.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia foi obtida através da realização de 6 amostras em duplicado em dias diferentes, pela mesma analista. Como este trabalho tem como objetivo a extensão das matrizes em que o método PAFQ.201 pode ser utilizado, o desvio padrão, o limite da precisão intermédia e o coeficiente de variação do método são calculados utilizando os dados aqui apresentados juntamente com os dados de outras matrizes analisadas anteriormente pela empresa, mas que não estão presentes neste relatório.

**Tabela 4.2** Valores determinados de desvio padrão (Si), da precisão intermédia (L.P.I.), e coeficiente de variação médio (C.M.V) para o método PAFQ.201 nos intervalos e população designados.

	Mono		Poli		Sat	
Intervalo	<50	> 50	<30	>30	< 30	> 30
População	41	31	53	19	44	28
Desvio padrão do intervalo (Si)	0,0615	0,0461	0,1035	0,0886	0,1086	0,0771
Limite da precisão intermédia (L.P.I.)	0,4073	0,2103	1,6378	0,6057	1,7388	0,5125
Coeficiente de variação médio (C.V.M.)	0,1455	0,0751	0,5850	0,2163	0,6211	0,1830

A precisão intermédia é normalmente utilizada para analisar a forma como os resultados variam aquando de uma única variável, neste ensaio essa variável é o tempo, entre as amostras em estudo aquando de uma única matriz. Os limites de precisão aqui apresentados são calculados para várias matrizes que sofreram o mesmo procedimento, sendo que todos os limites são inferiores a 1,74%, como se pode observar na tabela 4.2, correspondente ao limite de precisão intermédio no estudo dos ácidos gordos saturados. Estes dados são também importantes para determinar a incerteza do método.

### 4.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada através de 7 ensaios em condições de repetibilidade, pela mesma analista, no mesmo dia e dos dados de matrizes analisadas anteriormente, em condições semelhantes, na empresa.

Na Tabela 4.3.1 estão discriminados os valores obtidos em laboratório para as matrizes em estudo no âmbito da repetibilidade, juntamente com as respetivas médias, variâncias, desvios padrão, desvios padrão relativos, limites de repetibilidade (L.R.) e limites de repetibilidade relativos (L.R.R.).

**Tabela 4.3.1** Resultados analisados dos ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados e insaturados para as matrizes de chocolate de barrar, caramelo de barrar, pistacho, ração animal e salmão no âmbito da repetibilidade, nomeadamente a média, variância, desvio padrão, desvio padrão relativo, limite de repetibilidade e limite de repetibilidade relativo.

	M +/- DP (%)	Variância	Desvio padrão relativo	Limite da repetibilidade (L.R)	Limite da repetibilidade relativo (L.R.R)
<b>Mono</b>					
Caramelo	57,916 +/- 0,043	0,002	0,074	0,121	0,208
Chocolate	55,914 +/- 0,070	0,005	0,125	0,196	0,351
Salmão	45,241 +/- 0,050	0,002	0,109	0,139	0,306
Pistacho	57,331 +/- 0,034	0,001	0,059	0,094	0,164
Ração	56,228 +/- 0,073	0,005	0,131	0,206	0,366
<b>Poli</b>					
Caramelo	22,996 +/- 0,089	0,008	0,388	0,250	1,086
Chocolate	11,143 +/- 0,016	0,000	0,146	0,046	0,410
Salmão	28,035 +/- 0,051	0,003	0,181	0,142	0,508
Pistacho	31,807 +/- 0,009	0,000	0,029	0,026	0,083
Ração	20,156 +/- 0,073	0,005	0,360	0,203	1,009
<b>Sat</b>					
Caramelo	18,831 +/- 0,061	0,004	0,323	0,170	0,905
Chocolate	63,971 +/- 0,040	0,002	0,062	0,111	0,173
Salmão	14,924 +/- 0,093	0,009	0,626	0,261	1,752
Pistacho	10,812 +/- 0,031	0,001	0,283	0,086	0,792
Ração	33,649 +/- 0,095	0,009	0,284	0,267	0,794

**Legenda:** M - Média; DP - Desvio Padrão

Analisando a tabela, pode-se observar que o limite de repetibilidade relativo para os ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados e saturados estão compreendidos nos intervalos [0,208 - 0,366] %; [0,083-1,086] % e [0,173-1,752] %, respetivamente. O maior valor do limite de repetibilidade observa-se na matriz do salmão para os ácidos gordos saturados, nomeadamente 1,752%, o que significa que esta matriz aceita uma diferença maior entre resultados obtidos, visto que o desvio padrão é mais elevado.

Para os valores de Gp mínimos e máximos serem aceites, estes devem ser inferiores aos valores críticos a 1% presentes no anexo D. Estes valores são calculados utilizando a equação 2.3.1.8 Todas as matrizes foram consideradas aceitáveis depois da utilização do teste de Grubbs (tabela 4.3.2).

**Tabela 4.3.2** Teste de Grubbs para os ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados e saturados.

	População	Valor Crítico 1%	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
<b>Mono</b>						
Caramelo	7	2,139	2,047	Aceitável	0,987	Aceitável
Chocolate	7	2,139	1,260	Aceitável	1,324	Aceitável
Salmão	7	2,139	1,084	Aceitável	1,268	Aceitável
Pistacho	7	2,139	1,573	Aceitável	1,406	Aceitável
Ração	7	2,139	1,226	Aceitável	1,708	Aceitável
<b>Poli</b>						
Caramelo	7	2,139	1,308	Aceitável	1,065	Aceitável
Chocolate	7	2,139	1,334	Aceitável	1,178	Aceitável
Salmão	7	2,139	1,055	Aceitável	1,634	Aceitável
Pistacho	7	2,139	1,011	Aceitável	1,964	Aceitável
Ração	7	2,139	2,071	Aceitável	1,047	Aceitável
<b>Sat</b>						
Caramelo	7	2,139	1,472	Aceitável	1,271	Aceitável
Chocolate	7	2,139	1,448	Aceitável	1,391	Aceitável
Salmão	7	2,139	1,149	Aceitável	1,511	Aceitável
Pistacho	7	2,139	1,185	Aceitável	1,852	Aceitável
Ração	7	2,139	1,545	Aceitável	1,264	Aceitável

O teste C de Cochran (equação 2.3.1.7) é utilizado para determinar se é necessário eliminar alguma matriz para calcular a repetibilidade de um método tendo como base a análise das variâncias calculadas para cada matriz utilizada no estudo da precisão do método. Tendo esta informação em mente, nestes cálculos também são acontadas matrizes da mesma família das matrizes em estudo analisadas anteriormente pela empresa. Todos os resultados obtidos foram aceitáveis, visto que nenhum valor é superior ao valor crítico tabelado, pelo que não foi necessário rejeitar nenhuma matriz.

**Tabela 4.3.3** Teste C de Cochran

	Intervalo	Nº matrizes	Nº ensaios	Maior variância	C de Cochran	Valor crítico tabelado - CC (5 %):
Mono	< 50	7	7	0,005	0,280	0,3726
	> 50	5	7	0,005	0,382	0,4783
Poli	< 30	9	7	0,009	0,253	0,3067
	> 30	3	7	0,005	0,597	0,6771
Sat	< 30	7	7	0,009	0,283	0,3726
	> 30	5	7	0,009	0,477	0,4783

Após a análise do teste de Grubbs e de Cochran, e consequente verificação que todos os resultados são aceites, calculou-se o valor do limite de repetibilidade (equação 2.3.1.5) e o relativo (equação 2.3.1.6) e o coeficiente de variação médio relativo (equação 2.3.1.9) para os respetivos ácidos gordos nas respetivas gamas.

**Tabela 4.3.4** Cálculos do limite de repetibilidade, limite de repetibilidade relativo e o coeficiente de variação médio relativo

	Intervalo	Limite de repetibilidade	Limite de repetibilidade relativo	Coeficiente de variação relativo
Mono	< 50	0,138	0,321	0,115
	> 50	0,139	0,237	0,085
Poli	< 30	0,148	0,897	0,320
	> 30	0,134	0,380	0,136
Sat	< 30	0,168	1,141	0,408
	> 30	0,163	0,444	0,159

#### 4.4 Gama de trabalho

A gama de trabalho é delimitada pelo limite de qualificação (LQ), que neste caso é definida como a concentração mínima apresentada pelo equipamento (0,5 %) como o valor mínimo e por um valor determinado pontualmente que seja superior ao valor mais alto obtido para cada ácido gordo em estudo na repetibilidade. Na tabela 4.4 estão presentes as gamas de trabalho delimitadas, com as respectivas incertezas dentro de cada intervalo.

Tabela 4.4 Gamas de trabalho

	Gama (s) de trabalho		Apresentação dos resultados (resultado ± incerteza)					
Mono	0,05	47,49	0,05	±	0,01	47,49	±	0,95
	47,5	49,9	47,5	±	1	49,9	±	1
	50	85	50	±	1	85	±	1,7
Poli	0,05	24,49	0,05	±	0,01	24,49	±	0,98
	25	40	25	±	1	40	±	1,6
Sat	0,05	47,49	0,05	±	0,01	47,49	±	0,95
	47,5	49,9	47,5	±	1	49,9	±	1
	50	85	50	±	1	85	±	1,7

#### 4.5 Incerteza

A incerteza foi estimada utilizando os dados de justeza e de precisão obtidos. Como os limites de repetibilidade são semelhantes para os ácidos gordos monoinsaturados e não havia materiais de referência para uma das gamas (< 50) usou-se como referência a outra gama de trabalho. Os valores CRM foram apresentados anteriormente na tabela 4.1. Todas as incertezas estimadas estão abaixo de 5%, sendo as incertezas calculadas para os dois intervalos dos ácidos gordos polinsaturados as de maior valor, 3,74% e 3,33% para os intervalos <30 e >30 respectivamente, pelo que, segundo os critérios estabelecidos, a metodologia é apropriada para estimar a incerteza em todas as gamas de trabalho das matrizes em estudo.



## **5. Conclusões**

A validação de um método analítico envolve sete fases, nomeadamente a determinação dos parâmetros de validação, a obtenção das amostras para análise, o processamento das amostras através do método em estudo, o processamento dos dados obtidos através do método e a análise dos mesmos. Neste contexto, durante o período de estágio na Silliker, avaliou-se a aplicação de um método de quantificação de ácidos gordos através de cromatografia gasosa em diferentes matrizes alimentares, mais concretamente, ração animal, caramelo para barrar, chocolate para barrar, pistacho e salmão. De uma forma geral, os resultados demonstram que este método é válido na determinação da quantidade de ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados, saturados e trans presentes nas amostras.

Para além disto, a oportunidade de estagiar numa empresa internacional possibilitou e auxiliou o desenvolvimento de capacidades profissionais, tal como a eficiência, a autoeficácia, a iniciativa e a adaptabilidade.

Por fim, conclui-se que os objetivos foram cumpridos, nomeadamente, foi determinado que o método em estudo pode ser utilizado para quantificar o perfil de ácidos gordos nas matrizes em estudo e, como perspetiva futura, sugere-se a utilização de outras matrizes alimentares de modo a avaliar a aplicabilidade deste método em diferentes produtos alimentícios.

## **6. Bibliografia**

- Alain Karleskind, J.-P. W. (1992). *Manuel des corps gras, Volume 1*. Tec&Doc.
- Augusto, C., Cabrita, L., Marques, A., Contreiras, A., Ferreira, A., Alfaiate, B., Cartiga, B., Rola, E., Lourenço, Helena Fernandes, H., Móra, I., & Andrade, I. (2000). Validação de métodos internos de ensaio em análise química. In *Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química* (Vol. 13).
- Bockisch, M. (2015). Fats and Oils Handbook. In *Fats and Oils Handbook*.  
<https://doi.org/10.1016/C2015-0-02417-0>
- Braithwaite, A., & Smith, F. J. (1999). *Chromatographic Methods*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0599-6>
- Ecker, J., Scherer, M., Schmitz, G., & Liebisch, G. (2012). A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 897, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.015>
- Ettre, L. S. (2000). Chromatography: The separation technique of the 20th Century. *Chromatographia*, 51(1–2), 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF02490689>
- Glassware. (2017). <https://gelaslaboratorium.blogspot.com/2017/11/separating-funnel-corong-pemisah.html>
- Hamano, F., Tokuoka, S., Hashidate-Yoshida, T., Shindou, H., Shimizu, T., & Kita, Y. (2020). Quantification of Fatty Acids in Mammalian Tissues by Gas Chromatography–Hydrogen Flame Ionization Detection. *Bio-Protocol*, 10(9). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3613>
- Heil, C. S., Wehrheim, S. S., Paithankar, K. S., & Grininger, M. (2019). Fatty Acid Biosynthesis: Chain-Length Regulation and Control. *ChemBioChem*, 20(18), 2298–2321. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800809>
- Hewavitharana, G. G., Perera, D. N., Navaratne, S. B., & Wickramasinghe, I. (2020). Extraction methods of fat from food samples and preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(8), 6865–6875. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.039>
- Holcapek, Michal, and W. C. B. (2017). Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques. *Elsevier Inc.*

- Igarashi, M., Gao, F., Kim, H. W., Ma, K., Bell, J. M., & Rapoport, S. I. (2009). Dietary n-6 PUFA deprivation for 15 weeks reduces arachidonic acid concentrations while increasing n-3 PUFA concentrations in organs of post-weaning male rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.11.002>
- Indarti, E., Majid, M. I. A., Hashim, R., & Chong, A. (2005). Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(2–3), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.12.007>
- Iso. (2005). *NP EN ISO/IEC 17025 Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração* (pp. 1–40).
- James W Zubrick. (2007). *Reflux (Laboratory Manual)*. <http://what-when-how.com/organic-chemistry-laboratory-survival-manual/reflux-laboratory-manual/>
- Jonsson, A. L., Roberts, M. A. J., Kiappes, J. L., & Scott, K. A. (2017). Essential chemistry for biochemists. *Essays in Biochemistry*, 61(4), 401–427. <https://doi.org/10.1042/EBC20160094>
- Leco. (n.d.). Retrieved May 27, 2023, from <https://eu.leco.com/product/gcxgc-eed-fid>
- Lenti, L., Nartea, A., Orhotohwo, O. L., Pacetti, D., & Fiorini, D. (2022). Development and Validation of a New GC-FID Method for the Determination of Short and Medium Chain Free Fatty Acids in Wine. *Molecules*, 27(23). <https://doi.org/10.3390/molecules27238195>
- Los, U. M. D. E. C. D. E. (n.d.). *Leninger's*.
- Luick, B. (2020). Advances in Food and Nutrition Research. In *Journal of Nutrition Education and Behavior* (Vol. 52, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.jneb.2019.06.010>
- MerieuxNutrisciences. (n.d.-a). Retrieved February 10, 2023, from <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/quem-somos/>
- MerieuxNutrisciences. (n.d.-b). Retrieved February 10, 2023, from <https://www.merieuxnutrisciences.com/inspiring-science/>

- Oteng, A. B., & Kersten, S. (2020). Mechanisms of Action of trans Fatty Acids. *Advances in Nutrition*, 11(3), 697–708. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz125>
- Procedimento de Laboratório SILIKER: Determinação de ácidos gordos componentes. Método por cromatografia gasosa com detetor FID.* (2022). Siliker.
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 129, 115913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- Roopashree, P. G., Shetty, S. S., & Suchetha Kumari, N. (2021). Effect of medium chain fatty acid in human health and disease. *Journal of Functional Foods*, 87(August), 104724. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104724>
- Seader, J. D., Henley, E. J., & Roper, D. K. (2011). Separation process principles: Chemical and biochemical operations. *JS Afr. L.*, 821.
- Seppänen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465(1–2), 39–62. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00397-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00397-5)
- Sievers, R. E. (1964). Chromatographic Methods. In *Inorganic Chemistry* (Vol. 3, Issue 5). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1021/ic50015a047>
- Soria, A. C., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, J., & Martínez-Castro, I. (2014). Gas Chromatographic Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides. In *Food Oligosaccharides* (Vol. 9781118426, Issue March, pp. 370–398). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch20>
- Tang, B., & Row, K. H. (2013). Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *Journal of Chromatographic Science*, 51(7), 599–607. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt005>
- Zhang, H., Wang, Z., & Liu, O. (2015). Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(4), 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.01.005>



## **7. Anexos**

## Anexo A- Justeza e Repetibilidade

**Tabela 6.1** Resultados obtidos dos ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados e insaturados para as matrizes de chocolate de barrar, caramelo de barrar, pistacho, ração animal e salmão para o cálculo da justeza e repetibilidade

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7
<b>Mono</b>							
Caramelo	57,92	57,83	57,91	57,93	57,96	57,92	57,95
Chocolate	55,87	55,84	55,83	55,96	56,01	55,93	55,97
Salmão	56,29	56,17	56,32	56,15	56,16	56,22	56,30
Pistacho	57,31	57,32	57,38	57,33	57,28	57,34	57,36
Ração	45,27	45,18	45,33	45,21	45,23	45,27	45,21
<b>Poli</b>							
Caramelo	23,05	23,09	23,09	23,01	22,88	22,97	22,88
Chocolate	11,12	11,13	11,13	11,16	11,15	11,15	11,16
Salmão	27,98	28,04	28,06	28,07	27,98	28,12	28,00
Pistacho	31,81	31,83	31,80	31,81	31,80	31,81	31,80
Ração	20,01	20,18	20,23	20,19	20,17	20,13	20,19
<b>Sat</b>							
Caramelo	18,78	18,82	18,74	18,81	18,90	18,86	18,91
Chocolate	32,90	32,91	32,82	32,81	32,72	32,81	32,77
Salmão	14,88	15,02	14,82	14,95	15,06	14,84	14,90
Pistacho	10,83	10,81	10,78	10,81	10,87	10,80	10,79
Ração	33,77	33,54	33,69	33,70	33,67	33,69	33,50

## Anexo B – Precisão Intermédia

**Tabela 6.2** Resultados obtidos dos ácidos gordos monoinsaturados, polinsaturados e insaturados para as matrizes de chocolate de barrar, caramelo de barrar, pistacho, ração animal e salmão para o cálculo da precisão intermédia

	Chocolate		Caramelo		Pistacho		Ração		Salmão	
Mono	55,84	55,83	57,95	57,93	57,31	57,32	45,21	45,23	56,15	56,16
	55,79	55,72	57,67	57,78	57,33	57,30	45,07	44,98	56,28	56,23
	55,75	55,88	57,28	57,41	57,10	57,14	45,14	45,19	53,32	53,31
	55,54	55,53	57,74	57,79	57,23	57,19	45,04	44,99	55,98	56,02
	55,46	55,54	57,08	57,17	57,18	57,20	44,74	44,79	56,08	56,13
	55,73	55,88	57,75	57,72	57,26	57,29	45,24	45,08	56,59	56,61
Poli	11,15	11,15	23,09	23,09	31,80	31,81	20,19	20,17	28,06	28,07
	11,12	11,11	23,10	23,15	57,30	57,32	20,16	20,18	27,91	27,98
	11,24	11,28	23,45	23,36	57,10	57,14	20,29	20,59	29,92	30,07
	11,15	11,17	22,95	22,86	57,23	57,19	20,31	20,30	27,77	27,91
	11,13	11,09	23,30	23,32	57,18	57,20	20,19	20,21	27,95	27,86
	11,09	11,12	22,93	22,99	57,26	57,29	20,01	20,11	26,98	26,93
Sat	32,91	32,93	18,90	18,86	10,83	10,81	33,67	33,69	14,90	14,86
	32,99	32,97	18,97	18,82	10,87	10,86	33,78	33,67	15,07	15,03
	32,95	32,76	19,04	18,97	10,83	10,80	33,50	33,41	15,90	15,79
	33,18	33,17	19,05	19,04	10,90	10,92	33,67	33,74	15,26	15,10
	33,15	33,11	19,32	19,23	10,94	10,92	34,05	33,93	15,18	15,23
	33,11	32,91	19,04	19,02	10,93	10,93	33,77	33,85	15,56	15,59

**Anexo C - Certificados MRC do Salmão, Pistacho, Ração animal, Chocolate de barrar e Caramelo de barrar**

**Tabela 6.3.1 - Certificados MRC do Salmão**

Familia de matrizes	Matriz	Justeza/Incerteza					
		Ácido gordo	Valor alvo	Unidades	Intervalo de concentração	u(x)	SPDA
Produtos da pesca e derivados	BIPEA Salmon 2017-02	C4:0	0,00	%	0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C6:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C8:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C10:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C12:0	-		-	-	-
		C14:0	2,70		2,2 - 3,2	0,10	0,30
		C15:0 iso	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C15:0 aiso	-		-	-	-
		C15:0	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C16:0	9,30		8,4 - 10,2	0,10	0,50
		C16:1 (e seus isómeros)	2,90		2,4 - 3,4	0,10	0,30
		C17:0 iso	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C17:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C17:1n7c	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C18:0	2,20		1,7 - 2,7	0,00	0,30
		C18:1 (C18:1n9t + C18:1n11t + C18:1n9c + C18:1n7c)	39,00		35,5 - 42,5	0,30	1,80
		C18:2 total (C18:2n6t + C18:2n6c)	10,60		9,5 - 11,7	0,10	0,60
		C18:3 (C18:3t + C18:3n3c + C18:3n6c)	4,10		3,6 - 4,6	0,10	0,30

	C18:4n3c	0,80	0,3 - 1,3	0,00	0,30
	C20:0	0,30	0,0 - 0,8	0,00	0,30
	C20:1n9c	6,70	6,0 - 7,4	0,10	0,40
	C20:2n6c	1,10	0,6 - 1,6	0,00	0,30
	C20:3	0,60	0,1 - 1,1	0,10	0,30
	C20:4n3c	1,00	0,5 - 1,5	0,10	0,30
	C20:4n6c	0,20	0,0 - 0,7	0,00	0,30
	C20:5n3c	2,70	2,2 - 3,2	0,10	0,30
	C22:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C22:1n11c	5,90	5,3 - 6,5	0,20	0,30
	C22:1n9c	0,80	0,3 - 1,3	0,00	0,30
	C22:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:5n3c	1,50	1,0 - 2,0	0,00	0,30
	C22:6n3c	5,70	5,2 - 6,3	0,10	0,30
	C24:0	-	-	-	-
	C24:1n9c	0,60	0,1 - 1,1	0,00	0,30
	Saturados	15,30	13,8 - 16,8	0,20	0,80
	Monoinsaturados	55,60	52,1 - 59,1	0,40	1,80
	Polinsaturados	28,50	25,6 - 31,4	0,40	1,50
	Trans	0,60	0,1 - 1,1	0,10	0,30

**Tabela 6.3.2 - Certificados MRC do Pistacho**

Familia de matrizes	Matriz	Justeza/Incerteza					
		Ácido gordo	Valor alvo	Unidades	Intervalo de concentração	u(x)	SPDA
Frutos, algas, produtos hortícolas e derivados	BIPEA Pistachios 2022-05	C4:0	0,00	%	0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C6:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C8:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C10:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C11:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C12:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C13:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C14:0	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C15:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C16:0	9,10		8,2 - 10,0	0,10	0,50
		C16:1 (e seus isómeros)	0,80		0,3 - 1,3	0,00	0,30
		C16:2 (e seus isómeros)	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C16:3n4c	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:1 (e seus isómeros)	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C18:0	1,20		0,7 - 1,7	0,00	0,30
C18:1 (C18:1n9t + C18:1n11t + C18:1n9c + C18:1n7c)	55,60	52,1 - 59,1	0,10	1,80			
C18:2 total (C18:2n6t + C18:2n6c)	32,00	28,8 - 35,2	0,10	1,60			

	C18:3 (C18:3t + C18:3n3c + C18:3n6c)	0,40	0,0 - 0,9	0,00	0,30
	C18:4n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C20:1 (e seus isómeros)	0,40	0,0 - 0,9	0,00	0,30
	C20:2 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:3 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:4 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:5n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C22:1 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:3n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:4n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:5 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:6 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C24:0	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C24:1n9c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	Saturados	10,60	9,5 - 11,7	0,10	0,60
	Monoinsaturados	56,80	53,3 - 60,3	0,10	1,80
	Polinsaturados	32,40	29,2 - 35,6	0,10	1,60
	Trans (1t + 2t + 3t -- C18:1n9t + C18:1n11t + C18:2n6t + C18:3t)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30

**Tabela 6.3.3 - Certificados MRC do Ração animal**

Familia de matrizes	Matriz	Justeza/Incerteza					
		Ácido gordo	Valor alvo	Unidades	Intervalo de concentração	u(x)	SPDA
Alimentos para animais (simples e compostos)	BIPEA Dog food 2022-05	C4:0	0,00	%	0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C6:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C8:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C10:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C12:0	0,30		0,0 - 0,8	0,00	0,30
		C14:0	1,60		1,1 - 2,1	0,00	0,30
		C15:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C16:0	20,70		19,0 - 22,4	0,20	0,90
		C16:1 (e seus isômeros)	3,50		3,0 - 4,0	0,10	0,30
		C17:0 iso	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C17:0 aiso	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C17:0	0,30		0,0 - 0,8	0,00	0,30
		C17:1n7c	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C18:0	9,50		8,7 - 10,3	0,10	0,40
		C18:1 (C18:1n9t + C18:1n11t + C18:1n9c + C18:1n7c)	39,70		36,5 - 42,9	0,30	1,60
		C18:2 total (C18:2n6t + C18:2n6c)	14,90		13,7 - 16,1	0,10	0,60
		C18:3 (C18:3t + C18:3n3c + C18:3n6c)	2,10		1,6 - 2,6	0,10	0,30
		C18:4n3c	0,20		0,0 - 0,6	0,00	0,30

	C20:0	0,20	0,0 - 0,7	0,00	0,30
	C20:1n9c	1,40	0,9 - 1,9	0,10	0,30
	C20:2n6c	0,40	0,0 - 0,9	0,00	0,30
	C20:3	0,20	0,0 - 0,7	0,00	0,30
	C20:4n6c	0,30	0,0 - 0,8	0,00	0,30
	C20:5n3c	0,70	0,2 - 1,2	0,00	0,30
	C22:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C22:1n9c	0,50	0,0 - 1,0	0,10	0,30
	C22:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:5n3c	0,40	0,0 - 0,9	0,00	0,30
	C22:6n3c	1,10	0,6 - 1,6	0,10	0,30
	C24:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C24:1n9c	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30

**Tabela 6.3.4 - Certificados MRC do Chocolate de barrar**

Família de matrizes	Matriz	Justeza/Incerteza					
		Ácido gordo	Valor alvo	Unidades	Intervalo de concentração	u(x)	SPDA
Açúcar, produtos açucarados e derivados	BIPEA Sweetened spread chocolate 2022-06	C4:0	0,00	%	0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C6:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C8:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C10:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C11:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C12:0	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C13:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C14:0	0,70		0,2 - 1,2	0,00	0,30
		C15:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C16:0	26,80		24,1 - 29,5	0,10	1,40
		C16:1 (e seus isómeros)	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C16:2 (e seus isómeros)	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C16:3n4c	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C17:1 (e seus isómeros)	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C18:0	4,40		3,9 - 4,9	0,00	0,30
		C18:1 (C18:1n9t + C18:1n11t + C18:1n9c + C18:1n7c)	55,50		52 - 59	0,20	1,80
C18:2 total (C18:2n6t + C18:2n6c)	11,10	10,0 - 12,2	0,00	0,60			

	C18:3 (C18:3t + C18:3n3c + C18:3n6c)	0,30	0,0 - 0,8	0,00	0,30
	C18:4n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:0	0,30	0,0 - 0,8	0,00	0,30
	C20:1n9c (e seus isómeros)	0,20	0,0 - 0,7	0,00	0,30
	C20:2n6c (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:3 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:4n9c (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:5n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C22:1 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:3n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:4n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:5 (e seus isómeros)	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:6n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C24:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C24:1n9c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	Saturados	32,50	29,2 - 35,8	0,10	1,70
	Monoinsaturados	55,80	52,3 - 59,3	0,10	1,80
	Polinsaturados	11,30	10,2 - 12,4	0,10	0,60
	Trans (1t + 2t + 3t -- C18:1n9t + C18:1n11t + C18:2n6t + C18:3t)	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30

**Tabela 6.3.5 - Certificados MRC do Caramelo de barrar**

Família de matrizes	Matriz	Justeza/Incerteza					
		Ácido gordo	Valor alvo	Unidades	Intervalo de concentração	u(x)	SPDA
Açúcar, produtos açucarados e derivados	BIPEA Sweetened spread caramelo 2021-06	C4:0	0,00	%	0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C6:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C8:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C10:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C12:0	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C14:0	0,40		0,0 - 0,9	0,00	0,30
		C15:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C15:0	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C16:0	14,10		12,7 - 15,5	0,10	0,70
		C16:1 (cis e isômeros)	0,20		0,0 - 0,7	0,00	0,30
		C17:0 iso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0 aiso	0,00		0,0 - 0,5	0,00	0,30
		C17:0	0,10		0,0 - 0,6	0,00	0,30
		C18:0	3,00		2,5 - 3,5	0,00	0,30
		C18:1 (C18:1n9t + C18:1n11t + C18:1n9c + C18:1n7c)	56,20		52,7 - 59,7	0,10	1,80
		C18:1n9c	53,80		50,3 - 57,3	0,20	1,80
		C18:2 total (C18:2n6t + C18:2n6c)	17,40		15,7 - 19,1	0,10	0,90
		C18:2n6c	17,30		15,6 - 19,0	0,10	0,90
		C18:3n3c	5,60		5,0 - 6,2	0,10	0,30
C18:3n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30			
C18:4n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30			

	C20:0	0,60	0,1 - 1,1	0,00	0,30
	C20:1n9c	1,00	0,5 - 1,5	0,00	0,30
	C20:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:3	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:4n9c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:4n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:4n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C20:5n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:0	0,50	0,0 - 1,0	0,00	0,30
	C22:1n11c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:1n9c	0,20	0,0 - 0,7	0,00	0,30
	C22:2n6c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:5n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C22:6n3c	0,00	0,0 - 0,5	0,00	0,30
	C24:0	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	C24:1n9c	0,10	0,0 - 0,6	0,00	0,30
	Saturados	18,90	17,0 - 20,8	0,10	1,00
	Monoinsaturados	57,50	54,0 - 61,0	0,20	1,80
	Polinsaturados	23,10	20,8 - 25,4	0,10	1,20
	Trans (1t + 2t + 3t -- C18:1n9t + C18:1n11t + C18:2n6t + C18:3t)	0,30	0,0 - 0,8	0,10	0,30

## Anexo D - Valores críticos para o teste de Grubbs e teste C de Cochran

**Tabela 6.4.1:** Valores críticos do Teste de Grubbs

p	um maior ou um menor
	valor critico 1%
3	1,155
4	1,496
5	1,764
6	1,973
7	2,139
8	2,274
9	2,387
10	2,482
11	2,564
12	2,636
13	2,699
14	2,755
15	2,806
16	2,852
17	2,894
18	2,932
19	2,968
20	3,001
21	3,031
22	3,060
23	3,087
24	3,112
25	3,135
26	3,157
27	3,178
28	3,199
29	3,218
30	3,236
31	3,253
32	3,270
33	3,286
34	3,301
35	3,316
36	3,330
37	3,343
38	3,356
39	3,369
40	3,381

p= número de laboratórios num dado nível

**Tabela 6.4.2:** Valores críticos do Teste C de Cochran

valores criticos para teste C de Cochran									
n° matrizes	n° ensaios								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0,9985	0,975	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,801
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,653	0,6333	0,6167
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,398	0,3817	0,3682
7	0,7271	0,5612	0,48	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,391	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659
10	0,602	0,445	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439
12	0,541	0,3924	0,3264	0,288	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,116
30	0,2929	0,198	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958
40	0,237	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,078	0,0745