



**Instituto Politecnico de Santarem**  
**Escola Superior Agraria**

## **Quantificação do teor de sódio solúvel em pão: validação de um método interno**

**Dissertacao apresentada para a obtenção do grau de mestre na  
especialidade Sistemas de Prevencao e Controlo Alimentar**

**Andreia Sofia  
Ribeiro Ferreira**

**Orientadora:  
Doutora Margarida Goulart**  
**Co-Orientadora:  
Luciana dos Santos**

**Junho de 2012**



## **AGRADECIMENTOS**

No primeiro espaço desta dissertação gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento, a todos os que, pelo que fizeram e pelo que disseram, contribuíram decisivamente, para a sua construção.

À Doutora Margarida Goulart, pela disponibilidade que manifestou.

À Engenheira Luciana dos Santos, por todas a disponibilidade, energia e dedicação que colocou neste trabalho.

À doutora Joana Madeira e à técnica Tânia Santos por todo o apoio e conhecimentos que me transmitiram no decurso deste estudo.

À Engenheira Inês Carolino, por se disponibilizar a solicitar o meu estágio ao Laboratório de Medicina Veterinária.

Ao Laboratório de Medicina Veterinária, por me ter acolhido.

A todos os professores da Escola Superior Agrária, que contribuíram em grande parte para todo o conhecimento que adquiri no decurso do mestrado.

Aos meus amigos e família, particularmente à minha mãe, Maria de Fátima Ferreira e ao meu pai João Ferreira, ao meu irmão, Pedro pelo carinho e disponibilidade total, e por constituírem a âncora no meu percurso.



# QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE SÓDIO EM PÃO: VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO INTERNO

## RESUMO

O pão faz parte da dieta humana desde o Neolítico. Entre os seus ingredientes encontra-se o sal de cozinha, cloreto de sódio, o consumo exagerado do mesmo pode originar alguns problemas de saúde, como o aumento da tensão arterial, factor de risco das doenças cardiovasculares e está associado a um risco acrescido de neoplasias.

Com o surgimento da Lei nº 75/2009 de 12 de Agosto, que estabelece teores máximos para o conteúdo de sal no pão, surgiu a necessidade de validar um método interno que quantificasse o teor de sódio solúvel em pão.

Este trabalho tem como objectivos validar um método interno para a quantificação do teor de sódio solúvel em pão por Espectrometria de Absorção Atómica e compará-lo com o método de Charpentier-Volhard para a quantificação de cloretos. Comparar três técnicas de preparação de amostra, por digestão microondas, digestão seca e diluições directas. Também tem como objectivo testar a necessidade de adicionar cloreto de cézio às amostras de pão analisadas por Espectrometria de Absorção Atómica.

Os resultados obtidos revelam que o método foi devidamente validado e quando comparado com outro método não apresenta diferenças significativa. A técnica de preparação de amostra por diluições directas também não apresenta diferenças significativas quando comparada com outras técnicas referidas em ISO.

Comprovou-se que não existe necessidade de adicionar cloreto de cézio às soluções amostras, pois não existem diferenças significativas entre as amostras analisadas com adição de cloreto de cézio e as amostras analisadas sem adição de cloreto de cézio.

## ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de quadros</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de gráficos</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	<b>3</b>
2.1. O pão.....	3
2.2. O sal e a saúde.....	5
O cloreto de sódio.....	6
2.3. Espectrometria.....	7
2.3.1. Interferências.....	10
2.3.2. Vantagens.....	10
2.3.3. Limitações.....	11
2.3.4. Cloreto de cézio.....	11
2.3.5. Descontaminação do material de vidro.....	12
2.4. Charpentier-Volhard.....	12
2.5. Técnicas de Preparação de amostra.....	12
2.5.1. Digestão seca.....	13
2.3.2. Digestão por microondas.....	13
2.3.3. Diluições directas.....	13
2.6. Validação.....	13
2.6.1. Parâmetros de validação.....	14
2.6.1.1. Selectividade/Especificidade.....	15
2.6.1.2. Quantificação.....	15
2.6.1.2.1. Calibração.....	15
2.6.1.2.2. Limite de detecção.....	17
2.6.1.2.3. Limite de quantificação.....	17
2.6.1.3. Precisão.....	18
2.6.1.3.1. Repetibilidade.....	18
2.6.1.3.2. Reprodutibilidade.....	19
2.6.1.3.3. Precisão intermédia.....	19

2.6.1.3.4. Comparação da precisão entre métodos.....	20
2.6.1.4. Exactidão.....	20
2.6.1.4.1. Ensaio interlaboratoriais.....	21
2.6.1.4.2. Testes comparativos.....	22
<b>3. Reagentes e produtos auxiliares.....</b>	<b>24</b>
<b>4. Equipamentos e utensilios.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Procedimentos.....</b>	<b>27</b>
5.1. Preparação da amostra por diluições directas sem cloreto de cézio.....	27
5.2. Preparação da amostra por diluições directas com cloreto de cézio.....	27
5.3. Preparação da amostra por diluições directas com diferentes concentrações de ácido nítrico a 65%.....	27
5.4. Preparação da amostra por digestão seca.....	28
5.5. Preparação da amostra por digestão microondas.....	28
5.6. Determinação de sódio por espectrometria de absorção atómica.....	28
5.6.1. Condições de medição.....	28
5.6.2. Preparação da curva de calibração.....	28
5.6.3. Medição da solução a analisar.....	29
5.7. Determinação do teor de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard.....	29
<b>6. Resultados e tratamento estatístico.....</b>	<b>31</b>
6.1. Amostras preparadas com diferentes concentrações de ácido nítrico.....	31
6.2. Comparação dos resultados obtidos com a preparação da amostra por diluições directas com cloreto de cézio e sem cloreto de cézio.....	33
6.3. Especificidade.....	35
6.4. Calibração.....	36
6.4.1. Limite de detecção e limite de quantificação.....	36
6.4.2. Homogeneidade de variâncias.....	37
6.4.3. Teste de Mandel.....	38
6.4.4. Análise de resíduos.....	42
6.5. Precisão.....	43
6.5.1. Repetibilidade.....	43
6.5.2. Precisão intermédia.....	45
6.5.3. Comparação da precisão entre técnicas de preparação de amostra.....	49
6.6. Exactidão.....	51
6.6.1. Ensaio interlaboratorial.....	51
6.6.2. Testes comparativos.....	52

6.6.2.1. Comparação dos resultados obtidos por preparação da amostra por diluições directas e dos resultados obtidos por preparação da amostra por digestão microondas .....	52
6.6.2.2. Comparação dos resultados obtidos por preparação da amostra por diluições directas e dos resultados obtidos por preparação da amostra por digestão seca.....	58
6.6.2.3. Comparação dos resultados obtidos através da determinação do teor de sódio por espectrometria de absorção atómica com chama e dos resultados obtidos através da determinação do teor de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard .....	62
6.7. Taxas de recuperação .....	68
6.8. Verificação do equipamento .....	69
<b>7. Discussão dos resultados .....</b>	<b>71</b>
7.1. Ensaio interlaboratorial .....	71
7.2. Testes comparativos .....	71
<b>8. Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE QUADROS

1. Propriedades gerais do cloreto de sódio .....	7
2. Volume (mL) de ácido nítrico a adicionar a cada solução .....	27
3. Volumes de solução padrão de trabalho de sódio (4.8) a adicionar a cada balão volumétrico para preparar as soluções de calibração .....	29
4. Comparação da concentração de sódio solúvel em pão, de soluções preparadas com diferentes concentrações de ácido nítrico .....	32
5. Tratamento estatístico dos resultados descritos no quadro anterior .....	32
6. Resultados das amostras preparadas com adição de cloreto de cézio .....	33
7. Resultados das amostras sem adição de cloreto de cézio. ....	34
8. Tratamento dos resultados obtidos nos <b>QUADROS 6 e 7</b> .....	34
9. Resultados obtidos com o objectivo de estudar a especificidade do método e respectivo tratamento estatístico. ....	35
10. Ensaio em branco e determinação do limite de detecção e do limite de quantificação	37
11. Leituras dos padrões de calibração da gama de trabalho em estudo .....	38
12. Tratamento estatístico das leituras do primeiro e último padrões da gama de trabalho	38
13. Absorvâncias lidas pelo equipamento e determinadas por ajuste linear e ajuste polinomial.....	39
14. Cálculos intermédios para a determinação da linearidade da gama de trabalho .....	41
15. Tratamento estatístico dos resultados obtidos para o estudo da linearidade da gama de trabalho .....	42
16. Leituras das absorvâncias dos 10 padrões distribuídos ao longo da gama de trabalho	42
17. Concentração das amostras utilizadas para estudar a repetibilidade .....	44
18. Tratamento estatístico dos resultados obtidos no quadro anterior .....	45
19. Resultados obtidos pela analista Andreia .....	46
20. Resultados obtidos pela analista Joana .....	47
21. Tratamento estatístico dos resultados obtidos anteriormente .....	48
22. Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas .....	49
23. Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão microondas .....	49
24. – Comparação da precisão entre as técnicas de digestão microondas e diluições directas .....	50
25. Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas, com o objectivo de comparar com a concentração obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão seca.....	50

26. Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão seca, com o objectivo de comparar com a concentração obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas.....	51
27. Comparação da precisão entre as técnicas de digestão seca e diluições directas .....	51
28. Desempenho do Laboratório de Medicina Veterinária no ensaio interlaboratorial ..	52
29. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas .....	52
30. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão microondas .	53
31. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas .....	54
32. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão microondas .	55
33. Tratamento estatístico das concentrações de sódio (g/100g) determinadas por diluições directas e por digestão microondas .....	56
34. Determinação dos valores de $b \pm Sb^*t$ e de $a \pm Sa^*t$ .....	57
35. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas .....	59
36. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão seca .....	60
37. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas .....	61
38. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão seca .....	61
39. Tratamento estatístico das concentrações de sódio (g/100g) determinadas por diluições directas e por digestão seca .....	62
40. Volumes (mL) titulados para quantificar o teor de cloretos pela técnica de Charpentier-Volhard .....	63
41. Determinação da concentração de NaCl (g/100g) e sua conversão para concentração de Na (g/100g) .....	65
42. Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas .....	66
43. Tratamento estatístico dos resultados obtidos nos quadros anteriores .....	67
44. Determinação dos valores de $b \pm Sb^*t$ e de $a \pm Sa^*t$ .....	68
45. Taxas de recuperação determinadas em ensaios de rotina .....	69
46. Absorvâncias determinadas pelo equipamento para as soluções padrão utilizadas para a calibração em rotina .....	69

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Recta traçada pelo equipamento de Espectometria de Absorção Atómica .....**39**
2. Curva traçada pelo equipamento de Espectometria de Absorção Atómica .....**40**
3. Análise de resíduos .....**43**
4. Recta representativa do teste de regressão linear realizado para comparar as técnicas de preparação de amostra por diluições directas e digestão microondas .....**58**
5. Recta representativa do teste de regressão linear realizado para comparar os métodos espectrometria de absorção atómica com chama e determinação do teor de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard.....**68**
6. Curva traçada pela folha de cálculo “Microsoft Excel”.....**70**



## 1. INTRODUÇÃO

Por definição, pão é o produto obtido pelo cozimento, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa, fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água (BATTOCHIO *et al*, 2006). Entre outros ingredientes encontra-se o sal (NaCl), que influencia o comportamento do glúten, diminui a actividade das leveduras na massa, retarda a produção de gás e realça o sabor do pão (LYNCH *et al*, 2009).

Apesar de em termos tecnológicos a adição de sal ser benéfica, o consumo exagerado do mesmo pode originar alguns problemas de saúde. O principal efeito adverso associado ao consumo excessivo de sal é o aumento da tensão arterial, factor de risco das doenças cardiovasculares. Além da patologia cardiovascular, o consumo excessivo de sal também está associado a um risco acrescido de neoplasias (ARS CENTRO, 2008).

De acordo com Jorge Polónia (2009), os portugueses consomem o dobro do sal que deviam, ou seja, cerca de 12 gramas (quando a Organização Mundial de Saúde recomenda 6 gramas), sendo que, em Portugal, os veículos de sal mais relevantes são o pão, o queijo, as carnes vermelhas, os enchidos, os condimentos processados e as saladas.

Pelo risco que o consumo excessivo de sal constitui, surgiu a Lei nº 75/2009 de 12 de Agosto, que estabelece teores máximos para o conteúdo de sal no pão, bem como a obrigatoriedade de incluir o teor de sal no rótulo do alimento.

Para responder a esta nova exigência, o Laboratório de Medicina Veterinária sentiu necessidade de validar um método interno para a quantificação do teor de sódio solúvel em pão por Espectrofotometria de Absorção Atómica, sendo as amostras preparadas por diluições directas, visto que esta é a melhor forma de demonstrar que o método de ensaio conduz a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida (GUIA RELACRE 13).

Este trabalho tem como objectivos validar um método interno para a quantificação do teor de sódio solúvel em pão por Espectrofotometria de Absorção Atómica e compará-lo com o método de Charpentier-Volhard para a quantificação de cloretos. Comparar três técnicas de preparação de amostra, por digestão microondas, digestão seca e diluições directas. Também tem como objectivo testar a necessidade de

adicionar cloreto de cézio às amostras de pão analisadas por Espectrofotometria de Absorção Atômica.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O PÃO

O pão faz parte da dieta humana desde o Neolítico. O primeiro pão foi feito por volta de 10000 anos antes de Cristo, e pode ter sido desenvolvido através de uma experiência deliberada de água e farinha. Os Egípcios foram pioneiros na arte de fabrico de pão e tornaram-no popular por todo o mundo (Mondal e Datta, 2007).

Apesar de o pão ser produzido à milhares de anos, a compreensão de todo o processo de produção não é claro. Uma das possíveis razões para este facto é a de que muitos processos físicos fundamentais estão associados durante o cozimento, como a evaporação de água, a expansão do volume, a gelatinização do amido, a desnaturação das proteínas, a formação da crosta, etc. (Mondal e Datta, 2007).

Por definição, pão é o produto obtido pela cocção, em condições tecnologicamente adequadas, de uma massa, fermentada ou não, preparada com farinha de trigo e/ou outras farinhas que contenham naturalmente proteínas formadoras de glúten ou adicionadas das mesmas e água, podendo conter outros ingredientes. Já o pão integral, é definido como produto preparado, obrigatoriamente, com farinha de trigo e farinha de trigo integral e/ou fibra de trigo e/ou farelo de trigo (Battochio *et al*, 2006).

A água e a farinha são os ingredientes mais significativos numa receita de pão, uma vez que afectam a textura e a migalha (Mondal e Datta, 2007).

A farinha constitui sempre 100% e o resto dos ingredientes são uma percentagem dessa quantidade, por peso. De acordo com 100% de farinha, os restantes ingredientes estarão nas seguintes quantidades: leveduras de fermentação (2%), açúcar (4%), sal (2%) e margarina (3%) (Mondal e Datta, 2007).

O pão é um alimento diferente, comparado com outros, uma vez que é um produto fermentado, obtido através da fermentação dos açúcares da farinha de trigo libertados do amido pela acção das enzimas da farinha. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela fermentação. Ao longo da fermentação, o açúcar é convertido em CO<sub>2</sub> e vapor de água. Como o vapor de água e o CO<sub>2</sub> se expandem devido às altas temperaturas, agem como isolantes, impedindo que o miolo do pão atinja elevadas temperaturas e a evaporação excessiva da água. O açúcar é adicionado para iniciar a fermentação (Mondal e Datta, 2007), o sal, influencia o comportamento do glúten, diminui a actividade das leveduras na massa, retarda a produção de gás e salienta o *flavour* do pão. Sais sem carga (como o cloreto de sódio) influenciam as interacções

hidrofóbicas bem como induzem alterações conformacionais dos biopolímeros da massa. O sal aumenta o tempo de desenvolvimento da massa, a resistência à expansão e à extensão (Lynch *et al*, 2009). O cloreto de sódio tem um efeito fortalecedor nas propriedades da massa (Larsson, 2002).

A adição de emulsionantes é particularmente importante na produção em larga escala, para que a massa resista ao manuseamento da máquina, melhorar a taxa de hidratação, melhorar a estrutura do miolo, melhorar a capacidade de retenção de gás e aumentar a vida útil (Mondal e Datta, 2007).

É difícil reduzir o conteúdo de sódio no pão por várias razões. Primeiro, o cloreto de sódio tem um papel importante no processo de fabricação de pão, regula a taxa de fermentação e fortalece o glúten. Segundo, o cloreto de sódio contribui largamente para o tão desejado sabor salgado do pão e salienta o *flavour* do mesmo. Esta funcionalidade do cloreto de sódio é particularmente difícil de substituir. Tem sido demonstrado que uma redução de sódio em 25% no pão resulta numa diminuição do gosto, o que leva a que o produto seja menos aceito (Noort *et al*, 2010).

Têm sido propostas diferentes estratégias para reduzir o conteúdo em cloreto de sódio nos alimentos. Uma das estratégias é substituir o sódio por cloreto de potássio ou cloreto de magnésio. Outra estratégia é a adição de intensificadores de sabor (Noort *et al*, 2010).

O pão, depois de produzido sofre transformações que levam rapidamente à perda de crocância e ao endurecimento (Battochio *et al*, 2006). Este processo é responsável por grandes perdas económicas. Uma forma de aumentar a vida útil do pão é a aplicação de temperaturas de congelamento durante a distribuição. O pão é parcialmente produzido até a migalha se formar e antes de começarem as reações de Maillard na crosta. O pão obtido por este processo tem propriedades sensoriais e de textura próximas às que se obtêm pelo processo de fabricação convencional (Ronda *et al*, 2010).

O envelhecimento do pão (staling) não está relacionado com a perda de humidade da massa. Um pão analisado após 5 dias (armazenado em condições apropriadas) possuiria a mesma humidade que um pão “fresco”, embora apresente ao paladar a sensação de estar mais seco. O endurecimento estaria vinculado à retrogradação do amido e ao comportamento das proteínas e pentosanas (Battochio *et al*, 2006).

A retrogradação do amido é um dos factores que limita a vida útil do pão, uma vez que contribui para aumentar a firmeza do miolo, dando uma sensação de produto seco ao ser ingerido (Gutkoski *et al*, 2005).

## **2.2. O SAL E A SAÚDE**

Um terço das mortes da população global é atribuída a doenças cardiovasculares (Lynch *et al*, 2009), sendo Portugal o país da União Europeia com a maior taxa de mortalidade por acidentes vasculares cerebrais (AVC) (ARS CENTRO, 2008). Pressão arterial elevada é o maior causador de doenças cardiovasculares (Lynch *et al*, 2009), Espiga de Macedo refere que em Portugal 42,1% da população sofre de hipertensão (Macedo, 2009) e o sal (cloreto de sódio) é a causa primária do aumento da pressão arterial (Lynch *et al*, 2009).

A dieta ocidental lidera o consumo excessivo de sal, o que contribui para a prevalência de doenças cardiovasculares e outras doenças crónicas. Consequentemente os governos e as associações de saúde pública de todas as partes do mundo recomendam uma redução substancial dos teores de sal nos alimentos, com o objectivo de reduzir os teores de sal ingeridos de 9-12 gramas/dia para 5-6 gramas/dia (Noort *et al*, 2010). De acordo com He (2011) estes níveis, embora viáveis, continuam a ser muito elevados.

O principal efeito adverso associado ao consumo excessivo de sal é o aumento da tensão arterial (ARS CENTRO, 2008), no entanto além da patologia cardiovascular, o consumo excessivo de sal está também associado a insuficiência renal, insuficiência cardíaca, cancro, litiase renal, diabetes, asma e osteoporose (PINHEIRO, 2009).

A principal fonte de sal são os alimentos processados, sendo que os cereais e os alimentos produzidos a partir dos mesmos contribuem em 30% do consumo global (Lynch *et al*, 2009).

O professor Jorge Polónia indica que 65 a 68% do sal ingerido está escondido nos alimentos e aponta para o facto de que é no pão, entre outros alimentos, que se encontram as maiores fontes de consumo salino, afirma que uma das medidas que pode ser implementada com enormíssima expressão em termos de mortalidade é a redução do consumo de sal, principalmente no pão. Sublinha que se for reduzido um grama de sal no consumo diário da população portuguesa, 5 mil vidas poderiam ser poupadas todos os anos.

É expectável que a redução de sódio no pão origine benefícios significativos na saúde (Noort *et al*, 2010), pois o consumo moderado de sal tem o potencial de reduzir a

pressão arterial, e conseqüentemente reduzir a percentagem de sal no pão reduz substancialmente os encargos de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (Lynch *et al*, 2009).

Devido às patologias associadas ao consumo excessivo de sal e ao facto de o pão ser um alimento consumido com regularidade (ARS CENTRO, 2008) surgiu a necessidade de estabelecer limites máximos do teor de sal no pão. Assim surgiu a Lei nº 75/2009 de 12 de Agosto, que estabelece normas com vista à redução do teor de sal no pão bem como informação na rotulagem de alimentos embalados destinados ao consumo humano.

A Lei acima referida estabelece como limite máximo de sal 1,4 gramas de sal por 100 gramas de pão ou 0,55 gramas de sódio por 100 gramas de pão, sendo que o rótulo deve incluir a quantidade relativa e absoluta de sal contida na embalagem.

### **2.2.1. O CLORETO DE SÓDIO**

O cloreto de sódio (NaCl), sal de cozinha, é um composto iónico pois é formado por catiões e aniões, sendo Na<sup>+</sup> o catião e Cl<sup>-</sup> o anião (CHANG, 2010). É um sólido quebradiço, com uma temperatura de fusão elevada (801 °C) que conduz a electricidade no estado fundido e em solução aquosa (CHANG, 1994).

Uma fonte de cloreto de sódio é o minério sal-gema, o qual é encontrado em depósitos subterrâneos. Obtém-se também a partir de água do mar ou de salmoura por evaporação solar. Também se encontra na natureza na forma do mineral halite (CHANG, 1994).

No **QUADRO 1** estão representadas algumas das propriedades gerais do cloreto de sódio (CHANG, 1994).

**QUADRO 1** - Propriedades gerais do cloreto de sódio

<b>Propriedade</b>	<b>NaCl</b>
Aspecto geral	Sólido branco
Temperatura de fusão (°C)	801
Entalpia de fusão molar (kJ/mol)	30,2
Temperatura de ebulição	1.413
Entalpia de vaporização molar (kJ/mol)	600
Massa volúmica (g/cm <sup>3</sup> )	2,7
Solubilidade em água	Elevada
Condutividade eléctrica	
Sólido	Mau
Líquido	Bom

### 2.3. ESPECTROMETRIA

A espectrometria de absorção atómica com atomização em chama é uma técnica analítica bem estabelecida e suficientemente robusta para ser implementada em laboratórios (FERNANDES *et al*, 2003), sendo a ferramenta mais difundida para medir níveis de elementos metálicos em partes por milhão (ou inferior) (HARRIS, 2000). Devido à sua elevada sensibilidade e à facilidade com que cada amostra pode ser examinada, a absorção atómica tornou-se numa das principais ferramentas da química analítica (HARRIS, 1991).

Em espectrometria atómica, a solução amostra é aspirada por um tubo de plástico para uma chama que é suficientemente quente para quebrar a molécula em átomos (HARRIS, 2000). O espectro destes átomos consiste em linhas estreitas e cada elemento tem as suas características espectrais. Como as linhas são estreitas, normalmente existe pequena sobreposição entre o espectro dos diferentes elementos de uma mesma amostra (HARRIS, 1991).

Em absorção atómica, as amostras são vaporizadas a temperaturas muito altas e a concentração dos átomos seleccionados é determinada pela medição da absorção ou emissão dos seus comprimentos de onda característicos (HARRIS, 1991).

No caso da absorção atómica, a radiação do comprimento de onda seleccionado, atravessa a chama e a intensidade da radiação transmitida é medida (HARRIS, 2000).

Um monocromador selecciona o comprimento de onda da radiação que será lida no detector. É frequente medir níveis de concentrações de analito em partes por milhão (ppm) com uma precisão de 2%. Para analisar concentrações superiores, a amostra deve ser diluída, de forma a reduzir o nível de concentração para ppm (HARRIS, 2000).

A atomização é o processo de quebrar o analito em átomos gasosos, que serão medidos pela sua absorvância da radiação. Para atomizar a amostra podem-se utilizar diversos equipamentos, combustão por chama, câmara de grafite ou espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido (HARRIS, 2000).

A solução amostra é aspirada para um nebulizador pelo rápido fluxo do oxidante que passa na extremidade do tubo capilar. O líquido quebra-se numa fina mistura à medida que deixa a extremidade do nebulizador. O spray é atirado directamente a alta velocidade contra a esfera de vidro, partindo as gotas em partículas ainda mais pequenas, a formação destas partículas denomina-se nebulização. A mistura ar-acetileno, flui através de uma série de deflectores que promovem a mistura e libertam grandes gotas de líquido. O líquido é recolhido no final da câmara de spray e é escoado por um tubo. Apenas uma fina mistura, contendo cerca de 5% da amostra inicial chega ao atomizador.(HARRIS, 1991).

Neste trabalho a atomização foi realizada com chama.

A maioria dos espectrómetros de chama usa um queimador primário, onde a amostra, o oxidante e o combustível se misturam antes de serem introduzidos na chama. A solução amostra é submersa pelo rápido fluxo do oxidante e parte-se numa fina mistura quando deixa o nebulizador e atinge a pérola de impacto. A formação de pequenas gotas termina na nebulização. A mistura ar-acetileno, flui através de uma série de deflectores que promovem a mistura e libertam grandes gotas de líquido. Uma mistura fina contendo cerca de 5% da amostra inicial chega à chama (HARRIS, 2000).

Depois de o solvente se evaporar na chama, a amostra vaporiza e é decomposta em átomos. Muitos átomos metálicos formam óxidos e hidróxidos à medida que passam pela chama (HARRIS, 2000).

A combinação mais comum de oxidante-combustível é ar-acetileno, que produz uma chama com temperatura entre 2400-2700 K (HARRIS, 2000).

O gás entra pela zona de pré-aquecimento do queimador primário que é aquecida por radiação proveniente da zona de reacção primária. A combustão completa-se no queimador, onde o ar circundante é atirado para a chama. Cada amostra tem o seu espectro de emissão e oculta o espectro do analito em certas regiões (HARRIS, 1991).

As gotas que entram primeiro na chama perdem a sua água por evaporação, depois a amostra restante vaporiza e decompõem-se em átomos (HARRIS, 1991).

A taxa de fluxo da amostra, do gás, do oxidante e o nível a que a chama é observada pode ser optimizado para cada elemento (HARRIS, 1991).

A temperatura determina o grau a que a amostra se separa em átomos, Cada efeito influencia a força do sinal (HARRIS, 2000).

Podemos verificar que 99,98% dos átomos de sódio estão no estado fundamental a 2600 K. Se variarmos a temperatura em 10 K, dificilmente afectaremos a população no estado fundamental e não será visivelmente afectado o sinal numa experiência de absorção atómica (HARRIS, 2000).

Em absorção atómica devem-se ter alguns cuidados para distinguir o sinal do analito da radiação de fundo da chama (HARRIS, 1991).

Em espectrometria de absorção atómica em chama (FAAS), as alterações que ocorrem na temperatura da chama, na taxa de aspiração da solução, na composição da amostra, entre outras, podem prejudicar os resultados analíticos (FERNANDES *et al*, 2003).

A sensibilidade de um espectrómetro de absorção atómica para um dado elemento é definido como a concentração que esse elemento precisa para produzir 99% de transmitância. A sensibilidade e os interferentes observados em absorção atómica dependem dos detalhes do processo de aquecimento (HARRIS, 1991).

Para produzir linhas estreitas na frequência correcta, para absorção atómica, utiliza-se uma lâmpada de cátodo oco, que contém um vapor do mesmo elemento que está a ser analisado (HARRIS, 2000).

A técnica mais utilizada para análises quantitativas é a construção de uma curva de calibração, utilizando concentrações conhecidas do elemento desejado numa solução com composição semelhante à solução amostra. A curva de calibração é usada para determinar a concentração da solução amostra a partir da sua absorvância. É importante que a composição dos padrões seja semelhante à solução amostra, porque soluções diferentes podem ter diferentes tipos de interferentes que afectam o sinal (HARRIS, 1991).

### **2.3.1. INTERFERÊNCIAS**

Interferência é qualquer efeito que altera o sinal, quando a concentração do analito permanece inalterada (HARRIS, 2000). Em absorção atômica, as interferências são facilmente detectáveis (HARRIS, 1991). As interferências podem ser corrigidas contrariando a fonte de interferência ou preparando padrões que exibem a mesma interferência (HARRIS, 2000).

As interferências podem ser espectrais, químicas ou de ionização (HARRIS, 2000).

Interferências espectrais ocorrem quando o sinal do analito se sobrepõe ao sinal de outras espécies presentes na amostra ou sinais devidos à chama. A interferência da chama é subtraída por correção da radiação de fundo. A vantagem de trabalhar com uma sobreposição entre linhas de diferentes elementos na amostra é poder escolher outro comprimento de onda para a análise. O espectro de uma molécula é mais largo do que o de um átomo, por isso, a interferência espectral pode ocorrer a vários comprimentos de onda (HARRIS, 2000).

Interferência química é causada por qualquer substância que diminua a atomização do analito. Elementos facilmente ionizáveis podem ser adicionados à amostra para diminuir a interferência química. Uma chama rica em combustível reduz as espécies oxidáveis da amostra que poderiam interferir na atomização. Temperaturas de chama mais elevadas eliminam vários tipos de interferências químicas (HARRIS, 2000).

Interferências de ionização são um problema quando se analisam metais alcalinos, que têm o potencial de ionização mais baixos. Pode-se adicionar um supressor de ionização à amostra para diminuir a ionização do analito, por exemplo o cloreto de cério, pois é mais facilmente ionizado do que o analito em questão (HARRIS, 2000).

O método de adição de padrão compensa muitos tipos de interferências, ao adicionar quantidades conhecidas do analito numa amostra em que se desconheça a complexidade da matriz (HARRIS, 2000).

### **2.3.2. VANTAGENS**

Espectrometria de absorção atômica com chama é um método relativamente simples e pouco dispendioso, uma vez que não há necessidade de monocromadores de alta resolução; a sua alta selectividade e especificidade devem-se ao uso de uma fonte de linha específica para determinado elemento, para cada elemento existe uma lâmpada

de cátodo oco; além destas vantagens, este é um método que apresenta reduzidas interferências espectrais, ocasionadas por sobreposição de linhas de outros elementos, uma vez que há um número significativamente menor de linhas de absorção que de emissão (BORGES *et al*, 2005).

### **2.3.3. LIMITAÇÕES**

Este método não apresenta a possibilidade de determinar mais do que um elemento de cada vez, o que torna o procedimento relativamente tedioso se fôr determinado um grande número de elementos num conjunto de amostras, pois cada analito requer uma lâmpada específica. Se o laboratório pretender analisar diferentes analitos por este método, será necessário adquirir várias lâmpadas, que têm vidas úteis limitadas. A absorção medida na linha analítica pode ser causada não somente por átomos, mas também por moléculas (absorvem radiação) e partículas (espalham a radiação) provenientes de constituintes da matriz. Em absorção atômica, só é possível medir a absorção total, de maneira que o efeito de matriz deve ser determinado numa segunda medição e subtraído à absorção total, para fornecer a absorção líquida. Para minimizar erros devido à matriz, que muda rapidamente com o tempo, estas duas medições devem ser realizadas em sequência rápida, particularmente no caso de sinais que dependem do tempo (BORGES *et al*, 2005).

### **2.3.4. CLORETO DE CÉSIO**

Cloreto de céσιο é a forma de sal do elemento céσιο. Este é um elemento raro, tem uma estrutura semelhante ao lítio, sódio e potássio, o que faz com que possa ser absorvido por todas as células do corpo (American Cancer Society, 2011).

Cloreto de céσιο pode ser utilizado como supressor de interferências de ionização, pois é mais facilmente ionizado do que o analito em questão (HARRIS, 2000).

Para validar o método em estudo foi necessário verificar a necessidade de adicionar cloreto de céσιο às soluções amostra visto que este é um composto que acarreta elevados custos. Foram realizados ensaios de soluções amostra sem adição de cloreto de céσιο e ensaios de soluções amostra com adição de cloreto de céσιο.

#### **2.3.4. DESCONTAMINAÇÃO DE MATERIAL DE VIDRO**

O material de vidro utilizado na determinação de sódio por espectrometria de absorção atômica foi lavado, enxaguado e preenchido com solução de ácido nítrico 10% durante pelo menos 3 horas. Antes da utilização esses materiais foram enxaguados com água destilada.

#### **2.4. CHARPENTIER-VOLHARD**

É um método argentimétrico indirecto; a solução nítrica contendo o ião prata é titulada com tiocianato de amónio ou potássio, em presença de ião Fe III, que é adicionado na forma de solução saturada de sulfato de amónio e ferro III. A forma mais simples de aplicação deste método é a determinação de  $\text{Ag}^+$  por meio da titulação com tiocianato (Ministério da Educação).

O método é aplicado a determinação de Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup> em meio ácido. A solução nítrica contendo os halogenetos é tratada com nitrato de prata em excesso e o excesso de prata é titulado com uma solução de tiocianato (Ministério da Educação).

O Método de Charpentier-Volhard é um dos métodos utilizados em volumetria de precipitação e distingue-se dos restantes pela formação de um complexo corado e solúvel que dá cor à solução (EPED, 2006).

Um dos tipos mais comuns de reacção que ocorre em solução aquosa é a reacção de precipitação, caracterizada pela formação de um produto insolúvel, ou precipitado. Um precipitado é um sólido insolúvel que se separa da solução. As reacções de precipitação envolvem geralmente compostos iónicos (CHANG, 2010).

#### **2.5. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRA**

Ao longo deste estudo vão ser comparadas três técnicas de preparação de amostra, digestão seca, digestão por microondas e diluições directas.

A técnica de preparação de amostra depende da natureza da amostra. Existem vários métodos de preparação da solução para análise. Na escolha do método, deve-se dar particular atenção aos seguintes pontos; o método deve ser eficiente, razoavelmente simples e rápido; o método não deve atacar comprometedoramente o recipiente em que a amostra será tratada; o método não deve causar qualquer perda do constituinte interessado (OHLWEILER, 1981).

A destruição da matéria orgânica é um tratamento requerido, na análise de compostos orgânicos e também de certos materiais que contenham substâncias

orgânicas, para converter os elementos em estudo a uma forma susceptível de aplicação dos métodos analíticos (OHLWEILER, 1981).

### **2.5.1. DIGESTÃO SECA**

A digestão seca é uma das formas mais simples de preparar uma amostra. Consiste em aquecer a amostra numa cápsula de porcelana em mufla até completar-se a combustão do material carbonáceo a dióxido de carbono. O resíduo da inceneração contém, apenas, os elementos não-volatilizáveis nas condições do tratamento (OHLWEILER, 1981).

### **2.5.2. DIGESTÃO POR MICROONDAS**

Esta técnica consiste em destruir a matéria orgânica mediante aquecimento da amostra com ácido nítrico em forno microondas, a 200 °C e a elevada pressão durante 35 minutos, sendo 15 minutos para aquecimento e 20 minutos para a digestão. Inicialmente o tempo de aquecimento era de 10 minutos bem como o de digestão, estas são as indicações referidas na nota de aplicação da Milestone, marca do microondas, posteriormente foi necessário aumentar os referidos tempos.

### **2.5.3. DILUIÇÕES DIRECTAS**

Esta é a técnica que se pretende validar, pelo que foi comparada com as técnicas acima descritas. Diluições directas consiste em dissolver o analito que se pretende analisar em água destilada, o que é possível devido ao facto do cloreto de sódio ser uma substância bastante solúvel em água.

## **2.6. VALIDAÇÃO**

A validação deve ser vista como a ligação entre os dados experimentais que certificam a eficácia de determinado método de ensaio para determinado propósito e é da responsabilidade do laboratório (RILEY, 1996). É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam, conduzem a resultados creíveis e adequados à qualidade pretendida (RELACRE, 2000).

A validação de um método analítico consiste, primeiramente, na identificação de potenciais fontes de erro do método e sua quantificação (RILEY, 1996), pois um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumular

erros, podendo alterar de forma significativa o valor do resultado final (RELACRE, 2000). Os ensaios de validação usam métodos estatísticos relativamente simples. Durante a validação devem-se ter em atenção três tipos de erros na medição analítica: erros grosseiros, sistemáticas e aleatórios. O analista deve saber distinguir cada um deles (RILEY, 1996).

Erros grosseiros são definidos como erros tão sérios que é necessário terminar a análise. Incluem perda ou contaminação da amostra, omissão de reagentes fundamentais ou falha do equipamento. São erros que se reconhecem facilmente e por vezes são inevitáveis (RILEY, 1996).

Erros sistemáticos afectam a veracidade de uma amostra analítica, o que leva a que todos os resultados tenham o mesmo erro. São, usualmente, erros cometidos pelo analista, erros instrumentais (erros na calibração do equipamento), erros introduzidos pelo reagente ou uma combinação destes erros. Os erros sistemáticos alteram os resultados, para que sejam todos demasiado altos ou demasiado baixos. O erro sistemático, associado a uma medição analítica pode ser definido como *bias*, que pode ser positivo ou negativo, ou por veracidade, que pode estar entre zero e cem (RILEY, 1996).

Erros aleatórios resultam de variáveis incontroláveis nas condições de medição, que originam resultados individuais ou medições que caem num dos lados do valor verdadeiro. Estes erros podem ser reduzidos mas nunca eliminados (RILEY, 1996).

### **2.6.1. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO**

Os parâmetros estatísticos primários que validam um método analítico são a veracidade e a precisão. Embora a validação de dados experimentais possa ser definida primeiramente pela veracidade e precisão do método analítico utilizado para gerar esses dados, o uso destes parâmetros individualmente é considerado inadequado, sendo necessários ensaios suplementares para a validação de um método completamente novo (RILEY, 1996).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento da gama de trabalho, da linearidade, dos limiares analíticos, da sensibilidade, da precisão e da exactidão (RELACRE, 2000).

### **2.6.1.1. SELECTIVIDADE/ESPECIFICIDADE**

A selectividade descreve a capacidade do método analítico diferenciar várias substâncias presentes na amostra (RILEY, 1996) sem interferência de outros componentes (RELACRE, 2000) e é aplicável em métodos em que dois ou mais componentes são separados e quantificados numa matriz complexa (RILEY, 1996).

Selectividade é aplicada a métodos cromatográficos espectroscópicos e espectrofotométricos, nestes métodos, obtêm-se sinais separados para os diferentes componentes da mistura (RILEY, 1996).

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito (RELACRE, 2000).

Tanto a selectividade como a especificidade de um método são comprometidas pela presença de potenciais interferentes (RILEY, 1996). Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra (RELACRE, 2000).

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade (RELACRE, 2000).

Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e selectivo) quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100% (RELACRE, 2000). Para o trabalho em estudo, o laboratório estabeleceu que o método em questão seria aplicável se as taxas de recuperação forem  $100 \pm 10\%$ .

### **2.6.1.2. QUANTIFICAÇÃO**

#### **2.6.1.2.1. CALIBRAÇÃO**

Um passo importante na validação de qualquer método analítico é estabelecer a relação matemática entre o sinal e a concentração do analito. Assim que esta relação for estabelecida, o instrumento analítico ou o método podem ser calibrados. A calibração

irá depender do tipo de método, do tipo de amostra, da veracidade e precisão exigidos e da gama de concentração do analito ou dos interesses analíticos (RILEY, 1996).

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida (RELACRE, 2000).

Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica do equipamento inicia-se com o analista a preparar uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida, que serão medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar, de seguida estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da calibração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação. (RELACRE, 2000):

É desejável que a calibração analítica seja efectuada aquando da análise, devendo existir critérios para a aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações, definidos internamente (RELACRE, 2000).

Os padrões de calibração devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho, o branco de calibração é muitas vezes diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, quando aplicável (RELACRE, 2000).

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. Para realizar este teste é recomendável que a curva de calibração tenha 10 pontos que se distribuam de igual modo na gama de concentrações. O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes, calcula-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão, determina-se o valor teste (PG) e compara-se com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade. Se  $PG \leq F$ , concluiu-se que as variâncias não são significativas e que a gama de trabalho está bem ajustada. Se  $PG > F$ , concluiu-se que as variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrões permitam obter  $PG \leq F$  (RELACRE, 2000).

Quando verificarmos que temos uma gama de trabalho bem ajustada, será necessário avaliar a linearidade da mesma, que pode ser avaliada através de um modelo estatístico. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, bem como os respectivos desvios padrão residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y^2}$ . Determina-se a diferença das variâncias ( $DS^2$ ) e a partir deste calcula-se o valor teste (PG) (RELACRE, 2000). Compara-se o valor teste com o

valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher. Se  $PG \leq F$ , a função é linear, se  $PG > F$ , a função não é linear (RELACRE, 2000).

Tanto a análise da gama de trabalho como da linearidade devem ser encaradas como um estudo que deve ser realizado durante a fase de validação/implementação do método de ensaio, ou sempre que se justifique (RELACRE, 2000).

#### **2.6.1.2.2. LIMITE DE DETECÇÃO**

O limite de detecção de um método analítico é um parâmetro importante quando se realizam análises quantitativas a concentrações próximas deste (RILEY, 1996). Pode ser definido como a concentração mínima que origina um sinal instrumental que (RILEY, 1996) pode ser detectado numa amostra e que é significativamente diferente do branco, mas não é necessariamente quantificado como valor exacto (RELACRE, 2000).

Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa a ausência de analito. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor (RELACRE, 2000).

Em termos quantitativos o limite de detecção é obtido por (RELACRE, 2000):

$$L.D. = X_0 + K * \sigma_0$$

$X_0$  – média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina.

$\sigma_0$  – desvio padrão associado a  $X_0$ .

Se a lei de probabilidade de  $X_0$  é suficientemente conhecida e partindo do princípio que é gausseana (distribuição normal de erros), então toma-se o valor de  $K \approx 3,3$  para um nível de confiança de cerca de 99,7% (RELACRE, 2000).

Assim:  $L.D. \approx X_0 + 3,3 * \sigma_0$

#### **2.6.1.2.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO**

O limite de quantificação é a menor concentração de uma amostra que pode ser medido com um nível aceitável de veracidade e precisão (RILEY, 1996). Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a veracidade e precisão conseguidas são satisfatórias. Segundo as recomendações da

IUPAC, o coeficiente de variação para estes padrões não deve exceder 10% (RELACRE, 2000).

É um parâmetro importante, especialmente quando as medições realizadas são próximas deste limite (RILEY, 1996).

Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado por (RELACRE, 2000):

$$L.Q. = X_0 + 10 * \sigma_0$$

$X_0$  – média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina.

$\sigma_0$  – desvio padrão associado a  $X_0$ .

### **2.6.1.3. PRECISÃO**

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (RELACRE, 2000).

Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial. Geralmente, a precisão varia com a gama de concentrações (RELACRE, 2000).

#### **2.6.1.3.1. REPETIBILIDADE**

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível (RELACRE, 2000). Para a realização deste trabalho, os ensaios foram realizados pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, com o mesmo equipamento, com os mesmos reagentes e foram realizados num curto intervalo de tempo.

O limite de repetibilidade ( $r$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaios ( $X_i - X_{i-1}$ ), obtidos nas condições acima referidas (RELACRE, 2000).

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio laboratório, efectuam-se uma série de medições ( $n \geq 10$ ) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade (RELACRE, 2000). Devido à amplitude da gama de trabalho em estudo, este procedimento foi repetido em quatro amostras de pão com diferentes concentrações de sódio, para cobrir todo o domínio de aplicação do método. Foram analisadas, uma amostra de pão normal, uma amostra de pão sem sal, uma amostra de pão meio sal e uma amostra de pão de oito cereais.

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

$$r = 2,8 * \sqrt{S_{ri}^2}$$

O coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é dado por:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{X_m} * 100$$

#### **2.6.1.3.2. REPRODUTIBILIDADE**

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar o laboratório, o operador, o equipamento e o momento do ensaio (RELACRE, 2000). A reprodutibilidade não será determinada neste estudo visto que não foi possível reunir as condições necessárias para a sua realização.

#### **2.6.1.3.3. PRECISÃO INTERMÉDIA**

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar (uma ou mais). Para determinar este parâmetro devem-se fazer variar, o analista, o equipamento, o momento do ensaio e realizar ensaios com e sem verificação da calibração (RELACRE, 2000).

A determinação da precisão intermédia, neste estudo, foi realizada fazendo variar dois parâmetros, o analista e o momento da análise. Um analista (Andreia) realizou o ensaio num dia e o outro analista (Joana) no dia seguinte. Não foi possível variar o equipamento pois o laboratório apenas tem um. Em espectrometria de absorção atómica

é necessário efectuar a calibração diariamente e verificá-la, como tal esta condição também não foi avaliada.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar (RELACRE, 2000).

Para determinar a precisão intermédia foram processadas 15 soluções amostra em duplicadono primeiro dia por um analista e no dia seguinte foram processadas as mesmas amostras por um analista diferente. A expressão utilizada para detrminar a precisão intermédia nestas consições foi:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} * \sum_{j=1}^t (Y_{j1} - Y_{j2})^2}$$

$S_i$  – desvio padrão de precisão intermédia

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

$Y_{j2}$  – segundo resultado obtido para a amostra j.

#### **2.6.1.3.3. COMPARAÇÃO DA PRECISÃO ENTRE MÉTODOS**

Quando se pretende avaliar se dois métodos (A e B) têm diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F. Este baseia-se no cálculo da razão (PG) entre as variâncias dos dois métodos.

$$PG = \frac{S_A^2}{S_B^2}$$

Estas variâncias devem ser colocadas de modo a que esta razão seja maior ou igual a um. Em seguida é comparado o valor desta razão com o valor de F de Snedecor, atendendo aos graus de liberdade em questão. Se  $PG \leq F$ , os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões (RELACRE, 2000).

#### **2.6.1.4. EXACTIDÃO**

Exactidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro e implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos (RELACRE, 2000).

Para avaliar este parâmetro, normalmente utilizam-se materiais de referência certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais e testes comparativos (RELACRE, 2000). Ao longo deste estudo não foi possível utilizar MRC devido à inexistência deste material para a matriz em questão, o pão.

#### **2.6.1.4.1. ENSAIOS INTERLABORATORIAIS**

O primeiro ensaio interlaboratorial para a matriz em questão, pão, realizou-se em Outubro de 2011, três meses após a conclusão do trabalho experimental realizado no âmbito desta dissertação de mestrado.

O laboratório realizou o ensaio interlaboratorial com uma gama de trabalho menor do que a gama de trabalho em estudo, ou seja realizou o ensaio com uma gama de trabalho de 0 mg/L a 2,0 mg/L, ao passo que este estudo foi realizado para uma gama de trabalho entre 0 mg/L e 2,5 mg/L.

Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante os objectivos a que se destinam (RELACRE, 2000). Neste caso foi realizado um ensaio interlaboratorial de aptidão. Este tipo de ensaio destina-se a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório. Se possível, deve ser rastreado a um MRC, podendo geralmente os participantes usar os métodos que entenderem (RELACRE, 2000).

A avaliação do desempenho do laboratório participante é feita pela entidade organizadora. Em geral é usada a seguinte fórmula (“Z-score”) (RELACRE, 2000):

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

$X_{lab}$  – valor obtido pelo laboratório;

$X_v$  – valor aceite como verdadeiro, isto é, o estabelecido no ensaio interlaboratorial;

$S$  – unidade de desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de  $X_v$ , ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A avaliação pode ser feita segundo a seguinte escala de pontuação (RELACRE, 2000):

$|Z| \leq 2$  : Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$  : Quetionável

$|Z| > 3$  : Incorrecto

#### **2.6.1.4.2. TESTES COMPARATIVOS**

A comparação dos resultados obtidos pelo método interno de ensaio com os resultados obtidos por outro método tomado como referência é um importante contributo na validação. O objectivo principal deste tipo de ensaio comparativo é o de estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, de avaliar a exactidão do método interno relativamente ao de referência (RELACRE, 2000).

Uma vez que não existe um método de referência para a quantificação do teor de sódio em pão, a análise de testes comparativos teve por base Normas Portuguesas para outras matrizes. Para comparar o método que se pretende validar com a técnica de Charpentier-Volhard recorreu-se à NP-2972, norma para a determinação do teor de cloretos solúveis na água em alimentos para animais. A técnica utilizada para determinar o teor de cloretos solúveis em pão é baseada na técnica utilizada na NP-2972.

A NP EN ISO 6869/2007 e a ISO 8070 foram utilizadas como base para a comparação dos restantes métodos, espectrometria de absorção atómica por diluições directas, espectrometria de absorção atómica com digestão seca e espectrometria de absorção atómica com digestão microondas. Como não existe um método de referência para a determinação do teor de sódio em pão, as normas acima referidas foram consultadas com o objectivo de perceber quais as técnicas referenciadas para a preparação de amostras analisadas por espectrometria de absorção atómica. A NP EN ISO 6869/2007 apenas refere a digestão seca, no entanto a ISO 8070 refere a digestão seca e a digestão microondas, por esse motivo surgiu a necessidade de comparar o método que se pretende validar com os métodos acima referidos.

Os métodos em estudo, espectrometria de absorção atómica com diluição directa, espectrometria de absorção atómica com digestão microondas e a técnica de Charpentier-Volhard, foram comparados pelo teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio.

Recomenda-se a utilização deste teste quando se pretende comparar dois métodos em gamas de trabalho alargadas ou quando se pretende validar um método em toda a sua gama de trabalho. Neste caso analisam-se pelos dois métodos uma série de

amostras (no mínimo dez), de modo a cobrir toda a gama de trabalho que se pretende avaliar (RELACRE, 2000).

A concordância entre resultados obtidos por dois métodos diferentes é avaliada através da equação  $y = b * x + a$ . Designando y por método 1 e x por método 2, teremos a equação (RELACRE, 2000):

$$y = b * x + a$$

Sendo:

b – declive

a – ordenada na origem

Esta equação representa a equação de regressão linear entre dois métodos de ensaio (RELACRE, 2000).

Pode-se considerar que dois métodos não apresentam desvios sistemáticos se a equação anterior não fôr significativamente diferente da equação (RELACRE, 2000):

$$\text{Método 1} = \text{Método 2}$$

Ou seja, se o intervalo de confiança associado à ordenada na origem,  $a \pm S_a * t$ , deve conter o valor zero e o intervalo de confiança associado ao declive,  $b \pm S_b * t$ , deve conter o valor zero. Sendo  $S_a$  o desvio padrão da ordenada na origem,  $S_b$  o desvio padrão do declive e t o valor de t tabelado para um determinado grau de confiança e (N-2) graus de liberdade, sendo N o número de amostras ensaiadas (RELACRE, 2000).

Caso não se verifiquem estas duas condições simultaneamente, pode-se concluir que os métodos não são estatisticamente concordantes na gama de trabalho em estudo, para um determinado nível de confiança (RELACRE, 2000).

Quando se utiliza o método da regressão linear para avaliar a concordância dos resultados obtidos por dois métodos de ensaio, o método de maior precisão deverá ser colocado no eixo das abcissas e o outro no eixo das ordenadas, pois considera-se que os erros relativos ao eixo das abcissas são desprezáveis face aos associados ao eixo das ordenadas (RELACRE, 2000).

A espectrometria de absorção atómica com diluições directas e a espectrometria de absorção atómica com digestão microondas foram comparadas recorrendo a um teste ANOVA.

### **3. REAGENTES E PRODUTOS AUXILIARES**

3.1. Água destilada.

3.2. Ácido nítrico 65% PA da Merck, referência 1.00456.2500, lote K41641456, validade 31-10-2013.

3.3. Ácido nítrico a 25%

Pipetam-se 25 mL de ácido nítrico 65% PA para um balão de 100 mL com água destilada.

3.4. Ácido nítrico a 10%

Medem-se 500 mL de ácido nítrico 65% PA para um recipiente com 4,5 L de água destilada.

3.5. Peróxido de hidrogénio a 30% da Merck, referência 1.07298.1000, lote ZU74081198, validade 30-09-2013.

3.6. Cloreto de cézio da Merck, referência 1.02038.0100, lote K40631938 034, validade 31-12-2014.

3.7. Cloreto de cézio a 10%

Dissolvem-se 5g de cloreto de cézio em água destilada, para um balão de 50 mL.

3.8. Solução padrão de sódio 1000 mg/L da Merck, referência 1.70238.05, lote HC090917, validade 31-08-2013.

3.9. Solução padrão de trabalho de sódio 20 ppm

Para um balão de 200 mL com água destilada, pipetam-se 10 mL de ácido nítrico a 25% e 4 mL de solução padrão de sódio 1000 mg/L, perfaz-se o volume com água destilada.

3.10. Carvão activado da Panreac, referência 121237.1609, lote 0000104036, validade 11-2013.

3.11. Ferrocianeto de potássio da Merck, referência 4984, lote A640484.

3.12. Acetato de zinco da Panreac, referência 131775, lote 0000124361, validade 05-2014.

3.13. Ácido acético glacial da Panreac, referência 131008, lote 0000134800, validade 07-2011.

3.14. Acetona da Acros Organics, referência 176800025, lote 0926803, validade 11-01-2016.

3.15. Solução de nitrato de prata 0,1 N da Panreac, referência 181464.1211, lote 0000127203, validade 06-2014.

3.16. Solução de tiocianato de amónio 0,1 N da Panreac, referência 181144.1211, lote 0000117812, validade 04-2011.

3.17. Éter dietílico da Fisher Scientific, referência D12450117, lote 0881961, validade: dois anos após abertura.

3.18. Solução Carrez I

Pesam-se 11 g de acetato de zinco para um balão de 50 mL, adiciona-se 1,5 mL de ácido acético glacial e perfaz-se com água destilada.

3.19. Solução Carrez II

Pesam-se 5,3 g de ferrocianeto de potássio para um balão de 50 mL e perfaz-se com água.

3.20. Solução de sulfato de ferro III e amônio cristalizado saturada a frio e adicionada de ácido nítrico em quantidade suficiente para descorar a solução (cerca de 5 mL por 100 mL).

#### **4. EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS**

- 4.1. Balança sensível ao miligrama.
- 4.2. Cápsulas de porcelana, descontaminadas com ácido nítrico a 10% antes da utilização.
- 4.3. Balões de vidro de 500 mL, 200 mL, 100 mL, 50 mL e 25 mL, descontaminados com ácido nítrico a 10% antes da utilização.
- 4.4. Micropipeta de 100 - 1000  $\mu$ L da Boeco, calibrada a 11-2010 pela VWR, número de série 6096568.
- 4.5. Pipeta mecânica de 1 – 10 mL da Biohit, número de série 8500108.
- 4.6. Colher
- 4.7. Mufla eléctrica regulada à temperatura de  $550 \pm 15$  °C.
- 4.8. Placas eléctricas.
- 4.9. Excicador.
- 4.10. Digestor microondas da Milestone.
- 4.11. Contentores de plástico de 50 mL.
- 4.12. Pipetas de 5 mL, 10 mL, 25 mL e 50 mL.
- 4.13. Agitador mecânico.
- 4.14. Papel de filtro
- 4.15. Frascos cónicos de 200 mL.
- 4.16. Buretas de precisão.
- 4.17. Espectrofotómetro de absorção atómica com detecção por chama da Thermo Scientific.
- 4.18. Lâmpada de cátodo oco de sódio.

## 5. PROCEDIMENTOS

### 5.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR DILUIÇÕES DIRECTAS SEM CLORETO DE CÉSIO

Pesa-se 0,1 gramas de uma amostra de pão previamente moído para um balão de 100 mL e perfez-se com água destilada.

Pipetam-se 5 mL da solução preparada no balão de 100 mL para um balão de 25 mL, perfaz-se com água destilada.

### 5.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR DILUIÇÕES DIRECTAS COM CLORETO DE CÉSIO

Pesa-se 0,1 gramas de uma amostra de pão previamente moído para um balão de 100 mL, adicionam-se 10 mL de cloreto de césio a 10% e perfez-se com água destilada.

Pipetam-se 5 mL da solução preparada no balão de 100 mL para um balão de 25 mL, perfaz-se com água destilada.

### 5.3. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR DILUIÇÕES DIRECTAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO NITRICO A 65%

Pesa-se 0,1 gramas de uma amostra de pão previamente moído para um balão de 100 mL, adiciona-se ácido nítrico a 65% nos volumes discriminados no **QUADRO 2** e perfez-se com água destilada.

Pipetam-se 5 mL da solução preparada no balão de 100 mL para um balão de 25 mL, perfaz-se com água destilada.

**QUADRO 2** - Volume (mL) de ácido nítrico a adicionar a cada solução.

<b>Solução</b>	<b>Volume (mL) de ácido nítrico a 65%</b>
1	0
2	0,184
3	0,655
4	3,33
5	20,0

#### **5.4. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR DIGESTÃO SECA**

Pesa-se 0,1 gramas de uma amostra de pão previamente moído para um cadinho, coloca-se na placa de aquecimento durante uma hora, de seguida coloca-se na mufla, a 550°C, durante 3 horas.

Retiram-se os cadinhos da mufla e colocam-se no excicador até arrefecerem.

Adiona-se 1 mL de ácido nítrico a 65% às cinzas e transfere-se a solução para um balão de 100 mL e perfaz-se com água destilada.

Pipetam-se 5 mL da solução preparada no balão de 100 mL para um balão de 25 mL, perfaz-se com água destilada.

#### **5.5. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA POR DIGESTÃO MICROONDAS**

Pesa-se 0,5 gramas de uma amostra de pão previamente moído para um vaso, adicionam-se 7 mL de ácido nítrico a 65 % e 1 mL de peróxido de hidrogénio.

Coloca-se na hotte durante 30 minutos, de seguida colocam-se os vasos no digestor microondas e inicia-se a corrida.

No final da corrida transfere-se a solução do vaso para um contentor de plástico de 50 mL e de seguida para um balão de 100 mL. Perfaz-se com água.

Pipeta-se 1 mL do balão de 100 mL para o balão de 25 mL e perfaz-se com água.

#### **5.6. DETERMINAÇÃO DE SÓDIO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA**

##### **5.6.1. CONDIÇÕES DE MEDIÇÃO**

Ajusta-se o espectrofotómetro de absorção atómica de acordo com as instruções do fabricante. Optimiza-se a resposta do equipamento para as medições com chama ar-acetileno. Para a determinação de sódio, selecciona-se o comprimento de onda 589,6 nm.

##### **5.6.2. PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO**

Transferem-se os volumes discriminados no **QUADRO 3** de solução padrão de trabalho de sódio (4.8) para 11 balões volumétricos de 100 mL, de forma a estabelecer uma escala de 0,0 a 2,5 mg/L e perfaz-se o volume com água. Agita-se.

**QUADRO 3** - Volumes de solução padrão de trabalho de sódio (4.8) a adicionar a cada balão volumétrico para preparar as soluções de calibração.

<b>Balão volumétrico</b>	<b>Volume (mL) da solução padrão de trabalho</b>	<b>Concentração do íon sódio (mg/L)</b>
1	0,00	0,00
2	0,70	0,14
3	1,25	0,25
4	2,50	0,50
5	3,75	0,75
6	5,00	1,00
7	6,25	1,25
8	7,50	1,50
9	8,75	1,75
10	10,0	2,00
11	12,5	2,50

Mede-se a absorvância da solução em branco (balão volumétrico 1).

Medem-se as absorvâncias das soluções de calibração e o equipamento constrói a curva de calibração.

### **5.6.3. MEDIÇÃO DA SOLUÇÃO A ANALIZAR**

Após concluir a curva de calibração, faz-se uma leitura dos padrões de controlo de qualidade (0,14 mg/L e 1,00 mg/L), se o desvio não fôr superior a 10% inicia-se a leitura da solução amostra. A cada 10 leituras da solução amostra faz-se uma leitura dos padrões de controlo de qualidade.

### **5.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORETOS SOLÚVEIS NA ÁGUA PELA TÉCNICA DE CHARPENTIER-VOLHARD**

Pesa-se 5 g de pão para copo de precipitação e transfere-se para balão volumétrico de 500 mL; adiciona-se 1 g de carvão activado; 400 mL de água destilada; 5 mL de solução de Carrez I e 5 mL de solução de Carrez II. Agita-se durante 30 minutos em placa magnética, completa-se o volume com água destilada, homogeneiza-se e filtra-se para frascos cónicos de 500 mL.

De seguida pipetam-se 50 mL do filtrado para um frasco cónico de 250 mL, adicionam-se 5 mL de ácido nítrico 65%, 2 mL de solução saturada de sulfato de ferro III e amónio e 2 gotas de solução de tiocianato de amónio. Adiciona-se um volume de solução de nitrato de prata 0,1 N, medido por bureta de precisão, suficiente para precipitar os cloretos e assegurar um excesso de cerca de 5 mL; adicionam-se 5 mL de éter dietílico e agita-se fortemente até aglutinação do precipitado. Titula-se o excesso de nitrato de prata com a solução de tiocianato até que a cor vermelha-acastanhada persista, durante pelo menos 30 segundos.

## 6. RESULTADOS E TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Durante o período de estágio foram realizados vários ensaios com o objectivo de validar um método interno de quantificação do teor de sódio em pão. Os referidos ensaios foram realizados no Laboratório de Medicina Veterinária, nomeadamente no Departamento de Química Analítica, entre Outubro de 2010 e Junho de 2011.

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos, bem como o tratamento estatístico realizado.

### 6.1. AMOSTRAS PREPARADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO NÍTRICO

Ao longo da gama de trabalho, os padrões têm diferentes concentrações de ácido nítrico, visto que só a solução de sódio 20 ppm é preparada com ácido nítrico. A partir desta solução preparam-se os padrões de diferentes concentrações de sódio, sendo que no final cada solução padrão tem uma concentração de ácido nítrico.

A partir da mesma amostra de pão foram preparadas soluções com diferentes concentrações de ácido nítrico, com o objectivo de verificar se as diferentes concentrações de ácido nítrico têm influência no resultado final. As soluções foram preparadas em triplicado (**QUADRO 4**).

Para calcular a concentração em g/100g de Na, no caso das diluições directas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C_{(\text{mg/L})} \times 5 \times 0,1 \times (V_{\text{balão}}/m_{\text{amostra}})$$

**QUADRO 4** - Comparação da concentração de sódio solúvel em pão, de soluções preparadas com diferentes concentrações de ácido nítrico.

Data	Amostra	Quantidade de ácido nítrico (ml)	Massa (g)	Absorvância	Concentração (mg/L)	Concentração (g/100g)
11-05-2011	50509 A	0	0,104	0,108	0,4996	0,240192308
	50509 B		0,101	0,093	0,4294	0,212574257
	50509 C		0,102	0,108	0,5027	0,246421569
	50509 A	0,184	0,106	0,105	0,4877	0,23004717
	50509 B		0,106	0,106	0,4938	0,232924528
	50509 C		0,106	0,111	0,5186	0,244622642
	50509 A	0,655	0,102	0,1	0,4634	0,227156863
	50509 B		0,109	0,113	0,5281	0,242247706
	50509 C		0,106	0,108	0,5035	0,2375
	50509 A	3,3	0,108	0,112	0,5219	0,24162037
	50509 B		0,104	0,105	0,4888	0,235
	50509 C		0,105	0,114	0,533	0,253809524
	50509 A	20	0,105	0,11	0,5112	0,243428571
	50509 B		0,108	0,105	0,4847	0,224398148
	50509 C		0,102	0,105	0,4869	0,238676471

Os resultados foram tratados pela ferramenta estatística ANOVA e foram obtidos os resultados apresentados no **QUADRO 5**.

**QUADRO 5** - Tratamento estatístico dos resultados descritos no quadro anterior.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,000187	4	4,68E-05	0,369911	0,824864	3,47805
Dentro dos grupos	0,001266	10	0,000127			
Total	0,001453	14				

## 6.2. Comparação dos resultados obtidos com a preparação da amostra por diluições directas com cloreto de céσιο e sem cloreto de céσιο

O cloreto de céσιο é utilizado na análise de sódio por Espectrometria de Absorção Atómica para eliminar interferentes. Para testar a necessidade deste composto quimico foram testadas algumas amostras, preparadas com cloreto de céσιο (**QUADRO 6**) e sem cloreto de céσιο (**QUADRO 7**).

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1

**QUADRO 6** - Resultados das amostras preparadas com adição de cloreto de céσιο.

Data	Amostra	Tipo de pão	Massa (g) com cloreto de céσιο	Concentração (mg/L) com cloreto de céσιο	Concentração (g/100g) com cloreto de céσιο	Aceitação	Média (A/B)
<b>19-04-2011</b>	48950 A	Sem sal	0,1	0,0166	0,0083	Não	0,006221
	48950 B		0,105	0,0087	0,004142857	Satisfatório	
<b>20-04-2011</b>	49958 A	Integral	0,105	0,4956	0,236	Satisfatório	0,240054
	49958 B	meio sal	0,101	0,4931	0,244108911		
<b>19-04-2011</b>	48926 A	Padas	0,1	0,7465	0,37325	Satisfatório	0,368725
	48926 B		0,1	0,7284	0,3642		
	49213 A	Oito cereais	0,101	1,5503	0,767475248	Satisfatório	0,766002
	49213 B		0,106	1,6208	0,764528302		
	49118 A	Milho	0,106	0,7615	0,359198113	Satisfatório	0,35705
	49118 B		0,101	0,7169	0,35490099		
	49233 A	Alemão	0,103	0,8255	0,400728155	Satisfatório	0,397143
	49233 B		0,104	0,8186	0,393557692		
<b>14-04-2011</b>	49268 A	Integral	0,101	0,8632	0,427326733	Satisfatório	0,420842
	49268 B		0,101	0,837	0,414356436		
	49132 A	Bicos de pato	0,1	1,1169	0,55845	Satisfatório	0,553525
	49132 B		0,1	1,0972	0,5486		
<b>20-04-2011</b>	49035 A	Meio sal	0,1	0,4887	0,24435	Satisfatório	0,237883
	49035 B		0,106	0,4906	0,231415094		
	49029 A	Mistura	0,103	0,7807	0,378980583	Satisfatório	0,383956
	49029 B		0,103	0,8012	0,388932039		
	49172 A	Brasileiro	0,103	1,1345	0,550728155	Satisfatório	0,544066
	49172 B		0,104	1,1178	0,537403846		
	48875 A	Salioio	0,103	0,8306	0,403203883	Satisfatório	0,407901
	48875 B		0,102	0,8417	0,412598039		
	48871 A	Rústico	0,101	0,8897	0,440445545	Satisfatório	0,438598
	48871 B		0,1	0,8735	0,43675		
	49224 A	Enfarinhados	0,1	0,9402	0,4701	Satisfatório	0,463628
	49224 B		0,102	0,9326	0,457156863		
	49848 A	Regueifa	0,101	0,8127	0,402326733	Satisfatório	0,399653
	49848 B		0,101	0,8019	0,396980198		

**QUADRO 7** - Resultados das amostras sem adição de cloreto de céσιο.

Data	Amostra	Massa (g) sem cloreto de céσιο	Concentração (mg/L) sem cloreto de céσιο	Concentração (g/100g) sem cloreto de céσιο	Aceitação	Média (A/B)
<b>06-04-2011</b>	48950 A	0,103	0,0189	0,009174757	Não	0,010344
	48950 B	0,109	0,0251	0,011513761	Satisfatório	
	49958 A	0,101	0,5164	0,255643564	Satisfatório	0,261881
	49958 B	0,101	0,5416	0,268118812		
	48926 A	0,103	0,7373	0,357912621	Satisfatório	0,363613
	48926 B	0,102	0,7534	0,369313725		
	49213 A	0,105	1,452	0,691428571	Satisfatório	0,691071
	49213 B	0,105	1,4505	0,690714286		
	49118 A	0,1	0,6912	0,3456	Satisfatório	0,350225
	49118 B	0,1	0,7097	0,35485		
	49233 A	0,1	0,752	0,376	Satisfatório	0,375025
	49233 B	0,1	0,7481	0,37405		
	49268 A	0,103	0,8038	0,390194175	Satisfatório	0,395572
	49268 B	0,1	0,8019	0,40095		
	49132 A	0,103	1,0517	0,510533981	Satisfatório	0,510558
	49132 B	0,103	1,0518	0,510582524		
	49035 A	0,1	0,4874	0,2437	Satisfatório	0,242
	49035 B	0,1	0,4806	0,2403		
	49029 A	0,1	0,7049	0,35245	Satisfatório	0,372273
	49029 B	0,105	0,8234	0,392095238		
	49172 A	0,1	1,2016	0,6008	Satisfatório	0,607802
	49172 B	0,102	1,2542	0,614803922		
	48875 A	0,102	0,8881	0,435343137	Satisfatório	0,433772
	48875 B	0,1	0,8644	0,4322		
	48871 A	0,102	0,9405	0,461029412	Satisfatório	0,460894
	48871 B	0,112	1,0321	0,460758929		
	49224 A	0,1	0,9553	0,47765	Satisfatório	0,482275
	49224 B	0,1	0,9738	0,4869		
49848 A	0,101	0,8331	0,412425743	Satisfatório	0,414392	
49848 B	0,103	0,8577	0,416359223			

Os resultados foram tratados pela ferramenta estatística ANOVA e foram obtidos os resultados apresentados no **QUADRO 8**.

**QUADRO 8** - Tratamento dos resultados obtidos nos **QUADROS 6 e 7**.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6,1192E-06	1	6,119E-06	0,000229275	0,988026422	4,195971707
Dentro dos grupos	0,74730266	28	0,0266894			
Total	0,74730878	29				

### 6.3. Especificidade

Para testar a especificidade do referido método, foram analisadas duas amostras, uma amostra de um pão sem sal e uma amostra de um pão meio sal. A cada solução amostra foi adicionada uma determinada quantidade de padrão de sódio 1000 mg/L. As amostras foram preparadas em duplicado. De seguida foram calculadas as respectivas taxas de recuperação (**QUADRO 9**).

Taxa de recuperação (%) foi determinada com a seguinte equação:

$$Rec. (\%) = \frac{(C_{obtida} - C_0)}{C_{adicionada}} * 100$$

**QUADRO 9** - Resultados obtidos com o objectivo de estudar a especificidade do método e respectivo tratamento estatístico.

Data	Tipo de pão	Amostra	Volume adicionado (ml)	Fortificação (mg/L)	Massa (g)	Abs.	Conc. (mg/L)	Média (A-B)	Taxa de Recuperação (%)
17-03-2011	sem sal	45917 A	0	0	0,101	0,003	0,0168	0,02	
		45917 B			0,103	0,004	0,0232		
		45917 A	1,2	2,4	0,102	0,34	2,3007	2,3076	95,31666667
		45917 B			0,101	0,342	2,3145		
	meio sal	45917 A	0,75	1,5	0,103	0,222	1,4558	1,45185	95,45666667
		45917 B			0,102	0,22	1,4479		
		45917 A	0,25	0,5	0,105	0,08	0,5062	0,4992	95,84
		45917 B			0,101	0,078	0,4922		
	meio sal	50509 A	0	0	0,107	0,073	0,4627	0,44305	
		50509 B			0,102	0,067	0,4234		
		50509 A	0,95	1,7	0,11	0,324	2,1831	2,1768	101,9852941
		50509 B			0,104	0,322	2,1705		
		50509 A	0,5	1	0,106	0,222	1,4612	1,4402	99,715
		50509 B			0,109	0,216	1,4192		
		50509 A	0,25	0,5	0,103	0,15	0,9692	0,957	102,79
		50509 B			0,101	0,146	0,9448		

## 6.4. Calibração

### 6.4.1. Limite de detecção e limite de quantificação

Para determinar o limite de detecção (L.D.) e o limite de quantificação (L.Q.) foram realizados 20 ensaios de brancos em dias diferentes, calculou-se a média e o desvio padrão e posteriormente o limite de detecção e o limite de quantificação (QUADRO 10).

A média e o desvio padrão foram calculados através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Média e Fórmulas – Estatística – Desvio Padrão, respectivamente.

O limite de detecção (L.D.) e o limite de quantificação (L.Q.) foram determinados recorrendo às seguintes equações:

$$L.D. \cong X_m + 3,3 * S$$

$$L.Q. \cong X_m + 10 * S$$

**QUADRO 10** – Ensaios em branco e determinação do limite de detecção e do limite de quantificação.

<b>Data</b>	<b>Absorvância</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Média (mg/L)</b>	<b>Desvio padrão (mg/L)</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>
<b>03-03-2011</b>	0	0,0072	0,003785	0,009322	0,034546	0,097
<b>04-03-2011</b>	0,002	0,0039				
<b>09-03-2011</b>	0,000	-0,0045				
<b>15-03-2011</b>	0,001	0,0077				
<b>16-03-2011</b>	0,009	0,0253				
<b>18-03-2011</b>	0,001	0,0004				
<b>29-03-2011</b>	0	-0,0038				
<b>06-04-2011</b>	0,011	0,0072				
<b>07-04-2011</b>	0	-0,0012				
<b>07-04-2011</b>	0	-0,0039				
<b>14-04-2011</b>	0,003	-0,0114				
<b>12-04-2011</b>	0,002	-0,0058				
<b>19-04-2011</b>	0,003	0,0014				
<b>19-04-2011</b>	-0,001	-0,0016				
<b>21-04-2011</b>	0,001	0,0023				
<b>21-04-2011</b>	0,005	0,026				
<b>03-05-2011</b>	0,001	0,002				
<b>06-05-2011</b>	0,005	0,0059				
<b>11-05-2011</b>	0,006	0,0111				
<b>16-05-2011</b>	0,005	0,0075				

#### **6.4.2. Homogeneidade de variâncias**

Para determinar se existe homogeneidade de variâncias, foram realizadas 10 leituras do primeiro padrão e 10 leitura do último padrão da curva de calibração, realizadas no dia 03-04-2011 (**QUADRO 11**).

**QUADRO 11** – Leituras dos padrões de calibração da gama de trabalho em estudo.

Padrão	Absorvância	Ensaio									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,029	0,029	0,034	0,028	0,03	0,028	0,028	0,031	0,028	0,03	0,029
2	0,051										
3	0,1										
4	0,148										
5	0,196										
6	0,242										
7	0,292										
8	0,34										
9	0,383										
10	0,476	0,47	0,468	0,48	0,47	0,474	0,473	0,47	0,474	0,475	0,473

Com os resultados obtidos no **QUADRO 11**, foi efectuado o tratamento estatístico para determinar se existe homogeneidade de variâncias (**QUADRO 12**).

A média e o desvio padrão foram calculados através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Média e Fórmulas – Estatística – Desvio Padrão, respectivamente. F de Fisher o valor tabelado para uma probabilidade de 99% e 9 graus de liberdade. PG foi calculado através da equação, visto que  $S^2_{10} > S^2_1$ :

$$PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1}$$

**QUADRO 12** - Tratamento estatístico das leituras do primeiro e último padrões da gama de trabalho.

Padrão	Média	Desvio	Variância	PG	F de Fisher
1	0,0295	0,0019	3,61111E-06	3,264615	5,351129
10	0,4727	0,003433	1,17889E-05		

#### 6.4.3. Teste de Mandel

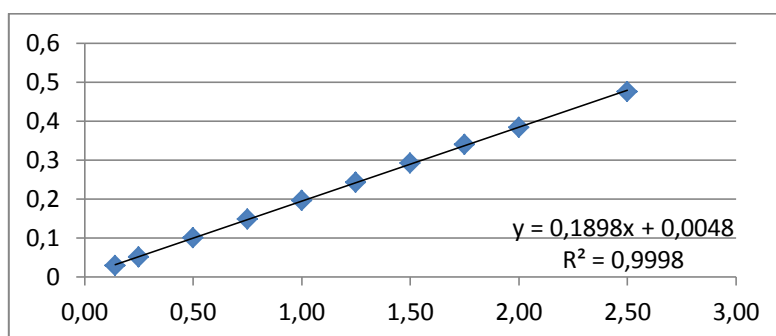
Com o objectivo de determinar se, com esta gama de trabalho, estamos perante um ajuste linear ou polinomial foi realizado o teste de Mandel. Foram determinadas as absorvâncias de acordo com a recta traçada (**GRÁFICO 1**) através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Ferramentas – Inserir – Gráfico de Dispersão – Adicionar

linha de tendência linear – Exibir equação e  $R^2$  no gráfico, bem como as absorvâncias de acordo com a curva traçada (**GRÁFICO 2**) através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Ferramentas – Inserir – Gráfico de Dispersão – Adicionar linha de tendência polinomial – Exibir equação e  $R^2$  no gráfico. As referidas absorvâncias estão registadas no **QUADRO 13**.

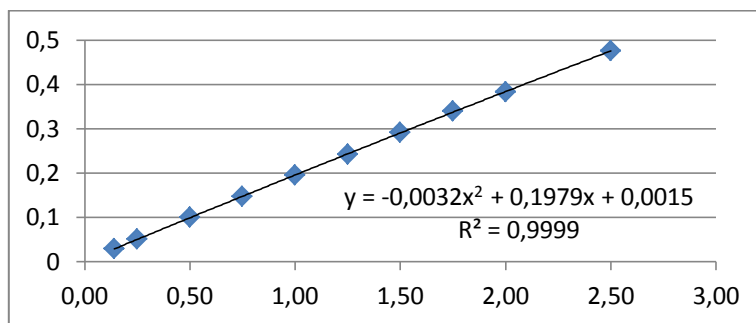
**QUADRO 13** – Absorvâncias lidas pelo equipamento e determinadas por ajuste linear e ajuste polinomial.

Data	Padrão	Concentração (mg/L)	Absorvância	Absorvância (Ajuste linear)	Absorvância (Ajuste polinomial)
<b>03-04- 2011</b>	1	0,14	0,029	0,031372	0,02914328
	2	0,25	0,051	0,05225	0,050775
	3	0,50	0,1	0,0997	0,09965
	4	0,75	0,148	0,14715	0,148125
	5	1,00	0,196	0,1946	0,1962
	6	1,25	0,242	0,24205	0,243875
	7	1,50	0,292	0,2895	0,29115
	8	1,75	0,34	0,33695	0,338025
	9	2,00	0,383	0,3844	0,3845
	10	2,50	0,476	0,4793	0,47625

**GRÁFICO 1** – Recta traçada pelo equipamento de Espectometria de Absorção Atómica.



**GRÁFICO 2** – Curva traçada pelo equipamento de Espectrometria de Absorção Atômica.



Com os resultados do **QUADRO 13**, determinou-se  $(Y-Y_i)^2$ , sendo Y a absorvância determinada pelo equipamento e  $Y_i$  a absorvância determinada pelo ajuste linear ou pelo ajuste polinomial. O somatório de  $(Y-Y_i)^2$  foi determinado através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Soma. N é o número de padrões de calibração.  $S_{y/x}$  foi determinado com as equações,

no caso do ajuste linear:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y - y_i)^2}{N - 2}}$$

no caso do ajuste polinomial:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y - y_i)^2}{N - 3}}$$

**QUADRO 14** – Cálculos intermédios para a determinação da linearidade da gama de trabalho.

	<b>Ajuste linear</b>		<b>Ajuste polinomial</b>
	$(Y-Y_i)^2$		$(Y-Y_i)^2$
	5,62638E-06		2,05292E-08
	1,5625E-06		5,0625E-08
	9E-08		1,225E-07
	7,225E-07		1,5625E-08
	1,96E-06		4E-08
	2,5E-09		3,51562E-06
	6,25E-06		7,225E-07
	9,3025E-06		3,90063E-06
	1,96E-06		0,00000225
	1,089E-05		6,25E-08
<b>Soma</b>	3,83664E-05	<b>Soma</b>	1,07005E-05
<b>N-2</b>	8	<b>N-3</b>	7
<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,002189931	<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,001236385

Os parâmetros do **QUADRO 15** foram determinados recorrendo às equações:

$$DS^2 = (N - 2) * S_{y/x}^2 - (N - 3) * S_{y/x}^2$$

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y/x}^2}$$

$F_{(1;N-3;95\%)}$  foi determinado através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Estatística – INVF, para uma probabilidade de 95% e sete graus de liberdade (N-3).

**QUADRO 15** – Tratamento estatístico dos resultados obtidos para o estudo da linearidade da gama de trabalho.

<b>DS<sup>2</sup></b>	<b>2,76659E-05</b>
<b>PG</b>	18,09826234
<b>F<sub>(1;N-3;95%)</sub></b>	5,591447848

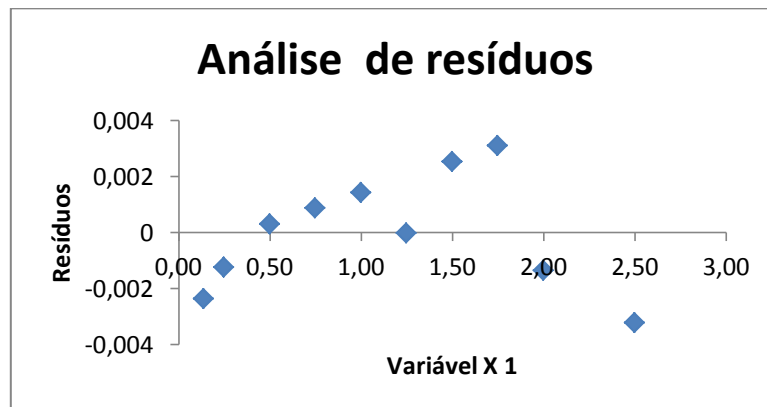
#### 6.4.4. Análise de resíduos

A análise de resíduos complementa o Teste de Mandel, permite-nos concluir se estamos perante um ajuste linear ou polinomial. As leituras de absorvância correspondentes a cada solução padrão estão descritas no **QUADRO 16**. A análise de resíduos (**GRÁFICO 3**) foi obtida através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Ferramentas – Análise de dados – Regressão – Resíduos.

**QUADRO 16** – Leituras das absorvâncias dos 10 padrões distribuídos ao longo da gama de trabalho.

Data	Padrão	Concentração (mg/L)	Absorvância
03-04- 2011	<b>1</b>	<b>0,14</b>	0,029
	<b>2</b>	<b>0,25</b>	0,051
	<b>3</b>	<b>0,50</b>	0,1
	<b>4</b>	<b>0,75</b>	0,148
	<b>5</b>	<b>1,00</b>	0,196
	<b>6</b>	<b>1,25</b>	0,242
	<b>7</b>	<b>1,50</b>	0,292
	<b>8</b>	<b>1,75</b>	0,34
	<b>9</b>	<b>2,00</b>	0,383
	<b>10</b>	<b>2,50</b>	0,476

**GRÁFICO 3** – Análise de resíduos



## 6.5. Precisão

### 6.5.1. Repetibilidade

Para determinar a repetibilidade foram analisados quatro pães que abrangem toda a gama de trabalho, foram preparadas 10 soluções amostra de cada pão. No **QUADRO 17** estão descritos os resultados obtidos.

**QUADRO 17** – Concentração das amostras utilizadas para estudar a repetibilidade.

<b>Data</b>	<b>Tipo de pão</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Abs</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Concentração (g/100g)</b>
<b>03-03-2011</b>	normal	48831 A	0,1	0,128	0,8363	0,41815
		48831 B	0,104	0,134	0,8759	0,421105769
		48831 C	0,102	0,131	0,8588	0,420980392
		48831 D	0,102	0,132	0,864	0,423529412
		48831 E	0,1	0,133	0,8675	0,43375
		48831 F	0,1	0,126	0,8196	0,4098
		48831 G	0,101	0,134	0,8779	0,43460396
		48831 H	0,102	0,126	0,8235	0,403676471
		48831 I	0,106	0,14	0,9176	0,432830189
		48831 J	0,107	0,143	0,9356	0,437196262
<b>03-03-2011</b>	sem sal	48950 A	0,101	0,001	0,0137	0,006782178
		48950 B	0,102	0,001	0,0157	0,007696078
		48950 C	0,103	0,002	0,0172	0,008349515
		48950 D	0,104	0,001	0,0137	0,006586538
		48950 E	0,1	0,001	0,0153	0,00765
		48950 F	0,109	0,002	0,0178	0,008165138
		48950 G	0,102	0,001	0,0142	0,006960784
		48950 H	0,107	0,002	0,017	0,007943925
		48950 I	0,1	0,002	0,0201	0,01005
		48950 J	0,106	0,002	0,0174	0,008207547
<b>09-03-2011</b>	meio sal	50509 A	0,105	0,069	0,417	0,198571429
		50509 B	0,1	0,073	0,4426	0,2213
		50509 C	0,1	0,068	0,4093	0,20465
		50509 D	0,102	0,074	0,448	0,219607843
		50509 E	0,1	0,067	0,4067	0,20335
		50509 F	0,106	0,068	0,4138	0,195188679
		50509 G	0,107	0,065	0,3899	0,182196262
		50509 H	0,111	0,066	0,3989	0,179684685
		50509 I	0,103	0,065	0,395	0,191747573
		50509 J	0,102	0,069	0,4156	0,20372549
<b>15-03-2011</b>	8 cereais	48837 A	0,1	0,136	0,9088	0,4544
		48837 B	0,103	0,134	0,8962	0,435048544
		48837 C	0,101	0,125	0,8324	0,412079208
		48837 D	0,104	0,136	0,9122	0,438557692
		48837 E	0,102	0,135	0,8998	0,441078431
		48837 F	0,101	0,127	0,8488	0,42019802
		48837 G	0,101	0,127	0,8513	0,421435644
		48837 H	0,101	0,133	0,8881	0,439653465
		48837 I	0,102	0,134	0,8936	0,438039216
		48837 J	0,103	0,143	0,9584	0,465242718

Após obtermos os resultados acima descritos foi realizado o tratamento estatístico, tendo sido calculados o limite de repetibilidade (r) e o coeficiente de variação do método (CVm), representados no **QUADRO 18**.

A média e o desvio padrão foram calculados através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Média e Fórmulas – Estatística – Desvio Padrão, respectivamente.

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1. O limite de repetibilidade (r) e o coeficiente de variação do método foram determinados com as seguintes equações:

$$r = 2,8 * \sqrt{S_{ri}^2}$$

$$CVr = \frac{S_{ri}}{Xm} * 100$$

**QUADRO 18** - Tratamento estatístico dos resultados obtidos no quadro anterior.

<b>Amostra</b>	<b>Média (g/100g)</b>	<b>Desvio padrão (g/100g)</b>	<b>Limite repetibilidade (g/100g)</b>	<b>CVm (g/100g)</b>
48831	0,42356	0,011177001	0,031295603	2,63881
48950	0,00784	0,000995283	0,002786792	12,69628
50509	0,2	0,013775417	0,038571168	6,887633
48837	0,43657	0,015899619	0,044518934	3,641913

### 6.5.2. Precisão intermédia

Foram preparadas quinze soluções amostra em duplicado para obter a precisão internédia. Para determinar este parâmetro variou-se o tempo de análise e o analista (**QUADRO 19** e **QUADRO 20**).

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1

**QUADRO 19** - Resultados obtidos pela analista Andreia.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo de pão</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Concentração (g/100g)</b>	<b>Aceitação</b>	<b>Média</b>
<b>06-</b>	48950 A	Sem sal	0,1	-0,0061	-0,00305	Não	-0,00253
<b>04-</b>	48950 B		0,104	-0,0042	-0,002019231	Satisfatório	
<b>2011</b>	49035 A	Meio sal	0,102	0,5208	0,255294118	Não	0,235855
	49035 B		0,106	0,4588	0,216415094	Satisfatório	
	49958 A	Integral meio	0,1	0,5027	0,25135	Satisfatório	0,246876
	49958 B	sal	0,102	0,4945	0,242401961		
	48926 A	Padas	0,106	0,7745	0,365330189	Satisfatório	0,364228
	48926 B		0,104	0,7553	0,363125		
	49213 A	Oito cereais	0,102	1,4371	0,704460784	Satisfatório	0,73373
	49213 B		0,1	1,526	0,763		
	49118 A	Milho	0,106	0,7387	0,348443396	Satisfatório	0,350702
	49118 B		0,103	0,7271	0,352961165		
	49233 A	Alemão	0,102	0,7829	0,38377451	Satisfatório	0,383787
	49233 B		0,1	0,7676	0,3838		
	49029 A	Mistura	0,102	0,8329	0,408284314	Satisfatório	0,41021
	49029 B		0,103	0,849	0,412135922		
	49172 A	Brasileiro	0,1	1,2319	0,61595	Satisfatório	0,628162
	49172 B		0,107	1,3704	0,640373832		
	48875 A	Salioio	0,103	0,8845	0,429368932	Satisfatório	0,432597
	48875 B		0,103	0,8978	0,435825243		
	48871 A	Rústico	0,102	0,9462	0,463823529	Satisfatório	0,469959
	48871 B		0,105	0,9998	0,476095238		
	49268 A	Integral	0,106	0,8481	0,40004717	Satisfatório	0,403679
	49268 B		0,106	0,8635	0,407311321		
	49132 A	Bicos de pato	0,102	1,0769	0,527892157	Satisfatório	0,548391
	49132 B		0,108	1,2288	0,568888889		
	49224 A	Enfarinhados	0,107	1,0779	0,503691589	Satisfatório	0,496307
	49224 B		0,102	0,9974	0,488921569		
	49848 A	Regueifa	0,103	0,8862	0,430194175	Satisfatório	0,42485
	49848 B		0,101	0,8474	0,41950495		

**QUADRO 20** - Resultados obtidos pela analista Joana.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo de pão</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Concentração (g/100g)</b>	<b>Aceitação</b>	<b>Média (A-B)</b>
<b>07-04- 2011</b>	48950 A	Sem sal	0,103	0,0189	0,009174757	Não	0
	48950 B		0,109	0,0251	0,011513761	Satisfatório	
	49035 A	Meio sal	0,1	0,4874	0,2437	Satisfatório	0,242
	49035 B		0,1	0,4806	0,2403		
	49958 A	Integral	0,101	0,5164	0,255643564	Satisfatório	0,261881
	49958 B	meio sal	0,101	0,5416	0,268118812		
	48926 A	Padas	0,103	0,7373	0,357912621	Satisfatório	0,363613
	48926 B		0,102	0,7534	0,369313725		
	49213 A	Oito cereais	0,105	1,452	0,691428571	Satisfatório	0,691071
	49213 B		0,105	1,4505	0,690714286		
	49118 A	Milho	0,1	0,6912	0,3456	Satisfatório	0,350225
	49118 B		0,1	0,7097	0,35485		
	49233 A	Alemão	0,1	0,752	0,376	Satisfatório	0,375025
	49233 B		0,1	0,7481	0,37405		
	49029 A	Mistura	0,1	0,7049	0,35245	Satisfatório	0,372273
	49029 B		0,105	0,8234	0,392095238		
	49172 A	Brasileiro	0,1	1,2016	0,6008	Satisfatório	0,607802
	49172 B		0,102	1,2542	0,614803922		
	48875 A	Salioio	0,102	0,8881	0,435343137	Satisfatório	0,433772
	48875 B		0,1	0,8644	0,4322		
	48871 A	Rústico	0,102	0,9405	0,461029412	Satisfatório	0,460894
	48871 B		0,112	1,0321	0,460758929		
	49268 A	Integral	0,103	0,8038	0,390194175	Satisfatório	0,395572
	49268 B		0,1	0,8019	0,40095		
	49132 A	Bicos de	0,103	1,0517	0,510533981	Satisfatório	0,510558
	49132 B	pato	0,103	1,0518	0,510582524		
	49224 A	Enfarinhados	0,1	0,9553	0,47765	Satisfatório	0,482275
	49224 B		0,1	0,9738	0,4869		
	49848 A	Regueifa	0,101	0,8331	0,412425743	Satisfatório	0,414392
	49848 B		0,103	0,8577	0,416359223		

A equação utilizada para determinada a precisão intermédia (Si), tem a seguinte forma:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} * \sum_{j=1}^t (Y_{j1} - Y_{j2})^2}$$

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

$Y_{j2}$  – segundo resultado obtido para a amostra j.

**QUADRO 21** – Tratamento estatístico dos resultados obtidos anteriormente.

$y_{j1}$	$y_{j2}$	$y_{j1} - y_{j2}$	$\sum_{j=1}^t (Y_{j1} - Y_{j2})^2$	Si
-0,00253	0,010344	-0,01288	0,1551	0,028317205
0,235855	0,242	-0,00615		
0,246876	0,261881	-0,01501		
0,364228	0,363613	0,000614		
0,73373	0,691071	0,042659		
0,350702	0,350225	0,000477		
0,383787	0,375025	0,008762		
0,41021	0,372273	0,037937		
0,628162	0,607802	0,02036		
0,432597	0,433772	-0,00117		
0,469959	0,460894	0,009065		
0,403679	0,395572	0,008107		
0,548391	0,510558	0,037832		
0,496307	0,482275	0,014032		
0,42485	0,414392	0,010457		

### 6.5.3. Comparação da precisão entre técnicas de preparação de amostra

A precisão entre técnicas foi determinada para as três técnicas de preparação de amostra, determinou-se a precisão comparando a digestão por microondas com as diluições directas (**QUADRO 24**) e a digestão seca com as diluições directas (**QUADRO 27**). Nos **QUADROS 22** e **23** estão descritos os resultados obtidos através das duas técnicas de preparação de amostra.

**QUADRO 22**- Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas.

Data	Amostra		Massa (g)	Abs	Resultado (mg/L)	Resultado final (g/100g)
<b>04-03-2011</b>	48635 (padas)	A	0,101	0,136	0,8807	0,43599
		B	0,110	0,137	0,8858	0,402636
	50509 (meio sal)	A	0,101	0,067	0,4261	0,210941
		B	0,104	0,071	0,4504	0,216538
<b>29-03-2011</b>	48941 (milho)	A	0,102	0,212	1,3505	0,66201
		B	0,103	0,209	1,3303	0,645777
	48885 (alemão)	A	0,105	0,126	0,787	0,374762
		B	0,101	0,120	0,7476	0,370099
	48906 (mistura)	A	0,104	0,152	0,9554	0,459327
		B	0,102	0,147	0,9219	0,451912

**QUADRO 23** - Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão microondas.

Data	Amostra		Massa (g)	Vaso	Abs	Resultado (mg/L)	Resultado final (g/100g)
<b>04-03-2011</b>	48635 (Padas)	A	0,513	5	0,141	0,9149	0,4458577
		B	0,506	6	0,139	0,9028	0,446047431
	50509 (meio sal)	A	0,505	8	0,075	0,4742	0,234752475
		B	0,512	9	0,073	0,4626	0,225878906
<b>29-03-2011</b>	48941 (milho)	A	0,511	8	0,206	1,3113	0,641536204
		B	0,508	9	0,204	1,2971	0,638336614
	48885 (alemão)	A	0,517	5	0,133	0,8345	0,403529981
		B	0,511	4	0,130	0,8145	0,398483366
	48906 (mistura)	A	0,517	8	0,153	0,9613	0,464845261
		B	0,511	9	0,155	0,9761	0,477544031

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1.

O desvio padrão e a variância foram calculados através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Fórmulas – Estatística – Desvio Padrão e Fórmulas – Estatística - Variância, respectivamente.

**QUADRO 24** – Comparação da precisão entre as técnicas de digestão microondas e diluições directas.

<b>Comparação entre digestão microondas e diluições directas</b>				
<b>Método</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Variância</b>	<b>PG</b>	<b>F de Fisher</b>
Microondas	0,138654764	0,019225144	0,855654718	3,178893105
Diluições directas	0,149894439	0,022468343		

Nos **QUADROS 25** e **26** estão descritos os resultados obtidos através das diluições directas e através da digestão seca, respectivamente.

**QUADRO 25** - Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas, com o objectivo de comparar com a concentração obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão seca.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa</b>	<b>Abs</b>	<b>Conc.</b>	<b>Conc.</b>
			<b>(g)</b>		<b>(mg/L)</b>	<b>(g/100g)</b>
<b>16-05-2011</b>	46167 (Integral	A	0,101		0,3646	0,180495
	meio sal)	B	0,100		0,3733	0,18665
	50509 (m/s)	A	0,100		0,4004	0,2002
		B	0,100		0,3269	0,16345
	48635 (Padas)	A	0,102		0,7889	0,386716
		B	0,102		0,838	0,410784
	50938 (Oito cereais)	A	0,103		1,3579	0,659175
		B	0,104		1,3696	0,658462

**QUADRO 26** - Concentração de sódio (g/100g) obtida pela técnica de preparação de amostra de digestão seca, com o objectivo de comparar com a concentração obtida pela técnica de preparação de amostra de diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa Abs (g)</b>	<b>Conc. (mg/L)</b>	<b>Conc. (g/100g)</b>
<b>16-05-</b>	46167 (Integral	A	0,103	0,3816	0,18524272
<b>2011</b>	meio sal)	B	0,101	0,3868	0,19148515
	50509 (m/s)	A	0,101	0,3498	0,17316832
		B	0,102	0,3394	0,16637255
	48635 (padas)	A	0,103	0,7722	0,37485437
		B	0,100	0,6948	0,3474
	50938 (Oito	A	0,103	1,3996	0,67941748
	cereais)	B	0,102	1,3915	0,68210784

**QUADRO 27** - Comparação da precisão entre as técnicas de digestão seca e diluições directas.

<b>Comparação entre digestão seca e diluições directas</b>				
<b>Método</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Variância</b>	<b>PG</b>	<b>F de Fisher</b>
Cinzas	0,219315949	0,048099485	0,915283652	3,78704354
Diluições directas	0,209820572	0,044024673		

## **6.6. Exactidão**

### **6.6.1. Ensaio Interlaboratorial**

O Laboratório de Medicina Veterinária participou no ensaio interlaboratorial, para a matriz pão, realizado por FAPAS em Outubro de 2011, assumindo a referência 1864. O laboratório acima referido participou neste ensaio recorrendo ao método em estudo, espectrometria de absorção atómica com chama e as amostras foram preparadas por diluições directas. O desempenho do laboratório está descrito no **QUADRO 28**.

**QUADRO 28** - Desempenho do Laboratório de Medicina Veterinária no ensaio interlaboratorial.

<b>Matriz</b>	<b>Valor obtido pelo laboratório (mg/Kg)</b>	<b>Valor aceite como verdadeiro (mg/Kg)</b>	<b>Z-score</b>	<b>Valor atribuído</b>
Pão	4155,5	4069	0,5	2

### 6.6.2. Testes comparativos

#### 6.6.2.1. Comparação dos resultados obtidos por preparação da amostra por diluições directas e dos resultados obtidos por preparação da amostra por digestão microondas

As amostras foram submetidas a diferentes técnicas de preparação, com o objectivo de verificar se existem diferenças significativas entre a técnica por diluições directas e as restantes.

Foram realizados alguns ensaios que não sofreram tratamento estatístico, esses resultados encontram-se no **QUADRO 29** para as amostras preparadas por diluições directas e no **QUADRO 30** para as amostras preparadas por digestão microondas.

**QUADRO 29** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa (g)</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado mg/L</b>	<b>Resultado final g/100g</b>		<b>Média A-B</b>
<b>12-01-2011</b>	44087 (sem sal)	A	0,100	0,01	0,0295	0,01475	Não	0,0073
		B	0,103	0,004	-0,0003	-0,0001	Satisfatório	
	43942 (meio sal)	A	0,105	0,068	0,3376	0,16076	Satisfatório	0,162
		B	0,100	0,066	0,3264	0,1632		
	43671 (padas)	A	0,100	0,207	1,1037	0,55185	Satisfatório	0,5392
		B	0,100	0,198	1,0531	0,52655		
	43628 (8 cereais)	A	0,102	0,181	0,9553	0,46828	Satisfatório	0,4605
		B	0,104	0,179	0,9418	0,45279		
	44837 (integral meio sal)	A	0,103	0,094	0,4758	0,23097	Satisfatório	0,2331
		B	0,104	0,096	0,4894	0,23529		

**QUADRO 30** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão microondas.

Data	Amostra		Massa (g)	Vaso	Abs	Resultado mg/L	Resultado final g/100g	Aceitação	Média A-B
<b>12-01-2011</b>	44087	A	0,502	2	0,004	0,0001	4,9801E-05	Não	-0,0007
	(sem sal)	B	0,503	3	0,003	-0,0028	-0,0013917	Satisfatório	
	43942	A	0,500	5	0,049	0,238	0,119	Não	0,13462
	(meio sal)	B	0,506	6	0,062	0,3041	0,15024704	Satisfatório	
	43671	A	0,506	2	0,169	0,8875	0,43848814	Satisfatório	0,42969
	(padas)	B	0,505	3	0,162	0,8502	0,42089109		
	43628 (8 cereais)	A	0,501	5	0,143	0,7435	0,37100798	Não	0,40732
		B	0,502	6	0,169	0,8908	0,4436255	Satisfatório	
	44837	A	0,500	8	0,080	0,4027	0,20135	Não	0,16815
	(integral)	B	0,500	9	0,055	0,2699	0,13495	Satisfatório	
	(meio sal)	B	0,500	9	0,051	0,2478	0,1239		

Nos **QUADROS 31** e **32** encontram-se os resultados obtidos por diluições directas e os resultados obtidos por digestão microondas, respectivamente.

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1

**QUADRO 31** – Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado</b>	<b>Resultado final</b>		<b>Média</b>
			<b>(g)</b>		<b>(mg/L)</b>	<b>(g/100g)</b>		<b>A-B</b>
<b>19-01-2011</b>	43942 (meio sal)	A	0,100	0,062	0,311	0,1555	Satisfatório	0,154
		B	0,100	0,060	0,3048	0,1524		
	44837 (integral meio sal)	A	0,101	0,078	0,3959	0,19599	Satisfatório	0,2018
		B	0,101	0,082	0,4195	0,207673		
	43671 (padas)	A	0,103	0,176	0,94	0,456311	Satisfatório	0,4574
		B	0,102	0,175	0,9352	0,458431		
43628 (8 cereais)	A	0,100	0,156	0,826	0,413	Satisfatório	0,4185	
	B	0,100	0,160	0,8479	0,42395			
<b>04-03-2011</b>	48837 (8 cereais)	A	0,101	0,144	0,9325	0,461634	Satisfatório	0,4846
		B	0,102	0,159	1,0354	0,507549		
	48635 (padas)	A	0,101	0,136	0,8807	0,43599	Satisfatório	0,4193
		B	0,110	0,137	0,8858	0,402636		
	50509 (meio sal)	A	0,101	0,067	0,4261	0,210941	Satisfatório	0,2137
		B	0,104	0,071	0,4504	0,216538		
<b>29-03-2011</b>	45917 (sem sal)	A	0,105	0,000	-0,0056	-0,00267	Não	-
		B	0,105	0,001	0,0038	0,00181	Satisfatório	
	48950 (sem sal)	A	0,101	0,001	0,0012	0,000594	Não	0,001
		B	0,103	0,001	0,0029	0,001408	Satisfatório	
	48941 (milho)	A	0,102	0,212	1,3505	0,66201	Satisfatório	0,6539
		B	0,103	0,209	1,3303	0,645777		
	48885 (alemão)	A	0,105	0,126	0,787	0,374762	Satisfatório	0,3724
		B	0,101	0,120	0,7476	0,370099		
	48906 (mistura)	A	0,104	0,152	0,9554	0,459327	Satisfatório	0,4556
		B	0,102	0,147	0,9219	0,451912		

Para calcular a concentração em g/100g de Na, no caso da digestão por microondas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$C_{(\text{mg/L})} \times 25 \times 0,1 \times (V_{\text{balão}}/m_{\text{amostra}})$$

**QUADRO 32** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão microondas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa</b>	<b>Vaso</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Aceitação</b>	<b>Média</b>	
			<b>(g)</b>			<b>(mg/L)</b>	<b>final (g/100g)</b>		<b>A-B</b>	
<b>19-01-2011</b>	43942	A	0,501	5	0,065	0,3267	0,163023952	Satisfatório	0,16431	
	(meio sal)	B	0,502	6	0,066	0,3325	0,165587649			
	44837	A	0,500	8	0,085	0,4383	0,21915	Satisfatório	0,22324	
	(integral meio sal)	B	0,506	9	0,09	0,4601	0,227322134			
	43671	A	0,501	2	0,186	0,9951	0,496556886	Satisfatório	0,4859	
	(padas)	B	0,505	3	0,18	0,96	0,475247525			
	43628	A	0,500	5	0,175	0,9312	0,4656	Satisfatório	0,46451	
	(8 cereais)	B	0,501	6	0,174	0,9287	0,463423154			
<b>04-03-2011</b>	48837	A	0,510	2	0,155	1,0092	0,494705882	Satisfatório	0,4937	
	(8 cereais)	B	0,523	3	0,159	1,0307	0,492686424			
	48635	A	0,513	5	0,141	0,9149	0,4458577	Satisfatório	0,44595	
	(Padas)	B	0,506	6	0,139	0,9028	0,446047431			
	50509	A	0,505	8	0,075	0,4742	0,234752475	Satisfatório	0,23032	
	(meio sal)	B	0,512	9	0,073	0,4626	0,225878906			
	<b>29-03-2011</b>	45917	A	0,514	2	0,002	0,0056	0,002723735	Não	0,00482
		(sem sal)	B	0,506	3	0,003	0,014	0,006916996	Satisfatório	
48950		A	0,500	5	0,003	0,0118	0,0059	Não	0,00727	
(sem sal)		B	0,506	6	0,003	0,0175	0,008646245	Satisfatório		
48941		A	0,511	8	0,206	1,3113	0,641536204	Satisfatório	0,63994	
(milho)		B	0,508	9	0,204	1,2971	0,638336614			
48885		A	0,517	5	0,133	0,8345	0,403529981	Satisfatório	0,40101	
(alemão)		B	0,511	4	0,130	0,8145	0,398483366			
48906	A	0,517	8	0,153	0,9613	0,464845261	Satisfatório	0,47119		
(mistura)	B	0,511	9	0,155	0,9761	0,477544031				

Com os resultados obtidos, registados nos **QUADROS 31 e 32**, procedeu-se ao tratamento estatístico para verificar se existem diferenças significativas entre a preparação de amostra por digestão microondas e por diluições directas. O método utilizado para o tratamento estatístico foi o da regressão linear. Os resultados obtidos por este método, estão no **QUADRO 33**.

**Quadro 33** - Tratamento estatístico das concentrações de sódio (g/100g) determinadas por diluições directas e por digestão microondas.

Data	Amostra	Conc. (g/100g)		Média ( $\bar{X}_m$ )		$(X_i - \bar{X}_m)^2$	$X^2$
		Microondas	Diluições	Microondas	Diluições		
29-03-2011	45917	0,004820366	-0,000428571	0,33601261	0,3193156	0,1096883	2,32359E-05
29-03-2011	48950	0,007273123	0,001000913			0,108069648	5,28983E-05
04-03-2011	50509	0,230315691	0,213739528			0,011171838	0,053045317
19-01-2011	43942	0,164305801	0,15395			0,029483227	0,026996396
19-01-2011	44837	0,223236067	0,201831683			0,012718548	0,049834342
04-03-2011	48635	0,445952565	0,419313231			0,012086795	0,198873691
19-01-2011	43671	0,485902205	0,457371026			0,022466892	0,236100953
19-01-2011	43628	0,464511577	0,418475			0,016511985	0,215771005
04-03-2011	48837	0,493696153	0,484591341			0,024864101	0,243735892
29-03-2011	48941	0,639936409	0,653893251			0,092369678	0,409518607
29-03-2011	48885	0,401006673	0,372430457			0,004224229	0,160806352
29-03-2011	48906	0,471194646	0,455619344			0,018274184	0,222024395
						<b>0,461929425</b>	<b>1,816783084</b>

Os parâmetros do **QUADRO 33** foram obtidos recorrendo às seguintes fórmulas:

$$S_b = \frac{S_{Y/X}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - X_m)^2}}$$

$$S_a = S_{Y/X} * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x^2}{N * \sum_{i=1}^N (X_i - X_m)^2}}$$

O erro padrão foi calculado através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Ferramentas – Análise de dados – Regressão.

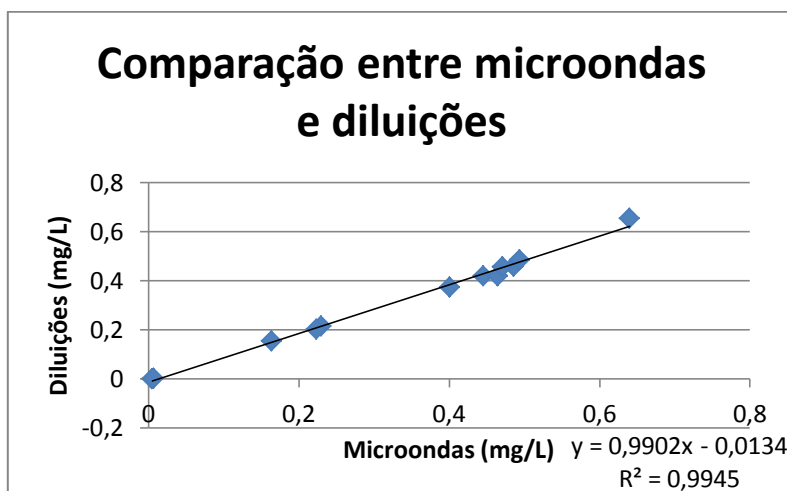
Sendo t o valor da variável de Student para o nível de confiança de 95% e 10 graus de liberdade.

Com os resultados obtidos no **QUADRO 33**, calcularam-se os parâmetros apresentados no **QUADRO 34**.

**QUADRO 34** – Determinação dos valores de  $b \pm S_b * t$  e de  $a \pm S_a * t$ .

<b>desvio padrão a</b>	<b>0,009910017</b>	
<b>desvio padrão b</b>	0,01172355	
<b>erro padrão</b>	0,015801949	
<b>t (0,995;10)</b>	3,169	
<b>Sa*t</b>	0,031404843	
<b>Sb*t</b>	0,037151929	
<b>b ± Sb*t</b>	0,953034663	1,027338521
<b>a ± Sa*t</b>	-0,022358277	0,018005266

**GRÁFICO 4** – Recta representativa do teste de regressão linear realizado para comparar as técnicas de preparação de amostra por diluições directas e digestão microondas.



#### 6.6.2.2. Comparação dos resultados obtidos por preparação da amostra por diluições directas e dos resultados obtidos por preparação da amostra por digestão seca

As amostras foram submetidas a diferentes técnicas de preparação, com o objectivo de verificar se existem diferenças significativas entre a técnica por diluições directas e as restantes.

Foram realizados alguns ensaios que não sofreram tratamento estatístico, esses resultados encontram-se no **QUADRO 35** para as amostras preparadas por diluições directas e no **QUADRO 36** para as amostras preparadas por digestão seca.

**QUADRO 35** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa (g)</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado mg/L</b>	<b>Resultado final g/100g</b>		<b>Média A-B</b>
<b>19-04- 2011</b>	48950 (sem sal)	A	0,105	0,003	0,0125	0,005952	Não	0,0076
		B	0,108	0,004	0,0201	0,009306	Satisfatório	
	49958 (Integral meio sal)	A	0,103	0,103	0,4478	0,217379	Satisfatório	0,2182
		B	0,100	0,101	0,438	0,219		
	48926 (Padas)	A	0,100	0,153	0,6732	0,3366	Satisfatório	0,3513
		B	0,101	0,167	0,7394	0,36604		
	49213 (Oito cereais)	A	0,101	0,293	1,3396	0,663168	Satisfatório	0,647
		B	0,100	0,277	1,2617	0,63085		
	49118 (Milho)	A	0,101	0,145	0,6395	0,316584	Satisfatório	0,3175
		B	0,101	0,146	0,6434	0,318515		
	49233 (Alemão)	A	0,100	0,155	0,6831	0,34155	Satisfatório	0,3345
		B	0,102	0,152	0,668	0,327451		
<b>21-04- 2011</b>	49213 (Oito cereais)	A	0,101	0,223	1,073	0,531188	Satisfatório	0,5255
		B	0,101	0,219	1,0502	0,519901		
	49233 (Alemão)	A	0,101	0,112	0,5226	0,258713	Não	0,2799
		B	0,101	0,130	0,608	0,30099	Satisfatório	
	48906 (Mistura)	A	0,100	0,184	0,8761	0,43805	Satisfatório	0,4377
		B	0,101	0,186	0,8836	0,437426		
	44714 (Oito cereais)	A	0,101	0,274	1,3304	0,658614	Satisfatório	0,6912
		B	0,103	0,304	1,4912	0,723883		
	45917 (Sem sal)	A	0,109	0,002	0,006	0,002752	Não	0,0035
		B	0,100	0,003	0,0084	0,0042	Satisfatório	
	50969 (Meio Sal)	A	0,105	0,141	0,6634	0,315905	Não	0,2939
		B	0,103	0,120	0,5603	0,27199	Satisfatório	

**QUADRO 36** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão seca.

Data	Amostra	Massa (g)	Cadinho	Abs	Resultado (mg/L)	Resultado final g/100g	A-B	Média A-B	
19-04-2011	48950 (sem sal)	A	0,103	1	0,008	0,0347	0,01684466	Satisfatório	0,016
		B	0,102	2	0,007	0,0323	0,01583333		
	49958 (Integral meio sal)	A	0,103	3	0,063	0,2711	0,13160194	Satisfatório	0,138
		B	0,103	4	0,069	0,2972	0,14427184		
	48926 (Padas)	A	0,100	5	0,070	0,3028	0,1514	Satisfatório	0,147
		B	0,104	6	0,069	0,2975	0,14302885		
	49213 (Oito cereais)	A	0,101	7	0,082	0,3555	0,1759901	Não Satisfatório	0,350
		B	0,102	8	0,237	1,0671	0,52308824		
	49118 (Milho)	A	0,102	9	0,079	0,3426	0,16794118	Satisfatório	0,160
		B	0,103	10	0,072	0,3126	0,15174757		
49233 (Alemão)	A	0,102	11	0,182	0,8081	0,39612745	Não Satisfatório	0,293	
	B	0,101	12	0,088	0,384	0,19009901			
21-04-2011	49213 (Oito cereais)	A	0,110	1	0,291	1,4211	0,64595455	Satisfatório	0,636
		B	0,104	2	0,269	1,3039	0,626875		
	49233 (Alemão)	A	0,103	3	0,126	0,5921	0,28742718	Satisfatório	0,293
		B	0,105	4	0,115	0,6257	0,29795238		
	48906 (Mistura)	A	0,101	5	0,133	0,5359	0,26529703	Satisfatório	0,260
		B	0,103	6	0,112	0,5228	0,25378641		
	44714 (Oito cereais)	A	0,101	7	0,239	1,1497	0,56915842	Satisfatório	0,558
		B	0,106	8	0,241	1,1614	0,54783019		
	45917 (Sem sal)	A	0,102	9	0,005	0,0189	0,00926471	Satisfatório	0,009
		B	0,103	10	0,005	0,02	0,00970874		
50969 (Meio Sal)	A	0,104	11	0,065	0,2969	0,14274038	Satisfatório	0,139	
	B	0,106	A	0,063	0,2876	0,13566038			

Nos **QUADROS 37** e **38** encontram-se os resultados obtidos por diluições directas e os resultados obtidos por digestão seca, respectivamente.

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1, tanto para a digestão seca como para as diluições directas.

**Quadro 37** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado (mg/L)</b>	<b>Resultado final (g/100g)</b>	<b>Aceitação</b>	<b>Média A-B</b>	
<b>16-05-2011</b>	46167 (integral meio sal)	A	0,101	0,087	0,3646	0,180495	Satisfatório	0,184
		B	0,100	0,089	0,3733	0,18665		
	50509 (meio sal)	A	0,100	0,095	0,4004	0,2002	Não	0,182
		B	0,100	0,078	0,3269	0,16345	Satisfatório	
	48635 (padas)	A	0,102	0,179	0,7889	0,3867157	Satisfatório	0,399
		B	0,102	0,189	0,838	0,4107843		
	50938 (8 cereais)	A	0,103	0,295	1,3579	0,6591748	Satisfatório	0,659
		B	0,104	0,297	1,3696	0,6584615		

**Quadro 38** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por digestão seca.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Cadinho</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado (mg/L)</b>	<b>Resultado final (g/100g)</b>	<b>A-B</b>	<b>Média A-B</b>	
<b>16-05-2011</b>	46167 (integral meio sal)	A	0,103	A	0,091	0,3816	0,18524272	Satisfatório	0,188
		B	0,101	B	0,092	0,3868	0,19148515		
	50509 (meio sal)	A	0,101	2	0,083	0,3498	0,17316832	Satisfatório	0,170
		B	0,102	3	0,081	0,3394	0,16637255		
	48635 (padas)	A	0,103	8	0,175	0,7722	0,37485437	Satisfatório	0,361
		B	0,100	9	0,159	0,6948	0,3474		
	50938 (8 cereais)	A	0,103	10	0,303	1,3996	0,67941748	Satisfatório	0,681
		B	0,102	11	0,301	1,3915	0,68210784		

Com os resultados obtidos, registados nos **QUADROS 37 e 38**, procedeu-se ao tratamento estatístico para verificar se existem diferenças significativas entre a preparação de amostra por digestão microondas e por diluições directas. O método utilizado para o tratamento estatístico foi ANOVA. Os resultados obtidos por este método, estão no **QUADRO 39**.

**QUADRO 39** - Tratamento estatístico das concentrações de sódio (g/100g) determinadas por diluições directas e por digestão seca.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	6,58E-05	1	6,579E-05	0,0012269	0,97319429	5,98738
Dentro dos grupos	0,321731	6	0,0536218			
Total	0,321797	7				

### **6.6.2.3. Comparação dos resultados obtidos através da determinação do teor de sódio por Espectrometria de Absorção Atómica com chama e dos resultados obtidos através da determinação do teor de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard**

As amostras foram submetidas a dois métodos diferentes, determinação de sódio por Espectrometria de Absorção Atómica com chama e determinação de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard, com o objectivo de verificar se existem diferenças significativas entre eles. Nos **QUADROS 41 e 42** encontram-se os resultados obtidos por estes dois métodos.

**QUADRO 40** – Volumes (mL) titulados para quantificar o teor de cloretos pela técnica de Charpentier-Volhard.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>	<b>Tipo de pão</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Vnitrato de prata (mL)</b>	<b>Vapós excesso (mL)</b>	<b>Vtiocianato (mL)</b>
<b>17-02-2011</b>	Branco 1		5 ml	0,2	5,2	5,2
	48788 A1	oito	5,033	1,2	6,2	5,1
	48788 B1	cereais	5,046	1,1	6,1	5
<b>22-02-2011</b>	Branco		5 ml	0,3	5,3	5,2
	48767 A	Padas	5,004	1,35	6,35	5,25
	48767 B		5,006	1,2	6,2	5,1
	48737 A	Integral	5,008	0,8	5,8	5,2
	48737 B	meio sal	5,027	0,9	5,9	5,3
<b>24-02-2011</b>	Branco		5 ml	0,3	5,3	5,2
	48950 A	sem sal	5,054	0,3	5,3	5,15
	48950 B		5,030	0,3	5,3	5,2
	48843 A	meio sal	5,052	0,7	5,7	5,2
	48843 B		5,049	0,6	5,6	5,1
<b>23-05-2011</b>	Branco		5 ml	0,2	5,2	5,1
	48950 A	sem sal	5,012	0,3	5,3	5,2
	48950 B		4,362	0,2	5,2	5,1
	50969 A	meio sal	5,026	0,9	5,95	5,35
	50969 B		5,011	0,8	5,8	5,1
	45156 A	padas	5,047	1,05	6,05	5
	45156 B		5,055	0,95	6	5
	50938 A	oito	5,036	1,7	6,7	5
	50938 B	cereais	5,05	1,7	6,7	5,1
	48885 A	alemão	5,038	1,05	6,1	5,1
	48885 B		5,004	1,1	6,1	5,1
	48906 A	mistura	5,05	1,2	6,2	5,05
	48906 B		5,021	1,3	6,3	5,1
	48941 A	milho	5,003	1,7	6,7	5,15
	48941 B		5,006	1,6	6,6	5

$V_{\text{nitrato de prata}}$  – Volume de nitrato de prata necessário para precipitar os cloretos.

$V_{\text{após excesso}}$  – Volume de nitrato de prata necessário para precipitar os cloretos mais 5 mL.

$V_{\text{tiocianato}}$  – Volume de tiocianato necessário para titular o excesso de nitrato de prata.

Após obter os resultados descritos no **QUADRO 40**, calculou-se a concentração de cloretos em g/100g de NaCl e posteriormente converteu-se em concentração de sódio (g/100g de sódio), **QUADRO 41**.

Para obter a concentração em g/100g de NaCl recorreu-se à seguinte fórmula:

$$C_{g/100g NaCl} = \frac{50 * 5,845 * (V_1 - V_2)}{V * m}$$

V – Volume da toma da solução, medido para a determinação.

$V_1$  – Volume da solução de nitrato de prata 0,1N, deduzido do volume eventualmente gasto no ensaio em branco.

$V_2$  – Volume da solução de tiocianato de amónio.

m – massa da toma para análise.

Para converter a concentração em g/100g Na utilizou-se a fórmula abaixo descrita:

$$C_{g/100g Na} = \frac{0,55 * C_{g/100g NaCl}}{1,4}$$

**QUADRO 41** – Determinação da concentração de NaCl (g/100g) e sua conversão para concentração de Na (g/100g).

Amostra	Resultado (g/100g NaCl)	Média A-B	Aceitação	Resultado (g/100g Na)	Média
Branco I					
48788 A1	1,277468707	1,275823136	Satisfatório	0,501862706	0,501216232
48788 B1	1,274177566			0,500569758	
Branco					
48767 A (P)	1,168065548	1,167832214	Satisfatório	0,458882894	0,458791227
48767 B (P)	1,167598881			0,458699561	
48737 A (I)	0,583566294	0,582463473	Satisfatório	0,229258187	0,228824936
48737 B (I)	0,581360652			0,228391685	
Branco					
48950 A (s/s)	0,057825485	0,028912742	Não Satisfatório	0,022717155	0,011358577
48950 B (s/s)	0			0	
48843 A (m/s)	0,462787015	0,462924504	Satisfatório	0,181809184	0,181863198
48843 B (m/s)	0,463061992			0,181917211	
Branco					
48950 A	0	5,95071E-16	Não	0	2,33778E-16
48950 B	1,19014E-15		Satisfatório	4,67556E-16	
50969 A	0,581476323	0,640668315	Não	0,228437127	0,251691124
50969 B	0,699860307		Satisfatório	0,274945121	
45156 A	1,100208044	1,070430432	Satisfatório	0,432224589	0,420526241
45156 B	1,040652819			0,408827893	
50938 A	1,857029388	1,796584001	Satisfatório	0,72954726	0,705800858
50938 B	1,736138614			0,682054455	
48885 A	1,044164351	1,047711672	Satisfatório	0,410207424	0,411601014
48885 B	1,051258993			0,412994604	
48906 A	1,21529703	1,247909419	Satisfatório	0,477438119	0,490250129
48906 B	1,280521808			0,503062139	
48941 A	1,69403358	1,722715951	Satisfatório	0,665513192	0,676781266
48941 B	1,751398322			0,688049341	

Para comparar os resultados obtidos com a técnica Charpentier-Volhard com a Espectrometria de Absorção Atômica com chama, analisaram-se as mesmas amostras por este método e com a técnica de preparação de amostras por diluições directas,

**QUADRO 42.**

O resultado expresso em g/100 g Na foi obtido com a fórmula referida em 6.1.

**QUADRO 42** - Concentração de sódio (g/100g) de amostras preparadas por diluições directas.

<b>Data</b>	<b>Amostra</b>		<b>Massa</b>	<b>Abs</b>	<b>Resultado</b>	<b>Resultado</b>	<b>Aceitação</b>	<b>Média</b>
			<b>(g)</b>		<b>(mg/L)</b>	<b>final</b>		<b>A-B</b>
						<b>(g/100g)</b>		
<b>29-03-2011</b>	48950 (sem sal)	A	0,101	0,001	0,0012	0,000594	Não	0,001
		B	0,103	0,001	0,0029	0,001408	Satisfatório	
	48941 (milho)	A	0,102	0,212	1,3505	0,66201	Satisfatório	0,6539
		B	0,103	0,209	1,3303	0,645777		
	48885 (alemão)	A	0,105	0,126	0,787	0,374762	Satisfatório	0,3724
		B	0,101	0,120	0,7476	0,370099		
<b>19-04-2011</b>	48950 (sem sal)	A	0,105	0,003	0,0125	0,005952	Não	0,0076
		B	0,108	0,004	0,0201	0,009306	Satisfatório	
<b>13-12-2010</b>	45156 (padas)	A	0,102	0,140	0,7679	0,376422	Satisfatório	0,3754
		B	0,101	0,137	0,7563	0,374406		
<b>03-02-2011</b>	48843 (meio sal)	A	0,104	0,066	0,3321	0,159663	Satisfatório	0,1628
		B	0,104	0,069	0,3451	0,165913		
<b>23-02-2011</b>	50969 (meio sal)	A	0,103	0,102	0,6129	0,297524	Satisfatório	0,2939
		B	0,105	0,101	0,6096	0,290286		
<b>08-02-2011</b>	48737 (integral meio sal)	A	0,104	0,112	0,5615	0,269952	Satisfatório	0,2593
		B	0,102	0,091	0,5074	0,248725		
<b>03-02-2011</b>	48767 (padas)	A	0,102	0,184	0,9992	0,489804	Satisfatório	0,4739
		B	0,104	0,175	0,9527	0,458029		
<b>03-02-2011</b>	48788 (8 cereais)	A	0,101	0,149	0,8015	0,396782	Satisfatório	0,3900
		B	0,100	0,143	0,7664	0,3832		
<b>22-02-2011</b>	50938 (8 cereais)	A	0,102	0,232	1,4501	0,710833	Satisfatório	0,7124
		B	0,100	0,228	1,4280	0,714		
<b>21-04-2011</b>	48906 (mistura)	A	0,100	0,184	0,9047	0,45235	Satisfatório	0,4520
		B	0,101	0,186	0,9125	0,451733		

Com os resultados obtidos, registados nos **QUADROS 41** e **42**, procedeu-se ao tratamento estatístico para verificar se existem diferenças significativas entre os diferentes métodos. O método utilizado para o tratamento estatístico foi o da regressão linear. Os resultados obtidos por este método, estão no **QUADRO 43**.

**QUADRO 43** - Tratamento estatístico dos resultados obtidos nos quadros anteriores.

Amostra	Conc. (g/100g)		Média		$(X_i - \bar{X})^2$	$X^2$
	Absorção atômica	Charpentier Volhard	Absorção atômica	Charpentier-Volhard		
48950	0,001	0,011358577			0,119181	0,000001
48950	0,0076	2,33778E-16			5,78E-05	0,00005776
48843	0,162788462	0,181863198			0,0265	0,02650008
50969	0,293904993	0,251691124			0,08638	0,08638014
48737	0,259338707	0,228824936			0,067257	0,06725656
48767	0,473916384	0,458791227			0,224597	0,22459674
45156	0,375413755	0,420526241	0,346225949	0,361558734	0,140935	0,14093549
48788	0,389991089	0,501216232			0,152093	0,15209305
50938	0,712416667	0,705800858			0,507538	0,50753751
48941	0,6539	0,676781266			0,427585	0,42758521
48885	0,3724	0,411601014			0,138682	0,13868176
48906	0,452041337	0,490250129			0,204341	0,20434137
					2,095147	1,97596668

Com os resultados obtidos no **QUADRO 43**, calcularam-se os parâmetros do **QUADRO 44** que foram obtidos recorrendo às seguintes fórmulas:

$$S_b = \frac{S_{Y/X}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}}$$

$$S_a = S_{Y/X} * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x^2}{N * \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}}$$

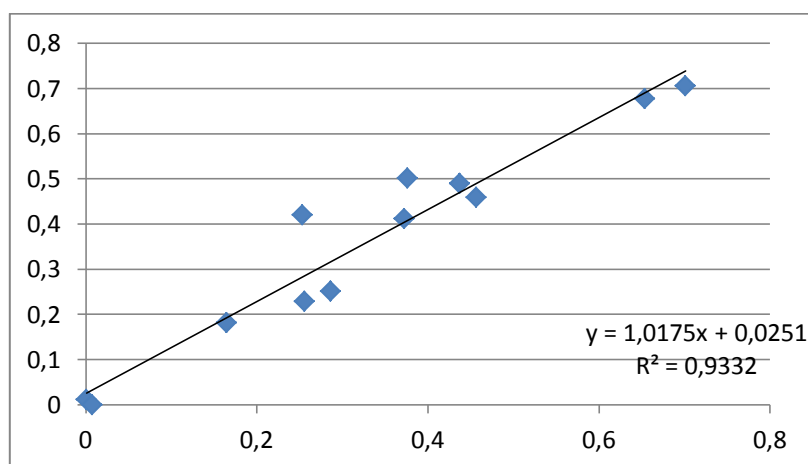
O erro padrão foi calculado através da folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Ferramentas – Análise de dados – Regressão.

Sendo t o valor da variável de Student para o nível de confiança de 95% e 10 graus de liberdade.

**QUADRO 44** - Determinação dos valores de  $b \pm Sb*t$  e de  $a \pm Sa*t$ .

<b>desvio padrão a</b>	0,019209618	
<b>desvio padrão b</b>	0,044790007	
<b>erro padrão</b>	0,062515304	
<b>t (0,995;10)</b>	3,169	
<b>Sa*t</b>	0,060875279	
<b>Sb*t</b>	0,141939533	
<b>b ± Sb*t</b>	0,875534161	1,159413227
<b>a ± Sa*t</b>	-0,027161566	0,085956246

**GRÁFICO 5** – Recta representativa do teste de regressão linear realizado para comparar os métodos espectrometria de absorção atómica com chama e determinação do teor de cloretos solúveis na água pela técnica de Charpentier-Volhard.



### 6.7. Taxas de recuperação

A taxa de recuperação é calculada sempre que se efectuam leituras de amostras de pão, com o objectivo de verificar se existe efeito de matriz. Preparou-se uma solução amostra fortificada e uma solução amostra sem fortificação, para posteriormente calcular a taxa de recuperação (**QUADRO 45**).

Taxa de recuperação (%) foi determinada com a seguinte equação:

$$Rec. (\%) = \frac{(C_{obtida} - C_0)}{C_{adicionada}} * 100$$

**QUADRO 45** – Taxas de recuperação determinadas em ensaios de rotina.

<b>Data</b>	<b>Tipo de pão</b>	<b>Amostra</b>	<b>Fortificação</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Taxa de recuperação (%)</b>	<b>Aceitação</b>
<b>11-05-2011</b>	Meio sal	50509	0	0,102	0,5027	97,2	Satisfatório
			1	0,102	1,4747		
<b>16-05-2011</b>	Meio sal	50509	0	0,1	0,4004	98,46	Satisfatório
			1	0,1	1,385		

### 6.8. VERIFICAÇÃO DO EQUIPAMENTO

Realizou-se uma verificação do software, que consistiu em verificar se o equipamento estaria a traçar correctamente a curva de calibração. No **QUADRO 46** estão as absorvâncias lidas pelo equipamento. No **GRÁFICO 6** está representada a curva traçada pela folha de cálculo “Microsoft Excel”, através de Inserir – Gráfico dispersão – Adicionar linha de tendência – Exibir equação e valor de  $R^2$  no gráfico.

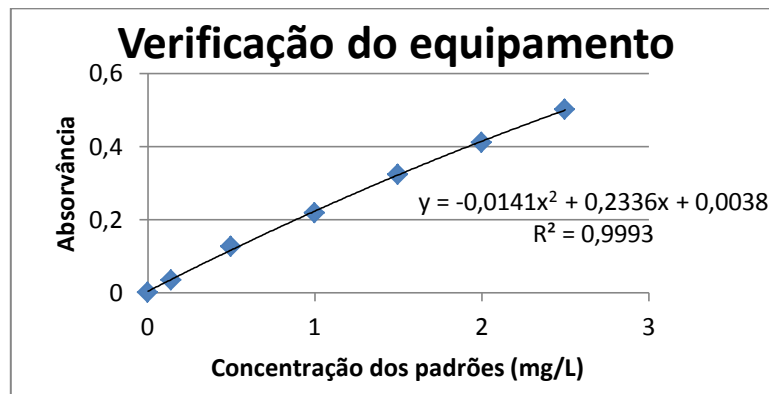
**QUADRO 46** – Absorvâncias determinadas pelo equipamento para as soluções padrão utilizadas para a calibração em rotina.

<b>Data</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Absorvância</b>
	0	0,001
	0,14	0,034
	0,5	0,127
<b>16-05-2011</b>	1	0,219
	1,5	0,323
	2	0,411
	2,5	0,502

Equação efectuada pelo equipamento

$$y = -0,013995x^2 + 0,23340x + 0,0035$$

**GRÁFICO 6** – Curva traçada pela folha de cálculo “Microsoft Excel”.



## **7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

### **7.1. ENSAIO INTERLABORATORIAL**

O objectivo proposto para este trabalho foi validar um método interno para a quantificação do teor de sódio solúvel em pão por Espectrofotometria de Absorção Atómica, sendo as amostras preparadas por diluições directas, para uma gama de trabalho entre 0 mg/L e 2,5 mg/L. Após o estudo da linearidade pode-se concluir que estamos perante um ajuste polinomial. O laboratório optou por trabalhar com um ajuste linear, o que obrigou a uma diminuição da gama de trabalho, passando esta a ser entre 0 mg/L e 2 mg/L. Sendo que não se efectuou mais nenhuma alteração ao método. O ensaio interlaboratorial foi realizado após a alteração da gama de trabalho, ou seja, foi realizado na gama de trabalho mais pequena (entre 0 mg/L e 2 mg/L).

Embora a gama de trabalho seja diferente, optou-se por apresentar o resultado do ensaio interlaboratorial, tendo sido atribuído ao laboratório um desempenho satisfatório, pois o valor de *Z-score* é inferior a dois.

### **7.2. TESTES COMPARATIVOS**

Os primeiros ensaios para comparar a técnica de preparação de amostras por diluições directas com a técnica por digestão microondas não sofreram tratamento estatístico pois as amostras analisadas em digestor microondas não foram totalmente digeridas. É possível observar que os resultados obtidos por esta técnica são significativamente mais baixos do que os resultados obtidos por diluições directas. Também foi possível observar que após a digestão a cor da solução amostra manteve-se, ou seja, inicialmente a solução amostra apresentava a cor amarela e após digerida a cor verde, no entanto este processo não ocorreu em algumas amostras. Como tal, o tempo de aquecimento do digestor microondas teve de ser aumentado para quinze minutos e o tempo de digestão foi aumentado para 20 minutos.

Os primeiros ensaios para comparar a técnica de preparação de amostras por diluições directas com a técnica por digestão seca não sofreram tratamento estatístico pois os resultados obtidos por esta técnica são significativamente mais baixos do que os resultados obtidos por diluições directas e a não se verifica repetibilidade em alguns ensaios. Estes resultados devem-se ao facto de inicialmente não se adicionar ácido nítrico às soluções amostra incinerada. Durante a incineração formam-se óxidos

insolúveis em água, mas solúveis em ácido nítrico. Após análise destes resultados passou a adicionar-se 1 mL de ácido nítrico a todas as soluções amostra incineradas.

## 8. CONCLUSÕES

Validar um método interno para a quantificação do teor de sódio em pão foi um dos objectivos propostos para este estudo, o que exigiu a realização de ensaios laboratoriais e o seu tratamento estatístico.

Foram realizados ensaios para determinar se as diferentes concentrações de ácido nítrico adicionadas às soluções padrão resultariam em alterações significativas do resultado final. Para comparar os resultados obtidos utilizou-se o teste ANOVA, que demonstrou que não existem diferenças estatísticas significativas entre as diferentes concentrações de ácido, ou seja, não têm influência o resultado final, pois o valor-P (0,824864) é superior a 0,05, para uma probabilidade de 95%.

Os resultados do estudo efectuado para determinar a necessidade de adicionar cloreto de cézio a todas as soluções amostra foram analisados pela ferramenta estatística ANOVA. Esta ferramenta permitiu concluir que não existem diferenças estatísticas significativas entre amostras preparadas com cloreto de cézio e amostras preparadas sem cloreto de cézio, ou seja este composto químico não influencia o resultado final, pois o valor-P (0,988026422) é superior a 0,05, para uma probabilidade de 95%.

Os ensaios realizados demonstram que o método em estudo é específico pois os resultados obtidos estão de acordo com o critério de aceitação de  $100 \pm 10\%$ , sendo que os ensaios de recuperação realizados variam entre 95% e 103%, aproximadamente. Podemos concluir que o método oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito.

Relativamente à homogeneidade de variâncias, pode-se considerar que a gama de trabalho está bem ajustada, ou seja as variâncias não são significativas pois, PG é inferior ao F de Snedecor/Fisher, sendo PG assume o valor 3,264615 e o valor tabelado de F de Snedecor/Fisher 5,351129.

A determinação dos limiares analíticos foi realizada recorrendo a 20 leituras de brancos efectuadas em dias diferentes. O limite de detecção determinado é 0,034546 mg/L de Na e o limite de quantificação é 0,097 mg/L de Na. Em rotina, o padrão mais baixo é 0,14 mg/L de Na, pois a especificação do cliente indica-nos que para teores inferiores a 0,14 mg/L considera-se que estamos perante um pão sem sal, para o qual não é necessário indicar o valor exacto mas sim que é inferior a 0,1 g Na/100g amostra.

Para avaliar a linearidade da curva de calibração recorreu-se ao Teste de Mandel e à análise de resíduos, ambos indicam que estamos perante uma gama de trabalho não linear. O Teste de Mandel indica que a equação para determinar o teor de sódio é

polinomial, pois o valor PG (18,09826234) é superior ao valor tabelado de F de Snedecor/Fisher (5,591447848). Se estivéssemos perante uma gama de trabalho linear, na análise de resíduos obteríamos pontos distribuídos aleatoriamente, neste caso é evidente que existe uma tendência não linear, visto que a distribuição não é aleatória.

Inicialmente foi estabelecido um critério de aceitação de duplicados de 13%, se a diferença entre duplicados fosse superior a 13% seria necessário repetir o ensaio a essa amostra. Após determinar a repetibilidade e o coeficiente de variação do método continuou-se a aceitar este critério, apesar de ser superior aos valores determinados. Este estudo foi realizado em toda a gama de trabalho, sendo que para pão normal obteve-se um coeficiente de variação do método de aproximadamente 3% e para pães meio sal, aproximadamente 7%.

Para determinar a precisão intermédia, realizaram-se vários ensaios fazendo variar o dia de análise e o analista. Obteve-se uma precisão intermédia ( $S_i$ ) de 0,028317205.

A comparação da precisão entre técnicas permite-nos concluir se os métodos em estudo apresentam diferenças significativas entre si. Para a gama de trabalho em estudo pode-se concluir que não existem diferenças significativas em termos de precisão entre a espectrometria de absorção atómica com preparação por digestão microondas e com preparação por diluições directas, pois o valor de PG (0,855654718) é inferior ao valor tabelado de F de Fisher (3,178893105). Para a gama de trabalho em estudo pode-se concluir que não existem diferenças significativas em termos de precisão entre a espectrometria de absorção atómica com preparação por digestão seca e com preparação por diluições directas, pois o valor de PG (0,915283652) é inferior ao valor tabelado de F de Fisher (3,78704354).

Foram realizados testes comparativos entre diferentes técnicas.

Para comparar a técnica de Charpentier-Volhard com a espectrometria de absorção atómica utilizou-se o teste da regressão linear entre dois métodos. Pode-se concluir que estes dois métodos não apresentam desvios sistemáticos pois  $a \pm S_a * t$  contém o valor zero, visto que assume os valores -0,027161566 e 0,085956246; e  $b \pm S_b * t$  contém o valor um, pois assume os valores 0,875534161 e 1,159413227.

Para comparar as técnicas de preparação de amostra por diluições directas e por digestão microondas utilizou-se o teste da regressão linear entre dois métodos. Pode-se concluir que estes dois métodos não apresentam desvios sistemáticos pois  $a \pm S_a * t$

contém o valor zero, visto que assume os valores -0,022358277 e 0,018005266; e  $b \pm S_b$   
\* t contém o valor um, pois assume os valores 0,953034663 e 1,027338521.

Os resultados do estudo efectuado para comparar as técnicas de preparação de amostra por diluições directas e por digestão microondas foram analisados pela ferramenta estatística ANOVA. Esta ferramenta permitiu concluir que não existem diferenças estatísticas significativas entre estas duas técnicas, pois o valor-P (0,97319429) é superior a 0,05, para uma probabilidade de 95%.

Em rotina, é realizado um ensaio de recuperação diário após a leitura de todas as soluções amostra. As taxas de recuperação obtidas permitem concluir que o método diferencia o analito das restantes substâncias presentes na amostra, uma vez que estão entre  $100 \pm 10\%$ , sendo uma das taxas de recuperação 97,2% e a outra 98,46%.

Para verificar se o software traçava correctamente a curva de calibração fez-se a sua verificação, comparando a curva traçada pelo software com a curva traçada pela folha de cálculo “Microsoft Excel”. Pode-se verificar que a curva traçada pelo software é muito semelhante à curva traçada pela folha de cálculo “Microsoft Excel”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADMINISTRAÇÃO REGIONAL DE SAÚDE DO CENTRO, I.P. (2008) – *Projecto de Intervenção comunitária pão.come*. Ministério da Saúde.
- American Cancer Society (2011) – *Cesium Chloride*. <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/ComplementaryandAlternativeMedicine/HerbsVitaminsandMinerals/cesium-chloride>, acessado a 14 de Abril de 2012.
- BATTOCHIO, Juliana Rosa; CARDOSO, Juliana Maria Porto; KIKUCHI, Mariana; MACCHIONE, Mariana; MODOLO, Juliana Stefanon; PAIXÃO, Andréa Letícia; PINCHELLI, Andréa Mattos; SILVA, Alessandra Regina da; SOUSA, Valéria Caselato de; WADA, Joeni Keiko Alves; WADA, Joyce Kazue Alves; BOLINI, Helena Maria André (2006) - *Perfil Sensorial de pão de forma integral*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 26(2): 428-433, abr.-jun. 2006.
- BORGES, Daniel L. Gallindo; CURTIUS, Adilson José; WELZ, Bernhard; HEITMANN, Uwe (2005) – *Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua*. Revista Analytica, Agosto/Setembro 2005, nº18.
- CHANG, Raymond (2010) – *Química Geral. Conceitos Essenciais*. 4ª edição. AMGH Editora Ltda.. Capítulo 3. Página 62, 96.
- CHANG, Raymond (1994) – *Química*. 5ª edição. Editora McGraw-Hill de Portugal, Lda.. Capítulo 9. Página 373, 377.
- EPED (2006) - *Determinação de Cloretos num Sal de Cozinha pelo Método de Charpentier-Volhard*. Disponível em <http://tal57.blogspot.pt/2006/10/determinao-de-cloretos-num-sal-de.html>, acessado a 14 de Fevereiro de 2011.
- FERNANDES, Kelly G.; MORAES, Mercedes de; NETO, José A. Gomes; NÓBREGA, Joaquim A.; OLIVEIRA, Pedro V. (2003) – *Padronização interna em espectrometria de absorção atômica*. Química Nova, volume 26, nº2, 249-252.
- GUTKOSKI, Luiz C.; BREHM, Cibele M.; SANTOS, Elisa dos; MEZZOMO Natália (2005) - *Efeito de ingredientes na qualidade da massa de pão de forma congelada não fermentada durante o armazenamento*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 25(3): 460-467, jul.-set. 2005.
- HARRIS, Daniel C. (1991) – *Quantitative Chemical Analysis*. 3ª edição. International Student Edition, capítulo 21. Páginas 588-605.

- HARRIS, Daniel C. (2000) – *Exploring Chemical Analysis*, 2ª edição. Michelson Laboratory China Lake, California. W. H. Freeman and Company (New York). Páginas 411-427.
- HE, Feng J., MACGREGOR, Graham (2011) – *Hypertension*. Journal of the American Heart Association.
- ISO 8070 (2007) – *Milk and milk products – Determination of calcium, sodium, potassium and magnesium contents – Atomic absorption spectrometric method*. International Dairy Federation.
- LARSSON, Helena (2002) - *Effect of pH and Sodium Chloride on Wheat Flour Dough Properties: Ultracentrifugation and Rheological Measurements*. Cereal Chemistry (4):544-545.
- Lei nº 75/2009 – *Diário da República, 1ª Série*. Nº 155 de 12 de Agosto de 2009.
- LYNCH, E.J.; BELLO, F. Dal; SHEEHAN, E.M.; CASHMAN, K.D.; ARENDT, E.K. (2009) - *Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics*. Food Research International 42 (2009) 885–891.
- MACEDO, Espiga de (2009) – *O que se sabe sobre a hipertensão em Portugal?* Notícias Diárias, 3º Congresso Português de Hipertensão, página 2.
- Ministério da Educação – *Prática nº 12. Análise volumétrica. Volumetria de Precipitação*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Departamento Académico de Química e Biologia. Tecnólogo em Processos Ambientais. Disponível em [http://pessoal.utfpr.edu.br/jcrazevedo/arquivos/pratica12\\_tit\\_precip.pdf](http://pessoal.utfpr.edu.br/jcrazevedo/arquivos/pratica12_tit_precip.pdf), acessado a 9 de Fevereiro de 2011.
- MONDAL, Arpita; DATTA, A.K. (2007) - *Bread baking – A review*. Journal of Food Engineering 86 (2008) 465–474.
- NOORT, Martijn W.J.; BULT, Johannes H.F.; STIEGER, Markus; HAMER, Rob J. (2010) - *Saltiness enhancement in bread by inhomogeneous spatial distribution of sodium chloride*. Food of Cereal Science.
- NP – 2972 (1985) – *Alimentos para animais. Determinação do teor de cloretos solúveis na água. Técnica de Charpentier-Volhard*. Direcção Geral de Qualidade.
- NP EN ISSO 6869 (2007) – *Alimentos para animais. Determinação dos teores de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, potássio, sódio e zinco. Método por espectrometria de absorção atómica*. Instituto Português da Qualidade.
- PINHEIRO, Pedro (2009) – *Sal e Hipertensão Arterial*. Disponível em <http://www.mdsauade.com/2008/09/sal.html#>, acessado a 23 de Novembro de 2010.

- POLÓNIA, Jorge (2009) – *O que se sabe sobre a hipertensão em Portugal?* Notícias Diárias, 3º Congresso Português de Hipertensão. Página 2.
- RELACRE (2000) – *Guia Relacre 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química.*
- RILEY, Christopher M. (1996) – *Development and Validation of Analytical Methods.* Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, series editions: C. M. Riley, A. F. Fell. Pergamon. Páginas 15-59.
- RONDA, Felicidad; CABALLERO, Pedro A.; QUILEZ, Joan; ROOS, Yrjö H. (2010) - *Staling of frozen partly and fully baked breads. Study of the combined effect of amylopectin recrystallization and water content on bread firmness.* Journal of Cereal Science.