



Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras

Monografia Submetida para Obtenção do Grau de Licenciatura em Química-Marinha

Tema: Validação do Método Modificado de Monier Williams para Quantificação de Sulfito por Titulometria na matriz de Caranguejo: Método usado no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane



Autora:

Ivânia Suzana Xavier Cândido



Escola Superior de Ciências Marinhas e Costeiras

Monografia Submetida para Obtenção do Grau de Licenciatura em Química-Marinha

Tema: Validação do Método Modificado de Monier Williams para Quantificação de Sulfito por Titulometria na matriz de Caranguejo: Método usado no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane



Supervisor

(dr. Horácio Madeira A. Gundana)

Co-Supervisor

(dr. Lúcio Jasse)

Quelimane, /_____/____ de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado os meus dias e meus caminhos em todos momentos da minha vida, até ao dia de hoje.

Aos meus orientadores, dr. Horácio Madeira Gundana e dr. Lúcio Jasse pela assessoria, críticas, contribuições prestadas durante a realização do estudo e pelo apoio técnico durante os ensaios.

A direcção e equipe do LIP-Quelimane por autorizar e apoiar a realização de experiência, em especial ao dr. Hélder João.

A direcção da ESCMC, seu corpo docente, direcção e administração que condicionaram os meios possíveis para mais uma grande e importante etapa da minha vida, a formação superior, sem poupar os seus esforços.

Agradeço aos meus pais *Xavier Raul Cândido e Nelita Bernardo Mapanzene* aos meus pais de coração *Lindolfo Guilherme Avelino* (memória) e *Maria de Fátima André* pelo apoio, carinho, amor e atenção depositados todos os dias.

Agradeço aos meus irmãos *João, Hélio, Rosalina, Elton, Victor, Vanila, Félix, Mélanie, Aline, Nilza*; aos meus irmãos do coração *Donácio, Sérgio, Arsélia, Beatriz, Eliana, Florinda, Adelina, Cristina, Tunya* (memória), *Xiluva, Ayra*; as minhas tias do coração *Emuna e Cristina*; agradeço aos meus sogros *Francisco e Virgínia*, também aos meus irmãos e pais *da Igreja Velha Apostólica*, pelo grande e incondicional apoio que depositaram em mim.

O meu muito obrigado vai a todos meus colegas de curso de Química Marinha, também aos dos cursos de Biologia Marinha e Oceanografia Marinha da ESCMC-UEM e carinhosamente as minhas amigas *Sheila, Isadora, Maria e Edna, Adriano, Andrice e Seven*, pela companhia e apoio durante todo período da formação académica.

Ao meu namorado *Debierne Paixão Francisco Paixão* endereço-lhe os mais sinceros e especiais agradecimentos por ter vivenciado todos os meus momentos, por me ter acompanhado em todo esse trajecto da formação como colega, amigo, companheiro, namorado conselheiro, suportando todas as minhas variações de humor, agradeço por ter tornado a minha vida mais feliz, interessante durante todo esse período, peço a Deus que esse companheirismo continue por mais longos anos de vida com muito amor, paz e saúde.

A todos outros que de forma directa ou indirecta contribuíram para a minha formação, mas que não pude mencionar os seus nomes, aí vai o meu agradecimento.

DEDICATÓRIA

Dedico esta obra aos meus pais Nelita Bernardo Mapandzene e Xavier Raul Cândido, meus irmãos, meu amor Deberne Paixão e em especial aos meus pais de coração Maria de Fátima André e Lindolfo Guilherme Avelino (memória), pelo carinho e encorajamento por eles demonstrados durante os meus estudos.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Ivânia Suzana Xavier Cândido portadora do Bilhete de Identificação número 080100052300C, emitido a 09/09/2016, pelo arquivo de Identificação Civil de Bilene, Macia, de Nacionalidade Moçambicana, declaro por minha honra que esta monografia científica é resultado da minha pesquisa pessoal e das orientações dos meus supervisores; feita segundo os critérios em vigor na Universidade Eduardo Mondlane, o seu conteúdo é original e todas as fontes consultadas estão devidamente mencionadas no texto e na bibliografia.

(Ivânia Suzana Xavier Cândido)

Quelimane / ____ / ____ / 2017

RESUMO

A aplicação de qualquer método novo em análises laboratoriais deve passar por uma validação para melhor ter a certeza dos resultados. Infelizmente no laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane utiliza o método não normalizado e não validado para quantificação de sulfito em matriz caranguejo, não garantido assim a qualidade dos resultados das suas análises, daí que o presente trabalho tem como objectivo **Validar o Método Modificado de Monier Williams usado para Quantificar Sulfito na matriz de Caranguejo**. Para o efeito avaliou-se directamente o método demonstrando a exactidão e indirectamente o método demonstrando especificidade/selectividade; linearidade; sensibilidade; limites de detenção e quantificação; precisão e robustez. A **exactidão** do método foi estimada a partir da recuperação do sulfito em amostras fortificadas analisadas por analistas diferentes a 25, 75 e 150ppm, onde em todos os pontos apresentou recuperação dentro do limite aceitável de 70 a 110%; **Especificidade/selectividade** do método foi estimada a partir da recuperação do analito na amostra em estresse (HCl, NaOH, H₂O₂, fluorescência e temperatura), onde apresentou resultados de recuperação do analito dentro do limite aceitável em amostras em todos meios de estresse conservadas no congelador e no stresse com HCl na geleira assim como no congelador; a **Linearidade** do método foi determinada pela determinação de sulfito nas amostras fortificadas em seis pontos (25, 50, 75, 100, 125 e 150ppm), onde verificou-se $R=0.9974$ demonstrando óptima correlação; a **Sensibilidade** do método corresponde ao coeficiente angular da recta, foi determinada juntamente com a linearidade, onde, $b=0.8825$ correspondente ao angulo 41.46° , indicando óptima inclinação da recta; os **Limites de Detenção e Quantificação** do método foram determinados a partir da regressão da concentração de 25ppm ate 17.5ppm, onde o limite de detecção foi de 15.67ppm e o limite de quantificação foi de 22.76ppm; a **Precisão** do método foi determinada juntamente com a exactidão do método, em foi verificada a repetibilidade por apresentar resultados seguidos do mesmo analista menores que a repetibilidade e reprodutibilidade por não apresentar variação nas médias e variâncias nos resultados dos dois analistas; **Robustez** foi determinada pela recuperação aceitável de sulfito mesmo variando o tempo de fluxo de sulfito e demonstrou que o aumento do tempo de fluxo de sulfito não influencia no resultado da análise. O Método Modificado de Monier Williams usado no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane é válido para quantificação de sulfito por titulometria na matriz de caranguejo.

Palavras-chaves: Validação, Método de Monier Williams, Sulfito, Caranguejo

ABSTRACT

The application of any new method in laboratory analysis must undergo a validation to better be sure of the results. Unfortunately in the Fish Inspection Laboratory of Quelimane uses the non-standard method and not validated for the qualification of sulphate in crab matrix, thus not guaranteeing the quality of the results of its analyzes, hence the present work aims to **Validate the Modified Method of Monier Williams Used for Qualification of Sulphite in the Crab Matrix**. For the purpose it was directly evaluated the method demonstrated the accuracy and indirectly the method demonstrating specificity/sensitivity; linearity; sensitivity; limits detection and quantification; precision and robustness. The **Accuracy** of the method was estimated from the recovery of the sulfite in fortified samples analyzed by analysts other than 25, 75 e 150ppm, where at all points recovered within the acceptable limit of 70 to 110%; **Specificities/Selectivity** was estimated from the analyte in the stress sample (HCl, NaOH, H₂O₂, fluorescence and temperature), where it showed results of recovery of the analyte within the acceptable limit in sample in all stress media conserved in the freezer and stress with HCl in the glacier as well as the freezer; the **Linearity** of the method was determined by the determination of sulphite in the fortified samples in six points (25,50, 75, 100, 125, 150ppm) where showed R=0.9974 there was great correlation; the **Sensitivity** of the method corresponds to the coefficient angle of straight, was determined together with the linearity, where, b=0.8825 corresponding to the angle of 41.46°.indicating optimal slope of the line; the **Limits of Detention and Quantification** of the method were determined from the concentration regression of 25ppm up to 17.5ppm, where the detention limit was 15ppm and the limit of quantification was 22.76ppm; the **Precision** of the method was determined together with the accuracy of the method, in which the repeatability was verified by presenting results followed by the same analysts smaller than the repeatability and reproductibility because it did not present variation in its means and variance in the results of the two analysts; **robustness** was determined by the acceptable recovery of sulphite even by varying the sulfite flow time, demonstrating that the increased sulphite flow time did not influence the result of the analysis. The Modified Monier Williams Method used in de Quelimane Fish Inspection Laboratory is valid for quantification of sulphite by titration in the crab matrix.

Keywords: Validation; Method of Monier Williams, Sulphite; Crab.

ÍNDICE DE TABELAS

Nr	TABELA	PAG
1	Tabela de apresentação dos reagentes e soluções utilizados nos ensaios.....	10
2	Tabela de resultado de recuperação resultante de estresse.....	17
3	Tabela de resultados dos limites de detenção e quantificação.....	19
4	Tabela de análise de rejeição/aceitação dos dados de obtidos nas análises usando o teste de Grubs.....	20
5	Tabela de resultados de repetibilidade e reprodutibilidade e testes de <i>t</i> student e Fisher.....	21
6	Tabela de resultados de recuperação variando o tempo de fluxo de sulfito.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Nr	FIGURA	PAG
1	Gráfico da linearidade em função da concentração teórica e determinada pelo método.....	18

Nr	EQUAÇÕES	PAG
Equação 1:	Equação de recuperação de sulfito	5
Equação 2:	Equação da homogeneidade da recta entre os pontos x e y	6
Equação 3:	Equação do coeficiente angular da recta	6
Equação 4:	Equação da ordenada na origem quando	6
Equação 5:	Equação de correlação entre as variáveis x e y.	6
Equação 6:	Equação de cálculo de ângulo da recta	6
Equação 7:	Equação de cálculo de limite de detenção	6
Equação 8:	Equação de cálculo de limite de quantificação	6
Equação 9:	Equação de cálculo de repetibilidade	7
Equação 10:	Equação de cálculo de reprodutibilidade	7
Equação 11:	Equação de cálculo de sulfito	13
Equação 12:	Equação de cálculo de massa	26
Equação 13:	Equação de cálculo de volume de HMS	26
Equação 14:	Equação de cálculo de volume usando a lei da diluição	26
Equação 15:	Equação de cálculo de densidade	27
Equação 16:	Equação de cálculo de concentração	27
Equação 19:	Equação de cálculo de Fisher	29
Equação 20:	Equação de cálculo de t student	29
Equação 21:	Equação de cálculo de Grubbs mínimo	29
Equação 22:	Equação de cálculo de Grubbs máximo	29

LISTA DE ABREVIATURA

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CV	Coefficiente de variância
$C_6H_{14}O_6$	D-mannitol
DP	Desvio padrão
F	Teste Fisher
G	Teste Grubbs
HCl	Ácido Clorídrico
HMS (CH_3NaO_4S)	Hidrometil sulfato de sódio
H_a	Hipótese alternativa
H_0	Hipótese nula
H_2O_2	Peroxido de hidrogénio
INIP	Instituto Nacional de Inspeção de Pescado
IPAC	Instituto Português de Acreditação
ISO	International Standard Organization
LD	Limite de detenção
LIP	Laboratório de Inspeção de Pescado
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade
mol	Número de mol
Mr	Massa molar relativa
$NaHPO_4 \cdot 7H_2O$	Hidrogeno-fosfato heptahidratado de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ppm	Partes por milhão
r	Repetibilidade
R	Reprodutibilidade
R%	Recuperação em percentagem
R^2	Coefficiente de correlação
SO_2	Dióxido de enxofre
\tan^{-1}	Arctangent
Vr	Variância
δ	Densidade de ácido (g/ml)

ÍNDICE

CAPÍTULO - 1:	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problematização	2
1.2. Justificativa	2
1.3. Objectivo	2
1.3.1. Objectivos gerais	2
1.3.2. Objectivos Específicos:	2
1.3. Hipóteses	3
CAPÍTULO 2:	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Validação de Método Analítico	4
2.1.1. Formas de Validação	4
2.1.2. Critério Directo de Avaliação	5
2.1.3. Critério Indirecto de Avaliação	5
2.2. Método de Monier Williams	7
2.3. Método Estatístico	8
2.3.1. Teste Comparativos	8
CAPÍTULO 3	9
3. METODOLOGIA	9
3.1. Forma de Validação	9
3.2. Material, Equipamento, Reagentes, Soluções e Preparação de Soluções	9
3.3. Preparação da Amostra de Caranguejo	12
3.4. Extracção e Quantificação de Sulfito em Amostras Fortificada de Caranguejo (Método Modificado de Monier Williams)	12
3.4.1. Análise de Branco	12
3.4.2. Modo Operativo	13
3.5. CRITERIO DIRECTO E INDIRECTO DE AVALIAÇÃO	14
3.5.1. Critério Directo de Avaliação	14
3.5.2. Critério Indirecto de Avaliação	14
CAPÍTULO 4:	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Especificidade /Selectividade	17
4.2. Linearidade	18
4.3. Sensibilidade	18

4.4. Limite de detenção e quantificação.....	19
4.5. Exactidão e Precisão	20
4.6. Robustez.....	22
CAPÍTULO 5:.....	23
5. Conclusão.....	23
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
APÊNDICE I.....	26
APÊNDICE II	29
APÊNDICE III.....	31
ANEXO-II.....	35

CAPÍTULO - 1:

1. INTRODUÇÃO

A demonstração da qualidade de medições ou análises químicas através de rastreios, comparabilidade e confiabilidade é cada vez mais exigida no mundo inteiro, sendo que dados analíticos não confiáveis podem comprometer conclusões de estudos e conduzir a decisões erradas, acompanhado de prejuízos financeiros irreparáveis (Perez, 2010).

O Instituto Nacional de Inspeção de Pescado de Quelimane (INIP) é a entidade competente nacional e com prestígio internacional, na garantia dos requisitos higio-sanitários da cadeia de produção e comercialização dos produtos alimentares de origem aquática e prestação de serviços com qualidade requerida pelo sector produtivo, garantindo a protecção do consumidor, bem como a saúde e bem-estar do animal e do ambiente.

De modo a garantir o cumprimento dos requisitos higio-sanitários ao mercado e uma maior protecção do consumidor, esta dispõe de um departamento denominado de “Laboratório de Inspeção de Pescado (LIP)”, com reconhecimento internacional da sua competência técnica em análises químicas e microbiológicas através da Norma ISO17025:2005, atribuída pelo IPAC-Acreditações (Instituto Português de Acreditação).

O Laboratório da Inspeção do Pescado introduziu medidas de garantia de qualidade tais como: métodos de análise validados; procedimentos internos de controlo de qualidade; participação em testes de ensaios de proficiência; credencial atendendo aos requisitos da norma ISO 17025 e estabelecimento de rastreabilidade de resultados e medições, para assegurar que são capazes de fornecer dados com qualidade requerida.

A validação de um método é a confirmação de que os ensaios realizados usando um certo método produzem resultados confiáveis e adequados a qualidade pretendida (DOQ-CGCRE-008, 2010).

O presente trabalho pretende validar o método modificado de Monier Williams recomendado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), por titulometria utilizado no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane para deteção de sulfito na matriz de caranguejo, visto que o mesmo ainda não foi submetido ao processo de validação.

1.1. Problematização

O Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane (LIP-Quelimane) utiliza o método modificado, não normativo de Monier Williams por titulometria para deteção de sulfito, que tem como princípio a destilação para deteção de sulfito em matrizes de camarão; caranguejo e lagosta. Este método, utilizado nesta instituição já foi validado e acreditado pelo IPAC Acreditações apenas para deteção de sulfito em miolo de camarão e o mesmo não é extensivo as outras matrizes, tal como a de caranguejo, lagosta e outras. A validação de um método consiste na avaliação da selectividade/especificidade; linearidade, sensibilidade; limites de deteção e de quantificação; precisão e robustez do método mediante alguma alteração relevante tal como a alteração da matriz. A consequência da falta de validação de um método não normativo é a falta de confiança nos resultados obtidos a partir do mesmo. Eis que surge a seguinte questão: Será que os resultados produzidos na análise de sulfito em caranguejo a partir do mesmo método são credíveis, verídicos e fiáveis?

1.2. Justificativa

Havendo falta de comprovativo de que a partir de um método não normalizado, utilizado por um laboratório pode-se obter resultados fiáveis, leva o mesmo a tomada de decisões que podem comprometer a sua confiabilidade. A gravidade do uso de métodos não validados reside na possibilidade do mesmo realizar leituras não verídicas. Neste caso, a alta concentração de sulfito no caranguejo, pode causar problemas de saúde aos consumidores, em baixas concentrações pode comprometer a conservação do caranguejo, fazendo com que perca o seu valor comercial e traduzir-se em perdas avultadas de dinheiro (Popolim, 2009). Neste contexto o presente trabalho sugere a validação do método de análise de sulfito em caranguejo utilizado no Laboratório de Inspeção Pescado de Quelimane.

1.3. Objectivo.

1.3.1. Objectivos gerais

- Validação do Método Modificado de Monier Williams usado no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane para Quantificação de Sulfito por Titulometria na matriz de Caranguejo.

1.3.2. Objectivos Específicos:

- Quantificar o sulfito em amostras de caranguejo fortificadas com HMS por meio de análise, utilizando o método modificado de Monier Williams.

- Determinar o critério directo de avaliação (exactidão) do método modificado de Monier Williams
- Determinar os critérios indirectos de avaliação (especificidade/selectividade, limites de detenção e de quantificação, linearidade, precisão e robustez) do método modificado de Monier Williams.

1.3. Hipóteses

H_n: O método modificado de Monier Williams é valido para quantificação de sulfito por titulometria em caranguejo.

H_a: O método modificado de Monier Williams não é valido para quantificação de sulfito por titulometria em caranguejo.

CAPÍTULO 2:

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Validação de Método Analítico

Validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objectiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos, sendo mais aplicado para casos em que se trata de um método novo; que não está descrito na literatura científica; método que existe mas que será implementado pela primeira vez num laboratório e método que existe mas que vai ser realizado recorrendo a uma matriz diferente ou que sofreu uma alteração significativa, sendo critérios da avaliação directa e indirecta, principais componentes para a realização da validação de um método analítico (DOQ-CGCRE-008, 2010).

2.1.1. Formas de Validação

A validação de um método analítico pode se realizar de forma seguinte:

- ✓ **Usando materiais de referência certificado** – consiste em analisar número suficiente de replicadas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Os MRC (quando disponíveis) são os materiais de controlo preferidos, pois estão directamente relacionados com padrões internacionais.
- ✓ **Usando amostras com resultados obtidos por diferentes métodos** – consiste na avaliação do método após análise de diferentes amostras com diferentes métodos, onde as diferenças obtidas para cada amostra são calculadas e comparadas com o valor desejado, estabelecendo-se o nível de confiança de acordo com o intervalo de concentração (menores valores de concentração causam maior dispersão dos dados aumentando o limite de confiança).
- ✓ **Usando programas inter-laboratoriais** – usa-se a análise de variância (ANOVA), que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos. No mínimo é aceitável a participação de oito (8) laboratórios participantes e caso não se consiga reunir esse número, pondera-se a participação de no mínimo cinco (5) laboratórios participantes.
- ✓ **Validação pelo método de recuperação** - é o método mais utilizado para validação de processos analíticos e está relacionada com a exactidão, pois reflecte a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra.

2.1.2. Critério Directo de Avaliação

O critério directo de avaliação é o critério que para a sua interpretação não se sustenta com outras ferramentas. A exactidão faz parte desse critério por se determinar a partir de ferramentas de avaliação directa (Martins, 2015).

- **Exactidão**

A exactidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados num determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método podem ser: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão ou ensaios inter-laboratoriais (Guia RELACRE, 2013).

A recuperação é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extracção, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra. O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a equação seguinte:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{nível de sulfito lido (ppm)}}{\text{nível de sulfito teorico (ppm)}} \times 100 \quad (1)$$

Este parâmetro deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com o padrão de recuperação aceite, podendo variar de país para país (Perez, 2010).

2.1.3. Critério Indirecto de Avaliação

O critério directo de avaliação necessita de outras ferramentas para a sua interpretação. Fazem parte desse critério especificidade/selectividade; linearidade; sensibilidade; limites de detenção e quantificação; precisão e robustez.

- **Selectividade/Especificidade**

Considera-se que um método é selectivo quando o mesmo consegue distinguir e quantificar com precisão o analito na presença de outras substâncias interferentes nas condições indicadas do ensaio para a mostra matriz em estudo. Especificidade é a ausência absoluta de efeitos de interferências, assim temos que especificidade é igual 100% a selectividade. Uma forma de avaliar a especificidade e selectividade de um método é realizando ensaios de recuperação (Martins, 2015).

- **Linearidade/Curva de Calibração**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação que deve ser definida por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A equação $y = bx + a$ (2) relaciona as duas variáveis, sendo, y - Resposta medida; x - concentração teórica; a - intersecção com o eixo y quando $x = 0$ e b - inclinação da curva analítica (Dos Santos, 2012).

$$b = \frac{\sum_{n=1}^N [(x_n - \bar{x}) \times (y_n - \bar{y})]}{\sum_{n=1}^N (x_n - \bar{x})} \quad (3);$$

$$a = \bar{y} - b \times \bar{x} \quad (4)$$

$$R^2 = \frac{\sum_{n=1}^N [(x_n - \bar{x}) \times (y_n - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_{n=1}^N (x_n - \bar{x})^2 \times \{\sum_{n=1}^N (y_n - \bar{y})^2\}]}} \quad (5)$$

Onde: x_n = valores individuais de concentração; y_n = valores individuais de sinal instrumental; \bar{x} = média dos valores em x (concentração teórica); \bar{y} - Média dos valores de y (concentração determinada) y .

- **Sensibilidade**

A sensibilidade é a medição da capacidade de um método ou aparelho distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. A mesma encontra-se associada à capacidade de resposta do analito (b) e não deve ser confundido com o limite de detecção. (Godin, *et all*, 2011).

$$\hat{\text{ângulo da recta}} = \tan^{-1} b \quad (6)$$

$$\hat{\text{ângulo da recta}} = \tan^{-1} 0.8825 = 41.43^\circ;$$

- **Limites de Detecção e de Quantificação**

Limite de detenção (LD) - é a concentração mínima de uma substância detectada e declarada com 95 ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

Limite de quantificação (LQ) - é o limite inferior de quantificação de um composto presente em uma amostra que possa ser determinado quantitativamente com precisão e exactidão (Moura, *et ell.*, 2008).

$$LD = \bar{x} + 3 \times DP \quad (7)$$

$$LQ = \bar{x} + 10 \times DP \quad (8)$$

Onde: (\bar{x}) - Média e (DP) - desvio padrão

- **Precisão**

A precisão é uma medida do grau de proximidade dos valores obtidos pelo método analítico sobre uma amostra, podendo ser determinada por repetibilidade e por Reprodutibilidade (Rosario, 2012).

A precisão de um método de ensaio por repetibilidade é efectuada em condições idênticas, isto é, ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, mesmo Laboratório; mesmo analista; mesmo equipamento; mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo (Guia RELACRE, 2013).

$$r = 2.8 \times \text{desvio padrão individual} \quad (9)$$

Considera-se precisão em condições de reprodutibilidade ensaio de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, variando o laboratório; os analistas, equipamentos e ou em épocas diferentes (Andiotti, 2005).

$$R = 2.8 \times \text{desvio padrão comum} \quad (10)$$

- **Robustez**

A robustez é a capacidade do método para conduzir ao mesmo resultado apesar das alterações introduzidas deliberadamente. Essas alterações podem ser: variação da temperatura; humidade; pH; comprimento de onda ou o tempo. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método quanto à sua precisão (Moser, 2014).

2.2. Método de Monier Williams

O método de Monier-Williams preconizado pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) quantifica sulfito total em diversas matrizes, com excepção dos vegetais do género *Brassicasp.* (couve, repolho, nabo) e *Alliumsp.* (cebola, alho), porque possuem, como componentes do aroma, dissulfetos que interferirem na análise (Nagato, *et all.*, 2013). Este determina o sulfito livre mais a parte reprodutível de sulfitos vinculados, tais como adição de produtos de carbonilo em produtos pesqueiros frescos e processados e de carne. A amostra é aquecida com refluxo de nitrogénio que é introduzida na amostra para arrastar o sulfito até ao condensador de água. O sulfito é borbulhado em uma solução de peróxido de hidrogénio a 3%, onde é oxidado a ácido sulfúrico. O sulfito contido é directamente proporcional ao ácido sulfúrico gerado que é determinado por titulação de hidróxido de sódio a 0.01N padroniza (INIP, 2015).

2.3. Método Estatístico

A estatística fornece um conjunto de ferramentas (média, desvio padrão, coeficiente de variância e variância e testes comparativos) para o controle da qualidade, essenciais para uma abordagem analítica completa. Estas ferramentas servem para, com critérios estatísticos, auxiliar a tomar decisões na interpretação dos resultados, viabilizando a realização da validação de método analítico (Andiotti, 2005).

2.3.1. Teste Comparativos

- **Teste de Grubbs**

O teste de Grubbs é um teste utilizado para verificar se existem valores discrepantes (mínimo e máximo), denominados de Outliers, que apresentam um grande afastamento dos restantes ou são inconsistentes com estes (Martins, 2015).

- **Teste de Fisher**

O teste exacto de Fisher serve para testar a hipótese de duas variáveis que estão associadas. É indicado quando o tamanho das duas amostras independentes é pequeno e consiste em determinar a probabilidade exacta de ocorrência de uma frequência observada, ou de valores mais extremos (Andiotti, 2005).

- **Teste *t*-student**

É o teste que utiliza a média das amostras, que se torna mais próxima da normal a medida em que o tamanho da amostra aumenta, assumindo que se trata de dispersões normais e independentes (Andiotti, 2005).

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGIA

3.1. Forma de Validação

A validação que será implementada nesse trabalho é a validação pelo método de recuperação, utilizando amostra branca de caranguejo enriquecida com a solução padrão HMS no Laboratório de Inspeção de Pescado de Quelimane, para a realização dos ensaios analíticos.

3.2. Material, Equipamento, Reagentes, Soluções e Preparação de Soluções

a. Material e Equipamento

Foi usado material e equipamentos previamente calibrados na realização dos ensaios analíticos, viabilizando a validação do método.

Amostra de Caranguejo triturado	Balões de destilação 500ml
Aparelhagem para destilação	Balões receptores (250ml)
Botija de azoto	Balança analítica 210 ± 0.0001 g
Manta eléctrica	Pipeta graduada (5ml e 10ml)
Bureta 25 ± 0.05 ml	Micropipeta 100-1000 μ l, 10ml
Erlenmayer 200ml	Pipetas volumétricas 50 ± 0.2 ml, 50 ± 0.2 ml
Copos de Becker 20ml e 50ml	Proveta graduada 50 ± 0.2 ml, 250 ± 2 ml
Balão volumétrico 100	Balão volumétrico de 1000 ± 0.4 ml
Balão volumétrico de 250 ± 0.3 ml	Balões volumétrico de 500 ± 0.25 ml
Balão volumétrico de 500 ± 0.5 ml	

b. Reagentes e Soluções

Tabela 1: Apresentação dos reagentes e soluções utilizados nos ensaios

Reagentes	Soluções
➤ Peroxido de hidrogénio a 30% (H_2O_2)	➤ Solução de peróxido de hidrogénio a 3%;
➤ Ácido clorídrico a 37% (HCl)	➤ Solução de ácido clorídrico a 4N;
➤ Hidróxido de sódio a 97% de pureza (NaOH)	➤ Solução de hidróxido de sódio a 0.1N e a 0.01N;
➤ Hidrogeno-ftalato de potássio	➤ Solução de hidrogeno-ftalato de potássio a 0.01N
➤ Etanol 99.0%	➤ Indicador vermelho de metilo 0.01N ➤ Indicador fenolftaleína 0.03N
➤ Vermelho de metilo	
➤ Fenolftaleína	
➤ Hidrogeno-fosfato hepta-hidratado de sódio ($NaHPO_4 \cdot 7H_2O$)	➤ Diluente de HMS (0.04M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.10M D-manitol). ➤ Solução padrão (HMS a 1.0 $\mu g/\mu L$).
➤ D-manitol ($C_6H_{14}O_6$)	
HMS hidrometil sulfato de sódio (CH_3NaO_4S).	

c. Preparação de Soluções

• Preparação HMS

i. Diluente de HMS

Para a preparação do diluente de HMS a 0.04M de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ mais 0.10M de D-manitol, foi pesada uma massa de 10.7g e 18.2 g respectivamente, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000ml e adicionou-se água destilada perfazendo o volume, agitou-se até a homogeneização e conservou-se em geleira.

ii. HMS

Para a preparação do HMS de 1.0 $\mu g/\mu l$, foi necessário pesar 1102g de HMS, transferiu-se a massa pesada para um balão volumétrico de 500ml e adicionou-se o diluente de HMS perfazendo o volume. O HMS é a solução padrão usada para a contaminação da amostra durante todo ensaio analítico.

- **Preparação do Peroxido de Hidrogénio (H₂O₂) a 3%**

Para a preparação de solução de peróxido de hidrogénio a 3%, pipitou-se 50ml de H₂O₂ a 30%, para um balão volumétrico de 500ml e perfazendo o volume com água destilada. Esta solução é preparada diariamente por ser uma solução instável.

- **Preparação do Ácido Clorídrico (HCl)**

Para preparação de solução de HCl a 4N, foi retirado 331.67ml de HCl a 37% para um balão volumétrico de 1000ml contendo pequena quantidade de água destilada e perfez-se o volume com água destilada.

- **Preparação do Indicador (Vermelho de Metilo)**

O vermelho de metilo é o indicador usado na determinação de sulfito. Na sua preparação pesou-se na 0,2500g, de seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 100ml, de seguida foi adicionado etanol perfazendo o volume, agitou-se até homogeneizar.

- **Preparação e Padronização de Hidróxido de sódio (titulante)**

Na preparação da solução de hidróxido de sódio a 0.1N, usada para preparação do titulante (hidróxido de sódio a 0.01N), pesou-se 2.00g de hidróxido de sódio em paletes, de seguida transferiu-se o pesado para um balão volumétrico de 500ml e adicionou-se água destilada perfazendo o volume.

Para preparar a solução de hidróxido de sódio a 0.01N usada na titulação, retirou-se 50ml da solução de 0.1N já preparada, pipitou-se em um balão volumétrico de 500ml e perfez-se o volume com água destilada.

- **Preparação de Hidrogeno-ftalato de Potássio**

Para a preparação da solução de hidrogeno-ftalato de potássio a 0.01N, usada na padronização hidróxido de sódio foi necessário retirar para um prato aproximadamente, estimado 15g de hidrogeno-ftalato de potássio e deixar por 2 horas em estufa a 110°C. Após, pesou-se 5.0000g hidrogeno-ftalato de potássio retirado da estufa, transferiu-se para um balão volumétrico de 500ml e adicionou-se água destilada perfazendo o volume, agitou-se até a dissolução completa.

- **Preparação do Indicador (Fenolftaleína)**

Fenolftaleína é o indicador usado na padronização de hidróxido de sódio. Na sua preparação pesou-se na balança analítica 1.0010g, de seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 100ml, adicionou-se 60ml de etanol, agitou-se e adicionou-se água destilada perfazendo o volume, agitou-se até homogeneizar.

- **Padronização de Hidróxido de Sódio**

Pipitou-se 40ml da solução hidrogeno-ftalato de potássio para erlmyer (em triplicado) a cada um deles, adiciona-se 5 gotas do fenolftaleína e titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0.1N previamente preparada até que a solução se tornasse roseada e finalmente anotou-se o volume do hidróxido de sódio gasto.

- **Cálculo da concentração de Hidróxido de Sódio.**

Aplicou-se o princípio de que em qualquer reacção estequiométrica, o número de moles equivalentes dos reagentes devem ser iguais (INIP,PTQ01, 2015).

Separe os cálculos dos procedimentos.

3.3. Preparação da Amostra de Caranguejo

Foram adquiridos 20Kg de caranguejo diverso nos mercados da cidade para efeitos de amostra branca no presente estudo. Estas foram preparadas e trituradas segundo o procedimento vigente no laboratório e posteriormente conservadas em forma de miolo em bolsas plástica a temperaturas $\leq -15^{\circ}\text{C}$. (*temperatura de conservação definida nos LIP's*).

3.4. Extracção e Quantificação de Sulfito em Amostras Fortificada de Caranguejo (Método Modificado de Monier Williams)

3.4.1. Análise de Branco

Em cada série de análise efectuou-se um ensaio em branco para verificar se há contaminação no equipamento de extracção, devendo ter como critério de aceitação não detectado. O ensaio em branco foi efectuado nas mesmas condições (método de Monier Williams) que as amostras fortificadas com o padrão mas sem a adição do padrão (HMS).

3.4.2. Modo Operativo

- ✓ Tomar a amostra recebida da recepção;
- ✓ Pesar em balança analítica 25,00±0.10g da amostra descongelada;
- ✓ Introduzir no balão de destilação 500ml cerca de 200ml de água destilada;
- ✓ Em balão receptor de 250ml introduzir 30ml de H₂O₂ a 3 % e 3 a 5 gotas do indicador vermelho de metilo (a solução toma uma cor avermelhada);
- ✓ Neutralizar a solução contida no balão cónico com gotas de NaOH a 0.01N ate o aparecimento da cor amarela;
- ✓ Proceder a montagem do equipamento de destilação de Monier Williams;
- ✓ Colocar o balão de destilação na manta eléctrica e o balão receptor com o conector junto a coluna de destilação;
- ✓ Ligar rapidamente o condensador e o fluxo de água;
- ✓ Adicionar quantidade pretendida de solução de HMS (17.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 ppm) e rapidamente adicionar 45ml de HCl a 4N, depois ligar a manta eléctrica.
- ✓ Ajustar o fluxo de gás azoto e verificar a existência de fuga;
- ✓ Aquecer ate a ebulição, reduzir o calor e continuar o aquecimento lentamente durante 60 minutos;
- ✓ Desligar a manta eléctrica e desmontar o balão receptor;
- ✓ Titular a solução formada no balão receptor caso altere a sua coloração, de amarelo para a cor avermelhada inicial, usando NaOH a 0.01N ate o aparecimento da cor amarela;
- ✓ Tomar o volume de NaOH a 0.01N gasto na titulação, a sua normalidade e a massa da amostra de caranguejo pesada para a quantificação do sulfito resultante da resposta instrumental (equação 11).

$$SO_2(ppm) = \frac{V \times N \times 32 \times 1000}{m} \quad (11)$$

Onde: m=massa de caranguejo pesada (g); V= volume de NaOH usado na titulação (ml); N= é a normalidade da solução de NaOH; $SO_2(ppm)$ = Concentração de sulfito em partes por mil.

3.5. CRITÉRIO DIRECTO E INDIRECTO DE AVALIAÇÃO

3.5.1. Critério Directo de Avaliação

a) Exactidão

Como método mais utilizado para a validação de processos analíticos foi usado a recuperação para o estudo da exactidão.

Recuperação - para este estudo a recuperação consistiu na fortificação da amostra (11 réplicas), ou seja, na adição de solução padrão (HMS) em baixas, médias e altas concentrações (25, 75 e 150ppm respectivamente) analisada por dois analistas diferentes (A e B), determinando a concentração do analito adicionado mediante aplicação do método operativo (descrito em 3.4.2.) e o cálculo da quantidade percentual recuperada pelo processo segundo a equação 1 (AOAC, citado por INIP, PTQ01 2015):

A escolha do nível de fortificação dependeu do propósito do estudo tomando como base o limite mínimo e máximo de Sulfito estabelecido pela legislação nacional que é de 25 a 150ppm respectivamente (INIP,PTQ01, 2015).

3.5.2. Critério Indirecto de Avaliação

a) Especificidade/Selectividade

Com base nos objectivos do estudo, foi determinada a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes na matriz (meio ácido, meio alcalino, adição de oxidante, luz e temperatura).

- Amostra padrão - Em amostra de caranguejo não tratada pesou-se $25,00 \pm 0,10$ g e adicionou-se em cada $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS.
- Meio ácido – pesou-se 10 réplicas da amostra de caranguejo com a massa de $25,00 \pm 0,10$ g cada, adicionou-se $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS e $0,1\text{ml}$ de solução de HCL a $0,1\text{M}$, foi deixada em exposição por 24horas, cinco das amostras na geleira e outras cinco no congelador.
- Meio alcalino- pesou-se 10 réplicas da amostra de caranguejo com a massa de $25,00 \pm 0,10$ g cada, adicionou-se $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS e $0,1\text{ml}$ de solução de NaOH a $0,1\text{N}$, foi deixada em exposição por 24horas, cinco das amostras na geleira e outras cinco no congelador.
- Adição de oxidante – pesou-se 10 réplicas da amostra de caranguejo com a massa de $25,00 \pm 0,10$ g cada, adicionou-se $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS e $0,1\text{ml}$ de solução H_2O_2 a $0,75$ (V/V) foi deixada em exposição por 18horas, cinco das amostras na geleira e outras cinco no congelador.

- Na presença da luz (fluorescência) -pesou-se 5 réplicas da amostra de caranguejo com a massa de $25,00 \pm 0.10$ g cada, adicionou-se $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS foram conservadas a temperatura ambiente por 18 horas na presença da luz fluorescente.
- Influência da temperatura – pesou-se 5 réplicas da amostra de caranguejo com a massa de $25,00 \pm 0.10$ g cada, adicionou-se $625 \mu\text{L}$ de solução de HMS. Deixar ficar em incubadora de 30°C durante 18 horas e analisar.

b) **Linearidade**

A curva analítica de linearidade foi ensaiada com (cinco) 5 repetições de para cada concentração de sulfito em caranguejo no intervalo de 6 pontos de concentração de sulfito determinados aleatoriamente na faixa de trabalho de 25 a 150ppm.

A linearidade do método modificado de Monier-Williams foi obtida do gráfico dos resultados de SO_2 determinado *versus* SO_2 teórico, verificada a partir da **equação 2** de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação (R^2) foi utilizado para indicar a evidência do ajuste ideal da recta. (a, b e R^2 determinados a partir do pacote estatístico Microsoft Excel 2010).

c) **Sensibilidade**

A sensibilidade foi determinada simultaneamente ao teste de linearidade e expressa pela inclinação da curva de regressão na faixa linear, (equação 6)

d) **Limite de detecção e Limite de Quantificação**

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir de concentrações decrescentes da concentração de sulfito de 25ppm até 17.5ppm de sulfito (HMS), sendo este repetido dez (10) vezes por meio de análise de detecção de sulfito em amostras fortificadas e a posterior retirada a sua média (\bar{x}) e desvio padrão (DP)

e) **Precisão**

A precisão nesse trabalho foi avaliada simultaneamente com a exactidão onde verificou-se a repetibilidade e reprodutibilidade do método.

Repetibilidade (r) - Neste ponto, os resultados dos dois técnicos foram avaliadas individualmente, onde a verificou-se a diferença entre dois resultados seguidos do mesmo analista comparado com repetibilidade calculada. (equação 9)

Reprodutibilidade (R) – Foi avaliada os resultados dos dois analistas simultaneamente, em que comparou se o desvio padrão comum com a reprodutibilidade calculada (equação 10).e verificou-se os testes estatísticos, t student e Fisher.

f) **Robustez**

Neste parâmetro avaliou-se o tempo (60min e 90min), de fluxo de sulfito, mantendo a temperatura constante de 23°C para a verificação dos resultados obtidos nas amostras adicionadas 25ppm da concentração padrão (HMS) e usou-se o teste *t* student para a análise dos resultados produzidos (apêndice II).

CAPÍTULO 4:

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Especificidade /Selectividade

Tabela 2: Resultado de Recuperação Resultante de Estresse

Apresentação dos resultados de recuperação de amostras analisadas sob condições de estresse e ambientes de conservação diferentes.

Estresse realizado	Condições	Média res. (ppm)	Média (R%)
Branco	_____	0.00	0.00
Meio alcalino (NaOH)	Geleira	15.96	63.85
	Congelador	18.75	75.02
Meio acida (HCl)	Geleira	20.21	80.87
	Congelador	22.12	88.84
Oxidante (H ₂ O ₂)	Geleira	15.84	63.35
	Congelador	21.11	84.46
Luz	Fluorescência	16.12	64.49
Temperatura	Incubadora	14.81	59.22

Onde: Res – Resultado

Dos resultados de recuperação (R%) apresentados na tabela 2 acima, mostram que o estresse em meio alcalino e em meio oxidante apresentam baixos níveis de recuperação quando conservadas em geleira que no congelador, nas condições de fluorescência e temperatura (incubadora 30°C) também apresentam recuperação muito baixa. Este cenário pode-se observar pela perda do sulfito por causa das condições de conservação. Contrariamente ao que se pode observar em meio ácido, que apresenta uma ótima recuperação nas duas condições de conservação (geleira e congelador), devido a ótima extração e conservação da amostra não interferindo na extração do analito.

O método demonstra selectividade e especificidade quando as amostras são conservadas em congelador comparado com os outros ambientes.

4.2. Linearidade

Apresentação gráfica da correlação entre os resultados da concentração teórica e determinada do sulfito a partir do método modificado de Monier Williams em 6 pontos diferentes (25ppm, 50ppm, 5ppm, 100ppm, 125ppm e 150ppm).

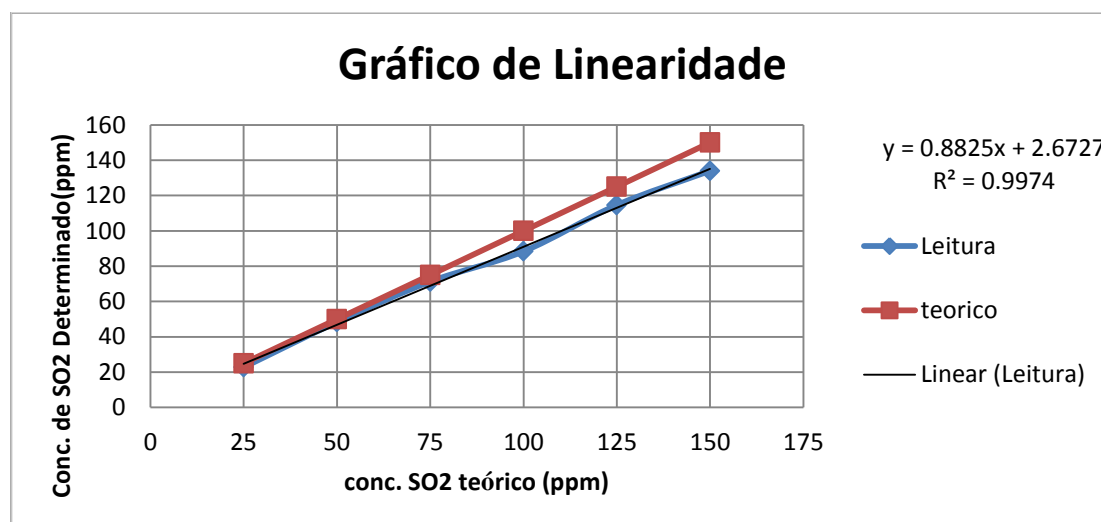


Figura1: Gráfico da linearidade em função da concentração teórica e determinada pelo método.

A figura 1 demonstra a curva de calibração linear e a correlação linear entre a concentração teórica e a determina, onde, o valor da correlação $R^2=0.9974$ foi maior que o menor valor de correlação aceite para análises químicas de $R^2=0.995$, a equação da recta foi do tipo $y=bx+a$ ($y=0.8825x+2.6727$) demonstrando a homogeneidade de variância ao longo da recta, considerando-se, portanto, o ajuste ideal dos dados na faixa de 25 a 150ppm de sulfito, evidenciando a linearidade do método.

4.3. Sensibilidade

Neste estudo, a sensibilidade foi de $b=0.8825$, (figura 1), correspondente ao ângulo de inclinação de 41.46° , valor este próximo de $b=1$ que corresponde ao ângulo de 45° respectivamente, indicando que variações de concentração (eixo x) resultam em variações directamente proporcionais na resposta (eixo y), ou seja, equivalência entre o valor teórico e o valor medido, bem como ausência ou minimização de erros sistemático, tendo em conta que quanto maior for a inclinação da recta maior será a sensibilidade (Nagato, *et all*, 2013), assim sendo, o método demonstrou óptima sensibilidade.

4.4. Limite de deteção e quantificação

Tabela 3: Resultados dos limites de deteção e quantificação

Apresentação da tabela dos limites de deteção (LD) e quantificação (LQ) determinados a partir de concentrações decrescentes da concentração de sulfito de 25ppm (concentração mínima aceite) até 17.5ppm de sulfito (HMS) em amostras fortificadas.

Nr	m. Pesada	C. HMS	V.NaOH (ml)	Conc.SO2 (ppm)
Branco	25.0010	0.00	0.00	0.00
1	25.0010	17.5	1	12.698
2	25.0010	17.5	1.1	13.967
3	25.0010	17.5	1	12.698
4	25.0010	17.5	0.95	12.063
5	25.0010	17.5	0.9	11.428
6	25.0010	17.5	0.95	12.063
7	25.0010	17.5	1	12.698
8	25.0010	17.5	1.15	14.602
9	25.0010	17.5	1	12.698
10	25.0010	17.5	0.9	11.428
M				12.634
DP				1.013
LD=M+3*DP				15.67213
LQ=M+10*DP				22.76108

Onde: Nr=numero de análise; M=média; DP=desvio padrão; m=massa pesada em gramas; C.=concentração; V=volume; µl= microlitro; ml= mililitro; ppm=partes por milhão.

A concentração mínima (LD) de sulfito detectada através da conversão do sinal instrumental em concentração é de 15.67ppm e a concentração inferior que o analito é quantificado com exactidão e precisão é a partir de 22.76ppm (LQ).

4.5. Exactidão e Precisão

Tabela 4: Análise de rejeição/aceitação dos dados de obtidos nas análises usando o teste de Grubbs. Tabela de avaliação de valores discrepantes dos resultados das análises para avaliação da precisão e exactidão usando o teste de Grubbs.

Conc	25ppm A	25ppmB	75ppmA	75ppmB	150ppmA	150ppmB
Va _{min sus}	19.63	20.26	60.02	62.54	126.33	127.26
Va _{max sus}	24.06	22.35	68.02	67.01	133.04	135.02
G _{min}	1.472	1.385	1.906	1.466	1.154	1.135
G _{max}	1.557	1.053	1.246	1.286	2.134	1.9818
G _{tabelado} ⁹⁵ %	2.355		2.355		2.355	

Onde: DP- desvio padrão; G_{min}- Grubbs mínimo; G_{max}- Grubbs máximo; Va_{min.sus}- Valor mínimo suspeita; Va_{max.sus}- Valor máximo suspeito; G_{tabelado}- Grubbs crítico.

Na verificação de valores suspeitos mínimos e máximos (Outliers) dos técnicos A e B (tabela 5), para onze (11) determinações para cada um deles nas concentrações de baixa, média e alta (25, 75 e 150 ppm respectivamente), pode-se observar que os valores suspeitos num nível de confiança de 95% foram menores que o Grubbs tabelado de 2.355, pois assim, nenhum dos valores suspeitos é rejeitado.

Tabela 5: Resultados de repetibilidade e reprodutibilidade e testes de *t* student e Fisher

Apresentação dos resultados da avaliação da exactidão do método a partir da média da recuperação de sulfito das análises realizadas em amostras fortificadas em baixas médias e altas concentrações (25, 75 e 150ppm's respectivamente). E precisão do método por repetibilidade (avaliação dos resultados de análises de cada analista) e reprodutibilidade avaliando as médias e as variâncias dos valores dos resultados das análises realizadas (avaliação dos resultados de análise dois analistas a partir dos testes *t* student e Fisher).

Técnicos Envolvidos						
Concentração	25ppm A	25ppmB	75ppmA	75ppmB	150ppmA	150ppmB
Nv. de confiança	95%	95%	95%	95%	95%	95%
Desvio padrão	1.463	0.858	2.538	1.624	1.949	2.491
D.P. comum	1.199		2.130		2.236	
Repetibilidade (r)	4.096	2.404	7.106	4.547	5.458	6.973
$ x_n - x_{n-1} $	1.34	0.64	0.48	0.42	0.02	1.21
Reprodutibilidade	3.358		5.965		6.262	
Replicas	11	11	11	11	11	11
Média (ppm)	21.783	21.446	64.857	64.920	128.880	130.087
Média de R%	87	86	87	87	86	87
C.V (%)	6.715	4.002	3.913	2.502	1.513	1.915
Variância	2.140	0.737	6.440	2.638	3.800	6.203
$F_{\text{crítico}}$	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98
$F_{\text{calculado}}$	2.90		2.44		1.63	
$t_{\text{calculado}}$	0.658		0.070		1.266	
t_{tabelado}	2.086		2.086		2.086	

Onde: Nv – nível; DP_{comum} - desvio padrão comum; $F_{\text{crítico}}$ - Fisher crítico; $F_{\text{calculado}}$ - Fisher calculado; $t_{\text{calculado}}$ - valor de teste t student calculado; t_{tabelado} - valor de teste t student tabelado; C.V- coeficiente de variância; R%- recuperação.

Para avaliação da exactidão, verificou-se que o método recuperou (R%) acima de 70% (78.52% a 92.24%), sendo que, o critério de aceitação da recuperação em Moçambique é de 70% a 110 % (INIP, 2015), assegurando que o método tem um bom desempenho em baixas, médias e altas concentrações.

Na verificação da precisão na forma de repetibilidade, verifica-se que em todos os resultados a condição de $|x_n - x_{n-1}| \leq r$ é satisfeita, garantindo assim que há repetibilidade nos resultados de cada um dos analistas (Guia RELACRE, 2013).

Avaliando as variâncias dos dois técnicos A e B a partir do teste de Fisher para 11 determinações para cada um deles nas concentrações de baixa, media e alta (25, 75 e 150 ppm respectivamente), pode se observar que os valores de $F_{\text{calculado}}$ dos dois foram menores que o $F_{\text{crítico}}$, sendo assim, não há diferença estatística significativa nos resultados obtidos nos ensaios entre os dois técnicos.

Na avaliação das médias utilizando o teste t student, pode se observar que os valores de $t_{\text{calculado}}$ dos dois foram menores que o t_{tabelado} , não havendo assim diferença estatística significativa nas médias

entre os dois técnicos, demonstrando que o método usado é reprodutivo. Assim sendo, A repetibilidade e reprodutibilidade demonstram a precisão do método usado nas análises realizadas.

4.6. Robustez

Tabela 6: Resultados de recuperação variando o tempo de fluxo de sulfito

Apresentação dos resultados obtidos a partir da variação do tempo de fluxo de sulfito, do tempo normal de fluxo de 60 min e 90 min. E avaliação das medias dos resultados obtidos usando o teste t student.

Nr	C. teórica (ppm)	60min		90min	
		C. determinada (ppm)	R%	C. determinada (ppm)	R%
Branco	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	25	21.587	86.35	19.682	78.74
2	25	20.953	83.81	22.222	88.89
3	25	20.318	81.27	23.492	93.97
4	25	23.492	93.97	23.492	93.97
5	25	21.587	86.35	20.952	83.81
Média		21.587	86.35	21.96	87.87
DP		1.189		1.656	
DP_{Comum}		2.076			
t calculado		0.116			
t Tabelado		2.306			

Onde: DP - desvio padrão; $t_{\text{calculado}}$ - valor de teste t student calculado; t_{tabelado} - valor de teste t student tabelado; $C_{\text{determinada}}$ - concentração determinada; $C_{\text{teórica}}$ - concentração teórica; R%- recuperação; min- minutos.

A variação do tempo de extração de sulfito no caranguejo em condições de temperatura constante não afectou na quantificação do sulfito, recuperado em 60 minutos e 90 minutos uma média de 86.35% e 87.87358% respectivamente, que se encontra de dentro dos limites aceitáveis de recuperação com uma pequena variação.

De acordo com o teste t student (tabela 6), onde, o t tabelado é maior que o t calculado, declarando que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos, ou seja, no nível de confiança 95%, as variações do tempo de análise não influenciam na quantificação do sulfito extraído, evidenciando assim a robustez do método.

CAPÍTULO 5:

5. Conclusão

O método de Monier Williams perante a avaliação directa apresentou uma boa exactidão, uma vez que os resultados de recuperação de sulfito estão dentro da faixa de aceitação.

Na avaliação indirecta o método de Monier Williams revelou-se:

- Selectivo/específico por identificar o analito perante outras substâncias interferentes quando conservadas as amostras em congelador.
- Linear por ter apresentado correlação linear entre a concentração de sulfito determinada e a teórica, e a homogeneidade das variâncias ao longo da recta;
- Sensível por apresentar uma óptima inclinação da recta de calibração.
- As quantidades de sulfito abaixo das concentrações do limite de detenção ($LD=15.67\text{ppm}$) e do limite de quantificação ($LQ=22.76\text{ppm}$), o método não poderá detectar e quantificar com precisão e exactidão.
- Preciso por apresentar repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados de baixas médias e altas concentrações de sulfito, confirmados pelo facto de todos dos resultados obtidos serem aceitáveis perante os testes estatísticos de rejeição/aceitação e de comparação de resultados, teste de Grubbs, *t* student e Fisher.
- Robustez por que mesmo variando o tempo de fluxo de sulfito, os resultados não tiveram afastamento significativo, dando credibilidade a hipótese nula do teste *t* de student.

O método modificado de Monier Williams usado no Laboratório de Inspeção de Pescado é valido para determinação de sulfito em matriz de caranguejo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mendes, A. S. (2005). *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*. Laboratório Regional de Controlo da Qualidade da Água, Portugal.

Alcatara, G. K. (2012). *Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Simultânea de Aminoácidos como Possíveis Marcadores Neurológicos da Esquizofrenia Utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência*. Dissertação para Mestrado, Universidade de São Paulo-Escola Superior de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento Química e Bioquímica, Ribeirão Preto-São Paulo- Brasil.

Andiotti, J. L. (2005). *Técnicas Estatísticas Aplicáveis a Tratamento de Informações Oriundas de Procedimentos Laboratoriais*. Relatório de Pesquisa, Serviço Geológico de Brasil, Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral, Superintendência de Porto Alegre-Brasil.

Burin, R., Burin, V. M., & Luiz Bordignon, M. T. (2008). *Validação de uma Metodologia Analítica para Determinação de Cálcio em Produtos Carneos*. Universidade Federal Santa Catarina, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Florianópolis-Brasil.

DOQ-CGCRE-008. (2010). *Orientação Sobre Validação de Método Analítico*. Documento Orientativo, Coordenação Geral de Acreditação.

Dos Santos, F. R. (2012). *Método de Lowry: Validação e Estimativa do Cálculo da Incerteza*. Dissertação de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara- São Paulo-Brasil.

EURACHEM. (2002). *Determinando a Incerteza na Medição Analítica Segunda Edição*. EURACHEM/CITAC. EURACHEM.

Godin, C. d., Junqueira, R. G., & deSouza, S. V. (2011). *Tendência em Validação de Métodos de Ensaio Qualitativos*. Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Minas Gerais-Brasil.

Guia RELACRE. (2013). *Guia Relacre-Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. Portugal: RELACRE.

INIP,PTQ01. (2015). *Determinação de Sulfito por Titulometria em Produtos de Pesca pelo Método de Monier Williams*. Procedimento Técnico (PTQ01), Instituto Nacional de Inspeção de Pesca, Departamento de Laboratórios, Maputo.

IPAC Acreditação. (2010). *Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*. Instituto Português de Acreditação, Portugal.

Maciela, E. (2005). *Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica de Multiresíduos para Qualificação de Resíduos de Pesticidas em Manga*. Universidad de São Paulo-Escola Superior de Agricultura, Departamento de Agroecossistema, Piracicaba-Estado de São Paulo .

Martins, A. I. (2015). *Controlo da Qualidade: Auditorias a métodos de ensaio*. Tese de Mestrado em Química, Faculdade de Ciências-Universidade do Porto, Departamento Química e Bioquímica, Portugal.

Moser, P. R. (2014). *Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial*. Divisão de Ensaios Químicos-Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial (DEQ/CGAL).

Moura, M. P., Lira, M. C., & Magalhães, N. S. (2008). *Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas*. Universidade Federal de Pernambuco,, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Pernambuco- Brasil.

Nagato, L. A., Takemoto, E., Della Torre, J. C., & Lichtig, J. (2013). *Verificação do método Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva*. Instituto de Química- Universidade de São Paulo,, São Paulo-Brasil.

Perez, M. Â. (2010). *Validação de Método Analítico volume 22-03*. Documento Informativo, Instituto de Tecnologia de Alimentos , Brasil.

Popolim, W. D. (2009). *Análise de Sulfito em Suco de Frutas e Estimativa de seu Consumo por Escolares*. Tese de Doutorado, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo.

Santos, L. d. (2011). *Acreditação de Laboratório de Ensaios de Acordo com os Requisitos da Norma ABN ISO/IEC17025*. Trabalho de Diplomacia em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Rio Grande do Sul- Brasil.

APÊNDICE I

Cálculos das massas, volume e concentração dos reagentes envolvidos

Cálculo das massas em g dos reagentes do diluente de HMS (12)		
Dados		Fórmula/Resolução
$m_A = ?$ $m_B = ?$ $C_A = 0.04N$ $C_B = 0.1N$ $V_{A/B} = 1L$	$M_{rA} = 268.07g/mol$ $M_{rB} = 182.17g/mol$ $A = Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ $B = D\text{-manitol}$	$m_{A/B} = C_{A/B} \times M_{rA/B} \times V_{A/B}$ $m_A = 0.04 \times 268.07 \times 1$ $m_A = 10.7g$ $m_B = 0.1 \times 182.17 \times 1$ $m_B = 18.2g$
Onde: $m_{A/B}$ =massa de A e B pesado (g); $C_{A/B}$ =concentração de A e B (N); $V_{A/B}$ =volume total da solução diluente (L); $M_{rA/B}$ =massa molar relativa (g/mol);		
Cálculo da massa pesada de HMS. (12)		
Dados		Fórmula/Resolução
$m = ?$ $M_r = 134.09g/mol$ $C = 0.01643M$ $V = 0.5L$	$m = M_r \times C \times V$ $m = 134.09 \times 0.01643 \times 0.5; m = 1102g$	
Cálculo do volume de HMS pipitado e da concentração de sulfito em 500ml de HMS		
Cálculo da concentração de sulfito contida no HMS		
$SO_2(\mu g/\mu l) = \frac{m \times SO_2HMS \times \eta_{HMS}}{V \times 100 \times 100}$ $SO_2(\mu g/\mu l) = \frac{1102 \times 47.78 \times 95}{500 \times 100 \times 100} = 1.0004\mu g/\mu l$		
Cálculo do volume (μl) de sulfito pipetado para 17,5, 25, 50, 75, 100,125, e 150ppm. (13)		
$V = \frac{CP_{SO_2} \times m_{amostra}}{C_{SO_2}HMS};$	$V = \frac{25g \times 17.5\mu \frac{g}{\mu l}}{1.0004\mu \frac{g}{\mu l}} = 437.33\mu l$ $V = \frac{25\mu \frac{g}{g} \times 25g}{1.0004\mu \frac{g}{\mu l}} = 625\mu l$ $V = \frac{25g \times 50\mu \frac{g}{g}}{1.0004\mu \frac{g}{\mu l}} = 1249.5\mu l$ $V = \frac{25g \times 150\mu g/g}{1.0004\mu g/\mu l} = 3748.50\mu l$	$V = \frac{25g \times 75\mu \frac{g}{g}}{1.0004\mu \frac{g}{\mu l}} = 1874.25\mu l$ $V = \frac{25g \times 100\mu \frac{g}{g}}{1.0004\mu \frac{g}{\mu l}} = 2499.0\mu l$ $V = \frac{25g \times 125\mu g/g}{1.0004\mu g/\mu l} = 3123.75\mu l$
Onde: m = massa pesada de HMS (mg); V = volume da solução de HMS; CP =concentração pretendida de sulfito; $m_{amostra}$ =massa pesada da amostra de M_r = massa molar relativa de HMS; C = concentração de sulfito contido na solução de HMS.		
Cálculo do volume de H_2O_2 pipetado (14)		
Dados		Fórmula/Resolução
$C_1 = 30\%$ $C_2 = 3\%$ $V_1 = ?$ $V_2 = 500ml$	$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $30\% \times V_1 = 3\% \times 500ml;$ $V_1 = \frac{3\% \times 500}{30\%}$ $V_1 = 50ml$	
Onde: C_1 =concentração inicial de peróxido de hidrogénio (%); C_2 =concentração final pretendida de peróxido de hidrogénio (%); V_1 =volume inicial do peróxido de hidrogénio (ml); V_2 =volume final do peróxido de hidrogénio (ml).		
Cálculo do volume e concentração de HCl pipetado		
Dados		Fórmula/Resolução
$\delta = 1.19g/ml$ $M_r = 36.5g/mol$ $m = ?$	$37.0ml_{HCl} \rightarrow 100ml_{solução}$ $X \rightarrow 1000ml_{solução};$ $X = 370ml$	

$V = 100ml$ $C_2 = 4N$ $C_1 = ?$ $V_1 = ?$ $V_2 = 1000ml/1L$	$\delta = \frac{m}{V} ; (15)$ $m = \delta \times V;$ $m = \frac{1.19g}{ml} \times 370ml; m = 440.3g$ $C = \frac{m}{M_r \times V_2} (16)$ $C = \frac{440.3}{36.5 \times 1} = 12.06N;$	
$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2; (14); V_1 = \frac{4 \times 1000}{12.06}; V_1 = 331.67$		
Onde: δ =Densidade de ácido (g/ml); M_r =massa molar relativa de HCl (g/mol); m = massa de HCl (g); V =volume da solução de HCl (ml); C_1 =concentração inicial de HCl (N); C_2 =concentração final pretendida na solução de HCl (N); V_1 =volume inicial de HCl (ml); V_2 =volume final pretendido na solução de HCl (ml).		
Cálculo da concentração de vermelho de metilo (16)		
Dados	Fórmula/Resolução	
$C = ?$ $V = 0.1L$ $M_r = 269.30$ $m = 0.2500g$	$C = \frac{m}{M_r \times V}$ $C = \frac{0.2500}{269.30 \times 0.1} = 0.01N$	
Onde: M_r = massa relativa do vermelho de metilo pesada; C =concentração do vermelho de metilo; V = volume do indicador e m = massa de vermelho de metilo pesada.		
Cálculo da massa pesada de NaOH (12)		
Dados	Fórmula/Resolução	
$M_r = 40g/mol$ $C = 0.1N$ $V = 0.5L$ $m = ?$	$m = C \times M_r \times V$ $m = 0.1 \times 40 \times 0.5$ $m = 2.000g$	
Onde: M_r =massa molecular relativo de NaOH (g/mol); C =concentração de NaOH (N); V = volume da solução de NaOH (L).		
Cálculo da massa pesada de hidrogeno-ftalato de potássio		
Dados	Fórmula/Resolução	
$m = ?$ $C = 0.05N$ $M_r = 204.22g/mol$ $V = 0.5L$	$m = C \times M_r \times V$ $m = 0.05 \times 204.22 \times 0.5$ $m = 5.000g$	
Onde: V =volume da solução de hidrogeno-ftalato de potássio (L); M_r =massa molar relativa de hidrogeno-ftalato de potássio (g/mol); m =massa de hidrogeno-ftalato de potássio (g); C =concentração de hidrogeno-ftalato de potássio (N).		
Cálculo da concentração de fenolftaleína		
Dados	Fórmula/Resolução	
$C = ?$ $V = 0.1L$ $M_r = 318.31$ $m = 1.0010g$	$C = \frac{m}{M_r \times V}$ $C = \frac{1.0010}{318.31} \times 0.1 = 0.03N$	
Onde: M_r = massa relativa de fenolftaleína; C =concentração de fenolftaleína; V = volume do indicador e m = massa de fenolftaleína pesada.		
Cálculo de concentração de Hidróxido de sódio		
Volume gasto na titulação	Dados	Fórmula/Resolução

$V_{1(A)} = 40ml$ $V_{2(A)} = 40ml$ $V_{3(A)} = 40ml$ $\bar{V}_{(A)} = 40ml$ $V_{1(B)} = 19.80ml$ $V_{2(B)} = 19.70ml$ $V_{3(B)} = 19.75ml$ $\bar{V}_B = 19.75ml$	$C_A = 204.22mol$ $V_d = 0.5l$ $m_A = 5.0017g$ $C_B = ?$ $V_A = 40ml$ $V_B = 19.75$ $A=C_8H_5KO_4$ $B=NaOH$	$C_A \times V_A = C_B \times V_B$, Onde: $C_A = \frac{m}{M_r \times V_d}$ $C_B = \frac{m \times V_A}{M_r \times V_d \times V_B}$ $C_B = \frac{204.22 \times 0.5 \times 19.75}{5.0017 \times 40}$ $C_B = 0.099206987N/10$ $C_B = 0.0099206987N$
<p>Onde: C_A -corresponde a concentração de hidrogeno-ftalato de potássio; C_B - corresponde a concentração real de hidróxido de sódio após a titulação; \bar{V}_B - Volume médio do hidrogeno-ftalato de potássio; \bar{V}_B- Volume médio de hidróxido de sódio gastado na titulação; V_d- corresponde ao volume final do hidrogeno-ftalato de potássio; m_A- corresponde a massa do hidrogeno-ftalato pesado</p>		

APÊNDICE II

Tabela de apresentação dos cálculos envolvidos dos testes de t student, Fisher e Grubbs

Cálculo de teste t student	
$GL = n_A + n_B - 2$ $GL = (11 + 11) - 2 = 20$	
t student calculado para 25, 75 e 150ppm (17)	
$t_{calculado} = \frac{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 }{DP_{comum} \times \sqrt{\left[\left(\frac{1}{n_1}\right) + \left(\frac{1}{n_2}\right)\right]}}$	$t_{calculado} = \frac{ (21.446364 - 21.78273) }{1.1992638 \times \sqrt{\left[\left(\frac{1}{11}\right) + \left(\frac{1}{11}\right)\right]}}$ $t_{calculado} = 0.657772425$ $t_{calculado} = \frac{ (64.85727 - 64.92091) }{2.1304027 \times \sqrt{\left[\left(\frac{1}{11}\right) + \left(\frac{1}{11}\right)\right]}}$ $t_{calculado} = 0.07005272$ $t_{calculado} = \frac{ (128.88 - 130.0873) }{2.2363499 \times \sqrt{\left[\left(\frac{1}{11}\right) + \left(\frac{1}{11}\right)\right]}}$ $t_{calculado} = 1.266038$
<p>Onde: $t_{calculado}$ = t de student calculado; \bar{x}_1 e \bar{x}_2 = são as médias dos técnicos A e B respectivamente; n = são números de análises realizadas pelos técnicos A e B respectivamente; DP = desvio padrão de cada concentração avaliada; GL = grau de liberdade; n = número de réplicas ensaiadas.</p>	
Cálculo de teste de Fisher	
$GL = n_1 - 1$; para o numerador $GL = 11 - 1 = 10$ $GL = n_2 - 1$; para o denominador $GL = 11 - 1 = 10$	
Coloca-se no numerador a maior variância e no denominador a menor variância	
Fisher calculado de 25, 75 e 150ppm	
$F_{calculado} = \frac{DP_A^2}{DP_B^2}; (18)$	$F_{calculado} = \frac{1.462731^2}{0.8584203^2} = 2.9035$ $F_{calculado} = \frac{2.537661^2}{1.624041^2} = 2.44159$ $F_{calculado} = \frac{2.490486^2}{1.949358869^2} = 1.632242$
<p>Onde: DP_A^2 = variância do técnico A; DP_B^2 = variância do técnico B; GL = grau de liberdade; n = número de réplicas ensaiadas.</p>	
Avaliação dos resultados do analista A usando o teste de Grubbs	
<p>Grubbs mínimo de 25, 75 e 10ppm do analista A</p> $G_{min} = \left \frac{x_{min} - \bar{x}}{DP} \right ; (19);$	$G_{min} = \left \frac{19.63 - 21.78273}{1.462731} \right = 1.471717871$ $G_{min} = \left \frac{60.02 - 64.92091}{2.537661} \right = 1.906193657$ $G_{min} = \left \frac{126.63 - 128.88}{1.949359} \right = 1.154225646$
<p>Grubbs máximo de 25, 75 e 150ppm do analista A</p> $G_{max} = \left \frac{x_{max} - \bar{x}}{DP} \right ; (20)$	$G_{max} = \left \frac{24.06 - 21.78273}{1.462731} \right = 1.556863711$ $G_{max} = \left \frac{68.02 - 64.85727}{2.537661} \right = 1.246316056$ $G_{max} = \left \frac{133.04 - 128.88}{1.949359} \right = 2.134034972$

Avaliação dos resultados do analista B usando o teste de Grubbs	
Grubbs mínimo de 25,75 e 150ppm do analista B $G_{min} = \left \frac{x_{min} - \bar{x}}{DP} \right $	$G_{min} = \left \frac{20.26 - 21.446364}{0.85842} \right = 1.138538178$ $G_{min} = \left \frac{62.54 - 64.92091}{1.624041} \right = 1.466040036$ $G_{min} = \left \frac{127.26 - 130.0873}{2.490486} \right = 1.1352292$
Grubbs máximo de 25, 75 e 150ppm do analista B $G_{max} = \left \frac{x_{max} - \bar{x}}{DP} \right $	$G_{max} = \left \frac{22.35 - 21.446364}{0.85842} \right = 1.052673541$ $G_{max} = \left \frac{67.01 - 64.92091}{1.624041} \right = 1.286353571$ $G_{max} = \left \frac{135.02 - 130.0873}{2.490486} \right = 1.980628181$
<p>G_{min} = Grubbs mínimo; G_{max} = Grubbs máximo; x_{min} = valor mínimo suspeito; x_{max} = valor máximo suspeito; DP = Desvio padrão; \bar{x} = Concentração média determinada</p>	

APÊNDICE III

Tabelas de dados das análises realizadas para análise da selectividade/especificidade; análise da linearidade; resultados dos Limites de detenção e quantificação; Resultados das análises realizadas pelos técnicos A e B para o estudo da exactidão e precisão.

Tabela dos resultados de condições de estresse para a avaliação da especificidade/selectividade

Meio Alcalino (NaOH)				Hidrólise Acida (HCl)			
Gel	R%	Cong	R%	Gel	R%	Cong	R%
15.712	62.848	19.48288	77.93152	18.8544	75.4176	22.62528	90.50112
16.3405	65.36192	18.8544	75.4176	20.11136	80.44544	21.9968	87.9872
16.969	67.87584	18.8544	75.4176	20.73984	82.95936	21.9968	87.9872
15.0835	60.33408	18.22592	72.90368	19.98566	79.942656	23.25376	93.01504
15.712	62.848	18.35162	73.40646	21.36832	85.47328	20.73984	82.95936
15.9634	63.85357	18.75384	75.01537	20.21192	80.8476672	22.122496	88.489984

Oxidante (H ₂ O ₂)				Fluorescência		Incubadora de 30°C	
Gel	R%	Cong	R%	Luz	R%	Temperatura	R%
15.08352	60.33408	20.7398	82.95936	15.0835	60.33408	12.443904	49.775616
15.712	62.848	19.4829	77.93152	15.0835	60.33408	14.45504	57.82016
15.08352	60.33408	20.7398	82.95936	16.969	67.87584	15.08352	60.33408
16.34048	65.36192	21.9968	87.9872	15.712	62.848	15.712	62.848
16.96896	67.87584	22.6253	90.50112	17.7766	71.10656	16.34048	65.36192
15.837696	63.350784	21.1169	84.46771	16.1249	64.499712	14.806989	59.2279552

Onde: Gel – Geleira; Cong – congelador e R%= Recuperação em percentagem

Tabelas dos resultados de Recuperação para a avaliação da Linearidade

Nr	25ppm	R%	50ppm	R%	75ppm	R%
1	24.3	97.2	41.22	82.44	66.03	88.04
2	20.95	83.8	37.46	74.92	56.51	75.3467
3	22.86	91.44	44.44	88.88	64.13	85.5067
4	20.95	83.8	43.17	86.34	66.03	88.04
5	21.58	86.32	43.17	86.34	64.13	85.5067
\bar{x}	22.128		41.892		63.366	
DP	1.443007276		2.731898607		3.948604817	

Nr	100ppm	R%	125ppm	R%	150ppm	R%
1	82.54	82.54	113.02	90.416	127	84.6667
2	96.51	96.51	111.75	89.4	123.17	82.1133
3	94.6	94.6	111.11	88.888	135.24	90.16
4	95.45	95.45	106.03	84.824	142.22	94.8133
5	90.16	90.16	113.65	90.92	129.52	86.3467
\bar{x}	91.852		111.112		131.43	
DP	5.73956183		110.7304		7.457224685	

Onde: Nr=numero do ensaio; \bar{x} =media; DP=desvio padrão; R%=recuperação; ppm=partes por mil

Tabela dos Resultados dos Limites de Detecção e Quantificação

Nr	m(g)	conc. HMS	V. HMS (μ l)	V. NaOH (ml)	SO2(ppm)
Branco	25.0010	0.00	0.00	0.00	0.00
1	25.0010	17.5	437.5	0.65	8.17516316
2	25.0010	17.5	437.5	0.6	7.54630446
3	25.0010	17.5	437.5	0.65	8.17516316
4	25.0010	17.5	437.5	0.7	8.80402187
5	25.0010	17.5	437.5	0.65	8.17516316
6	25.0010	17.5	437.5	0.7	8.80402187
7	25.0010	17.5	437.5	0.65	8.17516316
8	25.0010	17.5	437.5	0.75	9.43288057
9	25.0010	17.5	437.5	0.7	8.80402187
10	25.0010	17.5	437.5	0.65	8.17516316
Media					8.42670665
DP					0.53030022
LD=M+3*DP					10.0176073
LQ=M+10*DP					13.7297089

Onde: Nr= número de análise; m=massa pesada em gramas; conc.=concentração; V=volume; μ l= micro litro; ml=mililitro; ppm=partes por mil; DP= desvio padrão

ANEXO -I

Lista de equipamentos, materiais, reagentes, soluções preparadas, e padrão de referência usados no estudo da validação.

Tabela de Equipamento:

Equipamentos	Marca	Código	Calibração	Validade
Balança analítica	Adventure Ohaus	008QLQ	12.06.2017	12.06.2018
Electro manta	Barnested	032QLQ	NA	NA
Electro manta	Barnested	657QLQ	NA	NA
Extractor	_____	103QLQ	NA	NA
Botija de gas azoto	_____	_____	NA	NA

Onde: NA- não aplicável

Equipamento de extracção usado na realização das análises para extracção de sulfito nas amostras de caranguejo fortificadas com HMS.



Figura 2. Equipamento de destilação (extractor)

A- Manta eléctrica; B- balão de destilação; C- coluna; D-balão colector; E-conector; F-válvula de passagem de azoto; 1-tubo de passagem de azoto; 2-tubo de passagem de água acoplada a torneira; 3- garrafa de purificação de azoto (contendo NaOH a 0.01N); 4- garrafa de recepção de sulfito em casos de excesso (contendo NaOH a 0.01N); 5-tubo de passagem de sulfito quando estiver em excesso; 6-copos de conservação do cano de saída de azoto (contendo agua corrente); 7- suporte; 8-torneira de saída de água para arrefecimento da coluna durante a destilação.

Tabela de Materiais:

Material	Código	Calibração	Validade
Balão volumétrico 100±0.1ml	020MQQ-4	30.06.2016	30.06.2021
Balão volumétrico de 100±0.1ml	020MQQ-3	30.06.2016	30.06.2021
Balão volumétrico de 250±0.3 ml	629QLQ	30.06.2016	30.06.2021
Balão volumétrico de 500±0.5 ml	632QLQ	30.06.2016	30.06.2021

Balão volumétrico de 500±0.25 ml	016MQQ-3	20.02.2014	20.02.2019
Balão volumétrico de 500±0.25 ml	016MQQ-4	20.02.2014	20.02.2019
Balão volumétrico de 500±0.25 ml	016MQQ-1	20.02.2014	20.02.2019
Balão volumétrico de 1000±0.4ml	013MQQ-2	20.02.2014	20.02.2019
Balão de destilação de 500±0.25ml	008MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão de destilação de 500±0.25ml	007MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão de destilação de 500±0.25ml	006MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão de destilação de 500±0.25ml	005MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão colector de 250±0.25ml	004MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão colector de 250±0.25ml	003MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão colector de 250±0.25ml	002MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Balão colector de 250±0.25ml	001MQQ	20.02.2014	20.02.2019
Pipeta volumétrica de 25±0.2 ml	005MQQ-1	20.02.2014	20.02.2019
Pipeta volumétrica 1ml	009MQQ-6	20.02.2014	20.02.2019
Pipeta volumétrica de 50±0.07 ml	635QLQ	30.06.2016	30.06.2021
Pipeta graduada de 5ml±0.05 ml	007MQQ-2	20.02.2014	20.02.2019
Pipeta graduada de 10±0.03 ml	634QLQ	30.06.2016	30.06.2021
Bureta graduada de 25±0.05 ml	633QLQ	30.06.2016	30.06.2021
Micropipetador de 100 a 1000µl	595QLQ	25.05.2017	25.05.2018
Micropipetador 10ml	628QLQ	23.06.2017	23.06.2018
Proveta de 50±0.1 ml	031MQQ-1	20.02.2014	20.02.2019
Proveta de 250±2 ml	028MQQ-1	20.02.2014	20.02.2019

Tabela de Reagentes:

Reagentes	Conc/pureza	Fabricante
Peroxide de hidrogénio	30%	IDALAB
Ácido clorídrico	37%	UNIV AR
Vermelho de metilo	_____	PROMARK CHEMICALS
Fenolftaleína	_____	SAARCHM
Hidróxido de sódio	99%	ROCHELLE CHEMICAL
Hidrometil sulfato de sódio	95%	SIGMA ALDRICH
Hidrogeno-fosfato heptahidratado de sódio	98-102%	SIGMA ALDRICH
Etanol	99.8%	IDALAB LTD
D-manitol	>98%	SIGMA ALDRICH

Onde: Conc= concentração dos reagentes.

Tabela de Soluções Preparadas:

Solução	Concentração	Data Preparação	Validade (mês/ano)
Peroxido de hidrogénio	3%	Diariamente	Diariamente
Ácido clorídrico	4N	12.06.17	12.08.17
Indicador vermelho de metilo	0.01N	_____	_____
Indicador Fenolftaleína	0.03N	_____	_____
Hidróxido de sódio	0.10N	12.06.17	12.07.17
Hidrometil sulfato de sódio	1.0004µg/µl	Semanalmente	Semanalmente
Hidrogeno-ftalato de potássio	0.01N	12.06.17	12.07.17

ANEXO-II

Apresentação das tabelas consultadas de t student, Grubbs e Fisher a 0.05% de significância e 95 % de confiança (bilateral)

Tabela de t student

Graus de liberdade	Distribuição t		
	α		
	0,005 (unilateral) 0,01 (bilateral)	0,01 (unilateral) 0,02 (bilateral)	0,025 (unilateral) 0,05 (bilateral)
1	63,657	31,821	12,706
2	9,925	6,965	4,303
3	5,841	4,541	3,182
4	4,604	3,747	2,776
5	4,032	3,365	2,571
6	3,707	3,143	2,447
7	3,500	2,998	2,365
8	3,355	2,896	2,306
9	3,250	2,821	2,262
10	3,169	2,764	2,228
11	3,106	2,718	2,201
12	3,054	2,681	2,179
13	3,012	2,650	2,160
14	2,977	2,625	2,145
15	2,947	2,602	2,132
16	2,921	2,584	2,120
17	2,898	2,567	2,110
18	2,878	2,552	2,101
19	2,861	2,540	2,093
20	2,845	2,428	2,086
21	2,831	2,518	2,080

Fonte: (Andiotti, 2005)

Tabela de Fisher

v1 \Rightarrow	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
v2 \Downarrow										
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85

Fonte: (Andiotti, 2005)

Tabela de Grubbs crítico

N	Alpha		
	0.1	0.075	0.05
3	1.15	1.15	1.15
4	1.42	1.44	1.46
5	1.6	1.64	1.67
6	1.73	1.77	1.82
7	1.83	1.88	1.94
8	1.91	1.96	2.03
9	1.98	2.04	2.11
10	2.03	2.1	2.18
11	2.09	2.14	2.23
12	2.13	2.2	2.29
13	2.17	2.24	2.33
14	2.21	2.28	2.37
15	2.25	2.32	2.41
16	2.28	2.35	2.44
17	2.31	2.38	2.47

Fonte: (Andiotti, 2005)