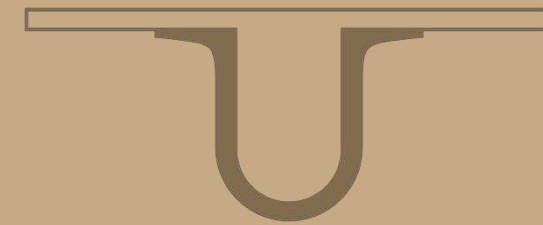




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Mafalda Daniela Leite Teixeira

**CONTROLO QUÍMICO DA QUALIDADE
DE TINTAS**

VOLUME 1

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química com área de
especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente orientada pelos
Professores Doutores Filipe João Cotovio Eufrásio Antunes e Jorge
Luís Gabriel Ferreira da Silva Costa Pereira e pela Dra Etelvina
Fernanda Ribeiro Veludo e apresentada ao Departamento de Química.**

Setembro de 2018

Mafalda Teixeira

CONTROLO QUÍMICO DA QUALIDADE DE TINTAS

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química com área
de especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente**

Professor Doutor Filipe Antunes

Professor Doutor Jorge Costa Pereira

Dra Etelvina Veludo

Setembro de 2018

Universidade de Coimbra



Nota prévia

O presente relatório foi realizado no âmbito da unidade curricular Projeto Científico ou Projeto Industrial do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e foi escrito ao abrigo do acordo de confidencialidade. As componentes do relatório que são abrangidas pelo sigilo técnico são a descrição detalhada da parte experimental, incluindo reagentes, material e instrumentação, identificação dos biocidas a analisar e métodos de análise, e ainda discussão detalhada dos resultados.

Deste modo, não serão mencionados nomes ou formulações dos produtos ensaiados, nem qualquer outro tipo de informação relevante que de algum modo possa ser usada por outros para benefício próprio. As matérias-primas e os produtos acabados ensaiados ao longo da realização deste trabalho são referidos neste relatório de forma codificada.

Agradecimentos

No decorrer deste estágio foram várias as pessoas que contribuíram tanto para a minha integração na empresa, como para o desenvolvimento do meu projeto e, como tal, quero agradecer-lhes por tudo isso.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao Eng.º João Machado, diretor do centro de investigação e desenvolvimento do Grupo CIN, por me ter proporcionado esta oportunidade de realizar o estágio numa empresa como a CIN.

Quero também agradecer à minha orientadora empresarial, doutora Etelvina Veludo, diretora do controlo de qualidade, e aos meus orientadores da Faculdade, professores doutores Filipe Antunes e Jorge Costa Pereira, por toda a orientação e ensinamentos que me proporcionaram e pela grande disponibilidade que tiveram.

Agradeço a todas as pessoas do centro de investigação e desenvolvimento que me proporcionaram sempre muito carinho e boa disposição, em especial à Catarina Santos, por todo o apoio e total disponibilidade.

A todos os meus amigos que me apoiaram e acompanharam durante todo este estágio.

Aos meus pais, à minha irmã e ao Ricardo, por todo o carinho, ânimo e incentivo que me deram ao longo deste projeto.

Resumo

No presente trabalho, utilizou-se a técnica HPLC para o desenvolvimento e otimização de métodos de quantificação de biocidas em tintas e matérias-primas sendo que todos eles foram validados. Do ponto de vista da empresa, é importante controlar quantitativamente os biocidas presentes nas suas tintas, de modo a cumprir todos os regulamentos e mantendo a qualidade dos seus produtos, sem prejudicar a saúde humana, animal e o ambiente. O desenvolvimento do método 1 apresenta diversas vantagens para a CIN. O fato de permitir a quantificação de três biocidas em simultâneo num curto espaço de tempo, aumenta bastante a eficácia com que se consegue identificar estes biocidas em amostras desconhecidas, e ainda quantificá-los nestas e noutra tipo de amostras. Com o desenvolvimento dos métodos 1, 2, 3 e 4, foram obtidas reduções do tempo de análise de cerca de 80, 70, 60 e 50 %, respetivamente. Tal reflete-se ainda numa diminuição do custo por análise, tornando estes novos métodos bastante vantajosos para a empresa, uma vez que serão capazes de efetuar análises precisas e rápidas.

É também de grande interesse para a CIN a realização de análises microbiológicas às tintas e suas matérias-primas, para além da adição dos biocidas. No decorrer deste projeto, foi implementado um método inovador de avaliação microbiológica rápida que permitiu a obtenção de resultados em apenas oito minutos, contrariamente às quarenta e oito horas através do método anterior. Além disso, este método fornece resultados quantitativos enquanto o anterior é apenas um método semiquantitativo. Estes dois aspetos demonstram ser de grande interesse para a empresa. Quando ensaiados em paralelo, constatou-se que ambos os métodos permitem indicar da mesma forma as amostras como apresentando ou não contaminação, pelo que se considerou o novo método validado para estas gamas.

Ao longo do presente trabalho, foi ainda utilizada a técnica analítica FT-NIR. O trabalho desenvolvido com esta técnica consistiu no desenvolvimento/otimização de métodos quimiométricos para a identificação de produtos/matérias-primas. Este trabalho é importante do ponto de vista da CIN, uma vez que os modelos NIR necessitam de otimizações periódicas, mas também porque a empresa pretendia ampliar a gama de produtos a controlar por esta técnica. No total foram desenvolvidas treze calibrações e otimizadas trinta e uma. Estes modelos desenvolvidos são capazes de identificar corretamente as amostras e rejeitar todas as outras, tornando-se numa vantagem para a CIN.

Abstract

This project was made with the HPLC technique for the development and optimization of biocides quantification methods in paints and raw materials. All of these were validated. According to the company, it is important to control the quantity of biocides in their paints, in order to fulfil with all regulations without impacting on the quality of their products, without harming the human and animal health as well as the environment. The development of method 1 presents several advantages for the company. The same method allows the quantification of three biocides simultaneously in a short period of time, which significantly increases the efficiency of biocides identification in unknown samples as well as their quantification in other kind of samples. With the development of methods 1, 2, 3 and 4, analysis time reductions of about 80, 70, 60 and 50%, respectively, were obtained. Therefore, it was noted a lower analysis cost, which makes this new methods more valuable and worth for the company, as it will allow precise and faster analysis.

The microbiological analysis of paints and their raw materials is also of a great interest to CIN, as well as the addition of the biocides. During the development of this project, an innovator method of rapid microbiological evaluation was implemented. This method allowed obtaining results in just eight minutes when compared to the previous method which it took forty eight hours. Furthermore, this method gives quantitative results, while the previous one it is just semiquantitative. Both of these features seems to be quite relevant to the company. As both methods showed that samples are contaminated, or not, in the same way, when performed simultaneously, the new method was considered validate for this ranges.

The analytic technique FT-NIR was also used in this project. The work developed with this technique consisted of development/optimization of the chemometric methods for the products/raw materials identification. According to CIN, this technique is essential as the NIR models need periodic optimizations. Also, the company intended to amplify the range of products controlled by this technique. In total, thirteen calibrations were performed and thirty one were optimized. The methods developed here are able to correctly identify samples and reject all the others, which is a advantage to CIN.

Índice

Nota prévia	V
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Índice	xiii
Simbologia e abreviaturas	xvii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema e objetivo do trabalho	1
1.2. Entidade acolhedora	2
1.3. Noções gerais sobre tintas e vernizes	4
1.4. Principais constituintes de uma tinta ou verniz	4
1.4.1. Veículo ou ligante, solvente e diluente	5
1.4.2. Pigmento	5
1.4.3. Carga	6
1.4.4. Aditivo	6
1.5. Biocidas	7
1.5.1. Regulamento relativo aos produtos biocidas	8
1.5.2. Aplicação de biocidas em tintas	9
1.5.3. Exemplos de biocidas utilizados em tintas	10
2. Fundamentação	21
2.1. Técnicas instrumentais	21
2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	21
2.1.2. ATP-bioluminescência	28
2.1.3. Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier	31
2.2. Procedimentos de quantificação por HPLC	36
2.2.1. Método da curva de calibração	37
2.3. Estatística aplicada à validação de métodos analíticos	38
2.3.1. Tipos de erros	38
2.3.2. Nível de significância, intervalo de confiança e nível de confiança	39
2.3.3. Procedimento	39
2.3.4. Formulação das hipóteses	40

2.3.5.	Valor de prova	41
2.3.6.	Tomada de decisão.....	41
2.3.7.	Testes baseados nas distribuições estatísticas	41
2.3.8.	Outros testes	43
2.4.	Caracterização e validação de métodos analíticos	46
2.4.1.	Especificidade e seletividade	47
2.4.2.	Gama analítica e linearidade da curva de calibração.....	47
2.4.3.	Sensibilidade.....	51
2.4.4.	Limiares analíticos	51
2.4.5.	Precisão	54
2.4.6.	Exatidão.....	57
2.4.7.	Robustez.....	58
2.5.	Quimiometria	58
2.5.1.	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais.....	60
2.5.2.	Pré-tratamento de dados	61
2.5.3.	Número de componentes principais	62
2.5.4.	Construção do modelo	63
3.	Parte experimental	67
3.1.	Reagentes, material e instrumentação.....	67
3.1.1.	Reagentes.....	67
3.1.2.	Material	68
3.1.3.	Instrumentação	69
3.2.	HPLC	70
3.2.1.	Procedimento experimental.....	70
3.2.2.	Métodos para a quantificação de biocidas por HPLC.....	71
3.3.	ATP-bioluminescência	72
3.3.1.	Determinação do ruído de fundo	73
3.3.2.	Manuseamento da luminase	73
3.3.3.	Calibração.....	74
3.3.4.	Análise de ATP total.....	74
3.3.5.	Análise de ATP dissolvido	75
3.3.6.	Determinação de ATP intracelular.....	76
3.3.7.	Interpretação dos resultados	76
3.3.8.	Avaliação microbiológica por <i>Dip Slides</i>	77

3.4.	Espetroscopia FT-NIR.....	77
3.4.1.	Método de identificação das amostras	78
4.	Resultados e discussão	83
4.1.	HPLC	83
4.1.1.	Espetrofotometria UV-Vis.....	83
4.1.2.	Validação dos métodos analíticos	85
4.1.2.1.	Seletividade	85
4.1.2.2.	Homogeneidade das variâncias	87
4.1.2.3.	Linearidade	90
4.1.2.4.	Avaliação dos <i>outliers</i>	91
4.1.2.5.	Significado estatístico dos parâmetros b_0 e b_1	93
4.1.2.6.	Limiars analíticos	97
4.1.2.7.	Precisão	98
4.1.2.8.	Exatidão.....	103
4.1.2.9.	Robustez.....	103
4.2.	ATP-bioluminescência	107
4.2.1.	Influência do volume das gotas de padrão na calibração	107
4.2.2.	Influência do valor da calibração no resultado final	109
4.2.3.	Ruído de fundo	111
4.2.4.	Calibração	111
4.2.5.	Ensaio comparativos	112
4.3.	Espetroscopia FT-NIR.....	114
4.3.1.	Desenvolvimento de um modelo PLS	114
4.3.2.	Modelos PLS desenvolvidos para cada matéria-prima/produto.....	115
5.	Conclusão	129
	Referências bibliográficas	133
	Apêndice A.....	139
	Apêndice B.....	161
	Apêndice C.....	163

Simbologia e abreviaturas

%R – Percentagem de recuperação

\bar{x} – Média dos valores da amostra

\bar{y} – Média dos valores obtidos do sinal do equipamento

ΔSS – Variação na soma de quadrados ($\Delta SS = SS_1 - SS_2$)

Δv – Variação no número de graus de liberdade ($\Delta v = v_1 - v_2$)

$\Delta \sigma^2$ – Alteração na variância

μ – Média de uma distribuição normal

AMP – Adenosina monofosfato

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

ATP 2G – Tecnologia de segunda geração de medição de ATP

b_0 – Ordenada na origem da reta

b_1 – Declive da reta (sensibilidade do método quando a reta segue um modelo linear)

BIT – 1,2-Benzisotiazolin-3-ona

cATP – ATP intracelular

CIN – Corporação Industrial do Norte, S.A.

CIT – 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona

CO₂ – Dióxido de carbono

COSV – Compostos orgânicos semivoláteis

COV – Compostos orgânicos voláteis

CV_r – Coeficiente de variação da repetibilidade

CV_R – Coeficiente de variação da reprodutibilidade

dATP – ATP dissolvido

DCOIT – 4,5-Dicloro-2-octil-4-isotiazolin-3-ona

DIY – *Do It Yourself*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

EM – Equivalentes Microbianos

FT-IR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

FT-NIR – *Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy*

GA – Gama alta

GB – Gama baixa

GC-FID – *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*

H – altura do pico cromatográfico, medida a partir do máximo do pico até a linha de base extrapolada do sinal observado, numa distância igual a 20 vezes a largura a meia altura

h – ruído de fundo pico-a-pico num cromatograma obtido após a injeção de um branco

H_0 – Hipótese nula

H_1 – Hipótese alternativa

H_2S – Sulfeto de hidrogénio

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

HS-GC-MS – *Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometry Analysis*

I&D – Investigação & Desenvolvimento

ICS – *Industrial Colour System*

IPBC – 3-Iodo-2-propinil-N-butilcarbamato

ISO – *International Organization for Standardization*

k – fator de expansão de acordo com o nível de significância selecionado pelo analista

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

M – Número de réplicas da amostra

MIT – 2-Metil-4-isotiazolin-3-ona

MQ_0 – Média quadrática (contribuição puramente aleatória)

MQ_A – média quadrática (contribuição devida ao fator)

n – Número de observações na amostra

N – Tamanho da amostra (número de pontos da curva de calibração)

N_2 – Azoto

NIR – *Near Infrared*

O_2 – Oxigénio

OIT – 2-Octil-4-isotiazolin-3-ona

OSHAS – *Occupational Health and Safety Assessments Series*

p – número de parâmetros do modelo

$p[H_0]$ – Valor de prova

P_{01} – Ajuste polinomial de primeiro grau

P_{012} – Ajuste polinomial de segundo grau

PLS – *Partial Least Squares*

QSA – Sistema Integrado de Gestão da Qualidade, Segurança e Ambiente

- R – Modo de medição em refletância difusa em espectroscopia NIR
- s – Desvio padrão dos valores da amostra
- $s_{(\text{entre analistas})}$ – Desvio padrão entre analistas
- $s_{(\text{entre dias})}$ – Desvio padrão entre dias
- S/N – Razão sinal/ruído
- s_0^2 – Estimativa da dispersão puramente aleatória
- s_1^2 – Variância das n repetições da solução padrão de menor concentração
- s_a – Desvio padrão da resposta
- s_A^2 – Estimativa da dispersão devida ao fator A
- s_{b1} – Desvio padrão do branco
- SE_{b0} – Desvio padrão da ordenada na origem da reta
- $s_{i(A)}$ – Precisão intermédia (analistas diferentes)
- $s_{i(D)}$ – Precisão intermédia (dias diferentes)
- s_{Li}^2 – Variância interlaboratorial (variância dos erros sistemáticos)
- s_N^2 – Variância das n repetições da solução padrão de maior concentração
- SNV – *Standard Normal Variate*
- s_{ri} – Desvio padrão da repetibilidade (desvio padrão dos erros aleatórios)
- s_{Ri}^2 – Variância da reprodutibilidade
- SS – Soma de quadrados
- SS_0 – Soma de quadrados interna (estimativa da aleatoriedade interna)
- SS_A – Soma de quadrados devida ao fator em estudo
- SS_T – Soma total de quadrados (dispersão total em torno da média global)
- s_{x0} – Desvio padrão do método
- T – Modo de medição em transmitância em espectroscopia NIR
- tATP – ATP total
- TV – Valor de teste
- UE – União Europeia
- UFC – Unidades Formadoras de Colónias
- URL – Unidades Relativa de Luz
- URL_{ATP1} – Valor de calibração obtido em URL com o kit de análise microbiológica rápida
- URL_{bg} – Valor de ruído de fundo obtido em URL com o kit de análise microbiológica rápida
- UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-visível

X_{alt} – Valores de concentração obtidos para amostras analisadas com método alterado

x_{b1} – concentração média do branco

x_i – Valores experimentais (variável independente)

$x_{i, norm}$ – cálculo matemático da normalização

$x_{i, SNV}$ – cálculo matemático da *Standard Normal Variate*

X_{ref} – Valores de concentração obtidos para amostras analisadas com método de referência

y_i – Valores experimentais (variável dependente)

α – Nível de significância

β – Vetor de regressão

Δr – Limite de repetibilidade

ΔR – Limite de reprodutibilidade

σ_0^2 – Variância interna (contribuição puramente aleatória)

σ^2 – Variância

σ_A^2 – Variância externa (contribuição devida ao fator)

σ_{fit} – Desvio padrão residual

σ_{pe} – Estimativa da dispersão puramente aleatória

σ_T^2 – Variância total



CAPÍTULO 1

1. Introdução

Neste capítulo serão abordados os objetivos do trabalho juntamente com um pequeno enquadramento do tema. Será feita uma pequena abordagem acerca da entidade acolhedora, assim como noções gerais sobre tintas e vernizes. Serão ainda referidos os produtos biocidas, sendo que serão apresentados alguns exemplos.

1.1. Enquadramento do tema e objetivo do trabalho

Devido à sua composição, as tintas de base aquosa proporcionam um ambiente favorável à proliferação de microrganismos. As indústrias utilizam, normalmente, tratamentos químicos preventivos (biocidas) e realizam análises microbiológicas para monitorizar a contaminação microbiana de matérias-primas e produtos acabados e, por vezes, para monitorizar materiais ao longo do processo de produção.¹

Os produtos biocidas são necessários para controlar os organismos prejudiciais à saúde humana ou animal e todos aqueles que provocam danos em materiais naturais ou manufacturados. Contudo, os produtos biocidas podem pôr em risco os seres humanos, os animais e o ambiente devido às suas propriedades intrínsecas e aos padrões de utilização que lhes estão associados.² Recentemente surgiu um novo regulamento relativo aos produtos biocidas que visa melhorar a livre circulação de produtos biocidas na União Europeia, assegurando simultaneamente um elevado nível de proteção da saúde humana e animal e do ambiente. As substâncias ativas necessitam de ser aprovadas antes de ser concedida uma autorização para um produto biocida que as contenha. O Comité dos Produtos Biocidas introduz critérios formais de exclusão e substituição que são aplicáveis à avaliação das substâncias ativas.³ Os biocidas deverão ser escolhidos em função da sua atividade contra os organismos alvo. A concentração utilizada deve ser seleccionada em função do organismo e da situação específica. O objetivo deverá ser a utilização da mais baixa concentração eficaz do biocida. O risco de danos para o ambiente, através da utilização de biocidas em tintas decorativas, deve ser minimizado. Nos impactos possíveis incluem-se emissões em locais de

fabrico, lixiviação de biocidas durante o uso e eliminação inadequada.⁴ Como tal, do ponto de vista da empresa (CIN – Corporação Industrial do Norte, S.A.), é importante controlar quantitativamente os biocidas presentes nas suas tintas, de modo a cumprir todos os regulamentos e mantendo a qualidade dos seus produtos, sem prejudicar a saúde humana, a saúde animal e o ambiente. A empresa já possui métodos para a quantificação dos biocidas, por cromatografia líquida, que mais comumente utiliza nas tintas e suas matérias-primas. De modo a diminuir o custo e o tempo de análise, o primeiro objetivo do presente trabalho é otimizar alguns destes métodos, desenvolver novos que permitam a quantificação de vários biocidas em simultâneo e, por fim, proceder à validação de todos os métodos analíticos alterados e criados.

Tal como referido anteriormente, para além da adição dos produtos biocidas, é também importante a realização de análises microbiológicas às tintas e suas matérias-primas. A empresa já possui um método eficaz para o efeito, porém, é demasiado moroso e não quantitativo. Deste modo, um segundo objetivo deste projeto é a implementação de um novo método de avaliação microbiológica rápida que, tal como o nome sugere, tem por finalidade diminuir o tempo de resposta.

Em algumas indústrias, parte do controlo de qualidade é realizado através da espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR). É uma técnica analítica útil que mede a quantidade de luz absorvida pela amostra em função do número de onda. Este método baseia-se em modos vibracionais de moléculas, principalmente, grupos funcionais C-H, O-H e N-H, que podem ser observados como sobretons e combinações no espetro NIR.⁵ A espectroscopia NIR tem crescido com grande importância na química analítica nas últimas duas décadas, devido às suas múltiplas vantagens.⁶ A CIN possui um FT-NIR com calibrações que permitem a identificação de matérias-primas e de produtos acabados por critério de aceitação/rejeição das diversas amostras. Como tal, um terceiro e último objetivo do presente trabalho é otimizar essas calibrações e desenvolver outras para novos produtos.

1.2. Entidade acolhedora

O Grupo CIN é um dos principais intervenientes no mercado das tintas e vernizes, liderando o mercado nacional desde 1992 e o mercado ibérico desde 1995.⁷ É constituído por nove fábricas distribuídas por vários países: Portugal, Espanha, França, Angola e Moçambique.⁸

A empresa-mãe do Grupo é a CIN - Corporação Industrial do Norte, S.A. e tem como atividade principal a produção e comercialização de tintas, vernizes e produtos afins.⁷ Possui tripla certificação QSA (Sistema Integrado de Gestão da Qualidade, Segurança e Ambiente): ISO 9001, ISO 14001, OSHAS 18001.⁸

A CIN dedica a sua atividade a distintos segmentos de mercado, tais como decorativos (abrange as tintas e vernizes de base aquosa e solvente, destinadas ao uso profissional ou ao DIY – *Do It Yourself*), indústria (primários, aditivos, diluentes, acabamentos e sistema Tintométrico ICS – *Industrial Colour System*), anticorrosão (proteção anticorrosiva de estruturas e equipamentos de aço e betão, quando expostas a vários ambientes agressivos, nomeadamente marítimos, químicos, urbanos e rurais) e acessórios.⁷

Com 100 anos de experiência no mercado, a CIN é considerada uma referência no campo da investigação e desenvolvimento de novos produtos, liderando desde sempre a criação das novas tendências para os mercados onde está presente. Em 1970 verificou-se um forte crescimento nas tintas decorativas, assim como a internacionalização da CIN que começou com a criação das Tintas CIN Angola, S.A.. Em 2010 inaugurou-se o novo Centro de Investigação & Desenvolvimento da CIN, na Maia. Em 2012, registou-se um aumento da capacidade produtiva da Megadur, fábrica de tintas em pó para o setor Industrial. Em 2013 implementou-se a CIN *Coatings* México, com o objetivo de intervir na venda e prestação de serviços na área da anticorrosão. Criou-se a CIN *Coatings* África do Sul, em 2014, com o objetivo de potenciar a intervenção da marca na área dos *Protective Coatings*.

A CIN tem uma política contínua de investigação, desenvolvimento e inovação de produtos que satisfaz as necessidades e solicitações presentes e futuras dos mercados e clientes, cumprindo integralmente os requisitos legais vigentes. O maior e mais importante centro I&D da CIN está localizado na Maia, tendo iniciado a sua actividade em janeiro de 2010. Este centro é constituído por laboratórios de I&D, de fabrico e de aplicações, departamento de colorimetria, laboratório analítico, laboratório de ensaios de envelhecimento acelerado, estação de ensaios de envelhecimento natural, salas de formação, de reuniões e *show-room*.

O controlo de qualidade de matérias-primas da unidade fabril CIN-MAIA e os ensaios analíticos para todo o grupo são efetuados no laboratório analítico. Atualmente, este laboratório possui, entre outros equipamentos, dois cromatógrafos gasosos, um deles com detector de massa (GC-FID e HS-GC-MS), dois espectrofotómetros de infravermelho (FT-IR e FT-NIR) e um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC). De um modo isolado ou em

combinação com outros, estes equipamentos permitem determinar o conteúdo de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis das tintas (COV e COSV), obter informações preciosas em situações de reclamação, identificar os constituintes relevantes em formulações desconhecidas, e ainda determinar a quantidade de componentes que se encontram presentes nas formulações das tintas.⁸

1.3. Noções gerais sobre tintas e vernizes

Tintas são misturas homogêneas de diversos componentes, que são aplicadas como um revestimento sobre os mais variados substratos, tais como rebocos, betão, gesso, telhas, plásticos, metais, madeira, pavimentos e outros, conferindo um efeito decorativo, protetor ou funcional. A composição básica de uma tinta apresenta os seguintes componentes: resinas, pigmentos, cargas, aditivos e solventes. As principais características de uma tinta são a cor, a viscosidade, a massa volúmica, a estabilidade, a aplicabilidade, a lacagem, a secagem (superficial, em profundidade ou endurecimento e para repintura/sobrepintura), a aderência, a espessura seca, a opacidade e o brilho.

Na proteção e decoração de superfícies também se aplicam vernizes. Estes últimos são uma composição não pigmentada líquida ou sólida, que quando aplicada em camada fina sobre uma superfície apropriada, no estado em que é fornecida ou após diluição, é convertível ao fim de certo tempo, numa película sólida, contínua, transparente ou translúcida. Existem vernizes para aplicação em diversos tipos de substratos, como por exemplo, madeira, metal, plástico e betão. No entanto, o seu uso típico é em madeiras.

1.4. Principais constituintes de uma tinta ou verniz

A proporção dos constituintes presentes numa formulação de tinta ou verniz depende da respetiva natureza do constituinte; da qualidade pretendida para a película, de acordo com o fim a que se destina a tinta; e de fatores económicos relativos ao mercado desses constituintes. Na Figura 1.1 está representada a composição genérica de uma tinta.

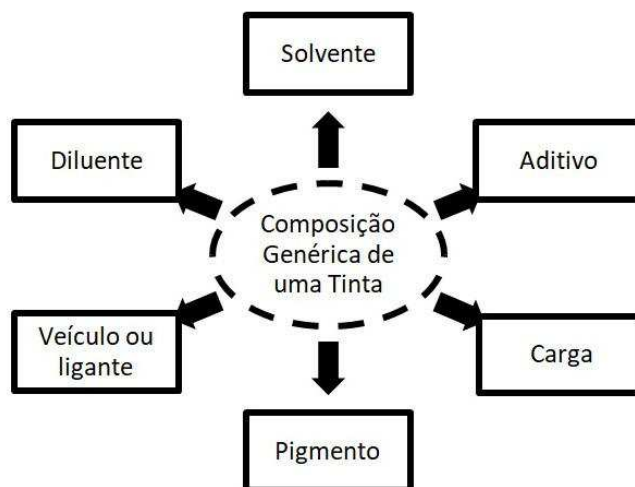


Figura 1.1 – Esquema representativo da composição genérica de uma tinta

1.4.1. Veículo ou ligante, solvente e diluente

O veículo fixo é o componente mais importante da tinta ou verniz, responsável pela formação de película, ou seja, pela camada contínua resultante da aplicação do revestimento sobre um substrato. O veículo fixo é constituído por um ou mais dos seguintes produtos: óleos secativos, resinas naturais ou sintéticas, produtos betuminosos ou outros.

O veículo volátil é componente da tinta ou verniz que se evapora durante o processo de secagem. É constituído por um ou mais solventes (líquidos voláteis, nas condições normais de secagem da tinta aplicada, capazes de dissolver o veículo fixo) e/ou diluente (líquido volátil, constituído por um ou mais solventes, parcial ou totalmente miscível com o veículo).

1.4.2. Pigmento

O pigmento é uma substância, geralmente no estado sólido, finamente dividida e praticamente insolúvel no veículo. De natureza orgânica ou inorgânica, os pigmentos são usados na preparação de tintas, com o fim de lhes conferir cor e opacidade, ou certas características especiais. Os pigmentos também possuem um papel relevante nas

propriedades mecânicas, brilho, resistência aos produtos químicos e envelhecimento do revestimento por pintura.

1.4.3. Carga

A carga é uma substância inorgânica (mineral) que se apresenta sob a forma de partículas mais ou menos finas. As cargas têm fraco poder de cobertura e são insolúveis no veículo, servindo para aumentar o teor de sólidos da tinta de forma económica. Certas cargas são empregues com o fim de ajustar o brilho, conferir textura ou outras características técnicas tais como isolamento, acústico e/ou térmico, resistência ao fogo, resistência à abrasão, entre outras.⁹

1.4.4. Aditivo

Os aditivos são componentes incorporados em pequenas quantidades nas tintas, vernizes e produtos similares que visam contribuir para facilitar o fabrico, melhorar a estabilidade da tinta na embalagem, facilitar a aplicação e resolver ou prevenir defeitos que possam surgir na película da tinta. Os aditivos são parte integrante da formulação das tintas e a sua escolha é um passo indispensável no desenvolvimento do produto.

Na CIN, estes componentes são usualmente agrupados consoante a função que cumprem e não pela sua composição química ou forma física que apresentam. Os aditivos mais frequentes são agrupados de acordo com a Tabela 1.1.¹⁰

Tabela 1.1 – Classificação dos aditivos de acordo com a sua função ⁹

Aditivo	Função
Anti-espuma	Diminuir ou evitar a formação de espumas indesejáveis durante o processamento e aplicação dos produtos.
Anti-pele	Impedir a formação de pele à superfície dos esmaltes alquídicos durante o armazenamento

Anti-sedimentante	Impedir a formação de sedimento (depósito) duro e não homogeneizável no fundo da embalagem.
Bactericida	Impedir o desenvolvimento de bactérias causadoras da putrefacção das tintas plásticas em fase líquida (durante o armazenamento).
Coalescente	Diminuir a Temperatura Mínima de Formação de Película (TMFP) de produtos aquosos.
Dispersante	Facilitar a dispersão dos pigmentos e cargas no veículo e prevenir a sua reaglomeração
Espessante	Provocar um aumento da viscosidade (consistência)
Fungicida	Impedir o desenvolvimento de fungos na película seca.
Inseticida	Assegurar a eliminação dos insetos que venham ao contacto com a película seca.
Molhante	Diminuir a tensão interfacial entre a fase sólida (pigmentos e cargas) e a fase líquida (veículo).
Plastificante	Conferir flexibilidade à película seca.
Secante	Reduzir o tempo de secagem dos produtos alquídicos à temperatura ambiente.

1.5. Biocidas

De acordo com o Decreto-Lei n.º 112/2010, de 20 de outubro, produtos biocidas são substâncias ativas e preparações que contenham uma ou mais substâncias ativas, apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador, que se destinam, por mecanismos químicos ou biológicos, a destruir, travar o crescimento, tornar inofensivo, evitar ou controlar de qualquer outra forma a ação de um organismo prejudicial e que se incluam num dos 23 tipos de produtos.¹¹

Os biocidas são utilizados para prevenir a contaminação microbiana e a deterioração de materiais e produtos como plásticos, tintas, papel, têxteis e pisos. Os biocidas podem ser incorporados em certos produtos para controlar o crescimento microbiano e prolongar a vida útil dos materiais.¹²

Em 2012 surgiu um novo regulamento relativo aos produtos biocidas que os classifica de acordo com 22 tipos, agrupados em quatro grupos principais: desinfetantes, conservantes, produtos de controlo de animais prejudiciais e outros produtos biocidas. Dado que os produtos biocidas utilizados como conservantes em géneros alimentícios e alimentos para

animais foram excluídos do âmbito do regulamento, o número atual de tipos de produtos inclui menos um do que a diretiva anterior.³

1.5.1. Regulamento relativo aos produtos biocidas

Durante a última década, tem sido dada uma atenção crescente aos efeitos ambientais do uso de biocidas, o que resultou numa legislação mais rigorosa nesta área. Alguns biocidas não são mais permitidos, enquanto outros foram sujeitos a uso restrito. A indústria deve seguir essas diretrizes desenvolvendo novas formas, mais compatíveis com o meio ambiente, para proteger seus produtos contra a deterioração microbiana.¹³

O regulamento relativo aos produtos biocidas (Regulamento (UE) n.º 528/2012) diz respeito à colocação no mercado e à utilização de produtos biocidas, que são usados para proteger seres humanos, animais, materiais ou artigos contra organismos prejudiciais, como parasitas ou bactérias, através da ação de substâncias ativas contidas no produto biocida. O regulamento visa melhorar o funcionamento do mercado dos produtos biocidas na UE, assegurando simultaneamente um elevado nível de proteção da saúde humana e do ambiente. É obrigatória uma autorização para todos os produtos biocidas antes de poderem ser colocados no mercado, e as substâncias ativas contidas no produto biocida devem ser previamente aprovadas. A fim de garantir um elevado nível de proteção da saúde e animal e do ambiente, as substâncias ativas consideradas mais perigosas não deverão ser aprovadas para utilização em produtos biocidas, exceto em circunstâncias específicas. Caso tenham propriedades perigosas intrínsecas, as substâncias ativas deverão ser designadas como candidatas a substituição. Ao autorizar produtos biocidas importa assegurar que, quando utilizados corretamente para os fins pretendidos, esses produtos são suficientemente eficazes e não têm efeitos inaceitáveis nos organismos visados, tais como o desenvolvimento de resistências. Além disso, não devem ter quaisquer efeitos inaceitáveis na saúde humana, na saúde animal ou no ambiente. Quando apropriado, importa estabelecer limites máximos de resíduos nos géneros alimentícios e nos alimentos para animais para as substâncias ativas contidas no produto biocida, a fim de proteger a saúde humana e animal.²

1.5.2. Aplicação de biocidas em tintas

Os biocidas são importantes na prevenção da biodeterioração de uma variedade de produtos, como cosméticos, produtos farmacêuticos, polímeros e tintas. A aplicação de biocidas em tintas de base aquosa é importante porque a presença de água, carbono (da resina) e carga mineral (nutrientes inorgânicos) torna este um meio apropriado para o desenvolvimento de uma variedade de microrganismos.¹⁴ A utilização adequada dos biocidas em tintas aquosas pode melhorar significativamente o período de estabilidade da tinta na embalagem, a proteção conferida ao substrato, o tempo de vida do revestimento e/ou o ciclo de manutenção necessário. Os biocidas são usados em tintas para fins específicos, tais como conservantes para produtos durante o armazenamento (biocidas *wet-state* ou *in-can*). Tal como referido anteriormente, a natureza aquosa destes produtos proporciona o crescimento de bactérias e fungos.⁴ Durante o armazenamento de tintas de base aquosa, as bactérias que podem estar presentes em determinadas matérias-primas encontram um ambiente favorável à sua proliferação. A contaminação também pode ocorrer devido à inadequada limpeza de equipamentos e tanques de armazenamento. Dentro da lata, existem locais com oxigénio (espaço vazio entre a tinta e a tampa da lata) que permitem o crescimento de bactérias aeróbicas e leveduras, e lugares sem oxigénio (em fase líquida) onde podem crescer bactérias anaeróbicas. A biodeterioração resultante leva a alterações na viscosidade e pH, produção de CO₂ (que pode causar espuma e deformação da lata) e, se houver bactérias redutoras de sulfato, um mau cheiro resultante da produção de H₂S. A adição de biocidas químicos para preservação em lata (biocidas *in-can*) e a implementação de um bom sistema de manutenção dos equipamentos podem evitar esse tipo de contaminação.¹⁴ Uma proteção insuficiente normalmente irá resultar na deterioração da tinta.

Os biocidas são também usados como produtos de proteção de películas, servindo de proteção para a película seca contra a deterioração e em casos extremos, danificação da película causada pelos microrganismos (biocidas *dry-film* ou *in-film*). Estas tintas e vernizes não são concebidos para proteger o substrato dos organismos, mas apenas para permitir que o revestimento decorativo desempenhe a sua função.⁴ Após a aplicação da tinta sobre uma superfície, o filme pode estar em contato com esporos fúngicos e algas. Esse tipo de contaminação pode levar à fragmentação do filme e à variação de cor (alterações estéticas indesejáveis). Para evitar esse tipo de contaminação, é importante usar fungicidas e algicidas.

Condições inadequadas de aplicação da tinta, como superfícies sujas, revestimentos antigos ou já contaminados por microrganismos, também podem contribuir para reduzir a durabilidade do filme.¹⁴ Uma proteção insuficiente resultará num revestimento inaceitável e, além disso, aumentará os ciclos de manutenção necessários.

A preservação de substratos é também uma das funções dos biocidas nas tintas. Estes são por vezes adicionados a tintas e vernizes para proteger o substrato inicial do ataque por organismos nocivos, destrutivos ou indesejáveis. Estes tipos de biocidas podem ser preservadores para madeira, onde o biocida se destina a evitar o desenvolvimento de fungos da madeira causado pela humidade; ou fungicidas adicionados a tintas para paredes interiores em que os produtos são concebidos para impedir a contaminação das paredes por fungos.⁴ Estes últimos são particularmente perigosos, uma vez que, ao contrário das algas, eles podem-se desenvolver tanto nas paredes externas como nas internas. A literatura aponta os fungos como o principal microrganismo responsável pela deterioração microbiológica das superfícies pintadas.¹⁴

1.5.3. Exemplos de biocidas utilizados em tintas

Neste subcapítulo serão apresentados alguns exemplos dos biocidas que mais comumente são utilizados em tintas.

1.5.3.1. Isotiazolonas

As isotiazolonas são biocidas de múltiplas funcionalidades que são amplamente utilizadas como poderosos conservantes para o controlo de microrganismos, tais como fungos e bactérias, em produtos industriais à base de água, como por exemplo produtos de limpeza, formulações de tintas, emulsões de resinas, adesivos e em cosméticos (produtos de higiene pessoal e de uso doméstico como champôs, outros produtos para cabelos e produtos para a pele, amaciadores, esmaltes, purificadores de ar, perfumes e desodorizantes).^{15, 16} As isotiazolonas são também utilizadas numa variedade de aplicações de tratamento de águas industriais para o controlo do crescimento microbiano e bioincrustação, apresentando eficácia e desempenho comprovados.¹⁷

Os biocidas à base de isotiazolonas estão entre os biocidas mais amplamente utilizados na proteção de tintas. Utilizam um mecanismo de ação que envolve dois passos, uma rápida

inibição (minutos) do crescimento e do metabolismo, que provém da capacidade das isotiazolonas passarem rapidamente para as paredes celulares dos fungos, seguida de dano celular irreversível, uma vez que reagem com proteínas intracelulares importantes que contêm enxofre ou com moléculas mais simples no interior da célula, provocando um enfraquecimento da função celular, resultando em perda de viabilidade (horas).^{14, 17}

O 1,2-benzisotiazolin-3-ona (BIT) é um dos biocidas químicos mais utilizados em produtos industriais, que possui uma estrutura heterocíclica e uma ampla gama de atividade antimicrobiana. Tem sido constatado que o BIT reage com proteínas contendo tiol em microrganismos alvo e é particularmente eficaz contra células ativamente metabolizantes. É amplamente utilizado em embalagens de alimentos, bem como em produtos industriais e de consumo, tais como: adesivos, detergentes para loiças e roupas, produtos de limpeza e desinfetantes, purificadores de ar, produtos para cuidados pessoais, protetores solares e tintas e outros produtos de revestimento.¹⁸ Os biocidas BIT também têm sido utilizados numa gama limitada de aplicações industriais que requerem preservação a longo prazo para o controlo bacteriano, incluindo os sistemas de arrefecimento de circuito fechado.¹⁷ Os regulamentos atuais impõem limitações rigorosas na sua concentração devido à sua toxicidade.¹⁸ Quando utilizado em tintas, o BIT apresenta uma função de conservante em lata.¹⁹ A sua estrutura molecular encontra-se representada na Figura 1.2 (a).

O produto mais frequentemente utilizado é uma mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMIT) e 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MIT) numa proporção de 3:1.¹⁷ O CIT-MIT tem sido usado com sucesso como conservante numa variedade de produtos industriais e de consumo há mais de 20 anos, como emulsões aquosas, tintas de base aquosa e outros revestimentos industriais à base de água, apresentando uma ampla eficácia contra bactérias, algas e fungos.^{17, 20, 21} Quando utilizado em tintas, o CMIT-MIT apresenta uma função de conservante em lata.¹⁹ A concentração da mistura é regulada pela União Europeia (UE) para valores inferiores a 15 miligramas por litro.¹⁵ Embora o MIT seja o menos ativo dos 2 componentes, considera-se que tanto o CMIT como o MIT são biologicamente funcionais.²¹ A utilização do biocida MIT sem o CMIT é permitida e em concentrações bastante superiores às definidas para a mistura CMIT-MIT.¹⁵ Por exemplo, o mais recente biocida de isotiazolona para sistemas de água industrial é baseado apenas no ingrediente ativo MIT.¹⁷ Este biocida é utilizado para a preservação de produtos industriais e de cuidados pessoais.²¹ As estruturas moleculares dos biocidas CMIT e MIT encontram-se representadas na Figura 1.2 (b) e (c), respetivamente.

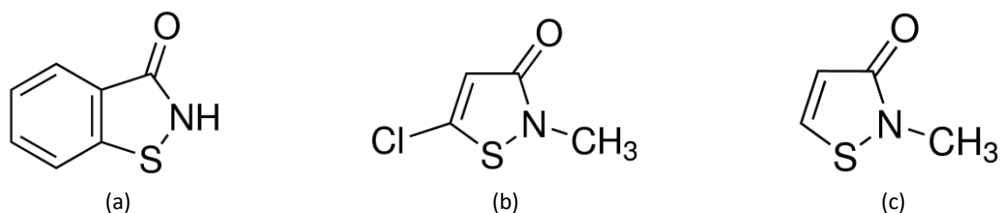


Figura 1.2 – Estruturas moleculares dos biocidas BIT (a), CMIT (b) e MIT (c) ²²

O 2-octil-4-isotiazolin-3-ona (OIT) é usado predominantemente como um fungicida para proteção de filmes em revestimentos de superfície. Apesar de ser um conservante de filme eficaz, é propenso a lixiviação sob condições húmidas devido à sua alta solubilidade em água, resultando em concentrações aumentadas necessárias durante o processamento inicial.¹² Este biocida é utilizado para a preservação de produtos industriais e de cuidados pessoais, apresentando funções de fungicida. Quando utilizado em tintas, o OIT pode também exercer uma função de conservante em lata.^{19, 21} Na Figura 1.3 encontra-se a sua estrutura molecular.

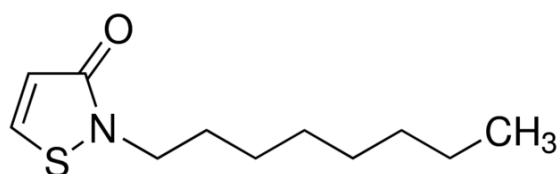


Figura 1.3 – Estrutura molecular do OIT ²²

O 4,5-dicloro-2-octil-4-isotiazolin-3-ona (DCOIT) é o ingrediente ativo numa série de formulações comercializadas.²³ Recentemente surgiu uma nova tecnologia que utiliza o DCOIT como um algicida para o tratamento da água de arrefecimento e como um fungicida para aplicações em fábricas de papel.¹⁷ Este biocida exerce também uma função bactericida quando utilizado noutro tipo de produtos, tais como tintas.¹⁹ A sua estrutura molecular encontra-se representada na Figura 1.4.

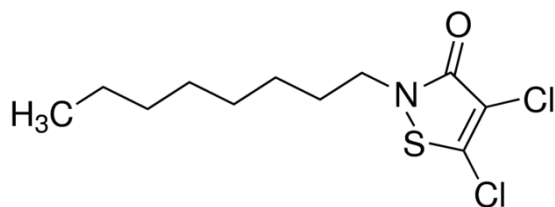


Figura 1.4 – Estrutura molecular do DCOIT ²²

1.5.3.2. Carbamatos

Os compostos pertencentes à família dos carbamatos são também utilizados como biocidas, mais concretamente como inseticidas. A sua ampla utilização deve-se à sua eficiência no controlo de insetos e também ao facto de terem uma degradação relativamente rápida após a sua aplicação.²⁴ Devido ao seu amplo espectro de atividade biológica, os carbamatos podem ser usados como inseticidas, miticidas, fungicidas e moluscicidas. A sua utilização para o controlo de pragas tem aumentado progressivamente durante as últimas décadas, juntamente com os organofosforados, como alternativas aos inseticidas organoclorados, devido à sua alta eficácia em numerosas pragas.^{25, 26} Estes insecticidas neurotóxicos são termicamente instáveis e podem ser encontrados nos alimentos. Os resíduos de carbamato são uma preocupação para o controlo de alimentos porque alguns compostos têm alta toxicidade.^{25, 27}

Os mecanismos de ação dos carbamatos ocorrem em humanos e outros mamíferos e baseiam-se principalmente na inibição da acetilcolinesterase, uma das importantes enzimas do sistema nervoso em insetos que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina.^{26, 27}

O 3-iodo-2-propinil-N-butilcarbamato (IPBC) é um derivado de carbamato contendo iodo e que exibe uma forte actividade antifúngica. O IPBC tem sido usado há anos como fungicida industrial, principalmente para preservação de madeira e tintas.²⁸ É um carbamato insaturado halogenado com aplicações cosméticas e farmacêuticas amplamente difundidas. O IPBC é um pó cristalino branco que tem pouca solubilidade em água e a sua estrutura molecular encontra-se na Figura 1.5.²⁹

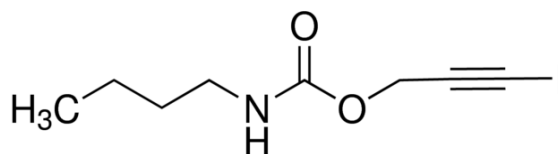


Figura 1.5 – Estrutura molecular do IPBC²²

O seu modo de ação está relacionado com a presença de iodo. Este último apresenta um forte poder de penetração celular, induz a precipitação de proteínas e a desnaturação da oxidação de proteínas e enzimas essenciais, interferindo assim nas reações metabólicas essenciais dos microrganismos.

O IPBC é seguro em termos de toxicidade ou irritação da pele quando usado em concentrações inferiores a 0,1 %. As suas aplicações foram ampliadas para uma variedade de produtos cosméticos, incluindo champôs, loções, pós, maquiagem, produtos para bebês e lentes de contato.²⁸ O IPBC é considerado seguro como conservante cosmético. No entanto, o uso disseminado do produto químico pode levar a níveis crescentes de alergia de contato e, deste modo, é importante uma monitorização rigorosa deste biocida.³⁰

1.5.3.3. Piretróides

Os inseticidas, como os piretróides sintéticos, são amplamente utilizados para o controlo de pragas de insetos na agricultura, bem como para a proteção da saúde pública. São responsáveis por cerca de 35 % da quota global do mercado dos inseticidas. Grande parte do uso de piretróides ocorre dentro e em redor de residências para erradicar determinadas espécies.³¹ Estes pesticidas têm sido utilizados por todo o mundo desde a década de 1980 devido ao seu alto nível de eficácia e baixa toxicidade em comparação com outros inseticidas.³² Na verdade, os piretróides são relativamente não tóxicos para aves e mamíferos, com alta eficácia em concentrações relativamente baixas.³³ Com base na sua estrutura molecular, eles podem ser divididos em piretróides agrícolas (com toxicidade média) e piretróides urbanos (com toxicidade baixa) usados, principalmente, para a agricultura e para o controlo de pragas não agrícolas, respetivamente. Estes inseticidas também desempenham um papel vital em produtos de cuidados pessoais, tais como champô e perfume.³²

Os piretróides utilizam várias vias para causar danos no sistema nervoso em invertebrados. Uma delas é a interferência com a ativação do canal de sódio nas terminações das células nervosas. Ao agir sobre os canais de sódio para despolarizar os terminais pré-sinápticos, os inseticidas piretróides paralisam os organismos, limitando severamente a neurotransmissão.³⁴

Existe uma preocupação crescente com os possíveis efeitos dos piretróides no desenvolvimento imunológico e neurocomportamental, na saúde respiratória e na função reprodutiva de humanos adultos. A exposição a piretróides também foi identificada como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de tumores cerebrais na infância.³¹ Em comparação com os pesticidas tradicionais, os piretróides têm menos potencial para poluir o meio ambiente, no entanto, podem entrar nos organismos através dos produtos alimentares.^{32, 35} A longo prazo, a exposição a uma dose baixa de piretróides pode causar

doenças crónicas e ter efeitos tóxicos sobre os sistemas nervoso, imunológico, cardiovascular e genético dos organismos.

Nos últimos anos, a bifentrina, a cipermetrina e a deltametrina têm sido amplamente utilizadas.³² A bifentrina é um inseticida piretróide sintético de terceira geração, caracterizado por uma forte persistência ambiental e uma alta atividade inseticida. É eficaz como inseticida de contato, sendo que afeta o sistema nervoso de vertebrados e invertebrados. A bifentrina é altamente tóxica para peixes e organismos aquáticos, pelo que não deve ser aplicada perto de fontes de água. Este inseticida é relativamente benigno para aves e mamíferos, mas o seu alto fator de bioconcentração pode afetar predadores de alto nível.³⁴ Na Figura 1.6 encontra-se a estrutura molecular da bifentrina.

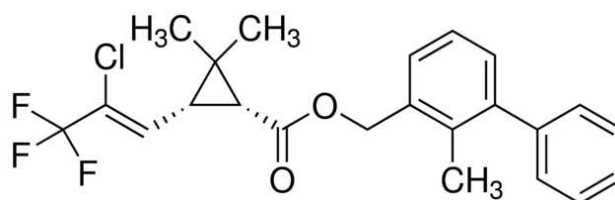


Figura 1.6 – Estrutura molecular da bifentrina ²²

A cipermetrina tem sido amplamente utilizada para o controlo de pragas, incluindo pragas de ambientes fechados, e ainda em diferentes produções agrícolas durante muitos anos. A cipermetrina apresenta baixa persistência e toxicidade para organismos não-alvo, sendo um dos cinco piretróides mais utilizados do mundo. Este piretróide é libertado diretamente no meio ambiente, principalmente por escoamento e entrada em bacias hidrográficas, sendo que surgiu como um contaminante aquático comum. Por este motivo, a cipermetrina foi encontrada em águas superficiais, sendo que existem preocupações generalizadas sobre os impactos ambientais adversos e potenciais riscos ecológicos de saúde induzidos pela exposição à cipermetrina.^{36, 37} Na Figura 1.7 encontra-se a sua estrutura molecular.

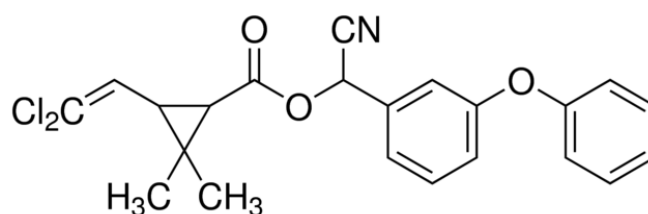


Figura 1.7 – Estrutura molecular da cipermetrina ²²

A deltametrina é um inseticida piretróide largamente utilizado em diferentes controlos de pragas, agrícolas e domésticas, para erradicar ácaros, formigas e besouros. É aplicada em casas e jardins sob a forma de *spray* para moscas, tiras para pragas, conservantes de madeira, produtos para matar baratas, veneno para ratos e champô para piolhos. A deltametrina é considerada a classe mais segura de inseticidas disponível com relativamente baixa toxicidade em mamíferos. Os produtos que contêm deltametrina estão amplamente disponíveis no mercado e são fáceis de adquirir nas lojas do dia-a-dia.³³ Na Figura 1.8 encontra-se a estrutura molecular da deltametrina.

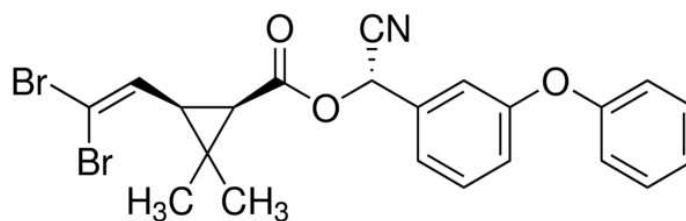


Figura 1.8 – Estrutura molecular da deltametrina²²

1.5.3.4. Formaldeído

O formaldeído é amplamente utilizado como conservante em produtos de higiene pessoal e cosméticos e ainda em produtos para uso doméstico. O formaldeído é também usado em produtos de limpeza e numa ampla gama de produtos industriais, como adesivos, tintas e lacas.³⁸ Este biocida tem ainda sido largamente usado como fixador de tecidos e explorado para estudar interações DNA-proteína.³⁹ À temperatura ambiente, o formaldeído é um gás incolor com um odor característico facilmente reconhecível.³⁸ O formaldeído está presente no ambiente, uma vez que pode ser libertado em múltiplas reações químicas, como a combustão de madeira, tabaco e gás natural. Pode ainda ser derivado de alguns componentes de ampla variedade de alimentos, incluindo café, caviar, presunto defumado e bacalhau.^{38, 39} No entanto, uma grande carga de formaldeído também pode ser originada endogenamente como resultado de metabolismos celulares. A estrutura molecular do formaldeído encontra-se na Figura 1.9.

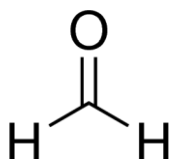


Figura 1.9 – Estrutura molecular do formaldeído²²

O formaldeído é uma toxina ambiental que foi classificada como um carcinogénico conhecido para humanos e animais pela Agência Internacional de Pesquisa em Cancro. Embora a exposição ambiental ao formaldeído seja um risco bem estabelecido para a saúde humana, relatórios recentes indicam que o formaldeído produzido endogenamente também representa uma ameaça significativa.³⁹ O seu amplo espectro de ação antimicrobiana faz do formaldeído um bom conservante, explicando o motivo de este ser utilizado numa grande variedade de produtos. No entanto, apesar da sua capacidade de eliminar uma ampla gama de bactérias e fungos, o uso de formaldeído diminuiu consideravelmente devido a preocupações com a sua toxicidade.³⁸

O formaldeído pode ser originário de duas fontes exógenas, o ambiente e a dieta. O corpo humano pode ser exposto a formaldeído por inalação direta ou ingestão de produtos contendo formaldeído ou moléculas que podem ser metabolizadas em formaldeído. Poluição industrial, combustão de biomassa, produtos domésticos, cosméticos e tabagismo são, provavelmente, as principais fontes de formaldeído no ambiente. A dieta pode também ser uma fonte significativa de formaldeído. O metanol, o álcool mais simples, é produzido pelas bactérias intestinais presentes nas pectinas de frutas e vegetais. Este álcool é rapidamente absorvido pelo organismo e metabolizado em formaldeído. Vários xenobióticos e compostos químicos são também absorvidos no trato gastrointestinal e metabolizados em metanol e/ou formaldeído.³⁹ Embora certos produtos não contenham formaldeído, estes contêm substâncias que podem libertar formaldeído à medida que se decompõem ou substâncias que foram sintetizadas com formaldeído. Os libertadores de formaldeído também são usados como conservantes em cosméticos e em produtos domésticos e industriais.³⁸ Quando utilizados em tintas, os libertadores de formaldeído exercem uma função de conservantes em lata.¹⁹



CAPÍTULO 2

2. Fundamentação

Neste capítulo serão abordados diversos temas, nomeadamente, as técnicas instrumentais empregues no presente trabalho, alguns métodos para quantificação por HPLC, estatística aplicada à validação de métodos analíticos e a própria validação, e ainda quimiometria.

2.1. Técnicas instrumentais

Neste subcapítulo serão abordadas as técnicas instrumentais que foram empregues durante o projeto, nomeadamente, cromatografia líquida de alta eficiência, ATP-bioluminescência e espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier.

2.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é uma técnica analítica que tem por objetivo a separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra, baseada na sua estrutura química e propriedades físico-químicas. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma estacionária e outra móvel. Esta última é uma fase líquida que se movimenta através de uma coluna, que contém a fase estacionária, arrastando os componentes da amostra. As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de diferentes graus de interação com as fases móvel e estacionária e, por conseguinte, as suas velocidades de eluição ao longo da coluna são igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. As partículas que interatuam mais fortemente com a fase estacionária tenderão a mover-se mais lentamente através dela do que aquelas que apresentem interações de menor intensidade. Assim, diferentes tipos de solutos podem ser separados à medida que se movem na coluna.

A cromatografia líquida separa as espécies químicas consoante as suas funções moleculares e por conseguinte é um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de amostras.⁴⁰ Neste tipo de cromatografia, uma amostra líquida, ou uma amostra sólida dissolvida num solvente adequado, é arrastada através de uma coluna de cromatografia por uma fase móvel líquida.⁴¹ A coluna cromatográfica é constituída por um cilindro rígido no interior do qual se encontra um material de enchimento formado, em geral, por pequenas partículas de sílica, cuja superfície pode, ou não, estar modificada.⁴² Esta técnica utiliza bombas de alta pressão para forçar a passagem do eluente através de colunas empacotadas com partículas finas (diâmetro compreendido entre 3 – 10 μm), que originam separações de elevada resolução, uma vez que a eficiência de uma coluna de empacotamento aumenta à medida que o tamanho das partículas da fase estacionária diminui. Tal permite melhorar a resolução ou então manter a mesma resolução e diminuir o tempo de separação.⁴³ A cromatografia líquida de alta eficiência pode ser realizada em fase normal ou fase reversa. A primeira ocorre quando as partículas de sílica da fase estacionária não têm qualquer modificação da superfície, enquanto, na segunda, a fase estacionária é constituída por partículas de sílica revestidas por um filme de polialquilsiloxano. O octadecil (C18) e o octil (C8) são os dois alquilos mais utilizados em colunas de fase reversa.⁴² Os grupos alquilo são apolares, conferindo assim um carácter apolar à fase estacionária de uma separação de fase reversa, ao contrário do que acontece numa separação de fase normal.⁴¹ A fase móvel é constituída por solventes polares quando a separação é de fase reversa, tais como água, metanol e acetonitrilo, e por solventes apolares quando a separação é de fase normal, como por exemplo, o n-hexano.⁴³ Geralmente, as separações por HPLC são utilizadas em substâncias termicamente instáveis.⁴²

No final da separação cromatográfica obtém-se um cromatograma que representa o registo do sinal do detetor ao longo do tempo. A Figura 2 mostra um cromatograma típico de uma mistura de dois solutos, sendo que cada pico corresponde à eluição do respetivo soluto. A avaliação da separação é feita através de alguns parâmetros, tais como, a resolução, a capacidade de retenção, a seletividade e a eficiência da separação.⁴⁰

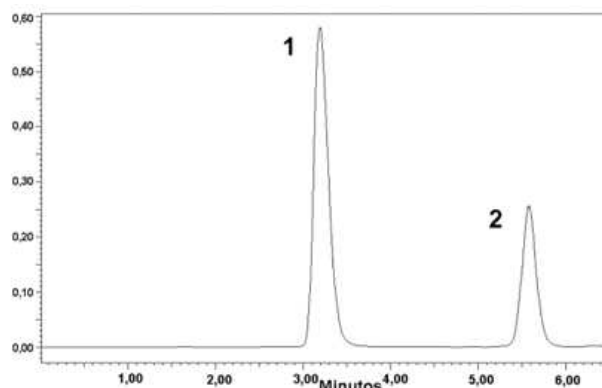


Figura 2.1 - Cromatograma típico de uma mistura de dois solutos detetáveis pelo sistema detetor ⁴⁰

O tempo de retenção de uma substância corresponde ao tempo do aparecimento do respetivo pico e é um parâmetro característico de cada composto, desde que não variem as condições operacionais da separação cromatográfica. A alteração das condições operacionais irá provocar alterações no tempo de retenção das espécies eluídas. Estas alterações podem ser ao nível da temperatura da coluna, do caudal e da natureza da fase móvel, do comprimento da coluna e do tipo de fase estacionária utilizada. ⁴²

2.1.1.1. Reservatórios de solvente. Fase móvel

Atendendo à complexidade de algumas matrizes de amostra bem como à diversidade de analitos presentes que se pretende resolver, uma característica importante da instrumentação de HPLC é a presença de vários reservatórios de solvente, pois o controlo da polaridade da fase móvel (poder de eluição) desempenha um papel importante no sucesso de uma separação por cromatografia líquida. A disponibilidade de vários reservatórios de solventes permite que a composição da fase móvel possa ser rápida e facilmente selecionada e variada ao longo da separação. Isto é essencial quando se utiliza eluição gradiente, para a qual a composição da fase móvel é sistematicamente alterada ao longo da separação. ⁴¹ Numa separação de fase reversa de uma mistura, o aumento da polaridade da fase móvel leva a tempos de retenção mais longos, enquanto que os tempos de retenção mais curtos são provocados por uma fase móvel de menor polaridade. ⁴³ Para além dos aspetos relacionados com a separação, a fase móvel deve também dissolver a amostra sem a decompor nos seus componentes e não inutilizar a fase estacionária; deve também ter baixa viscosidade e ser compatível com o tipo de detetor. ⁴²

Antes de serem utilizados, os solventes da fase móvel devem ser tratados para remover partículas sólidas em suspensão, tais como poeiras e gases dissolvidos, tais como os principais constituintes do ar, N_2 e O_2 , uma vez que, devido ao aumento da pressão, a solubilidade dos gases diminui, levando ao aparecimento de bolhas gasosas que provocarão um aumento do ruído no sinal do detetor.⁴¹ Além disso, o oxigênio absorve radiação ultravioleta de comprimento de onda compreendido entre 200 – 250 nm, interferindo com a detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta.⁴³ As partículas presentes nos solventes, capazes de obstruir as tubagens ou contaminar as bombas e a própria coluna, são previamente removidas por filtros de porosidade compreendida entre 10 – 40 μm .⁴² A formação de partículas no reservatório de solventes é também removida por filtros situados dentro de cada reservatório (Figura 2.2). Os solventes usados na preparação da fase móvel devem também possuir grau de pureza específico para HPLC, sendo designados como “HPLC grade”. Deste modo, evita-se a degradação precoce de colunas habitualmente de elevado custo e minimiza-se as oscilações da linha de base provocadas pela presença de contaminantes.⁴³



Figura 2.2 - Filtro do reservatório de solventes

2.1.1.2. Bomba

Os solventes da fase móvel são puxados dos seus reservatórios através da ação de uma bomba, que pode ser isocrática, binária, ternária ou quaternária dependendo da sua capacidade para bombear, respetivamente, um, dois, três ou quatro solventes em simultâneo. Deve ter capacidade para produzir pressões elevadas (400 bar) e, no caso de não ser isocrática, deve possibilitar a programação da combinação dos solventes utilizados como fase móvel. É também importante que os seus componentes sejam resistentes à corrosão e que possua um intervalo de caudais de 0,1 a 10 mL/min.^{41, 42} A qualidade de uma bomba para HPLC é medida por quão estável e reprodutível é o fluxo que consegue produzir. Um fluxo flutuante pode criar ruído no detetor, suficiente para mascarar sinais de baixa intensidade.⁴³

Existem dois tipos de eluição, isocrática e gradiente. Na eluição isocrática a composição da fase móvel permanece constante ao longo de toda a análise, sendo capaz de separar um número limitado de analitos. É a eluição mais simples e tem uma certa dificuldade em eluir todos os solutos com boa resolução e num tempo razoável. É igualmente difícil encontrar uma única composição de fase móvel que seja adequada para todos os solutos. Por outro lado, na eluição gradiente a composição da fase móvel varia durante a separação, podendo-se tratar de uma variação gradual, linear ou não-linear.⁴¹ É especificamente eficiente quando os componentes da amostra diferem muito em polaridade e permite a separação de amostras mais complexas. Outra vantagem desta eluição é o melhoramento da resolução dos cromatogramas, com redução do tempo de análise e aumento da seletividade, uma vez que é possível a separação de picos muito próximos numa parte do cromatograma sem alterar a resolução dos picos noutras regiões.⁴² No caso da separação de fase reversa, a composição inicial de fase móvel é relativamente polar, sendo que, quando a separação progride, a composição da fase móvel vai-se tornando menos polar.⁴¹

2.1.1.3. Injetor

Um bom sistema de injeção deve ter a menor contribuição possível para o alargamento das bandas dos componentes e deve ser quimicamente inerte tanto para o eluente como para a amostra. Deve ainda ser reprodutível e capaz de operar a altas pressões.⁴² A pressão de funcionamento típica de um HPLC é suficientemente elevada (200 bar), logo a amostra é introduzida através de um injetor em *loop*.⁴¹ Gradientes constituídos até um máximo de quatro solventes são criados passando os líquidos através de uma válvula de quatro vias a baixa pressão e, em seguida, bombeando a mistura a alta pressão para a coluna. A válvula de injeção, tal como mostra a Figura 2.3, tem *loops* intercambiáveis, cada um dos quais retém um volume fixo. *Loops* de diferentes tamanhos retêm volumes que vão desde 2 a 1000 μL , mas o volume habitual é da ordem de 10-20 μL . Na posição de carregamento, uma seringa de capacidade superior ao *loop* é usada para lavar e carregar com a amostra à temperatura ambiente. O fluxo de alta pressão da bomba para a coluna passa através do segmento inferior esquerdo da válvula. Quando a válvula sofre rotação de 60° no sentido horário, o conteúdo do *loop* da amostra é injetado na coluna a alta pressão.

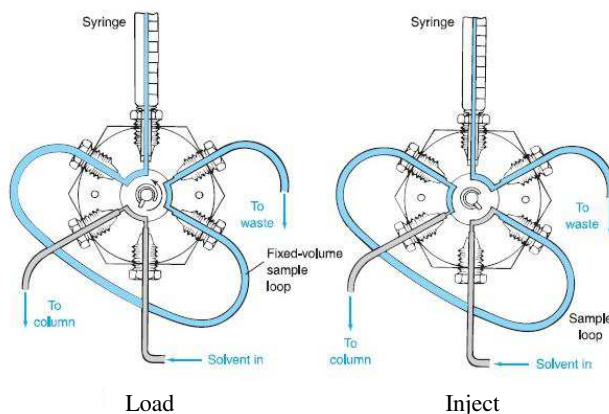


Figura 2.3 - Válvula de injeção⁴³

2.1.1.4. Coluna

As colunas são dispendiosas e facilmente degradadas quer por acumulação de micropartículas sólidas ou partículas cedidas pela amostra, quer por adsorção irreversível de impurezas da amostra ou do solvente. Assim, partículas finas e solutos fortemente adsorvidos são retidos na pré-coluna, que é periodicamente substituída quando a pressão da coluna aumenta ou após um determinado número de injeções ou tempo de utilização.⁴³ No entanto, é também necessário ter algum cuidado com as amostras, tal como centrifugar e/ou filtrar antes de serem colocadas em *vials* para um amostrador automático ou levadas para uma seringa para uma injeção manual.

A escolha de uma coluna apropriada é um ponto crítico para o sucesso da análise, uma vez que o seu tamanho pode afetar a resolução da separação dos diferentes constituintes da amostra mas, mais importante, pode afetar a velocidade da fase móvel.⁴² Para uma coluna de menor diâmetro interno é necessário menor quantidade de solvente para que a separação se observe.⁴³ As colunas mais comumente usadas para HPLC são construídas a partir de aço inoxidável, com diâmetros internos entre 2,1 mm e 4,6 mm, e comprimentos que variam de cerca de 30 a 300 mm. Estas colunas são empacotadas com partículas de sílica porosa, de forma maioritariamente esférica (diâmetro 3 – 10 μm).⁴¹ O suporte mais comum são partículas esféricas de sílica, microporosas e de elevada pureza. Estas partículas são permeáveis ao solvente e têm uma área superficial de várias centenas de metros quadrados por grama. A maioria da sílica com superfície não modificada não pode ser utilizada acima de pH 8, enquanto a modificada com polialquilsiloxano não pode ser exposta a pH inferior a 2. A fase

estacionária C18 é a mais utilizada em HPLC e separa uma ampla variedade de substâncias quando o solvente é escolhido criteriosamente.

A temperatura da coluna é um dos fatores que afeta a separação cromatográfica. Aquecer uma coluna de cromatografia normalmente diminui a viscosidade do solvente, reduzindo a pressão necessária ou permitindo um fluxo mais rápido. O aumento da temperatura reduz os tempos de retenção e poderá melhorar a resolução uma vez que a difusão dos solutos é acelerada. No entanto, o aumento da temperatura pode provocar o aparecimento de bolhas gasosas provenientes da evaporação parcial da fase móvel, a degradação da fase estacionária e, conseqüentemente, a diminuição do tempo de vida da coluna.⁴³

2.1.1.5. Detetor

O detetor permite monitorizar o eluato que sai da coluna, dando preferência à deteção dos solutos. Para isso, precisa de ter sensibilidade distinta para os solutos e para a fase móvel.⁴² Um detetor ideal, de qualquer tipo, é sensível a baixas concentrações de todos os analitos, proporciona respostas lineares e não alarga os picos eluídos. Para prevenir o alargamento do pico, o volume do detetor deve ser menor do que 20% do volume correspondente ao pico cromatográfico.⁴³ O sistema de deteção deve idealmente apresentar uma resposta rápida, uma vez que um detetor lento provoca o aparecimento de picos deformados (baixos e largos) e com cauda longa. Além disso, um bom detetor tem de detetar uma mudança na composição da fase móvel, convertê-la num sinal elétrico e enviá-lo para o registador.⁴² Deve, também, ser insensível a mudanças de temperatura, composição do solvente e velocidade do fluxo.⁴³ Atualmente existe uma vasta gama de detetores para HPLC, tais como o detetor UV-Vis, o detetor de índice de refração, o detetor fluorimétrico, o detetor eletroquímico e o detetor de condutividade elétrica (utilizado em cromatografia iónica). Os detetores UV-Vis são os mais comuns em HPLC pois apresentam o menor custo, são praticamente insensíveis a pequenas variações de fluxo e temperatura, totalmente compatíveis para gradientes de solventes, e também porque muitos solutos absorvem a luz UV.^{40, 43}

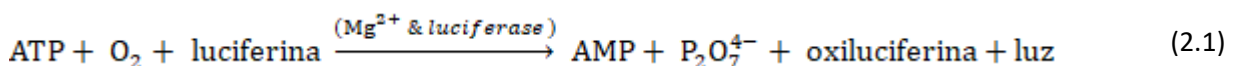
2.1.2. ATP-bioluminescência

Devido à sua composição, as tintas de base aquosa proporcionam um ambiente favorável à proliferação de microrganismos. Uma alta carga biológica (bactérias, fungos, algas, entre outros) pode afetar a qualidade e causar mau funcionamento no processo de produção. Para evitar estes efeitos prejudiciais, é necessário gerir, rigorosamente, a qualidade das matérias-primas, produtos intermédios ou produtos acabados. As indústrias utilizam, normalmente, tratamentos químicos preventivos (agentes biocidas) e realizam análises microbiológicas para monitorizar a contaminação microbiana de matérias-primas e produtos acabados e, por vezes, para monitorizar materiais ao longo do processo de produção. No entanto, estas análises nem sempre contabilizam a grande diversidade de micróbios que podem proliferar nestes ambientes nutricionais especializados.¹

A adenosina trifosfato (ATP) é um nucleótido multifuncional usado para transportar energia química dentro das células para o metabolismo. Uma molécula de ATP é constituída por uma molécula de adenosina, que consiste numa base azotada de adenina e um açúcar de ribose, e três grupos fosfato. Todas as células vivas e saudáveis contêm ATP. A sua deteção e quantificação fornecem uma correlação direta do número de células microbianas vivas.⁴⁴

O sistema de ATP-bioluminescência é um dos benefícios obtidos através de pesquisas realizadas com organismos bioluminescentes. Esta técnica utiliza a enzima luciferase, derivada de pirilampos, que é altamente sensível à presença de ATP.

As moléculas de ATP reagem com o complexo enzimático luciferina-luciferase.⁴⁵ Durante a reação, o ATP é desfosforilado para adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato. Esta reação liberta luz, tal como demonstrado na equação (2.1):⁴⁴ para cada molécula de ATP consumida é gerado um fóton de luz e a intensidade da luz é medida através de um luminómetro. Portanto, quanto maior a concentração de ATP na superfície, maior será a intensidade de luz emitida, expressa em URL (Unidades Relativa de Luz).



Pode-se definir como “rápido” qualquer método destinado à deteção, contagem e caracterização de microrganismos do qual se obtém resultados de forma simples, confiável e em menor tempo do que com os métodos convencionais. A rapidez da leitura dos resultados com o método ATP-bioluminescência é uma das principais vantagens para sua aplicação,

embora esta técnica seja pouco sensível para contagens baixas de UFC (Unidades Formadoras de Colónias).⁴⁵

Ao contrário das análises genéticas que dependem da especificidade do DNA, ou análises imunológicas que dependem da especificidade do antigene, a medição de ATP não identifica nenhuma espécie microbiana.

2.1.2.1. ATP 2G - tecnologia de segunda geração

As primeiras ferramentas de medição de ATP apareceram na década de 1970, tendo-se tornado mais comuns durante as décadas de 1980 e 1990 e foram relativamente bem sucedidas, apesar das aplicações limitadas.

A medição de ATP de segunda geração é muito mais poderosa devido aos principais avanços da biotecnologia, tais como a microfiltração, a lise celular e a padronização. Relativamente à microfiltração, o facto de inserir uma membrana microporosa permite que as células viáveis sejam retidas, enquanto os compostos residuais que podem interferir no sinal luminescente são eliminados. Tal minimiza a interferência e o ruído de fundo. A microfiltração fornece uma vantagem principal adicional, nomeadamente, a separação do ATP extracelular livre (liberado pelas células mortas) e do ATP intracelular (contido nas células vivas). Estes recursos aumentam muito a sensibilidade e a precisão da medição. Outro avanço importante é a etapa da lise celular, uma vez que o conjunto de enzimas tem uma ampla gama de ação e atividade aumentada, e pode extrair até 99,99 % do material celular, pelo que a medição do ATP é mais representativa do conteúdo biológico real. A calibração do dispositivo fornece uma escala de conversão entre a medição física (URL – Unidades Relativas de Luz) e uma medição biológica (pg ATP/mL ou EM/mL). Os resultados são, portanto, mais relevantes. Mais importante ainda, esta conversão em unidades biológicas permite que sejam feitas comparações entre medições feitas por diferentes luminómetros em locais diferentes. Tal otimiza a coordenação de dados (histórico, comparativo) para o utilizador.

Assim, a tecnologia ATP de segunda geração melhora o desempenho analítico da medição de ATP tradicional e disponibiliza-a para uma maior variedade de aplicações.

2.1.2.2. Kit de análise microbiológica rápida

A melhor solução para a indústria química é a rápida e precoce detecção da contaminação microbiológica e a criação de ações pró-ativas em vez de tratamentos corretivos.¹

Os kits de análise microbiológica rápida baseiam-se na medição de ATP, sendo que existem vários para diferentes matrizes.⁴⁶ Por exemplo, existe um kit de teste concebido para amostras de base aquosa não filtráveis e de elevado teor de sólidos, tendo como objetivo a monitorização microbiana em tempo real de produtos industriais que exigem preservação, tais como tintas, emulsões e revestimentos.¹ Fornece uma medição em tempo real da atividade microbiana total em matérias-primas, produtos intermédios e produtos acabados. Este kit determina a quantidade precisa de ATP extracelular, que corresponde ao ATP libertado pelas células mortas e se encontra fora das mesmas, e de ATP total. Estes valores podem ser usados para determinar a quantidade de ATP intracelular, que corresponde ao ATP contido dentro das células vivas e que, por sua vez, determina o número de microrganismos viáveis.

Estes kits de análise microbiológica rápida apresentam diversas vantagens, tais como permitirem obter resultados no local e em apenas alguns minutos, não apresentarem interferências na detecção da biomassa viva total e permitirem a detecção dos microrganismos totais. No entanto, também possuem algumas desvantagens, como por exemplo, requerem alguma habilidade/formação, o custo por análise é elevado quando comparado com as técnicas tradicionais e é necessária a aquisição de diferentes kits para testar amostras com diferentes matrizes, tais como águas e tintas, entre outras.⁴⁶

2.1.2.3. Avaliação microbiológica por *Dip Slides*

Os *Dip Slides* fornecem um método económico para determinar a contaminação microbiana aeróbia total em amostras aquosas ou em superfícies, sendo que os seus resultados são semiquantitativos. É um método de simples utilização, capaz de distinguir entre bactérias e fungos.⁴⁷ O *Dip Slide* é um *slide* sintético, de dimensões compreendidas entre 7 e 10 cm², com um ou ambos os lados cobertos por um meio de cultura sólido que é selecionado de acordo com os microrganismos alvo.⁴⁸ Originalmente, os *Dip Slipes* foram concebidos para determinar o número de bactérias em amostras de urina. No entanto, foram modificados ao longo dos anos tornando o *slide* de dupla face num *slide* com um lado que possui um meio para espécies Gram positivas e o outro lado com um meio para Gram negativas. Existem no mercado vários tipos de *Dip Slides* disponíveis, sendo que alguns têm a possibilidade de

transportar diferentes meios de cultura em cada lado do *slide*, tornando o processo mais eficiente em termos de tempo e custo.⁴⁹

Os *Dip Slides* utilizados pela empresa possuem dois meios de cultura diferentes em cada um dos lados do *slide*, sendo que um deles é concebido para o crescimento de bactérias que crescem como colónias vermelhas e o outro para o crescimento de fungos e leveduras (geralmente colónias redondas brancas, creme ou rosa), tal como demonstra a Figura 2.4.

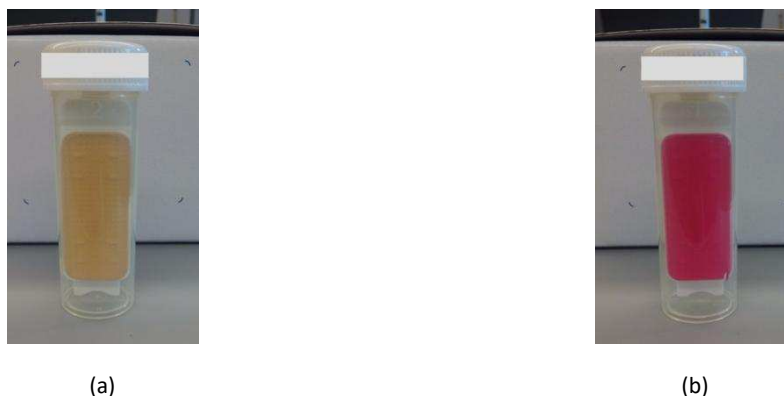


Figura 2.4 – *Dip Slides* utilizados pela empresa com meios de cultura para o crescimento de bactérias totais (a) e fungos e leveduras (b)

Comparativamente com os kits de análise microbiológica rápida que utilizam a técnica ATP-bioluminescência, os *Dip Slides* são vantajosos na medida em que o custo por análise é baixo, não requer grande habilidade de manuseio e o mesmo tipo de *Dip Slide* pode ser compatível com amostras de diferentes matrizes. No entanto, quanto à apresentação dos resultados, tanto a sua rapidez como o facto de serem quantitativos, quanto às interferências na deteção da biomassa viva total bem como a deteção dos microrganismos, a utilização do kit de análise microbiológica rápida torna-se mais vantajosa.

2.1.3. Espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier

A espectroscopia NIR tem sido destacada como uma técnica analítica não destrutiva, rápida, conveniente e precisa. É baseada na absorção de radiação eletromagnética na região de 800 a 2500 nm (4000 cm^{-1} a 12500 cm^{-1}). A radiação NIR que interage com as amostras pode ser absorvida, transmitida ou refletida, sendo captada utilizando diferentes modos de medição do equipamento NIR.⁵⁰ O princípio de funcionamento pode ser definido

resumidamente da seguinte forma: a luz infravermelha próxima é direcionada para uma amostra, modificada de acordo com a composição da mesma e depois detetada; as modificações espectrais são convertidas em informações relativas à composição da amostra através de calibrações.⁵¹

A espectroscopia NIR dá origem a espectros complexos caracterizados por possuírem bandas largas e pouco intensas provenientes da sobreposição de bandas de absorção que se identificam, principalmente, como bandas sobretons e bandas de combinação de modos fundamentais de vibrações moleculares tais como C-H, O-H, N-H e S-H.^{50, 52} Deste modo, as características de qualidade das amostras podem ser avaliadas através da análise do seu espectro NIR. O NIR também pode ser usado para monitorizar e avaliar com precisão as variações de qualidade de matérias-primas e produtos acabados.⁵⁰

As absorções observadas na região do infravermelho próximo correspondem a bandas sobretons ou bandas de combinações de alongamento fundamentais que ocorrem na região de 3000-1700 cm^{-1} . A espectroscopia NIR pode ser uma opção interessante para certos sistemas orgânicos, devido à facilidade de amostragem. A Tabela 2.1 resume as bandas comumente observadas para moléculas orgânicas na região do infravermelho próximo.⁵³

Tabela 2.1 – Bandas comuns de infravermelho próximo de compostos orgânicos⁵³

Comprimento de onda / nm	Atribuição
2200 – 2450	Banda de combinação do alongamento C-H
2000 – 2200	Banda de combinação do alongamento N-H
	Banda de combinação do alongamento O-H
1650 – 1800	Banda do primeiro sobretom do alongamento C-H
	Banda do primeiro sobretom do alongamento N-H
1400 – 1500	Banda do primeiro sobretom do alongamento O-H
	Banda de combinação do alongamento C-H
1300 – 1420	Banda do segundo sobretom do alongamento C-H
1100 – 1225	Banda do segundo sobretom do alongamento N-H
	Banda do segundo sobretom do alongamento O-H
950 – 1100	Banda do terceiro sobretom do alongamento C-H
850 – 950	Banda do terceiro sobretom do alongamento N-H
775 – 850	

Por outro lado, a água sempre formou um meio problemático para a espectroscopia ótica devido a razões físicas (por exemplo, alta absorvidade) e químicas (extenso número de ligações de hidrogénio em mútua alteração temporal, não totalmente compreendida e

altamente sensível a vários fatores externos).⁶ A água tem uma forte caracterização da informação espectral no NIR, com bandas na região entre os 1450 e 1886 nm ($6897\text{-}5302\text{ cm}^{-1}$).⁵

2.1.3.1. Instrumentação

Um espectrómetro NIR é geralmente composto por uma fonte luminosa, um monocromador, um suporte onde são inseridas as amostras e um detetor de sinal que permite efetuar medições em modo de transmitância ou refletância, conforme ilustrado na Figura 2.5.⁵²

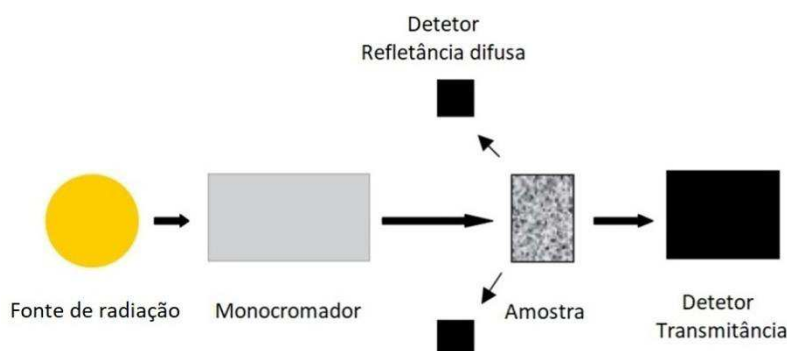


Figura 2.5 – Configurações básicas de um espectrómetro NIR⁵²

Um equipamento NIR deve apresentar um bom desempenho em todo o comprimento de onda requerido, deve ser flexível e fácil de usar, permitir o uso de calibrações, e ainda deve ser adequado para o ambiente de utilização desejado. O equipamento NIR pode incorporar uma variedade de dispositivos. Para se proceder à escolha do equipamento mais adequado, é necessário ter em atenção as características da amostra e as condições analíticas e necessidades de ensaio.⁵¹

Os tipos de detetores mais comuns são os de silício, os de sulfureto de chumbo (PbS) e os de índio-gálio-arsénio (InGaAs). Os detetores de silício são rápidos, de baixo ruído, pequenos e altamente sensíveis desde a região visível até aos 1100 nm. Os detetores PbS são mais lentos mas muito populares, pois são sensíveis de 1100 a 2500 nm e fornecem boas propriedades sinal/ruído. Os detetores InGaAs são mais caros e combinam as características de velocidade e tamanho do detetor de silício com a gama de comprimento de onda do detetor de PbS.⁵² Os espectrofotómetros mais utilizados atualmente são baseados na utilização de Transformada de Fourier (FT-NIR), sendo que fornecem um método para que todos os comprimentos de

onda transmitidos possam ser medidos simultaneamente num único detetor.⁵⁴ A espectroscopia de transformada de Fourier tem por base um interferómetro designado de Michelson, que se encontra ilustrado na Figura 2.6.

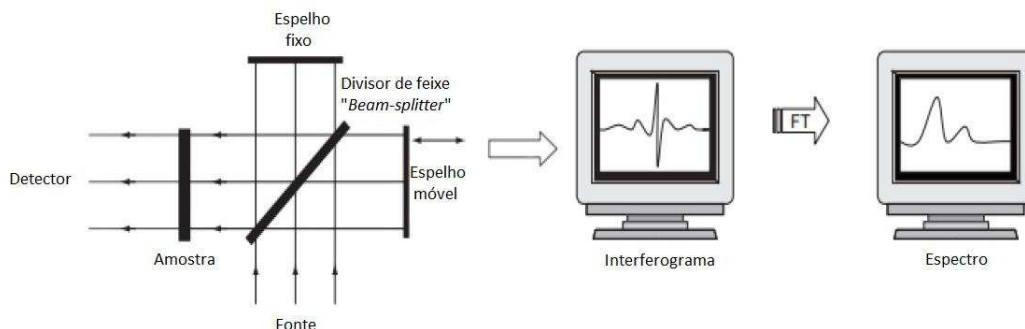


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo do interferómetro de Michelson e dos espectros resultantes da aplicação da transformada de Fourier⁵⁵

O interferómetro de Michelson dispõe de dois espelhos (um fixo e um móvel) e de um divisor de feixe (*beam-splitter*) que transmite 50 % da radiação emitida pela fonte luminosa para o espelho móvel e reflete os outros 50 % para o espelho fixo. Os espelhos, por sua vez, refletem os dois feixes para o divisor. À medida que o espelho móvel percorre uma determinada distancia, é formado um interferograma com a recombinação de feixes. Deste modo, o interferograma é constituído pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao detetor. Após a aquisição do interferograma, é aplicada a transformada de Fourier que converte os dados obtidos no interferómetro num espectro que relaciona a intensidade com o número de onda.⁵⁵

2.1.3.2. Modos de medição

O modo de medição NIR apropriado será determinado pelas propriedades óticas das amostras. Os materiais transparentes são geralmente medidos em transmitância (T), enquanto líquidos turvos ou semi-sólidos e sólidos podem ser medidos em refletância difusa (R) ou transfletância, dependendo das suas características de absorção e dispersão. Em qualquer caso, os valores de absorbância (A) relativos a um material de referência padrão são medidos, com A correspondendo a $\log \frac{1}{R}$ e $\log \frac{1}{T}$ para espectros de refletância e transmitância, respetivamente.⁵²

Transmitância

A transmitância baseia-se na absorção da radiação por parte da radiação incidente sendo que, conseqüentemente, haverá diminuição da intensidade da radiação incidente após atravessar a amostra transparente. Tal é demonstrado pela Figura 2.7.

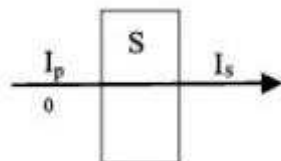


Figura 2.7 – Esquema representativo relativamente ao modo de medição em Transmitância ⁵⁶

Refletância difusa

A refletância difusa exprime o quociente entre a intensidade da radiação refletida pela amostra e a refletida, ambas em modo difuso, por uma superfície refletora de referência. Quando a radiação incidente que não absorvida, deverá ser totalmente refletida pela amostra, o que significa que a radiação não poderá ser transmitida, tal como está ilustrado na Figura 2.8.

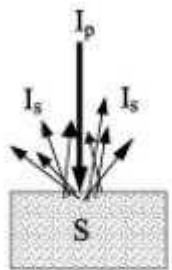


Figura 2.8 – Esquema representativo relativamente ao modo de medição em Refletância Difusa ⁵⁶

Relativamente à medição por refletância, os espectros são geralmente traçados a partir da grandeza $\log \frac{1}{R}$, que é aproximadamente equivalente à absorvância.⁵⁶

Transfletância

A transfletância é uma medida de transmitância combinada com a refletância. A Figura 2.9 mostra o princípio em que se baseia a sua medição.

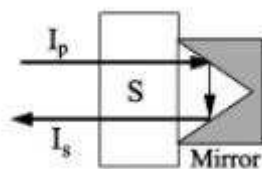


Figura 2.9 – Esquema representativo relativamente ao modo de medição em Transfletância ⁵⁶

O feixe da radiação incide na face transparente do suporte que atravessa a amostra. A radiação transmitida é então direcionada para um conjunto de espelhos que inverte o sentido da propagação da radiação fazendo-a retornar, atravessando novamente a amostra, para ser captada pelo detetor.⁵⁷ A diferença em relação a uma medição simples de transmitância é que o trajeto ótico resultante da transfletância é o dobro da trajetória percorrida pela radiação na medição simples de transmitância.

Este modo de medição é frequente quando são empregues sondas, sendo que a sonda tem de estar em contacto direto com a superfície da amostra.⁵⁶

2.2. Procedimentos de quantificação por HPLC

Existem três tipos de procedimentos analíticos para quantificação de espécies químicas em análise instrumental, nomeadamente, o método da adição simples ou sucessiva de solução padrão, o método da curva de calibração e a titulação. Os dois primeiros métodos podem ser, ou não, executados na presença de um padrão interno. O método da adição de solução padrão é especialmente apropriado quando a matriz da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico. Conhecem-se vários procedimentos experimentais que podem ser usados na execução do método da adição de solução padrão. O procedimento mais comum consiste na adição à amostra a ensaiar de um ou mais pequenos volumes de uma solução padrão da substância a quantificar, de modo a não provocar uma diluição significativa à amostra a ensaiar. Cada adição de solução padrão deve também provocar uma variação de concentração

do analito próxima da sua concentração na amostra a ensaiar. A determinação da concentração do analito é obtida a partir da equação da reta de uma função analítica, que é estabelecida de acordo com a técnica instrumental e as condições operacionais utilizadas.⁵⁸

A titulação é um procedimento quantitativo de análise que se baseia na estequiometria de uma reação quantitativa entre o titulado e o titulante. O cálculo da quantificação do analito requer o conhecimento do volume mínimo da solução titulante necessário para reagir completamente com a solução titulada, que é conhecido por volume equivalente. Este volume é obtido experimentalmente quando pequenos volumes da solução de titulante são adicionados lentamente à solução titulada até que se atinja o ponto de final da titulação, que é sinalizado por um indicador apropriado ou por uma variação brusca de uma propriedade física detetada por uma técnica instrumental.⁵⁹

Além dos dois procedimentos de quantificação referidos, existe ainda o procedimento da curva de calibração que, como foi utilizado no presente trabalho, será explicado mais pormenorizadamente e integrado no trabalho realizado.

2.2.1. Método da curva de calibração

Todos os detetores cromatográficos produzem um sinal elétrico à passagem do eluente, que é simultaneamente tratado eletronicamente, registado e posteriormente poderá ser integrado em função do tempo. A presença de um soluto no eluente irá ser revelada pelo detetor através do aumento brusco do sinal elétrico produzido pelo detetor que se distingue do sinal elétrico referente ao eluente sem o soluto. A resposta de cada detetor à passagem de um soluto depende da natureza do mesmo, pelo que é sempre necessário calibrar o detetor quando se pretende quantificar um ou mais analitos através de ensaios com soluções padrão desses mesmos analitos. A intensidade do sinal de resposta do detetor à presença de um soluto é dada pela altura do pico, mas é a área deste que está relacionada com a quantidade de soluto no eluente.⁴² Uma vez que em HPLC a introdução da amostra e das soluções padrão no injetor é feita a volume constante, a área do pico pode também correlacionar-se com a concentração do soluto em cada uma das soluções ensaiadas. Como resultado, as medições quantitativas podem ser feitas a partir de soluções padrão do analito e da correspondente reta de calibração.⁴¹ Relativamente ao procedimento experimental, deve-se começar por preparar

um conjunto de soluções padrão do analito (normalmente 5 a 6 soluções são suficientes). Considerando as concentrações de cada solução padrão e as áreas dos correspondentes picos cromatográficos, a correlação entre ambos é feita por regressão linear com o objetivo de se obter a equação da reta de calibração. Dispondo da equação, podem-se calcular as quantidades do analito nas amostras, conhecendo as áreas dos respectivos picos para as mesmas condições de ensaio. Em geral, os sistemas de HPLC já têm incorporados sistemas computadorizados de tratamento de dados e, quando concentrações padronizadas são usadas para preparar as retas de calibração, é possível obter automaticamente um conjunto de resultados para cada composto isolado, desde que previamente sejam conhecidas as retas de calibração para cada um desses compostos. Somente interpolações são válidas para fins efetivamente quantitativos, extrapolações não são aceitáveis, pelo que é importante certificar que a amostra injetada esteja dentro da gama de trabalho da reta de calibração.⁴²

2.3. Estatística aplicada à validação de métodos analíticos

Neste subcapítulo será abordada a estatística necessária para a validação de métodos analíticos, nomeadamente, os testes de hipóteses. Nestes testes, decide-se entre rejeitar ou não rejeitar alguma afirmação sobre a população com base em dados observados. Serão ainda abordados alguns exemplos de testes estatísticos, nomeadamente, os que foram utilizados no decorrer deste projeto.

2.3.1. Tipos de erros

O tamanho da região crítica é determinado pelo erro que se está disposto a aceitar na tomada de decisão. Existem dois tipos de erros no teste de hipóteses, erro do tipo I e erro do tipo II. Um erro do tipo I ocorre quando se rejeita a hipótese nula quando esta é realmente verdadeira. Este é o erro que se especifica antecipadamente e é o erro que determina o valor crítico. Um erro do tipo II ocorre quando não se rejeita a hipótese nula quando esta é falsa. A probabilidade de cometer um erro do tipo I é dada pela letra α . O objetivo é sempre rejeitar H_0 quando esta não é válida, de forma a evitar um erro do tipo I. Para facilitar a aplicação de um teste deve-se fixar o valor de α antes de se dar início ao mesmo.⁶⁰

2.3.2. Nível de significância, intervalo de confiança e nível de confiança

O nível de significância do teste, α , é a probabilidade de gerar um erro do tipo I. Os valores mais comuns de α são 0,05 e 0,01.⁶⁰ Nunca se pode estar inteiramente certo de que a hipótese nula deve ser aceite ou rejeitada. Para tomar essa decisão tentam-se avaliar quais as possibilidades da hipótese nula não ser verdadeira. Na maioria dos casos adota-se a seguinte regra arbitrária, segundo Fisher: se houver mais de 5 % de possibilidades da diferença observada ser devida ao acaso, aceita-se a hipótese nula e diz-se que a diferença não é significativa; se houver 5 % de possibilidades, ou menos, da diferença ser devida ao acaso, rejeita-se a hipótese nula e diz-se que esta diferença é significativa se a diferença observada tiver entre 1 e 5 % de possibilidades de ser devida ao acaso; ou muito significativa se a diferença observada tiver 1 % de possibilidades, ou menos, de ser devida ao acaso. Anotam-se igualmente os níveis de significância da seguinte forma: diferença não significativa para $\alpha > 0,05$; diferença significativa para $\alpha \leq 0,05$ e diferença muito significativa para $\alpha \leq 0,01$.

Designa-se por intervalo de confiança, a 95 ou 99 % em torno de uma estatística, ao intervalo cujos limites são o valor mínimo e o valor máximo, entre os quais há 95 ou 99 % das possibilidades de se encontrar o parâmetro que lhe corresponde na população.⁶¹ Calcula-se o intervalo de confiança através dos dados observados, sendo que o intervalo pode mudar dependendo da amostra. De seguida, atribui-se um nível de confiança que reflete a proporção desse intervalo que contém o parâmetro populacional verdadeiro. O nível de confiança é dado por $1 - \alpha$. Tal significa que, se se considerar todas as amostras aleatórias e calcular o intervalo de confiança para cada amostra, esperar-se-ia que 100 (1 - α) % dos intervalos contivessem o valor verdadeiro do parâmetro populacional.⁶⁰

2.3.3. Procedimento

Um teste estatístico deve ser aplicado seguindo sempre um conjunto de passos que constituem o seu procedimento lógico. Desta forma devem-se seguir os seguintes passos: identificação do problema em questão; escolha do teste apropriado a aplicar tendo em conta a distribuição estatística que melhor se enquadra; estabelecimento do nível de significância (geralmente o valor mais comum é o $\alpha = 0,05$ mas o valor $\alpha = 0,01$ deve ser utilizado sempre

que a importância das decisões seja maior); formulação da hipótese nula (H_0) e da hipótese alternativa (H_1) de forma simples e concreta, de modo a não haver dúvidas; determinação do valor de teste (TV) a partir da expressão matemática correspondente; e, por fim, comparação dos valores críticos ou determinação direta do respectivo valor de prova de forma a tomar a decisão de aceitar ou rejeitar H_0 .⁶²

2.3.4. Formulação das hipóteses

As hipóteses estatísticas a avaliar serão sempre duas, a hipótese nula e a hipótese alternativa. A hipótese é concebida no sentido da igualdade e é representada por H_0 . É designada por nula porque, normalmente, representa o estado atual ou a ausência de anomalias, sendo que se investigam possíveis desvios da mesma. A hipótese alternativa, denotada por H_1 , deve ser o complementar da hipótese nula no sentido de ambas poderem cobrir todas as eventuais possibilidades para a situação em avaliação.

2.3.4.1. Simetria do teste

No teste de hipóteses, a decisão baseia-se na hipótese de a estatística estar ou não dentro de alguma região da distribuição de probabilidade sob a hipótese nula. Tal é designado por região crítica. As regiões críticas estão situadas na cauda da distribuição estatística sob a hipótese nula e o seu limite é dado pelo valor crítico.⁶⁰ Uma vez que a hipótese nula vai sempre no sentido da igualdade, a simetria do teste a efetuar depende da hipótese alternativa formulada. Se a hipótese alternativa especifica o sinal da diferença, então o teste é unilateral.⁶² Neste caso, a eventual diferença tem um único sentido que é conhecido *a priori*. Deste modo, o teste tem apenas uma alternativa, ou seja, para rejeitar a hipótese nula há apenas uma única possibilidade (por exemplo, $H_1: A > B$).⁶¹ Os testes unilaterais apresentam a região crítica em apenas um dos lados da cauda da distribuição.⁶⁰ Se a hipótese alternativa não especifica o sinal da diferença, então o teste é bilateral.⁶² Neste caso, a eventual diferença pode ter dois sentidos possíveis, sendo que não se pode excluir *a priori* uma dessas possibilidades. Deste modo, o teste tem duas alternativas, ou seja, para rejeitar a hipótese nula existem duas possibilidades ($H_1: A \neq B$, isto é, $A > B$ ou $A < B$).⁶¹ Os testes bilaterais apresentam a região crítica em ambos os lados das caudas da distribuição.⁶⁰

2.3.5. Valor de prova

O valor de prova corresponde à probabilidade de aceitação da hipótese nula. Deste modo, o valor de prova que permite decidir, com base nos dados, se existe evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula. Deste modo, o valor de prova permite tirar a conclusão sem ter de calcular as tabelas de distribuições estatísticas, e ainda concluir melhor acerca dos casos de dúvida estatística. Quando se utiliza o valor de prova, se este for inferior ao valor de alfa ($p[H_0] < \alpha$), a hipótese nula deve ser rejeitada.

2.3.6. Tomada de decisão

Se o valor de teste calculado for igual ou inferior ao valor crítico, a hipótese nula é aceite; se pelo contrário for superior terá que se voltar a realizar o teste estatístico, considerando agora uma probabilidade de erro inferior ao primeiro caso, ou seja, $\alpha = 0,01$ caso o anterior tenha sido $\alpha = 0,05$. Caso se continue a verificar que o valor de teste obtido continua a ser superior ao crítico, H_1 é considerada como válida e H_0 rejeitada. Quando se utiliza a abordagem do valor de prova para a tomada de decisão, não é necessária a repetição do teste, uma vez que o valor de α representa o limite entre aceitação/rejeição de H_0 , tal como referido anteriormente.⁶²

2.3.7. Testes baseados nas distribuições estatísticas

Neste subcapítulo serão abordados alguns exemplos de testes baseados nas distribuições estatísticas, nomeadamente, os que foram utilizados no decorrer deste projeto.

2.3.7.1. *t* de Student

O teste *t* de Student é um método que permite decidir se a diferença observada entre duas médias experimentais ou uma média experimental e um valor conhecido se pode atribuir

a uma causa sistemática, resulta unicamente como resultado de erros aleatórios.^{61, 63} A estatística utilizada no teste t é baseada na média \bar{x} dos valores da amostra. O teste t assume que os dados são apresentados de forma independente e a partir de uma distribuição normal com média μ .⁶⁰ A hipótese nula assume a igualdade de valores e a hipótese alternativa assume a desigualdade, tal como demonstrado na equação (2.2).⁶³

$$\begin{cases} H_0: \bar{x} = \mu \\ H_1: \bar{x} \neq \mu \end{cases} \quad (2.2)$$

O valor de teste é calculado segundo a equação (2.3). e o valor crítico encontra-se na distribuição t de Student, com nível de significância α e $n - 1$ graus de liberdade.⁶⁰

$$TV = \frac{(\bar{x} - \mu) \sqrt{n}}{s} \quad (2.3)$$

2.3.7.2. Fisher-Snedecor

Aplica-se o teste de Fisher-Snedecor para verificar se duas variâncias diferem significativamente uma da outra ou se, pelo contrário, não são diferentes senão entre limites das flutuações da amostragem, devidas ao acaso. Encontra-se este tipo de problemas quando se quer saber se dois grupos têm a mesma dispersão, ou antes, quando se compara a variância de um grupo experimental com a de um grupo de controlo.⁶¹

A hipótese nula assume a igualdade de variâncias e a hipótese alternativa assume a desigualdade, tal como demonstrado na equação (2.4).⁶³

$$\begin{cases} H_0: s_1^2 = s_2^2 \\ H_1: s_1^2 \neq s_2^2 \end{cases} \quad (2.4)$$

Considerando s_2^2 à maior das variâncias e s_1^2 à menor, calcula-se o valor de teste de acordo com a equação (2.5).⁶¹ O valor crítico encontra-se na distribuição bilateral de Fisher-Snedecor, com nível de significância α , $n_1 - 1$ graus de liberdade para a amostra 1 e $n_2 - 1$ graus de liberdade para a amostra 2.⁶³

$$TV = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (2.5)$$

O teste F também pode ser efetuado de forma diferencial, também conhecido como teste de Mandel. Este processo consiste em comparar a alteração da variabilidade ($\Delta\sigma^2 = \Delta SS/\Delta v$), o aumento da variabilidade resultante de uma diminuição do número de graus de liberdade, $[(v_1 - v_2) > 0]$ com uma estimativa puramente aleatória da dispersão ($\sigma_{pe}^2 = \sigma_2^2$). O valor de teste calcula-se de acordo com a equação (2.6).

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta SS / \Delta v}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(v_1 \cdot \sigma_1^2 - v_2 \cdot \sigma_2^2) / (v_1 - v_2)}{\sigma_2^2} \quad (2.6)$$

Como hipóteses considera-se H_0 : os objetos/parâmetros removidos não afetam significativamente a variância da população; caso contrário H_1 : estes afetam significativamente a variabilidade final.⁶⁴

2.3.8. Outros testes

Neste subcapítulo serão ainda abordados mais alguns exemplos de testes estatísticos, nomeadamente, os que foram utilizados no decorrer deste projeto.

2.3.8.1. Teste de Grubbs

O teste de Grubbs é um método comum para fazer a deteção de *outliers* que utiliza a média e o desvio padrão. O critério original de Grubbs é popularmente conhecido como método de deteção de dados discrepantes paramétricos clássicos. Este método é geralmente baseado na suposição de que os dados satisfazem, aproximadamente, a distribuição normal.⁶⁵ Como hipóteses estatísticas considera-se H_0 : não há *outliers* no conjunto de dados; e H_1 : há pelo menos um *outlier* no conjunto de dados. Através do cálculo da média e do desvio padrão dos resultados, determina-se o valor de teste tal como demonstrado pela equação (2.7). O valor crítico encontra-se na tabela estatística de Grubbs com n número de ensaios e nível de significância α .

$$TV = \frac{\max_{i=1,\dots,N} |x_i - \bar{x}|}{s} \quad (2.7)$$

Este método detecta um *outlier* de cada vez. Se TV exceder o valor crítico, o valor experimental com maior desvio é então removido como um *outlier*. Caso tal suceda é comum repetir o teste nos restantes $n - 1$ resultados e continuar até que o teste de Grubbs não mostre a existência de mais *outliers*.⁶⁶

2.3.8.2. Teste de Cochran

Segundo a norma ISO 5725, o teste de Cochran é recomendado para verificar numericamente se três ou mais conjuntos de dados distribuídos normalmente mostram homogeneidade de variâncias, ou seja, homocedasticidade. O teste de Cochran é um teste de *outliers* unilateral que identifica desvios padrão desviantes e aplica-se apenas a conjuntos de dados de igual tamanho. Este teste utiliza valores críticos que estão disponíveis apenas para a cauda direita da distribuição de variação, em números selecionados de conjuntos de dados, números selecionados de réplicas por conjunto e somente em dois níveis de significância, 1 e 5 %. O teste de Cochran concentra-se na maior variância observada. Se essa variação for classificada como *outlier* será omitida do intervalo e o teste será repetido nos valores restantes.⁶⁷ O teste de Cochran é muito sensível à não normalidade da distribuição estatística subjacente. A norma ISO 5725-2 recomenda o uso do teste de Cochran com nível de significância de 1 %.

Como hipótese inicial assume-se que não há diferença estatística entre variâncias, tal como demonstrado na equação (2.8).

$$\begin{cases} H_0: s_{\max}^2 \leq s_i^2 \\ H_1: s_{\max}^2 > s_i^2 \end{cases} \quad (2.8)$$

Denotando cada um dos desvios padrão da amostra por s_i , o valor de teste calcula-se segundo a equação (2.9), onde s_{\max} é o maior desvio padrão. O valor crítico encontra-se na tabela estatística de Cochran, com nível de significância α e M réplicas.

$$TV = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (2.9)$$

Se TV exceder o valor crítico, o maior desvio padrão é então removido como um *outlier*. Caso tal suceda é comum repetir o teste nos demais $n - 1$ desvios padrão e continuar até que o teste de Cochran não mostre significância estatística.⁶⁸

2.3.8.3. ANOVA

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada (σ_T^2). Permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatórias (σ_0^2) e as contribuições sistemáticas entre amostras (σ_A^2).

A ANOVA de fator único baseia-se na decomposição da dispersão total (SS_T) em duas parcelas, a dispersão interna ou puramente aleatória (SS_0) e a dispersão causada pelo efeito em estudo (SS_A), tal como demonstrado pela equação (2.10).

$$SS_T = SS_0 + SS_A \quad (2.10)$$

No caso de haver m_i réplicas em cada nível de fator, a variância interna de cada nível (variabilidade dentro das amostras) é estimada através da equação (2.11), sendo que \bar{x}_i representa o valor médio desse nível.

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{(m_i - 1)} \quad (2.11)$$

A variância dentro dos N grupos (variabilidade interna média dos diferentes níveis do factor) é dada pelo somatório das variâncias internas de todos os grupos, tal como se pode observar na equação (2.12).

$$s_0^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N s_i^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{\sum_{i=1}^N (m_i) - N} \quad (2.12)$$

No caso de o número de réplicas ser idêntico em cada nível do factor em estudo ($m_i = M$), então a variância dentro dos N grupos passa a ser calculada através da seguinte equação mais simplificada.

$$s_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{m_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N (M - 1)} \quad (2.13)$$

A variância entre amostras (entre os diferentes níveis do factor A) é dada pela dispersão das médias de cada um dos níveis x_i em relação à média global \bar{x} , tal como demonstrado na equação (2.14).

$$s_A^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.14)$$

Novamente, no caso de o número de réplicas ser idêntico ($m_i = M$), a seguinte equação permite um cálculo simplificado da variância entre amostras.

$$s_A^2 = \frac{M \cdot \sum_{i=1}^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(N - 1)} \quad (2.15)$$

Se o fator em estudo (fator A) não influencia de modo significativo, ambas as dispersões (dentro dos níveis e entre níveis do fator) são estimativas da variância da componente aleatória. Quando o fator influencia de modo significativo, a dispersão devida ao fator A (s_A) torna-se maior que a componente puramente aleatória (s_0).

As hipóteses estatísticas formuladas encontram-se demonstradas pela equação (2.16).

$$\begin{cases} H_0: s_A^2 \leq s_0^2 \\ H_1: s_A^2 > s_0^2 \end{cases} \quad (2.16)$$

Deste modo, a equação (2.17) mostra como pode ser calculado o valor de teste do teste F para comparar as dispersões, e ainda como encontrar o valor crítico.⁶⁹

$$TV = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(N-1, N(M-1))}^u \quad (2.17)$$

2.4. Caracterização e validação de métodos analíticos

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrarem, através da validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.⁷⁰

O principal objetivo da validação de um procedimento analítico é demonstrar que o procedimento é adequado para o propósito pretendido.⁷¹ Quando se pretende validar um método interno de ensaio é necessário efetuar a sua descrição e caracterização. Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento de alguns parâmetros, nomeadamente, gama de trabalho e linearidade, limiares analíticos (deteção e quantificação), sensibilidade, precisão

e exactidão.⁷⁰ Pode ainda ser necessária a revalidação do método de ensaio em algumas circunstâncias, como por exemplo, mudanças na composição do produto acabado ou mudanças no procedimento analítico.

2.4.1. Especificidade e seletividade

A especificidade é a capacidade que o método tem de apenas responder ao analito em causa na presença de componentes que se espera que estejam presentes. Normalmente, estes podem incluir impurezas, degradantes, matriz, entre outros.⁷¹ Por outras palavras, diz-se que um método é específico quando este permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando é capaz de responder exclusivamente a um só analito.

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. Ou seja, o método responde preferencialmente ao analito em causa mas também apresenta resposta a outros analitos presentes na matriz. Esta característica depende do tipo de compostos a analisar.⁷⁰

2.4.2. Gama analítica e linearidade da curva de calibração

O ensaio de calibração requer que a gama analítica preliminar seja estabelecida de modo a que abranja, na medida do possível, a gama de aplicação para todo o tipo de amostras da indústria. A concentração de amostra mais frequentemente esperada deve estar no centro da gama analítica. Os valores medidos obtidos devem ser linearmente correlacionados às concentrações. Tal exige que os valores medidos obtidos perto do limite inferior da gama de trabalho possam ser distinguidos dos brancos do método. O primeiro padrão deve, portanto, ser igual ou superior ao limite de deteção do método. É igualmente importante que a variância dos valores da informação seja independente da concentração. Tal é verificado por um teste estatístico de linearidade.

2.4.2.1. Homogeneidade de variâncias

Após estabelecer a gama de trabalho preliminar, devem ser determinados os valores medidos de, pelo menos, cinco soluções padrão, sendo que o recomendado são dez ($N = 10$). As concentrações, x_i , destas soluções padrão devem ser distribuídas de forma equidistante sobre a gama de trabalho.⁷² Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho deve ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias, uma vez que a variância dos valores determinados a partir de soluções padrão selecionadas deve ser homogênea e independente da concentração. Para tal, devem ser determinadas uma série de repetições de cada uma das concentrações mais baixa e mais alta (x_1 e x_N), sendo que o número de repetições (N) recomendado é 10.^{70, 73} Ambos os conjuntos de dados das concentrações x_1 e x_N são usados para calcular as variâncias s_1^2 e s_N^2 , conforme indicado na equação (2.18).

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{N_i - 1} \quad (2.18)$$

As variâncias são testadas, através do teste estatístico F , para diferenças significativas nos limites da gama analítica. O valor de teste é determinado de acordo com a equação (2.19) ou (2.20).

$$TV = \frac{s_N^2}{s_1^2} \text{ para } s_N^2 > s_1^2 \quad (2.19)$$

$$TV = \frac{s_1^2}{s_N^2} \text{ para } s_1^2 > s_N^2 \quad (2.20)$$

Dada a importância desta etapa, este teste deve ser efetuado ao nível de significância de 1 %. Se a diferença entre as variâncias for significativa, a gama de trabalho preliminar deve ser reduzida até que a diferença entre as variações seja apenas aleatória.⁷²

2.4.2.2. Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico corresponde à sua capacidade, dentro de um determinado intervalo, de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração de analito na amostra. Este parâmetro deve ser avaliado ao longo da gama de trabalho do

procedimento analítico, sendo que é recomendado um mínimo de cinco concentrações. Uma análise dos *outliers* da linha de regressão pode ser útil para avaliar a linearidade.⁷¹

A avaliação da linearidade faz-se também através do teste de Mandel, comparando o desempenho do ajuste dos valores experimentais com o polinómio de primeiro (P_{01}) e o de segundo (P_{012}) graus. O valor de teste é calculado a partir da equação (2.6), onde σ_{pe}^2 é uma estimativa de erro puramente aleatório que, regra geral, é dada pela variância do ajuste com o modelo com maior número de parâmetros, neste caso, $\sigma_{fit}^2(P_{012})$.

Tal como referido acima, a avaliação dos *outliers* é uma etapa que pode auxiliar no estudo da linearidade. Tal deve ser efetuado através do teste estatístico de Mandel anteriormente referido.⁶⁴ Uma regressão robusta é uma boa opção para determinar os possíveis *outliers*. Para tal, para cada ponto de dados (x_i, y_i) , onde $i = 1, \dots, n$, deve-se estimar um conjunto de declives $(n - 1)$ entre esse ponto e todos os outros. Os declives individuais são calculados através da equação (2.21).

$$b_{ij} = \frac{(y_j - y_i)}{(x_j - x_i)}, j \neq i \quad (2.21)$$

O declive final robusto do modelo de regressão é definido como a mediana de todos os n declives determinados pela equação 2.21, tal como demonstrado na equação (2.22).⁷⁵

$$b_1 = \text{mediana}(b_{ij}) \quad (2.22)$$

A ordenada na origem pode ser estimada através da equação (2.23), usando o valor de b_1 estimado acima.⁷⁶

$$b_0 = \text{mediana}(y_i - b_1 x_i) \quad (2.23)$$

De seguida, determinam-se os valores previstos pela regressão robusta através da equação (2.24).

$$y_i^* = b_0 + b_1 \cdot x_i \quad (2.24)$$

Por fim, identificam-se os eventuais *outliers* através da expressão $(y_i - y_i^*)^2$, sendo que estes são avaliados através do teste de Mandel.

2.4.2.3. Curva de calibração

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. Geralmente, em métodos instrumentais de análise, para efetuar a calibração analítica do equipamento, o analista começa por preparar uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida; de seguida, essas soluções padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar; por fim, estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação.⁷⁰ Esta análise de regressão linear permite obter os coeficientes b_0 e b_1 da função de calibração que descrevem a correlação linear entre a concentração x como uma variável independente e o sinal do equipamento y como uma variável dependente. A função de calibração, bem como as características do método, devem resultar de dados obtidos de uma gama de trabalho x_1 a x_N , conforme recebido da medição e não de correção de brancos. Geralmente, nenhum valor de branco (concentração $x = 0$) deve ser incluído na calibração e, conseqüentemente, no ajuste de mínimos quadrados da regressão. A função de calibração linear é dada pela equação (2.25), em que b_0 representa a ordenada na origem e b_1 o declive da reta.

$$y = b_0 + b_1 x \quad (2.25)$$

Os coeficientes são obtidos a partir das equações (2.26) para o declive (sensibilidade do método) e (2.27) para a ordenada na origem.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.26)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (2.27)$$

Os coeficientes fornecem uma estimativa da função verdadeira, que é limitada pela dispersão processual inevitável.⁷² A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual, σ_{fit} , que exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração e é dado pela equação (2.28).^{70, 72}

$$\sigma_{\text{fit}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (b_0 + b_1 x_j)]^2}{N - 2}} \quad (2.28)$$

A qualidade do procedimento analítico aumenta com o aumento da sensibilidade e diminuição do desvio padrão residual. O desvio padrão do método s_{x0} é a característica que permite ao analista verificar a qualidade do seu próprio trabalho, sendo que pode ser calculado segunda a equação (2.29).⁷²

$$s_{x0} = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \quad (2.29)$$

2.4.3. Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido e a variação da concentração correspondente aquele acréscimo. Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama analítica e igual ao declive da curva de calibração (b_1).⁷⁰

2.4.4. Limiares analíticos

Os parâmetros de limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) estão relacionados, no entanto, possuem definições distintas. Em geral, o limite de deteção consiste na menor concentração de um analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições estabelecidas do teste. O limite de quantificação é a menor concentração de um analito numa amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas sob as condições estabelecidas do teste.

Alguns métodos comuns para a estimativa dos limites de deteção e quantificação são o cálculo da relação sinal/ruído, o cálculo do desvio padrão do branco e o cálculo da reta de calibração em concentrações baixas. A equação (2.30) demonstra uma fórmula geral para o cálculo dos limiares analíticos, sendo que s pode corresponder ao desvio padrão do branco, ao desvio padrão da ordenada na origem ou ao desvio padrão residual da regressão linear.⁷⁷ O

valor de k representa o fator de expansão de acordo com o nível de significância selecionado pelo analista.

$$LD/LQ = \frac{k \cdot s}{b_1} \quad (2.30)$$

As equações (2.31) e (2.32) mostram, respetivamente, como determinar o valor de k para o cálculo dos limites de deteção e quantificação.⁷⁴

$$k = 2 \cdot t_{(\alpha, N-p)}^u \text{ para o cálculo de LD} \quad (2.31)$$

$$k = 6 \cdot t_{(\alpha, N-p)}^u \text{ para o cálculo de LQ} \quad (2.32)$$

2.4.4.1. Razão sinal/ruído

Para determinar os limiares analíticos através da razão sinal/ruído, é necessário medir o ruído pico-a-pico em torno do tempo de retenção do analito e, subsequentemente, estima-se a concentração do analito que produziria um sinal igual a um determinado valor da razão sinal/ruído. A magnitude do ruído pode ser medida manualmente na impressão do cromatograma ou pelo integrador automático do instrumento. Uma razão sinal/ruído (S/N) de valor três é geralmente aceite para estimar o limite de deteção, enquanto uma razão sinal/ruído de valor dez é usada para estimar o limite de quantificação. Este método é comumente aplicado a métodos analíticos que exibem ruído de linha de base. Em cromatografia, uma amostra com o analito no nível no qual a deteção é requerida é analisada ao longo de um período de tempo equivalente a 20 vezes a largura do pico a meia altura. A razão sinal/ruído é calculada a partir da equação (2.33), sendo H a altura do pico, medida a partir do máximo do pico até a linha de base extrapolada do sinal observado, numa distância igual a 20 vezes a largura a meia altura, e h o ruído de fundo pico-a-pico num cromatograma obtido após a injeção de um branco, tal como se pode observar na Figura 2.10.

$$LD/LQ = \frac{2 H}{h} \quad (2.33)$$

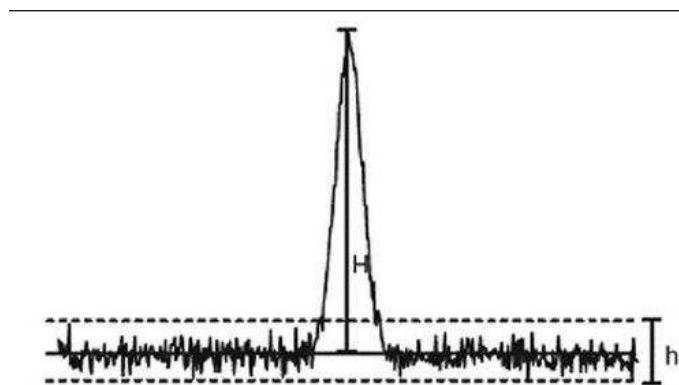


Figura 2.10 – Exemplo da determinação de H e h para o cálculo de LD e LQ pela razão sinal/ruído ⁷⁷

2.4.4.2. Branco

A determinação dos limiares analíticos através do branco é aplicada quando a análise do branco fornece resultados com um desvio padrão diferente de zero. Neste caso, o limite de deteção é expresso como a concentração do analito correspondente ao valor do branco da amostra mais três desvios padrão e limite de quantificação mais dez desvios-padrão, tal como demonstrado pelas equações (2.34) e (2.35), respetivamente.

$$LD = x_{b1} + 3 s_{b1} \quad (2.34)$$

$$LQ = x_{b1} + 10 s_{b1} \quad (2.35)$$

Este método é simples e rápido. A sua desvantagem é que não há evidência objetiva para provar que uma concentração baixa de analito realmente produzirá um sinal distinguível de um branco (concentração zero).

2.4.4.3. Regressão linear

Para uma curva de calibração linear, assume-se que a resposta do instrumento y está linearmente relacionada com a concentração padrão x para um intervalo limitado de concentração. Este modelo é utilizado para calcular a sensibilidade (b_1) e os limites de deteção e quantificação. Deste modo, os limiares analíticos podem ser expressos segundo a equação (2.36), sendo que s_a corresponde ao desvio padrão da resposta.

$$LD/LQ = \frac{k \cdot s_a}{b_1} \quad (2.36)$$

O desvio padrão da resposta pode ser estimado, entre outros, pelo desvio padrão da ordenada na origem (SE_{b0}). Este método é mais aplicável quando o método de análise não envolve ruído de fundo. Uma vez que utiliza uma gama de valores baixos próximos de zero para a curva de calibração, com uma distribuição mais homogénea, resultará numa avaliação mais relevante.⁷⁷

2.4.5. Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções padrão, em condições definidas. A precisão deve ser investigada usando amostras homogéneas e autênticas. No entanto, se não for possível obter uma amostra homogénea, pode ser averiguada utilizando uma solução padrão.

A precisão de um procedimento analítico é geralmente expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medidas, e pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, sendo a primeira e a última duas medidas extremas de precisão. Geralmente, a precisão varia com a gama de concentrações.^{70, 71}

2.4.5.1. Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas de operação durante um curto intervalo de tempo, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra/solução padrão, em condições tão estáveis quanto possível, tais como mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo. Para determinar a repetibilidade de um método efetuam-se uma série de medições sobre uma mesma amostra/solução padrão, em condições de repetibilidade.^{70, 71} A repetibilidade deve ser demonstrada de uma das seguintes formas: um mínimo de nove determinações dentro da gama de trabalho do método analítico, por

exemplo, três concentrações diferentes com três réplicas de cada concentração; ou um mínimo de seis determinações envolvendo 100 % da gama de trabalho.⁷¹

O limite de repetibilidade (Δr) é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (x_i, x_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas. Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|x_i - x_{i-1}| \leq \Delta r$.⁷⁰ Para um nível de confiança de 95 %, o limite de repetibilidade é avaliado segundo a equação (2.37), sendo que s_{ri} corresponde ao desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados e pode ser obtido através da ferramenta ANOVA.^{70, 78}

$$\Delta r = \sqrt{2} \cdot t_{0,05}^b (M-1) \cdot s_{ri} \quad (2.37)$$

O coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r), expresso em percentagem, é dado pela equação (2.38), sendo que a CIN definiu 5 % como critério de aceitação máximo.

$$CV_r = \frac{s_{ri}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.38)$$

2.4.5.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou soluções padrão, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a varia, tais como analistas, equipamentos e/ou dias, entre outros. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável de utilizar.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se n medições em replicado ou em ensaio único, sobre a amostra/solução padrão, nas condições pré-definidas. Na maioria dos casos, o cálculo da precisão intermédia é efectuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos e após eliminação dos resultados aberrantes (*outliers*).⁷⁰

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, sendo um deles por meio de uma análise de variância (ANOVA), caso se varie um máximo de dois fatores.^{70, 78} Para utilizar este método é necessária a homocedasticidade das variâncias e a ausência de

outliers. Considerando, por exemplo, a variação do fator “dias”, a existência de *outliers* deve ser verificada pelo teste de Cochran para resultados intra-diários, com nível de significância de 5 %. A ANOVA é utilizada para comparar as variabilidades dos resultados entre dias e durante o dia através do teste F. A variabilidade entre dias ($s_{(\text{entre dias})}^2$) é calculada segundo a equação (2.39) e apenas no caso de o teste F determinar que existem diferenças significativas de variância, ou seja, $s_A^2 > s_0^2$.

$$s_{(\text{entre dias})}^2 = \frac{MQ_A - MQ_0}{M} \quad (2.39)$$

De seguida determinar-se-ia a precisão intermédia devido à contribuição do fator “dias” ($s_{i(D)}$) segundo a equação (2.40) mas, como $s_A^2 > s_0^2$, considera-se que a variabilidade entre dias é igual à precisão intermédia devido à contribuição do fator “dias”, pelo que este próximo cálculo é desnecessário.

$$s_{i(D)} = s_0 + s_{(\text{entre dias})} \quad (2.40)$$

O mesmo raciocínio é aplicado para analisar qualquer outro fator diferente de “dias”.⁷⁸

2.4.5.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como laboratórios, operadores, equipamentos e/ou dias.⁷⁰ Por outras palavras, a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios.⁷¹ Deste modo, a reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. Assim, é enviada uma série de amostras aos laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra. O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado de acordo com a equação (2.41).

$$s_{Ri}^2 = s_{Li}^2 + s_{ri}^2 \quad (2.41)$$

Tal como na repetibilidade, a reprodutibilidade também apresenta um valor limite (ΔR) sob o qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas. Esse limite calcula-se segundo a equação (2.42).

$$\Delta R = \sqrt{2} \cdot t_{0,05}^b (M-1) \cdot s_{Ri} \quad (2.42)$$

O cálculo da reprodutibilidade é efetuado para cada nível, separadamente, após eliminação dos *outliers*. O coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é dado pela seguinte equação.⁷⁰

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (2.43)$$

2.4.6. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa a proximidade de acordo entre o valor que é aceite como um valor verdadeiro convencional ou um valor de referência aceite e o valor obtido. A exatidão deve ser estabelecida na gama especificada do procedimento analítico e é recomendável que seja avaliada usando um mínimo de nove determinações ao longo de um mínimo de três níveis de concentração que cobrem a gama analítica (por exemplo, três concentrações com três réplicas cada).⁷¹

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método de ensaio são, entre outros, através de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais, testes comparativos ou ainda através da realização de testes de recuperação.⁷⁰ Estes últimos podem ser efetuados pelo ensaio da adição de uma quantidade conhecida de analito na amostra ou como a diferença entre o valor médio e o valor real aceite juntamente com os intervalos de confiança.⁷¹ O valor das percentagens de recuperação deverá ser próximo de 100 %, sendo que caberá ao laboratório que realiza ensaios ter critérios de aceitação relativos às taxas de recuperação conseguidas, baseados em dados e factos credíveis.⁷⁰ A percentagem de recuperação (%R) calcula-se de acordo com a equação (2.44), sendo que X_1 corresponde à concentração da amostra fortificada, X_0 à concentração da amostra inicial e X_{add} à concentração adicionada à amostra fortificada.⁷⁹

$$\%R = \frac{X_1 - X_0}{X_{add}} \cdot 100 \quad (2.44)$$

2.4.7. Robustez

A robustez de um procedimento analítico expressa a sensibilidade que este apresenta face a ligeiras, mas deliberadas, variações nos parâmetros do método, sendo que fornece uma boa indicação da sua fiabilidade durante o uso corrente. Por outras palavras, um método diz-se robusto quando se revela praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado.

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de YOUNDEN. Trata-se de um teste de análise fatorial que é bastante eficaz e onde se podem avaliar até um máximo de sete fatores.^{70, 71}

2.5. Quimiometria

A quimiometria consiste na utilização de técnicas matemáticas e estatísticas com o intuito de extrair informações relevantes de dados analíticos, neste caso, os dados espectrais NIR. Normalmente, o conjunto de dados espectrais é submetido a um pré-tratamento antes de ser utilizado para fins qualitativos ou quantitativos.⁵⁶

O objetivo dos métodos de análise multivariada é construir modelos capazes de prever com precisão as características e propriedades de amostras desconhecidas. No que diz respeito ao desenvolvimento das calibrações, a escolha do método depende do propósito da análise, das características das amostras e da complexidade do sistema em questão (por exemplo, o caso da não linearidade).

Tal como ilustrado na Figura 2.11, a análise multivariada pode ser dividida em análise quantitativa ou análise qualitativa.

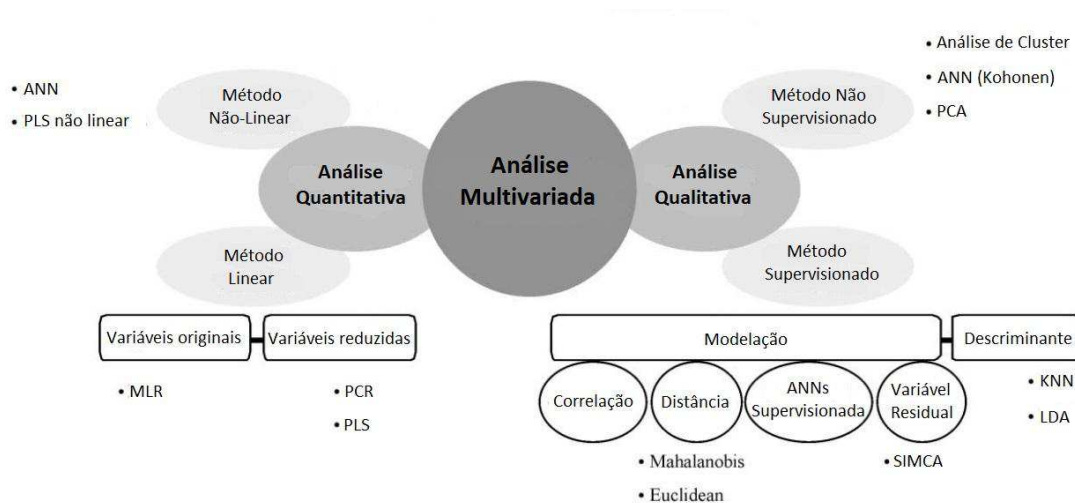


Figura 2.11 – Ilustração dos principais métodos de análise multivariada de análise quantitativa e qualitativa em espectroscopia NIR⁸⁰

A análise quantitativa é empregue quando se pretende desenvolver métodos que determinam as propriedades existentes em amostras desconhecidas. Por outro lado, a análise qualitativa é utilizada em modelos onde as amostras apresentam características semelhantes, com o objetivo de estabelecer métodos que permitam classificar amostras desconhecidas. As análises qualitativas por espectroscopia NIR geralmente dependem do uso de bibliotecas espectrais que são construídas através de ferramentas analíticas qualitativas. O uso apropriado de bibliotecas NIR permite não apenas identificar produtos, simplesmente pela comparação do coeficiente de correlação entre o espectro de uma amostra desconhecida e aqueles contidos na biblioteca, mas também para verificar se eles possuem as propriedades físicas desejadas (como por exemplo, teor de humidade). Os métodos de análise multivariada qualitativos têm por base dois métodos de reconhecimento de padrões classificados em "supervisionados" ou "não supervisionados", dependendo se a classe a que a amostra pertence é ou não conhecida.⁸ Durante a calibração multivariada, a seleção de variáveis tenta identificar e remover as variáveis que afetam o desempenho de um modelo (*outliers*). Os procedimentos de seleção de variável são de particular interesse quando se lida com dados espectroscópicos. Na realidade, o número de variáveis é potencialmente elevado em relação ao número de amostras à disposição para um modelo de regressão. Normalmente, esse problema dimensional é contornado através de métodos como a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS).⁸¹

2.5.1. Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é uma técnica de regressão multivariada que tem por objetivo estabelecer uma ligação linear entre duas matrizes, os dados espectrais (matriz X) e os valores de referência (matriz Y). Esta técnica modela ambas as matrizes com o intuito de descobrir quais as variáveis na matriz X que melhor descrevem a matriz Y.⁸² O PLS pode ser usado em regiões espectrais específicas ou na totalidade do espectro, e permite que mais informações sejam incluídas no modelo de calibração⁸⁰. É uma técnica importante uma vez que é utilizada para projetar e construir modelos de calibração robustos para análises quantitativas multivariadas.

A regressão PLS consiste em dois passos fundamentais. Primeiro, transforma a matriz X (espectros) de ordem $n \times P$ (n = número de amostras e P = número de variáveis em cm^{-1}) numa outra de componentes ou variáveis latentes não correlacionadas, $T = (T_1, \dots, T_p)$ de ordem $n \times P$, chamados componentes de PLS, usando o vetor de resposta Y (concentrações) de ordem $n \times 1$. De seguida, calcula o modelo de regressão estimado usando o vetor de resposta Y como variável independente. Como os componentes são ortogonais, pode-se aplicar diretamente uma redução dimensional. O número de componentes principais para a análise de regressão deve ser muito menor do que o número de variáveis independentes. As equações (2.45) e (2.46) correspondem às operações lineares algébricas das matrizes X e Y.⁸³

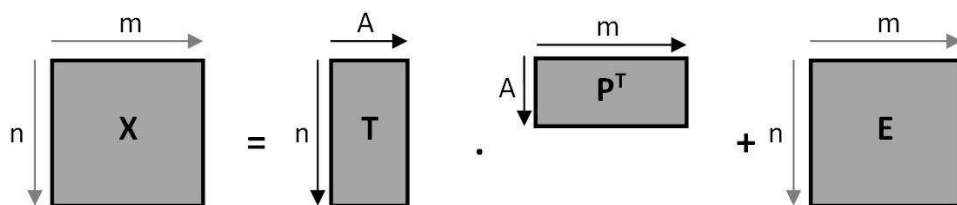


Figura 2.12 – Decomposição em variáveis latentes da matriz x Adaptado da referência 83

$$X = T \cdot P^T + E \quad (2.45)$$

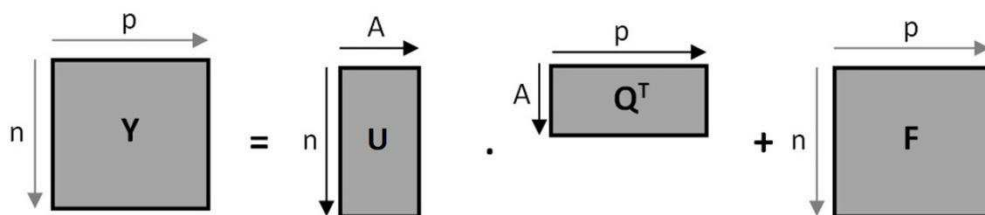


Figura 2.13 – Decomposição em variáveis latentes da matriz y Adaptado da referência 83

$$Y = U \cdot Q^T + F \quad (2.46)$$

2.5.2. Pré-tratamento de dados

Os pré-tratamentos de dados são utilizados com o objetivo de melhorar a informação contida nos espectros através da remoção ou eventual minimização dos fatores que influenciam negativamente a análise.⁸² Atualmente, existem vários métodos de pré-tratamento que podem ser empregues ao conjunto de dados experimentais. Seguidamente, serão apenas referidos os pré-tratamentos de dados que foram utilizados ao longo deste projeto, sendo que o seu propósito foi eliminar as variações sistemáticas, corrigir a linha de base, diminuir a diferença sinal/ruído, melhorar a definição dos picos que se encontravam sobrepostos, remover toda a informação irrelevante para a análise e realçar os parâmetros de interesse de modo a aumentar a seletividade da calibração.⁸⁴

2.5.2.1. Standard Normal Variate (SNV)

Este método é calculado em duas partes e aplicado individualmente a todos os espectros. Primeiro, o SNV é aplicado para corrigir os efeitos das interferências multiplicativas relacionadas com a dispersão da radiação e do tamanho da partícula. Depois, é aplicado para remover as variações adicionais na linha de base.

Este método de pré-tratamento consiste no cálculo do valor médio e do desvio padrão para cada ponto do espectro, sendo que o valor médio (\bar{x}) é subtraído à absorvância de cada ponto experimental (x_i) e o resultado é dividido pelo correspondente desvio padrão (s), tal como demonstrado pela equação (2.47).⁸⁵

$$x_{i,SNV} = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \quad (2.47)$$

2.5.2.2. Normalização

A normalização é um tipo de pré-tratamento que tem por objetivo reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados, de modo a garantir que cada observação seja representada de forma adequada e consistente. Este método pretende reduzir a influência de variações indesejáveis na concentração da amostra, devido às variações do percurso ótico e efeitos causados pelo detetor.

O cálculo matemático consiste na divisão de cada uma das variáveis de uma dada amostra i pela soma dos valores absolutos de todas as variáveis, tal como demonstra a equação (2.48).⁸⁶

$$x_{i,norm} = \frac{x_i}{\sum_{j=1}^n |x_{i,j}|} \quad (2.48)$$

2.5.2.3. Correção da linha de base

Normalmente, em análises por espectroscopia NIR, os espectros apresentam desvios da linha de base ou ruído aleatório. Quando tal ocorre, os espectros devem ser submetidos a este tipo de pré-tratamento que consiste na subtração de todos os pontos experimentais do valor de absorvância de um dos pontos extremos do espectro ou da absorvância média de uma gama de pontos previamente selecionada.⁸⁷

2.5.3. Número de componentes principais

O número de componentes principais (variáveis) definido num modelo de calibração multivariável é um requisito de extrema importância no resultado final. Um modelo que contenha um número de componentes inferior ao ideal resultará num subajuste, pois não irá considerar na totalidade a informação presente no conjunto de dados. Por sua vez, quanto maior for o número de componentes, maior será o ruído e os erros de modelação, resultante

num sobreajuste. Deste modo, o número ótimo de componentes deverá ser aquele para o qual se observa um erro mínimo de previsão.

2.5.4. Construção do modelo

Para a construção do modelo PLS é necessário proceder a uma calibração. Esta última consiste num procedimento para encontrar um algoritmo matemático que produza propriedades de interesse a partir dos resultados registados pelo instrumento. Os espectros, um para cada amostra, são organizados numa matriz X de variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra e contém as respostas medidas para a mesma. Cada coluna de X corresponde a um comprimento de onda específico. O outro conjunto de dados é constituído pelas variáveis dependentes e organizado na matriz Y , caso haja mais do que uma variável (mais de um analito de interesse), ou pelo vetor y , no caso de uma única variável.

A etapa da construção do modelo de calibração começa com a seleção cuidadosa de um conjunto de amostras para que sejam representativas de toda a região a ser modelada. Estas serão os padrões (conjunto de calibração) utilizados na construção de um modelo apropriado para relacionar as respostas instrumentais com a concentração, de forma a calcular o vetor de regressão (β) de acordo com a equação (2.49).

$$y = X \cdot \beta \quad (2.49)$$

Uma vez validado e otimizado o modelo está pronto a ser usado, ou seja, o número de componentes principais está definido e as amostras anómalas (*outliers*) foram detetadas e excluídas. Como resultado, obtém-se o vetor de regressão (β), que será então usado para prever a concentração, c_{prev} , das novas amostras, sendo que x_{prev} abrange o espectro da amostra desconhecida.⁸⁸

$$c_{prev} = x_{prev}^t \cdot \beta \quad (2.50)$$



CAPÍTULO 3

3. Parte experimental

O desenvolvimento deste projeto decorreu no Laboratório Analítico do Centro de Investigação e Desenvolvimento da CIN, na Maia. Para se proceder à execução do trabalho experimental foram utilizados os equipamentos e os materiais disponíveis no laboratório.

Neste capítulo descrevem-se os reagentes, os materiais e os instrumentos necessários para a execução das metodologias analíticas. Apresentam-se também os procedimentos experimentais seguidos e os métodos utilizados ao longo deste trabalho de estágio, resumidamente e codificadamente, devido ao sigilo técnico.

3.1. Reagentes, material e instrumentação

Neste subcapítulo serão mencionados os reagentes, os matérias e os instrumentos que foram utilizados no decorrer deste projeto. No entanto, as suas marcas e os seus fornecedores serão omitidos por questões de confidencialidade, assim como os nomes dos biocidas utilizados.

3.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados durante a execução do presente projeto encontram-se descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados durante o desenvolvimento do projeto

Reagente	Grau de pureza
Água	Tipo I
Ácido sulfúrico	95 – 98 %
Acetonitrilo	HPLC grade
Metanol	HPLC grade
Biocida A	≥ 98 %
Biocida B	≥ 98 %
Solução aquosa biocidas C/B	-
Biocida D	≥ 98,5 %
Kit ATP 2G	-

A água tipo I apresenta valores padrão para determinados parâmetros, tal como demonstrado na Tabela 3.2.⁸⁹

Tabela 3.2 – Especificações padrão para a água tipo I⁸⁹

Parâmetro	Valor
Condutividade elétrica (25 °C)	≤ 0,056 µS/cm
Resistividade elétrica (25 °C)	≥ 18,0 MΩ.cm
Carbono orgânico total	≤ 100 µg/L
Sódio	≤ 1 µg/L
Sílica	≤ 3 µg/L
Cloreto	≤ 1 µg/L

Antes da sua utilização para HPLC, a água tipo I foi filtrada por um filtro de membrana de 0,2 µm.

3.1.2. Material

Para a execução do trabalho experimental foi utilizado material habitualmente disponível em laboratório. No entanto, usou-se ainda material específico para o trabalho realizado, que se encontra abaixo discriminado, com omissão da marca e modelo.

- Balões volumétricos de várias capacidades, classe A;
- Micropipetas de várias capacidades;
- Seringas esterilizadas de capacidades 2 e 5 mL;
- Filtros com membrana de nylon de 0,2 µm de porosidade;
- *Vials* para HPLC de capacidade 1,5 mL;
- Tubos Falcon de capacidade 15 mL;
- Tubos de centrífuga;
- *Dip Slides*;
- *Vials* para NIR de capacidade 1 mL.

Para além dos materiais citados, neste trabalho também foram ainda utilizados diluentes, resinas, endurecedores, vernizes e secantes provenientes da produção ou dos armazéns, com tempo de armazenamento variável mas dentro do respetivo prazo de validade.

3.1.3. Instrumentação

Durante a realização do projeto, foi necessária a utilização dos seguintes instrumentos de trabalho:

- Balança analítica com precisão 0,0001 g;
- Banho de ultrassons;
- Medidor de pH;
- Agitador vortex com alcance de velocidade até 2500 rpm;
- Centrífuga;
- Espectrofotómetro ultravioleta-visível de duplo feixe;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, equipado com detetor UV-Vis e coluna de separação C18;
- Luminómetro;
- Incubadora;
- Espectrofotómetro de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier, equipado com uma sonda de transletância e um acessório para *vials* termostatzado.

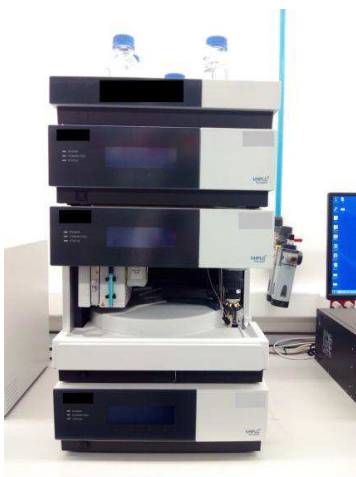
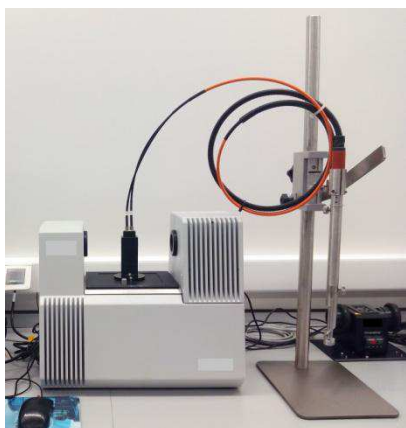


Figura 3.1 – HPLC equipado com detetor UV-Vis



Figura 3.2 – Luminómetro com módulo *bluetooth*



(a)



(b)

Figura 3.3 – FT-NIR equipado com uma sonda de transletância (a) e acessório para *vials* termostatizado (b)

3.2. HPLC

Neste subcapítulo será descrito o procedimento experimental realizado no decorrer deste projeto, relativamente à técnica analítica HPLC. Serão ainda abordadas as condições operacionais dos métodos desenvolvidos, embora muito genericamente por motivos de confidencialidade.

3.2.1. Procedimento experimental

Tal como referido anteriormente, uma vez que este projeto foi desenvolvido sob condições de confidencialidade, o seguinte procedimento experimental será sucinto e, por vezes, poderá omitir certas etapas.

Os métodos para a quantificação dos biocidas A, B e C já se encontravam implementados na CIN desde 2016. A estes métodos iremos designar por X o método já existente para a quantificação do biocida A e por Y o método já existente para a quantificação dos biocidas B e C. Dada a grande quantidade de amostras da empresa que possuem na sua constituição os biocidas A e B ou mesmo os três biocidas, e sendo que é necessário o seu controlo por HPLC, tornou-se de grande interesse o desenvolvimento de um novo método para a quantificação destes três biocidas em simultâneo. Outro motivo foi ainda uma questão de rapidez de identificação dos biocidas presentes em formulações desconhecidas. Deste modo, após

pesquisa bibliográfica, comparação com os métodos X e Y, análise dos biocidas em questão por espectrofotometria UV-Vis e depois da execução de múltiplos ensaios analíticos, foi então desenvolvido o método 1 que possibilita a quantificação dos biocidas A, B e C, permitindo assim uma redução no custo e uma diminuição significativa do tempo de análise de cerca de 80 %, não contabilizando a limpeza e condicionamento da coluna necessários aquando da mudança do método X para o método Y.

Uma vez que este método provocou alguma perda de sensibilidade, tornou-se também de interesse otimizar os métodos X e Y de modo a reduzir o tempo de análise. Através da análise do método 1 e de alguns testes de ensaio, foram então otimizados os métodos X e Y que deram origem, respetivamente, aos métodos 2 e 3. Estes últimos obtiveram uma redução do tempo de análise de cerca de 70 e 60 %, respetivamente.

Embora o método para a quantificação do biocida D já se encontrasse implementado na empresa há cerca de uns meses, ainda não estava validado. Deste modo, tornou-se relevante a validação deste método, designado por método Z. Uma vez que este último possuía um tempo de análise elevado e levava a quantificações incertas, optou-se pela sua otimização. Novamente, foi necessária pesquisa bibliográfica, comparação com o método Z, análise do biocida D por espectrofotometria UV-Vis e execução de múltiplos ensaios analíticos, até à otimização do método que foi classificado como método 4, tendo levado a uma redução do tempo de análise de 50 %.

No final, procedeu-se à validação de todos os métodos desenvolvidos (1, 2, 3 e 4).

3.2.2. Métodos para a quantificação de biocidas por HPLC

Tal como referido no procedimento experimental, os métodos de separação e análise por HPLC não serão descritos detalhadamente devido ao sigilo técnico.

Os quatro métodos desenvolvidos variam entre si nos solventes utilizados (frequentemente acetonitrilo, metanol, água e água acidificada), no fluxo da fase móvel (entre 1 e 1,3 mL.min⁻¹) e no comprimento de onda utilizado na análise (entre 200 e 320 nm). Os comprimentos de onda foram selecionados de acordo com a substância a quantificar sendo que, na maioria dos métodos, foi escolhido o comprimento de onda correspondente à absorção máxima de radiação por parte do biocida.

Todos os métodos preveem que as soluções padrão mais concentradas dos biocidas A, B e C sejam preparadas por pesagem rigorosa das respectivas substâncias puras e consequente dissolução em solventes adequados a cada um dos biocidas. Posteriormente, através de diluições a partir da solução mais concentrada, prepararam-se as soluções padrão a ensaiar para os diferentes biocidas. As concentrações das soluções padrão foram calculadas tendo em conta não só as massas pesadas das substâncias puras e os volumes finais das soluções, como também os respetivos graus de pureza. No final, todas as soluções foram armazenadas ao abrigo da luz.

Os métodos analíticos desenvolvidos são semelhantes relativamente à preparação das amostras, uma vez que todos utilizam técnicas de separação física, nomeadamente, a centrifugação e filtração; diferem apenas nos solventes de diluição utilizados.

3.3. ATP-bioluminescência

O kit de teste recomendado para fluidos químicos de alta viscosidade contendo uma alta concentração de matéria orgânica polimerizável, como tintas, emulsões e revestimentos, é constituído por tubos de ensaio, luminase, padrão de ATP, pontas de micropipetas esterilizadas e tubos Falcon contendo cada um deles reagentes com diferentes finalidades: pré-diluição da amostra (tubo A), extração de ATP total (tubo B), diluição de ATP total (tubo C) e estabilizador de ATP dissolvido (tubo D). Para a realização da análise é ainda necessário o uso de um luminómetro para efetuar a leitura.

As características microbiológicas da maioria das amostras começam a alterar-se imediatamente após a recolha. Deste modo, é importante que, caso as amostras não possam ser testadas dentro de 2 horas após a recolha, estas sejam armazenadas no frigorífico (2 a 8 °C) e testadas dentro de 24 horas após a recolha. Para uma interpretação confiável, deve-se permitir que as amostras atinjam a temperatura ambiente antes de realizar a análise.

3.3.1. Determinação do ruído de fundo

Os valores típicos do ruído de fundo do luminómetro utilizado são iguais ou inferiores a 10 URL. Um único valor de ruído de fundo pode ser usado para múltiplas análises.

Existem três níveis diferentes de ruído de fundo, sendo que o primeiro é o ruído de fundo do luminómetro. Para o determinar basta efetuar a leitura com o luminómetro vazio. O segundo nível é o ruído de fundo dos tubos de ensaio e para determinar o seu valor efetua-se a leitura com um tubo de ensaio vazio dentro do luminómetro. O terceiro e último nível é o ruído de fundo da luminase e, para o quantificar, transfere-se 100 µL da luminase para um tubo de ensaio e efetua-se a leitura. Estes valores devem ser registados como URL_{bg} e, caso sejam superiores a 10 URL, devem ser subtraídos aos valores de ATP determinados posteriormente. Em caso de valores elevados, tal é representativo de uma contaminação da câmara de leitura, dos tubos de ensaios e/ou da luminase.

3.3.2. Manuseamento da luminase

A luminase é sujeita a um processo designado liofilização. Este processo maximiza a estabilidade do produto antes da sua utilização. Deste modo, antes de utilizar a luminase, esta deve ser reidratada por mistura com o tampão líquido e depois deixada a incubar durante, pelo menos, 5 minutos. Deve-se ter algum cuidado para evitar a contaminação ao remover a tampa do frasco de vidro do tampão.

A luminase reidratada deve ser armazenada no frigorífico até 3 meses após a reidratação, ou no congelador até 6 meses com ciclos de congelamento/descongelamento ilimitados. Antes da sua utilização, a luminase reidratada deve ser colocada à temperatura ambiente (geralmente, 1 hora é suficiente), uma vez que a cinética da reação mudará com a temperatura.

3.3.3. Calibração

A calibração utiliza um padrão de ATP e converte os valores de URL do luminómetro em concentrações reais de ATP. Deve-se efetuar uma calibração por dia ou para cada conjunto de amostras analisadas ao mesmo tempo.

Para proceder à calibração deve-se adicionar 2 gotas do padrão de ATP (correspondem a cerca de 100 µL) a um tubo de ensaio. De seguida, adicionar 100 µL de luminase e agitar cinco vezes, suavemente. Inserir de imediato no luminómetro e medir, registando esse valor como URL_{pad} .

Para o mesmo lote de luminase, o valor de URL_{pad} irá decair ao longo do tempo. Tal deve-se à diminuição da atividade enzimática da luciferase. Se $URL_{pad} \leq 50000$ é recomendado reidratar um novo frasco de luminase para obter máxima sensibilidade.

3.3.4. Análise de ATP total

A análise de ATP total (tATP) mede o ATP tanto de células vivas como de células mortas.

Recomenda-se que produtos químicos altamente turvos sejam pré-diluídos antes de realizar a análise de tATP. Deste modo, o primeiro passo é a pré-diluição da amostra. Para tal, deve-se transferir 1 mL de amostra para o tubo A que contém o reagente de pré-diluição. Homogeneizar muito bem e avançar para a segunda etapa que é a da extração. Neste passo, deve-se transferir 1 mL de amostra pré-diluída para o tubo B que contém o reagente de extração de ATP total. De seguida, deve-se inverter três vezes para homogeneizar e deixar, pelo menos, 5 minutos para a incubação. O terceiro passo consiste na diluição e, para tal despeja-se todo o conteúdo do tubo B para o tubo C que contém o reagente de diluição de ATP total. Seguidamente, transfere-se a mistura de um tubo para o outro e vice-versa, pelo menos, três vezes para obter uma melhor exatidão da mistura. Depois inverte-se três vezes para homogeneizar e aguarda-se para que a resina se deposite. A penúltima etapa consiste em transferir 100 µL do conteúdo do tubo C para um tubo de ensaio e adicionar 100 µL de luminase. De seguida, agita-se cinco vezes, suavemente, insere-se de imediato no luminómetro e efetua-se a leitura, registando esse valor como URL_{tATP} .

Por fim, após a conclusão das análises de tATP, os valores de URL devem ser convertidos em concentrações de ATP através dos cálculos apresentados na equação (3.1).

$$tATP \text{ (pg ATP/mL)} = \frac{URL_{tATP}}{URL_{pad}} \times 100\,000 \text{ (pg ATP/mL)} \quad (3.1)$$

Quando aplicável, deve-se subtrair o valor de URL_{bg} ao valor de URL_{tATP} .

Caso o valor de URL_{tATP} seja igual ou inferior a 10, como está abaixo do limite de deteção inferior do luminómetro utilizado, deve-se registar $tATP \text{ (pg ATP/mL)} = 0$.

3.3.5. Análise de ATP dissolvido

A análise de ATP dissolvido (dATP) apenas mede o ATP das células mortas.

Como a primeira etapa da análise de ATP dissolvido é igual ao primeiro passo da análise de ATP total, utiliza-se a mesma amostra pré-diluída preparada para a análise de tATP. Deste modo, avança-se de imediato para a segunda etapa que é a da diluição. Para tal, basta transferir 1 mL da amostra pré-diluída do tubo A para o tubo D. De seguida, inverte-se três vezes para homogeneizar e deixa-se, pelo menos, 5 minutos para a incubação. Posteriormente, transfere-se 100 μ L do conteúdo do tubo D para um tubo de ensaio e adicionam-se 100 μ L de luminase. De seguida, agita-se cinco vezes, suavemente, insere-se de imediato no luminómetro e efetua-se a leitura, registando esse valor como URL_{dATP} .

Por fim, após a conclusão das análises de dATP, os valores de URL devem ser convertidos em concentrações de ATP através dos cálculos apresentados na equação (3.2).

$$dATP \text{ (pg ATP/mL)} = \frac{URL_{dATP}}{URL_{pad}} \times 100\,000 \text{ (pg ATP/mL)} \quad (3.2)$$

Quando aplicável, deve-se subtrair o valor de URL_{bg} ao valor de URL_{dATP} .

Caso o valor de URL_{dATP} seja igual ou inferior a 10, como está abaixo do limite de deteção inferior do luminómetro utilizado, deve-se registar $dATP \text{ (pg ATP/mL)} = 0$.

3.3.6. Determinação de ATP intracelular

Ocorrências de valores de ATP dissolvido superiores a valores de ATP total são, frequentemente, o resultado de uma combinação das sensibilidades do método de teste e da instrumentação, e devem ser consideradas normais caso estes valores sejam significativamente semelhantes. Em caso de tal eventualidade, deve-se considerar o valor de ATP dissolvido igual ao valor de APT total, em unidades de pg/mL.

O ATP intracelular (cATP) representa a quantidade de ATP contida nas células vivas e é uma indicação direta da biomassa viva total (quantidade). Na equação (3.3) pode-se observar a fórmula de cálculo do cATP.

$$cATP \text{ (pg ATP/mL)} = tATP \text{ (pg ATP/mL)} - dATP \text{ (pg ATP/mL)} \quad (3.3)$$

Para comunicar os resultados na mesma base que os testes de cultura tradicionais, os resultados de cATP podem ser convertidos em Equivalentes Microbianos (EM), tal como demonstrado na equação (3.4). Tal é baseado na conversão estabelecida de que uma bactéria do tamanho da *Escherichia coli* contém 0,001 pg de ATP.

$$cATP \text{ (EM/mL)} = cATP \text{ (pg ATP/mL)} \times \frac{1 \text{ EM}}{0,001 \text{ pg ATP}} \quad (3.4)$$

3.3.7. Interpretação dos resultados

Uma vez calculado o resultado de cATP com o kit de análise microbiológica rápida, o controlo microbiano pode então ser avaliado. As medições baseadas em ATP são extremamente sensíveis às mudanças na quantidade microbiana total. Em geral, os processos terão o melhor controlo microbiano quando o ATP intracelular for minimizado.

Existem diretrizes para a interpretação do valor de cATP em unidades de pg ATP por mL, indicadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Diretrizes para a interpretação do resultado de cATP em pg/mL

Bom	Ação preventiva	Ação corretiva
< 100	100 – 1000	> 1000

Em suma, pode ser interpretado que um bom controlo é alcançado em níveis abaixo de 100 pg/mL. Devem ser tomadas medidas preventivas em níveis entre 100 e 1000 pg/mL, e medidas corretivas em níveis superiores a 1000 pg/mL.⁴⁶

3.3.8. Avaliação microbiológica por *Dip Slides*

O primeiro passo para a análise microbiológica por *Dip Slides* consiste na agitação das amostras até sua completa homogeneização. É também de extrema importância que as amostras estejam à temperatura ambiente. De seguida, deve-se mergulhar o slide na amostra líquida de tal modo que ambas as faces fiquem em contacto com a amostra. Após identificar devidamente a amostra com o nome do produto e a data e hora de início do ensaio, para o crescimento de bactérias, o *Dip Slide* deve ser incubado, na vertical, durante 48 horas, a uma temperatura de 29 ± 2 °C. Para o crescimento de fungos e leveduras, o *Dip Slide* deve permanecer à temperatura ambiente durante 4 a 5 dias. Após a incubação procede-se à contagem do número de colónias, apresentando o resultado segundo a escala de avaliação representada na Figura 3.5. As bactérias irão crescer sob a forma de colónias vermelhas ou amarelas, enquanto a maioria dos fungos e leveduras irão formar colónias com coloração rosa ou branca.⁴⁸

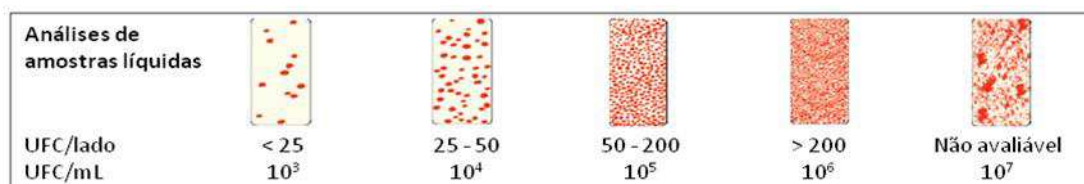


Figura 3.5 – Escala de avaliação para avaliação microbiológica por *Dip Slides*⁴⁸

3.4. Espectroscopia FT-NIR

O controlo de qualidade por Espectroscopia NIR já se encontrava implementado na CIN desde 1996, sendo que foi adquirido um novo equipamento em 2016, por descontinuidade do anterior, tendo sido necessário desenvolver novos modelos. Os modelos atualmente

implementados no novo *software* requerem uma otimização periódica para que pequenas alterações variações que ocorrem de fabrico para fabrico sejam inseridas na calibração, a fim de não interferirem com o resultado, continuando a responder de acordo com o pretendido. Por outro lado, as formulações dos produtos podem ser alvo de ajustes, deixando de ser possível utilizar o modelo existente para o seu controlo. Deste modo, e também porque a empresa pretendia ampliar a gama de produtos a controlar por esta técnica, foi necessário otimizar/desenvolver as calibrações de alguns produtos.

O *software* quimiométrico utilizado encontra-se subdividido em três módulos. O primeiro destina-se à aquisição dos espectros, ao desenvolvimento das calibrações e à validação das mesmas. O segundo módulo permite o desenvolvimento dos métodos de controlo de qualidade e definição dos limites de aceitação e rejeição das calibrações. O terceiro módulo destina-se à execução do controlo de qualidade e apresentação dos resultados.

O procedimento experimental consistiu no desenvolvimento/otimização de modelos de regressão estatística multivariável para identificação de diluentes, endurecedores, resinas, secantes e vernizes, por critérios de aprovação/rejeição. No total, foram desenvolvidas uma calibração para um diluente, dez calibrações para endurecedores e duas para vernizes. Foram ainda otimizadas quinze calibrações de diluentes, oito de endurecedores, uma de resinas, duas de secantes e cinco de vernizes. De notar que, por vezes, foi necessário otimizar certas calibrações por mais do que uma vez e também que, dada a pouca disponibilidade de amostras diferentes de alguns produtos, foi necessário, em alguns casos, aguardar o fabrico de novos lotes.

3.4.1. Método de identificação das amostras


Embora os métodos usuais de identificação das amostras sejam de cariz qualitativo, por especificidade do *software* do equipamento, o presente trabalho foi desenvolvido por um método quantitativo, nomeadamente o PLS, que se transformou num método qualitativo ao atribuir concentração 1 aos espectros da substância que se pretende identificar e concentração 0 aos restantes espectros provenientes de outras substâncias introduzidas na calibração e que não são objeto de identificação.

Com o intuito de que o método de identificação das amostras seja robusto e preciso, foi necessário desenvolver uma biblioteca espectral que irá permitir a comparação entre o espectro a identificar com todos aqueles contidos no modelo. Para tal, esta biblioteca deve conter

espectros de diversos lotes aprovados, de modo a que o maior número possível de variabilidades aceitáveis estejam contidas no modelo, para que as diferenças que ocorrem de fabrico para fabrico não afetem a identificação do produto. Neste projeto, a biblioteca espectral foi desenvolvida com pelo menos sete lotes de amostras diferentes, sendo que os espectros foram adquiridos em duplicado ou triplicado consoante se efetuou a análise por *vial* ou sonda, respetivamente.

Relativamente ao valor de correlação, caso se aproxime de 1, constata-se que existe uma boa semelhança entre a amostra em análise e as amostras da biblioteca espectral.

Os critérios para a aprovação e rejeição das amostras foram estabelecidos internamente, sendo que as amostras são aprovadas quando apresentam um valor no intervalo de 0,95 e 1,05. As restantes são rejeitadas.



CAPÍTULO 4

4. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos no decorrer deste trabalho para as diferentes técnicas analíticas empregues no projeto.

Em relação à técnica instrumental HPLC, não serão apresentados detalhes associados aos ensaios de novos métodos desenvolvidos, por motivos de confidencialidade. Dada a sua relevância para a compreensão do desenvolvimento do método 1 serão apresentados ensaios relativos à pesquisa do comprimento de onda adequado para as determinações e a validação dos métodos.

Relativamente à espectroscopia NIR, serão apresentados exemplos de calibrações desenvolvidas.

4.1. HPLC

Neste subcapítulo serão apresentados os ensaios de espectrofotometria UV-Vis relativos à determinação do comprimento de onda adequado para cada método e os ensaios referentes à validação dos métodos 1, 2, 3 e 4.

4.1.1. Espectrofotometria UV-Vis

Uma das etapas para o desenvolvimento do método 1 foi a análise dos biocidas A, B e C por espectrofotometria UV-Vis. Para tal, foram analisados por esta técnica analítica três padrões do biocida A e três padrões mistos dos biocidas B e C, todos de diferentes concentrações. Os espectros obtidos encontram-se ilustrados pela Figura 4.1.

O mesmo procedimento foi efetuado para o desenvolvimento do método 4. Deste modo, foram também analisados padrões de diferentes concentrações do biocida D, através da espectrofotometria UV-Vis. Os espectros obtidos encontram-se ilustrados pela Figura 4.2.

Todos os espectros foram traçados num intervalo de 150 a 500 nm. Esta escolha de comprimento de onda foi efetuada tendo em conta a pesquisa bibliográfica efetuada e os métodos já existentes na empresa para os biocidas em questão, isto é, os métodos X, Y e Z.

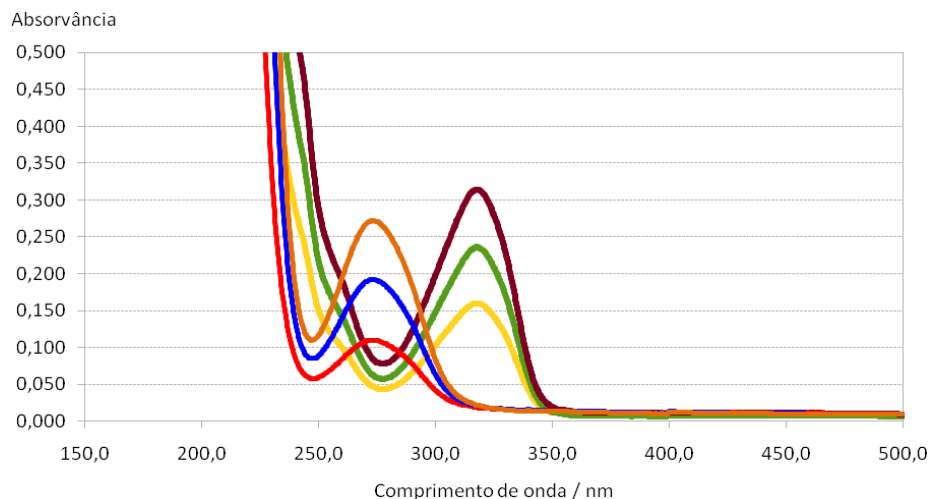


Figura 4.1 – Espectros UV-Vis de padrões contendo diferentes concentrações dos biocidas A, B e C

Na Figura 4.1 podem-se observar as absorvâncias para o biocida A e para os biocidas B e C. Uma vez que o propósito do desenvolvimento do método 1 é a quantificação simultânea destes três biocidas, foi selecionado o comprimento de onda onde os espectros se intersectam e que apresenta maior absorvância.

Relativamente aos métodos 2 e 3, foram utilizados os comprimentos de onda onde ocorre máxima absorção da radiação UV para cada biocida.

Após a seleção dos comprimentos de onda foram efetuados diversos ensaios analíticos de modo a determinar as restantes condições operacionais do método.

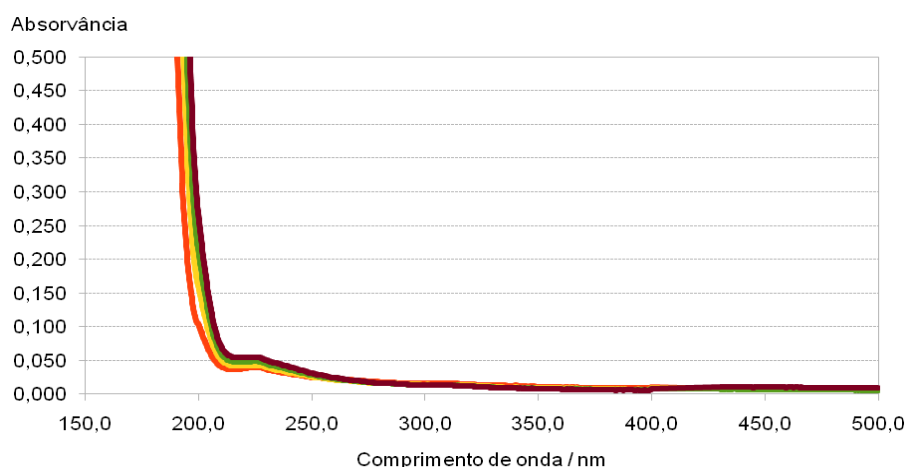


Figura 4.2 – Espectros UV-Vis de padrões contendo diferentes concentrações do biocida D

De acordo com a Figura 4.2, não se observam zonas de grande intensidade de absorção da radiação UV para o biocida D. Deste modo, foram realizados vários ensaios analíticos com comprimentos de onda no intervalo de 200 a 230 nm, onde se observam valores de absorvância superiores a 0,025. Uma vez que estes valores de comprimento de onda são bastante baixos, os cromatogramas obtidos apresentam bastantes interferências na zona do tempo de retenção do biocida D. Conjugando com outros ensaios que tiveram por objetivo determinar as restantes condições operacionais do método 4, foi selecionado o comprimento de onda que apresentou uma menor quantidade de interferências e com menor sinal, em simultâneo com uma correta quantificação de amostras do biocida D, principalmente, de baixas concentrações.

4.1.2. Validação dos métodos analíticos

Relativamente à especificidade dos métodos, nenhum deles é considerado específico uma vez que, ao analisar amostras, poderão sempre existir componentes da matriz que absorvem radiação nos comprimentos de onda de cada um dos métodos. Deste modo, nenhum dos métodos desenvolvidos é capaz de responder exclusivamente a um só analito.

Para os biocidas B e D foi necessário dividir as gamas analíticas em baixa (GB) e alta (GA), de modo a abranger toda a gama de amostras da empresa, mantendo a homogeneidade das variâncias e a linearidade das curvas de calibração.

O método 1 permite a quantificação dos biocidas A, B e C, pelo que foi efetuada a sua validação para os três biocidas em separado. O mesmo ocorreu com o método 3, tendo-se validado o método para os biocidas B e C separadamente.

4.1.2.1. Seletividade

As Figuras 4.3 a 4.6 mostram exemplos de amostras analisadas pelos diferentes métodos, contendo todos os biocidas em questão.

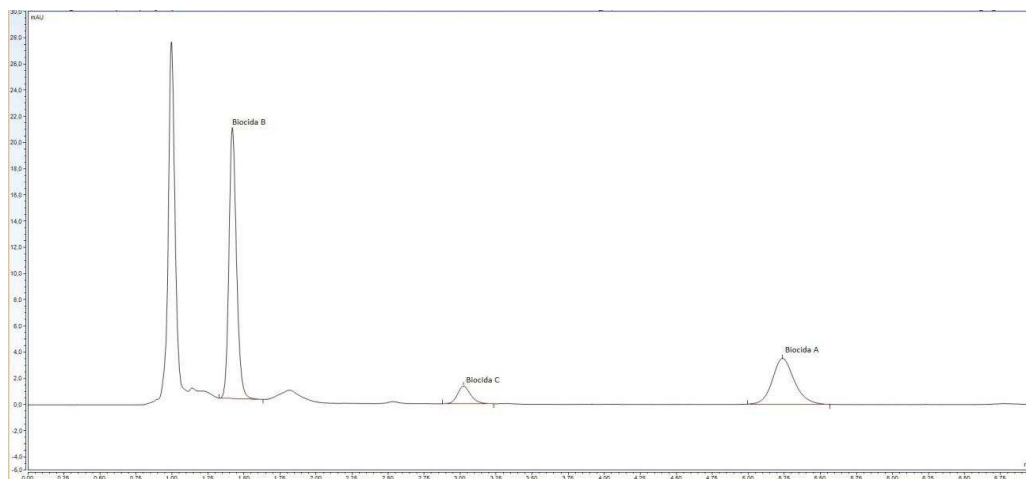


Figura 4.3 – Cromatograma representativo de uma amostra contendo os biocidas A, B e C, utilizando o método 1

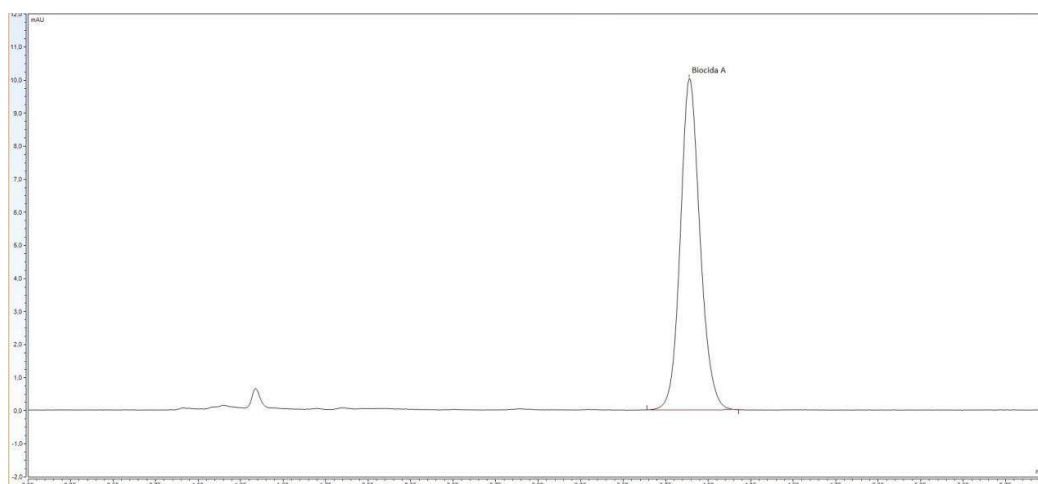


Figura 4.4 – Cromatograma representativo de uma amostra contendo o biocida A, utilizando o método 2

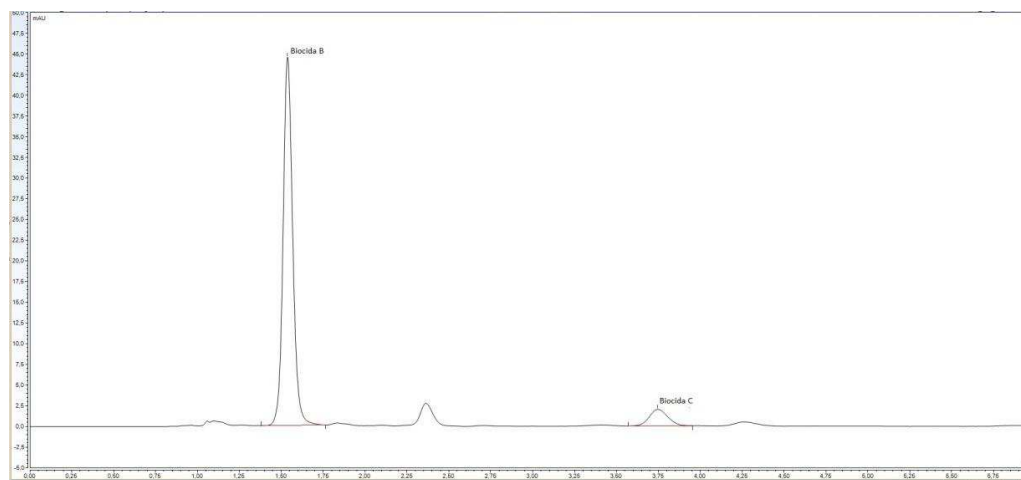


Figura 4.5 – Cromatograma representativo de uma amostra contendo os biocidas B e C, utilizando o método 3

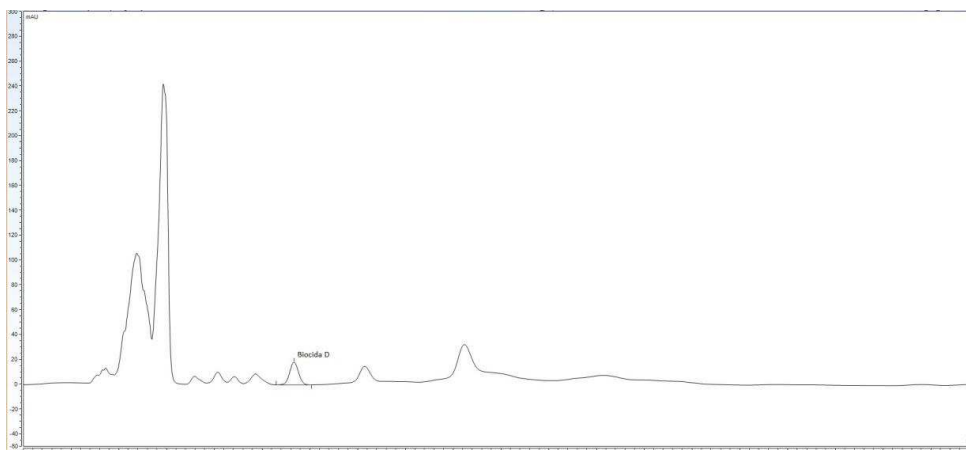


Figura 4.6 – Cromatograma representativo de uma amostra contendo o biocida D, utilizando o método 4

Relativamente à seletividade, nas condições analíticas estabelecidas e para a análise deste tipo de amostras, todos os métodos demonstraram ser seletivos uma vez que em todos os cromatogramas foi possível identificar as espécies nos tempos de retenção previstos, sem interferências de outros componentes.

4.1.2.2. Homogeneidade das variâncias

Para proceder ao estudo da homocedasticidade foram efetuadas cinco repetições das soluções padrão de cada substância a ensaiar com a menor e a maior concentração usadas no traçado da reta de calibração. Depois de ensaiadas todas as soluções, procedeu-se ao cálculo das respetivas variâncias com o intuito de determinar os valores de teste e de prova. Os resultados obtidos para todos os biocidas encontram-se nas Tabelas 4.1 a 4.5.

Tabela 4.1 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com os métodos 1 e 2, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 2)	Padrão maior (método 2)
Ensaio 1	0,1307	1,5782	0,2492	3,6988
Ensaio 2	0,0997	1,6217	0,2544	3,6993
Ensaio 3	0,1078	1,6387	0,2589	3,7192
Ensaio 4	0,1044	1,6406	0,2610	3,7329
Ensaio 5	0,1049	1,6683	0,2643	3,7201
Variância	0,00015	0,0011	0,000035	0,00022

Após o cálculo das variâncias determinaram-se os valores de teste de acordo com a equação (2.5), tendo-se obtido valores de 7,40 e 6,25 para os métodos 1 e 2, respetivamente. Foram ainda determinados os valores de prova sendo que se obteve 0,039 para o método 1 e 0,052 para o método 2.

Tabela 4.2 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama baixa com os métodos 1 e 3, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 3)	Padrão maior (método 3)
Ensaio 1	0,0321	0,1239	0,0947	0,3775
Ensaio 2	0,0318	0,1234	0,0946	0,3810
Ensaio 3	0,0290	0,1267	0,0920	0,3864
Ensaio 4	0,0323	0,1218	0,0909	0,3652
Ensaio 5	0,0312	0,1222	0,1028	0,4097
Variância	0,0000018	0,0000037	0,000022	0,00027

Relativamente ao biocida B (GB), para o método 1, obteve-se um valor de teste de 2,08 e respetivo valor de prova de 0,248. Para o método 3, 12,32 foi o resultado obtido para o valor de teste e 0,016 para o valor de prova.

Tabela 4.3 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com os métodos 1 e 3, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 3)	Padrão maior (método 3)
Ensaio 1	0,1612	2,1643	0,4973	6,3912
Ensaio 2	0,1540	2,1835	0,4951	6,3821
Ensaio 3	0,1725	2,1802	0,4838	6,3899
Ensaio 4	0,1677	2,1610	0,4989	6,4199
Ensaio 5	0,1673	2,2050	0,4997	6,4191
Variância	0,000051	0,00031	0,000042	0,00031

Quanto à gama alta do biocida B, obtiveram-se valores de teste de 6,09 e 7,50, respetivamente, para os métodos 1 e 3, e valores de prova de 0,054 e 0,038.

Tabela 4.4 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com os métodos 1 e 3, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 3)	Padrão maior (método 3)
Ensaio 1	0,0970	0,3747	0,1836	0,7450
Ensaio 2	0,0951	0,3717	0,1860	0,7481
Ensaio 3	0,0867	0,3859	0,1772	0,7580
Ensaio 4	0,0972	0,3664	0,1779	0,7195
Ensaio 5	0,0936	0,3696	0,2019	0,7863
Variância	0,000025	0,000068	0,00010	0,00058

Relativamente ao biocida C, determinaram também os valores de teste e de prova. Os resultados obtidos para os valores de teste foram 3,03 e 5,84 para os métodos 1 e 3, respetivamente, e para os valores de prova, 0,154 e 0,058.

Tabela 4.5 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida D para as gamas baixa e alta com o método 4, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (GB)	Padrão maior (GB)	Padrão menor (GA)	Padrão maior (GA)
Ensaio 1	0,3956	2,0702	2,4326	12,2937
Ensaio 2	0,3989	2,0726	2,4687	12,2762
Ensaio 3	0,3980	2,0800	2,4659	12,3801
Ensaio 4	0,3998	2,0895	2,4775	12,4206
Ensaio 5	0,4050	2,0965	2,4969	12,4099
Variância	0,000012	0,00012	0,00055	0,0045

Relativamente ao biocida D, para gama baixa obteve-se um valor de teste de 10,34 e respetivo valor de prova de 0,022. Para gama alta, 8,20 foi o resultado obtido para o valor de teste e 0,033 para o valor de prova.

Tal como referido no capítulo 2, este teste deve ser realizado com um nível de significância de 1 %. Deste modo, como se obteve valor de prova igual ou superior a 0,010 em todos os casos, a hipótese nula é aceite, logo há homogeneidade de variâncias para todas as retas de calibração efetuadas com os quatro métodos.

4.1.2.3. Linearidade

Como se concluiu que existe homocedasticidade em todas as retas de calibração estudadas, pode-se então prosseguir com o estudo da linearidade. Este foi efetuado através do teste de Mandel, sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Valores obtidos para o estudo da linearidade

Biocida	Método	Ajuste linear	SS	v	σ_{fit}
A	1	P ₀₁	0,0015	5	0,017
		P ₀₁₂	0,0014	4	0,019
A	2	P ₀₁	0,0014	5	0,017
		P ₀₁₂	0,0012	4	0,018
B (GB)	1	P ₀₁	0,0000091	5	0,0013
		P ₀₁₂	0,0000091	4	0,0015
B (GB)	3	P ₀₁	0,0010	5	0,014
		P ₀₁₂	0,00088	4	0,015
B (GA)	1	P ₀₁	0,00017	5	0,0057
		P ₀₁₂	0,00013	4	0,0056
B (GA)	3	P ₀₁	0,026	5	0,073
		P ₀₁₂	0,025	4	0,080
C	1	P ₀₁	0,000079	5	0,0040
		P ₀₁₂	0,000079	4	0,0044
C	3	P ₀₁	0,0041	5	0,0035
		P ₀₁₂	0,029	4	0,030
D (GB)	4	P ₀₁	0,0046	5	0,030
		P ₀₁₂	0,0043	4	0,033
D (GA)	4	P ₀₁	0,21	5	0,21
		P ₀₁₂	0,20	4	0,22

Os valores de teste foram calculados segundo a equação (2.6), tendo-se de seguida determinado os valores de prova. Para o biocida A obtiveram-se valores de teste de 0,29 e 0,57, respetivamente, para os métodos 1 e 2, e valores de prova de 0,621 e 0,492. Relativamente ao biocida B, para a gama baixa obteve-se 0,02 e 0,63 como valores de teste e 0,899 e 0,470 como valores de prova, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Quanto à sua gama alta, 1,23 e 0,18 foram os valores obtidos para valores de teste e 0,330 e 0,693 para

valores de prova, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Relativamente ao biocida C, foram também determinados os valores de teste para os métodos 1 e 3, tendo-se obtido 0,01 e 0,67. Os resultados para os mesmos métodos para os valores de prova foram, respetivamente, 0,938 e 0,458. Em relação ao método 4, quanto à gama baixa do biocida D determinou-se um valor de teste de 0,29 e um valor de prova de 0,621. Os mesmos valores foram calculados para a gama alta deste biocida, tendo-se obtido, respetivamente, 0,34 e 0,590.

Deste modo, pode-se constatar que os valores obtidos para o valor de prova são todos superiores a 0,010. Uma vez que este teste foi efetuado com um nível de significância de 1 %, pode-se concluir que a função polinomial de primeiro grau (P_{01}) ajusta convenientemente o conjunto de pontos experimentais para todas as retas de calibração traçadas.

4.1.2.4. Avaliação dos outliers

Tal como referido no capítulo 2, além do estudo da linearidade, é também importante avaliar a possível existência de *outliers*. A listagem dos eventuais *outliers* foi efetuada através de uma regressão robusta, com o auxílio das equações (2.21) a (2.24). De seguida, foi realizado o teste de Mandel, sendo que os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 4.7 e 4.8.

Tabela 4.7 – Valores obtidos para a avaliação de *outliers* para os biocidas A e B (GB)

Biocida	Método	Pontos utilizados	SS	v	σ_{fit}
A	1	Todos	0,0015	5	0,017
		Exceto X_2	0,0011	4	0,017
A	2	Todos	0,0014	5	0,017
		Exceto X_6	0,00025	4	0,0080
B (GB)	1	Todos	0,0000091	5	0,0013
		Exceto X_3	0,0000034	4	0,00092
B (GB)	3	Todos	0,0010	5	0,014
		Exceto X_4	0,000043	4	0,0033
		Exceto X_7	0,0000069	3	0,0015

Tabela 4.8 – Valores obtidos para a avaliação de *outliers* para os biocidas B (GA), C e ambas as gamas do biocida D

Biocida	Método	Pontos utilizados	SS	v	σ_{fit}
B (GA)	1	Todos	0,00017	5	0,0057
		Exceto X_3	0,00010	4	0,0050
B (GA)	3	Todos	0,026	5	0,073
		Exceto X_6	0,0028	4	0,027
		Exceto X_7	0,0011	3	0,019
C	1	Todos	0,000079	5	0,0040
		Exceto X_3	0,000044	4	0,0033
C	3	Todos	0,0041	5	0,029
		Exceto X_4	0,00015	4	0,0062
		Exceto X_7	0,000026	3	0,0029
D (GB)	4	Todos	0,0046	5	0,030
		Exceto X_7	0,0024	4	0,024
D (GA)	4	Todos	0,21	5	0,21
		Exceto X_3	0,047	4	0,11

Os valores de teste foram calculados segundo a equação (2.6) e, de seguida, foram determinados os respetivos valores de prova. Relativamente ao biocida A, obtiveram-se valores de teste de 1,44 e 18,26 para os métodos 1 e 2, respetivamente, e valores de prova de 0,296 e 0,013. Como estes últimos valores obtidos são superiores a 0,010, concluiu-se que não existem *outliers* para ambas as retas de calibração do biocida A.

Relativamente à gama baixa do biocida B, para o método 1 determinou-se um valor de teste de 6,71 e um valor de prova de 0,061, sendo que se conclui o mesmo que no biocida A. Por outro lado, quanto ao método 3, obteve-se um valor de teste de 90,86 e respetivo valor de prova de 0,001 quando se testou o quarto padrão. Assim, como o valor de prova obtido não excedeu o valor de 0,010, o quarto padrão foi considerado um *outlier* e foi retirado da reta de calibração. De seguida, testou-se o ponto (x_i, y_i) com maior diferença entre o valor de Y obtido e o valor de Y previsto pela regressão robusta, neste caso, o sétimo padrão. Desta vez, obteve-se um valor de teste de 15,80 e respetivo valor de prova de 0,028 pelo que, conclui-se que esta reta de calibração apenas apresenta um *outlier*, o quarto padrão.

Quanto à gama alta deste mesmo biocida, para o método 1 também se verificou a inexistência de *outliers* na reta, dado que se obteve um valor de prova de 0,186 para o respetivo valor de teste de 2,54. Em relação ao método 3, ao testar o sexto padrão constatou-

se que este é efetivamente um *outlier* da reta, uma vez que o valor de prova obtido corresponde a 0,004 para o respetivo valor de teste de 33,60. Após retirar este ponto, testou-se o sétimo padrão tendo-se obtido valores de teste e de prova de 4,46 e 0,125, respetivamente. Deste modo, esta reta de calibração apresenta apenas um *outlier*, o sexto padrão.

Relativamente ao biocida C, quanto ao método 1, obtiveram-se valores de teste e de prova de 3,20 e 0,148, respetivamente, sendo que se conclui que esta reta de calibração não apresenta *outliers*. Quanto ao método 3, constatou-se que o quarto padrão é um *outlier* da reta, dado ter-se obtido um valor de prova de 0,001 para o respetivo valor de teste de 103,84. Este ponto foi retirado da reta de calibração e, de seguida, testou-se o sétimo padrão, sendo que se constatou que esta reta não apresenta mais *outliers* além do quarto padrão, uma vez que o valor prova obtido foi de 0,031 para o respetivo valor de teste de 14,85.

Quando se analisou o método 4, para ambas as gamas do biocida D, verificou-se que as duas retas estão isentas de *outliers*, dado terem-se obtido valores de prova de 0,129 e 0,020 para os respetivos valores de teste de 3,65 e 14,05, para as gamas baixa e alta, respetivamente.

De notar que, sempre que o valor de prova exceder o valor de 0,010, conclui-se que não existem *outliers* na respetiva reta de calibração uma vez que, quando o ponto (x_i, y_i) com maior diferença entre o valor de Y obtido e o valor de Y previsto pela regressão robusta não é um *outlier*, os restantes pontos da reta também não são. É também importante mencionar que, quando se verificou a existência de *outliers*, o teste da linearidade foi repetido após serem retirados todos os *outliers* das retas traçadas, sendo que se voltou a obter linearidade.

4.1.2.5. Significado estatístico dos parâmetros b_0 e b_1

A próxima etapa na validação de métodos é a verificação do significado estatístico dos parâmetros. Os valores de b_0 e b_1 foram determinados segundo as equações apresentadas no capítulo 2, assim como os respetivos erros padrão. As retas de calibração, tal como as respetivas equações e coeficiente de correlação, correspondentes a cada uma das retas de calibração traçadas, encontram-se representadas nas Figuras 4.7 a 4.12.

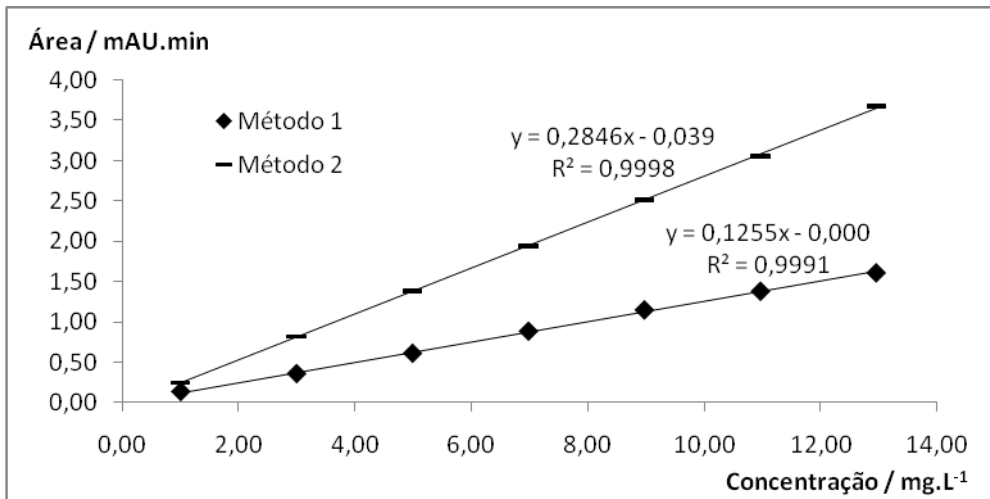


Figura 4.7 – Gráfico representativo das retas de calibração do biocida A utilizando os métodos 1 e 2

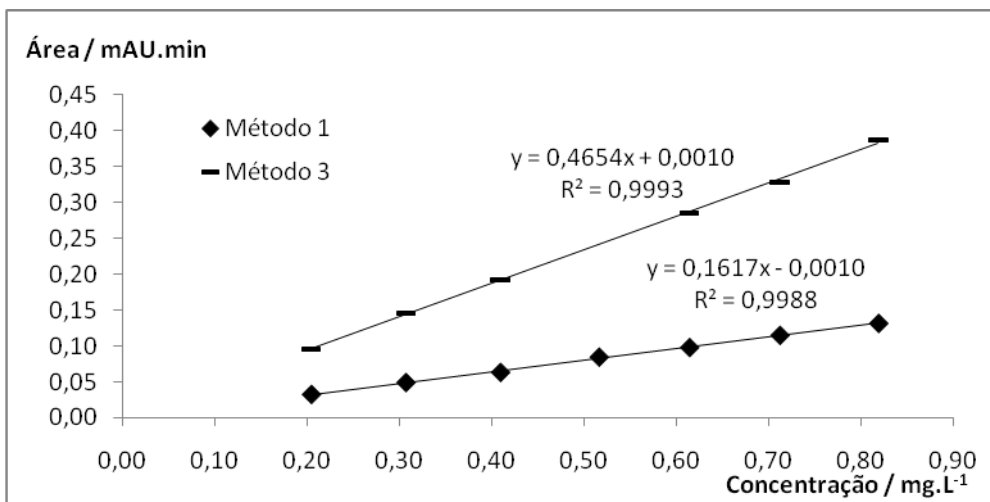


Figura 4.8 – Gráfico representativo das retas de calibração para a gama baixa do biocida B utilizando os métodos 1 e 3

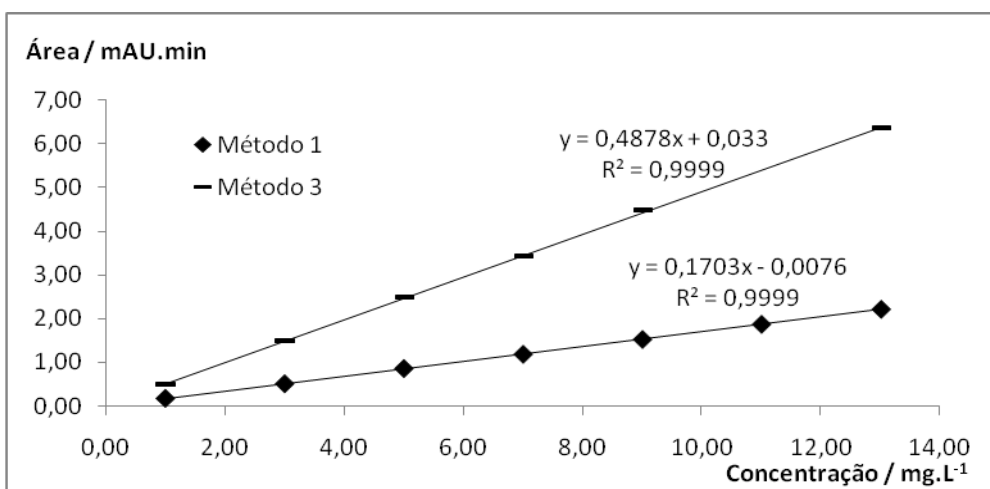


Figura 4.9 – Gráfico representativo das retas de calibração para a gama alta do biocida B utilizando os métodos 1 e 3

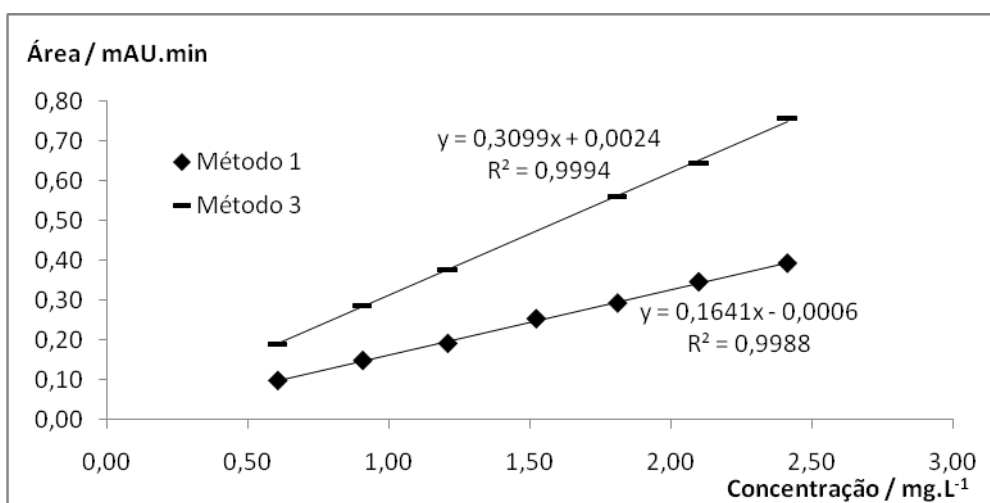


Figura 4.10 – Gráfico representativo das retas de calibração do biocida C utilizando os métodos 1 e 3

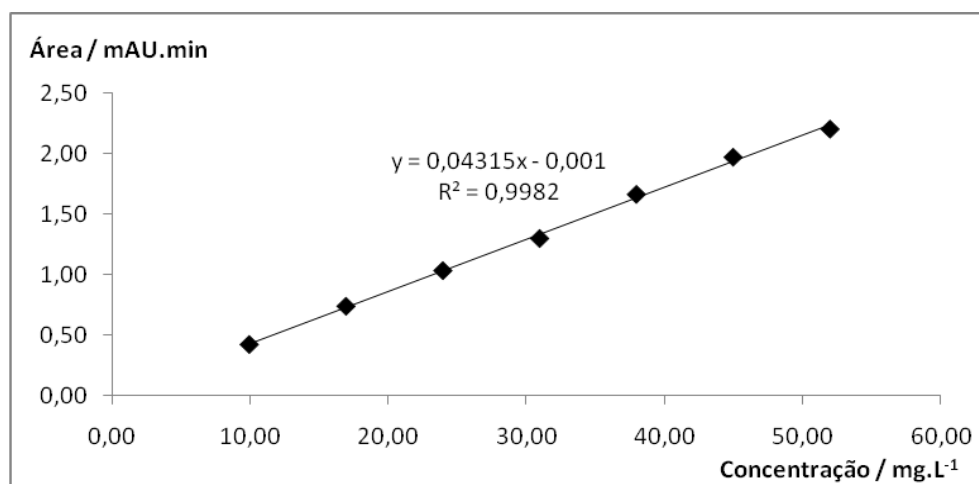


Figura 4.11 – Gráfico representativo da reta de calibração para a gama baixa do biocida D utilizando o método 4

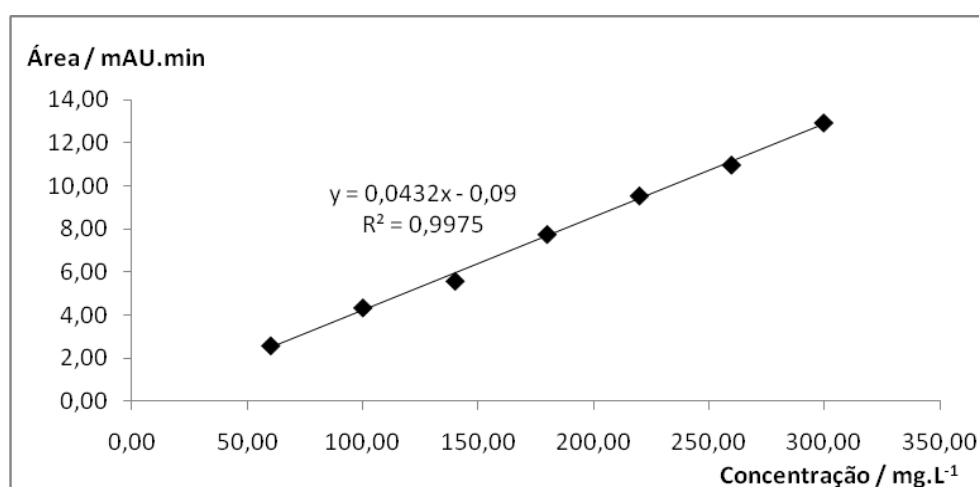


Figura 4.12 – Gráfico representativo da reta de calibração para a gama alta do biocida D utilizando o método 4

Para além dos testes já efetuados (homogeneidade de variâncias e linearidade), todas as retas foram consideradas satisfatórias uma vez que possuem $R^2 > 0,995$.

Para verificar se os parâmetros da reta são ou não considerados estatisticamente iguais ou diferentes de zero, foi aplicado o teste *t* de Student, sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Valores obtidos para o estudo do significado estatístico dos parâmetros de todas as retas de calibração dos biocidas A e B

Biocida	Método	$b_0 / \text{mAU.min}$	SE (b_0)	$b_1 / \text{L.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$	SE (b_1)
A	1	0,000	0,013	0,1255	0,0017
	2	-0,039	0,013	0,2846	0,0016
B (GB)	1	-0,0010	0,0014	0,1617	0,0025
	3	0,0010	0,0034	0,4654	0,0061
B (GA)	1	-0,0076	0,0044	0,17032	0,00054
	3	0,033	0,020	0,4878	0,0027
C	1	-0,0006	0,0041	0,1641	0,0025
	3	0,0024	0,0064	0,3099	0,0039
D (GB)	4	-0,001	0,028	0,04315	0,00082
D (GA)		-0,09	0,19	0,0432	0,0010

Foram ainda determinados os valores de teste e de prova para cada uma das retas sendo que, seguidamente, serão mencionados os resultados obtidos relativamente à ordenada na origem.

Quanto ao biocida A, para o método 1 obteve-se um valor de teste de 0,02 e um valor de prova de 0,987, enquanto para o método 2 os respetivos resultados foram 3,02 e 0,039. Em relação à gama baixa do biocida B, obtiveram-se valores de prova de 0,516 e 0,785 para os respetivos valores de teste de 0,70 e 0,29, para os métodos 1 e 3, respetivamente. Quanto à gama alta deste mesmo biocida, os resultados obtidos para os mesmos métodos foram, respetivamente, para os valores de prova, 0,141 e 0,156 para os respetivos valores de teste de 1,74 e 1,62. Relativamente ao biocida C, 0,881 e 0,725 foram os resultados obtidos para os valores de prova, respetivamente, para os métodos 1 e 3, correspondendo aos respetivos valores de teste de 0,16 e 0,37. Por fim, analisando o método 4, obtiveram-se valores de prova de 0,982 e 0,670 correspondentes aos valores de teste de 0,02 e 0,45, respetivamente, para as gamas baixa e alta.

Deste modo, relativamente à análise da ordenada na origem, como o valor de prova excedeu o valor de 0,050 em todos os casos à exceção de um, pode-se concluir que este parâmetro não tem significado estatístico. Relativamente à reta de calibração do biocida A através do método 2, como o valor de prova se encontra no intervalo de 0,050 a 0,010, selecionou-se o valor de 0,030 como valor de decisão. Assim, como se obteve um valor superior a 0,030, conclui-se também neste caso que a ordenada na origem não tem significado estatístico. Esta conclusão força a exclusão da estimativa dos limiares analíticos através da ordenada na origem.

Seguidamente, serão mencionados os resultados obtidos para os valores de testes relativamente ao estudo do significado estatístico do declive.

Para o biocida A obtiveram-se valores de 75,75 e 178,60, respetivamente, para os métodos 1 e 2. Relativamente à gama baixa do biocida B, obtiveram-se valores de 64,76 e 76,63, correspondentes aos métodos 1 e 3. Quanto à sua gama alta, para os mesmos métodos, obtiveram-se valores de 314,19 e 178,02. Relativamente ao biocida C, foram também determinados os valores de teste para os métodos 1 e 3, tendo-se obtido 65,60 e 79,55, respetivamente. Em relação ao método 4, determinou-se um valor de teste de 52,77 para a gama baixa do biocida D e um valor de teste de 44,23 para a gama alta deste mesmo biocida. Quanto aos resultados obtidos para os valores de prova, estes foram sempre iguais a 0,000 para todos os casos estudados.

Deste modo, contrariamente aos resultados obtidos na análise da ordenada na origem, no estudo do declive obteve-se, em todas as retas de calibração, valores de prova inferiores a 5 % pelo que, conclui-se que este parâmetro tem significado estatístico e, portanto, pode-se prosseguir com a validação.

4.1.2.6. Limiares analíticos

Os limiares analíticos são parâmetros importantes em validação, uma vez que definem a concentração a partir da qual se pode detetar (limite de deteção) e quantificar (limite de quantificação) a substância a analisar.

Uma vez que a linha de base não apresenta ruído, os limiares analíticos não foram calculados pela razão sinal/ruído e, como se concluiu que a ordenada na origem não tem significado estatístico em nenhuma das retas de calibração traçadas, também não foram

calculados pelo erro padrão deste parâmetro da reta. Assim, os limites de deteção e de quantificação foram sempre determinados através do desvio padrão residual, segundo as equações (2.30) a (2.32) do capítulo 2, sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Valores obtidos de LD e LQ para as retas de calibração traçadas com os métodos 1, 2, 3 e 4

Biocida	Método	$b_1 / \text{L.mg}^{-1}\text{min}^{-1}$	σ_{fit}	LD / mg.L^{-1}	LQ / mg.L^{-1}
A	1	0,1255	0,017	0,5614	1,684
	2	0,2846	0,017	0,2381	0,7143
B (GB)	1	0,1617	0,0013	0,03361	0,1008
	3	0,4654	0,0033	0,03005	0,09016
B (GA)	1	0,17032	0,0057	0,1360	0,4081
	3	0,4878	0,027	0,2319	0,6957
C	1	0,1641	0,0040	0,09775	0,2932
	3	0,3099	0,0062	0,08527	0,2558
D (GB)	4	0,04315	0,030	2,826	8,478
D (GA)		0,04318	0,21	19,27	57,80

À exceção da reta de calibração do biocida A traçada através do método 1, os limites de quantificação obtidos para as restantes retas são inferiores ao padrão de menor concentração. Relativamente à reta acima referida, apesar de o limite de quantificação ser superior ao primeiro padrão, é inferior ao segundo padrão de menor concentração e o limite de deteção é inferior ao primeiro padrão de menor concentração. Uma vez que esta é também uma situação aceitável, todos os limites obtidos foram considerados satisfatórios.

Assim, podem-se definir as gamas analíticas finais como tendo início nos limites de quantificação e termo nos padrões de maior concentração utilizados para o traçado de cada uma das retas.

4.1.2.7. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado apenas a dois níveis, repetibilidade e precisão intermédia, uma vez que para o estudo da reprodutibilidade são necessários ensaios interlaboratoriais.

Repetibilidade

A repetibilidade de cada método foi avaliada a partir da realização de cinco repetições, em condições de repetibilidade, dos ensaios referentes a três concentrações diferentes dentro da gama de trabalho, padrões de concentração menor, intermédia e maior. Uma vez que o desvio padrão da repetibilidade foi determinado a partir da ANOVA, previamente, foi efetuado o teste de Cochran aos resultados dos ensaios obtidos. A Tabela 4.11 demonstra os resultados obtidos para o método 1, biocida A.

Tabela 4.11 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com o método 1, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,1307	0,8488	1,5782
Ensaio 2	0,0997	0,8396	1,6217
Ensaio 3	0,1078	0,8965	1,6387
Ensaio 4	0,1044	0,8258	1,6406
Ensaio 5	0,1049	0,8749	1,6683
Variância	0,00015	0,00081	0,0011

Acerca dos valores obtidos neste teste, determinou-se a variância máxima, 0,0011, e ainda a soma das variâncias, tendo-se obtido um valor de 0,0021. De seguida, calculou-se o valor de teste, através da equação (2.9) do capítulo 2, sendo que se obteve um valor de 0,536. O valor crítico foi obtido pela tabela estatística de Cochran, com nível de significância 0,05, número de ensaios igual a três e número de réplicas igual a cinco. Deste modo, tem-se um valor crítico igual a 0,746 que, como é superior ao valor de teste calculado, pode-se concluir, com 95 % de confiança, que os ensaios efetuados em condições de repetibilidade não possuem *outliers* de variância. Deste modo, pode-se prosseguir com a análise através da ANOVA. O mesmo se concluiu para as restantes retas de calibração traçadas pelos quatros métodos, sendo que os resultados encontram-se no apêndice A, nas Tabelas A1.

Os valores de desvio padrão, coeficiente de variação e limite de repetibilidade, resultados obtidos após a análise através da ANOVA, encontram-se representados nas Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Valores obtidos para o estudo da repetibilidade

Biocida	Método	s_{ri}	Δr	$CV_r / \%$
A	1	0,026	0,08	2,3
	2	0,012	0,037	2,4
B (GB)	1	0,0022	0,0068	0,02
	3	0,019	0,060	0,4
B (GA)	1	0,022	0,07	2,5
	3	0,013	0,044	4,6
C	1	0,0090	0,028	0,2
	3	0,019	0,060	0,7
D (GB)	4	0,020	0,062	2,6
D (GA)		0,060	0,19	44,6

Pela análise da Tabela 4.12 verifica-se que, com um nível de confiança de 95 %, obtiveram-se coeficientes de variação bastante baixos, à exceção da reta de calibração para a gama alta do biocida D. Tal pode dever-se ao facto de esta gama abranger concentrações bastante elevadas, que leva a áreas significativamente maiores, aumentando o erro sistemático, logo aumentando a variância dos resultados. Assim, todos os resultados foram considerados satisfatórios.

Precisão intermédia

Para determinar a precisão intermédia de cada um dos métodos realizaram-se cinco repetições em cada dia, ao longo de cinco dias, de ensaios referentes à solução padrão de concentração intermédia. Estes ensaios foram efetuados por dois analistas em simultâneo. Uma vez que se variaram dois fatores, analistas e dias, a análise deste parâmetro foi efetuada através da ANOVA. Esta última permite a segmentação de fontes de variabilidade além da estimativa puramente aleatória e, por isso, pode ser usada na estimativa de fontes de variabilidade. Contudo é conveniente que a variabilidade interna seja homogénea de forma a conseguir obter boas estimativas de variabilidade. Como tal, antes de se prosseguir com a análise de variâncias, foram avaliados os *outliers* intra-diários de variabilidade excessiva de cada analista através do teste de Cochran. Os resultados obtidos respetivos ao biocida A

através do método 1, para os ensaios dos analistas 1 e 2 ao longo dos cinco dias, encontram-se na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com o método 1, para o estudo da precisão intermédia

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	0,8488	0,8750	0,7563	0,7294	0,7098
	Ensaio 2	0,8396	0,8680	0,7536	0,7031	0,7124
	Ensaio 3	0,8965	0,8622	0,7393	0,7041	0,7077
	Ensaio 4	0,8258	0,8668	0,7449	0,7534	0,7064
	Ensaio 5	0,9863	0,8744	0,7524	0,6672	0,7056
Analista 2	Ensaio 1	0,8882	0,8722	0,7329	0,7599	0,7609
	Ensaio 2	0,8326	0,8709	0,7187	0,7571	0,7598
	Ensaio 3	0,7761	0,8703	0,7318	0,7537	0,7602
	Ensaio 4	0,8699	0,8692	0,7394	0,7502	0,7599
	Ensaio 5	0,8735	0,8738	0,7489	0,7499	0,7604

De modo a avaliar os *outliers* intra-diários de ambos os analistas, através do teste de Cochran, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0043; 0,000029; 0,000049; 0,0010 e 0,0000076, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,0020; 0,0000032; 0,00012; 0,000019 e 0,00000019, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. De seguida, observou-se a variância máxima do analista 1, 0,0043, e do analista 2, 0,0020. Calculou-se a soma das variâncias, tendo-se obtido 0,0054 e 0,0022, respetivamente, para os analistas 1 e 2. Os valores de teste foram determinados pela equação (2.9), sendo que os valores obtidos foram 0,792 e 0,934, correspondentes aos analistas 1 e 2. Uma vez que o valor crítico de Cochran para 5 % de significância, cinco ensaios e cinco réplicas é igual a 0,544, e os valores de teste calculados para cada analista são ambos superiores ao valor crítico, então existe um *outlier* de variância que, em ambos os casos, corresponde aos ensaios efetuados no dia 1. Deste modo, o teste de Cochran foi repetido até não existirem *outliers* de variância, sendo que se concluiu que o dia 4 é também *outlier* para o analista 1, e que os ensaios do analista 2 não poderão ser utilizados. O estudo dos *outliers* intra-diários para as restantes retas de calibração traçadas pode ser verificado no apêndice A, nas Tabelas A2.

Após a remoção de todos os *outliers* a variabilidade interna fica bem estabelecida e pode ser usada na estimativa das restantes fontes de variabilidade. Deste modo, prosseguiu-se com a análise através da ANOVA, sendo que os resultados obtidos para o valor de prova relativamente a todas as retas encontram-se na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Valores obtidos para o valor de prova após a análise através da ANOVA

Biocida	Método	Analistas	Dias	Interações
A	1	-	0,000	-
	2	0,008	0,022	0,917
B (GB)	1	0,138	0,569	0,096
	3	0,101	0,018	0,912
B (GA)	1	0,000	0,000	0,000
	3	0,906	0,075	0,548
C	1	0,127	0,629	0,067
	3	0,092	0,042	0,985
D (GB)	4	0,001	0,001	0,000
D (GA)		0,000	0,006	0,298

Tal como referido no capítulo 2, a variabilidade entre dias/analistas só pode ser calculada quando o valor de prova é inferior a 0,010 ou, tal como referido anteriormente, quando se situa no intervalo entre 0,010 e 0,050, seleciona-se o valor de 0,030 como valor de decisão. Deste modo, foi calculada a variabilidade entre analistas para o método 1 (gama alta do biocida B), para o método 2 (biocida A) e para o método 4 (ambas as gamas do biocida D). A variabilidade entre dias foi determinada para o método 1 (biocida A e gama alta do biocida B), para o método 2 (biocida A), para o método 3 (gama baixa do biocida B) e para o método 4 (ambas as gamas do biocida D). Concluiu-se ainda que existe interação dos fatores analistas/dias quanto ao método 1 para a gama alta do biocida B, e quanto ao método 4 para a gama baixa do biocida D. Relativamente aos restantes não é possível determinar a precisão intermédia do método.

Concluiu-se ainda que existe interação dos fatores analistas/dias quanto ao método 1 para a gama alta do biocida B, e quanto ao método 4 para a gama baixa do biocida D. Os valores calculados de desvio padrão entre analistas e/ou dias, e ainda os valores determinados de precisão intermédia, segundo as equações (2.39) e (2.40) encontram-se na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Valores determinados de desvio padrão entre analistas/dias e de precisão intermédia

Biocida	Método	$S_{(entre\ analistas)}$	$S_i (A)$	$S_{(entre\ dias)}$	$S_i (D)$
A	1	-	-	0,084	0,089
	2	0,047	0,14	0,042	0,13
B (GB)	1	-	-	-	-
	3	-	-	0,0035	0,010
B (GA)	1	0,048	0,053	0,015	0,015
	3	-	-	-	-
C	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
D (GB)	4	0,027	0,067	0,027	0,067
D (GA)		0,20	0,45	0,14	0,39

Pela análise da Tabela 4.17, pode-se concluir que, sempre que foi possível determinar a precisão intermédia devida a ambos os fatores (analistas e dias), verificou-se que o fator “analistas” introduz mais erros em termos de variabilidade do que o fator “dias”.

4.1.2.8. Exatidão

Como forma de avaliar a exatidão do método 1, realizaram-se testes de recuperação em duas amostras com duas réplicas cada uma para cada reta de calibração traçada. Destas amostras fizeram parte produtos acabados e matérias-primas tais como emulsões, aditivos e corantes.

Uma vez que foram efetuados poucos ensaios para o estudo deste parâmetro devido à pouca disponibilidade de amostras e de tempo, e uma vez que estes resultados foram inconclusivos, futuramente será necessário repetir as taxas de recuperação para todos os métodos de modo a ser possível tirar conclusões.

4.1.2.9. Robustez

Para determinar a robustez dos métodos procedeu-se a uma ligeira variação num dos parâmetros de cada um deles, nomeadamente, o fluxo. Por questões de tempo não foi

efetuado este estudo para o método 4 e, por questões de indisponibilidade de amostras, também não foi estudada a robustez da gama baixa do biocida B (nem no método 1, nem no método 3).

Uma vez que apenas se estudou um parâmetro, a avaliação da robustez não foi feita através do teste de YOUNDEN. Após uma diminuição de 0,1 mL/min, foram traçadas novas retas de calibração para os quatro biocidas e estudadas algumas características, nomeadamente, homogeneidade de variâncias, linearidade, avaliação de *outliers* pelo teste de Mandel, estudo do significado estatístico dos parâmetros da reta e determinação dos limiares analíticos. Todas as retas obtiveram bons resultados, sendo que estes encontram-se no apêndice A, nas Tabelas A3.

De seguida, analisam-se entre 14 a 18 amostras através do método 1 e do método com o fluxo alterado, tendo-se comparado os métodos pelo do teste *t* de Student, através de um polinómio de primeiro grau que traduz a função de resposta:

$$X_{alt} = b_0 + b_1 \cdot X_{ref} \quad (4.1)$$

Os resultados obtidos dos ensaios das amostras para o biocida A através do método 1 encontram-se nas Tabelas 4.16 e 4.17. No apêndice A, nas Tabelas A3, podem-se encontrar os resultados obtidos para os restantes biocidas através do método 1 e os resultados para os restantes métodos.

Tabela 4.16 – Valores obtidos em mg.L⁻¹ para as amostras analisadas do biocida A com o método 1 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	X _{ref} / mg.L ⁻¹	X _{alt} / mg.L ⁻¹
Produto 1	Amostra I1	5,333	4,861
Produto 1	Amostra I2	5,058	4,836
Produto 1	Amostra M1	6,822	6,918
Produto 1	Amostra M2	7,207	7,306
Produto 1	Amostra N1	6,622	6,878
Produto 1	Amostra N2	6,606	6,557
Produto 1	Amostra O1	7,501	7,830
Produto 1	Amostra O2	7,367	7,214
Produto 1	Amostra P1	7,177	7,640
Produto 1	Amostra P2	7,451	6,929

Tabela 4.17 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida A com o método 1 e com o método com fluxo alterado (continuação)

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 2	Amostra A	1,846	1,910
Produto 2	Amostra C1	2,996	2,970
Produto 2	Amostra D	3,143	3,458
Produto 2	Amostra C2	2,355	2,370

Após a análise das amostras, foram avaliados os *outliers* através do teste de Mandel. Calcularam-se os valores de teste segundo a equação (2.6) e, de seguida, foram determinados os respetivos valores de prova. Relativamente ao biocida A, obtiveram-se valores de teste de 4,78 e 8,17 para os métodos 1 e 2, respetivamente, e valores de prova de 0,051 e 0,016. Como estes últimos valores obtidos são superiores a 0,010, concluiu-se que não existem *outliers* para ambas as retas.

Relativamente à gama baixa do biocida B, para o método 1 determinaram-se valores de teste de 4,78 e 8,17 correspondentes a valores de prova de 0,051 e 0,016, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Assim, como os valores de prova excederam o valor de 0,010, concluiu-se o mesmo que no biocida A.

Quanto à gama alta deste mesmo biocida, para o método 1 também se verificou a inexistência de *outliers* na reta, dado que se obteve um valor de prova de 0,039 para o respetivo valor de teste de 5,09. Em relação ao método 3, ao testar o terceiro ensaio constatou-se que este é efetivamente um *outlier* da reta, uma vez que o valor de prova obtido corresponde a 0,000 para o respetivo valor de teste de 50,82. Após retirar este ponto, testou-se o oitavo ensaio tendo-se obtido valores de teste e de prova de 13,38 e 0,003, respetivamente. Deste modo, retirou-se também este ponto, tendo-se testado de seguida o décimo primeiro ensaio. Conclui-se que este último não é um *outlier*, dado que o valor de prova obtido foi de 0,071 para o correspondente valor de teste de 3,98.

Relativamente ao biocida C, quanto ao método 1, obtiveram-se valores de teste e de prova de 7,09 e 0,020, respetivamente, sendo que se conclui que esta reta não apresenta *outliers*. Quanto ao método 3, constatou-se que o décimo quinto ensaio é um *outlier* da reta, dado ter-se obtido um valor de prova de 0,000 para o respetivo valor de teste de 125,03. Este ponto foi retirado da reta e, de seguida, testou-se o décimo terceiro ensaio, sendo que se constatou que também é um *outlier* uma vez que se obteve um valor prova obtido de 0,007

para o respetivo valor de teste de 10,74. Posteriormente, testou-se o sexto ensaio tendo-se constatado que esta reta não apresenta mais *outliers* porque o valor de prova obtido foi de 0,072 para o correspondente valor de teste de 3,97.

Na Figura 4.13 encontra-se ilustrado o gráfico representativo da equação (4.1) para o biocida A através do método 1, sendo que a linha a tracejado representa a situação $X_{alt} = X_{ref}$.

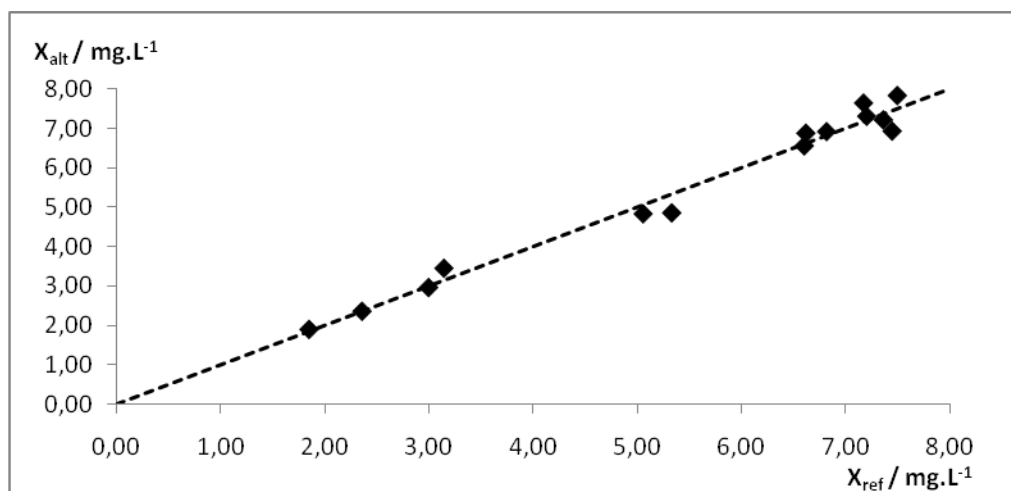


Figura 4.13 – Gráfico representativo da equação (4.1) para o biocida A, método 1

De seguida, determinaram-se os valores da ordenada na origem e do declive, os respetivos erros padrão, e efetuou-se o teste *t* de Student para verificar a robustez do método relativamente às respetivas retas. A Tabela 4.18 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4.18 – Valores obtidos para o estudo da robustez

Biocida	Método	b_0 / mAU.min	SE (b_0)	b_1 / L.mg ⁻¹ min ⁻¹	SE (b_1)
A	1	0,03	0,23	0,998	0,040
	2	0,00	0,10	0,979	0,015
B (GA)	1	0,25	0,12	0,973	0,016
	3	-0,28	0,10	1,045	0,015
C	1	-0,063	0,051	0,997	0,064
	3	-0,0050	0,0049	0,9831	0,0081

De seguida, foram determinados os valores de teste e de prova. Seguidamente serão apresentados os resultados obtidos para a ordenada na origem. Relativamente ao biocida A, obtiveram-se valores de teste de 0,11 e 0,01 e valores de prova de 0,991 e 0,993, respetivamente, para os métodos 1 e 2. Quanto à gama alta do biocida B, 2,02 e 2,88 foram os resultados obtidos para os valores de teste, respetivamente, para os métodos 1 e 3, enquanto

0,060 e 0,014 foram os valores calculados para os valores de prova, para os mesmos métodos. Em relação ao biocida C, obtiveram-se valores de 0,239 e 0,060 como valores de prova correspondentes aos valores de teste de 1,23 e 1,04, respetivamente, para os métodos 1 e 3.

Seguidamente serão apresentados os resultados obtidos para o declive. Quanto ao biocida A, 0,06 e 1,40 foram os resultados obtidos para os valores de teste, respetivamente, para os métodos 1 e 2, enquanto 0,955 e 0,187 foram os valores calculados para os valores de prova, para os mesmos métodos. Relativamente à gama alta do biocida B, calcularam-se os valores de teste, tendo-se obtido 1,66 e 2,95 e os correspondentes valores de prova, tendo-se obtido 0,116 e 0,012, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Em relação ao biocida C, os valores de prova obtidos foram 0,959 e 0,060 para os respetivos valores de teste de 0,05 e 2,08, correspondentes aos mesmos métodos do biocida B.

Deste modo, como os valores de prova obtidos são todos superiores a 0,010, tal significa que, em todos os casos, $b_0 = 0$ e $b_1 = 1$, logo os métodos 1, 2 e 3 são considerados robustos quanto a variações no fluxo para as retas de calibração traçadas dos biocidas A, B (gama alta) e C.

4.2. ATP-bioluminescência

Os kits de análises rápidas que utilizam a técnica ATP-bioluminescência são um método inovador para avaliações microbiológicas. Como são ainda pouco conhecidos, a empresa optou por começar por efetuar estudos da influência de algumas variáveis, nomeadamente do volume das gotas de padrão utilizadas na calibração e o ruído de fundo. Após esses testes foram então efetuados ensaios comparativos com análise por *Dip Slides*, com o intuito de validar este método inovador.

4.2.1. Influência do volume das gotas de padrão na calibração

Tal como explicado no capítulo anterior, o padrão de ATP é fornecido em frasco contendo gotas selado (não sendo possível utilizar uma micropipeta para medir um volume rigoroso) e

para proceder à calibração adicionam-se 2 gotas a um tubo de ensaio para o qual, de seguida, se transferem 100 μL de luminase. Utilizando um conta-gotas é quase impossível adicionar gotas sempre com a mesma massa. Deste modo, foi feito um estudo para determinar qual o efeito da massa das gotas adicionadas no valor de calibração obtido. Para tal, foram efetuados 10 ensaios de calibração, sendo que a massa das duas gotas adicionadas ao tubo de ensaio foi sempre registada, tal como o valor de calibração. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Valores observados das massas das duas gotas adicionadas e da calibração para 10 ensaios

Ensaio	massa (2 gotas) / g	URL _{pad} / URL
1	0,0791	170506
2	0,0666	154817
3	0,0948	203873
4	0,0864	193685
5	0,0793	182521
6	0,0951	210710
7	0,0933	194233
8	0,0891	200668
9	0,0885	203794
10	0,0868	186365

Tal como se pode observar na Tabela 4.19, existe um efeito no valor de calibração causado pelo tamanho das gotas, sendo que quanto maior a sua massa, maior o valor de calibração obtido, o que seria de esperar. Nas Figuras 4.14 e 4.15 podem-se observar os gráficos representativos das variações tanto da massa das duas gotas como do valor de calibração.

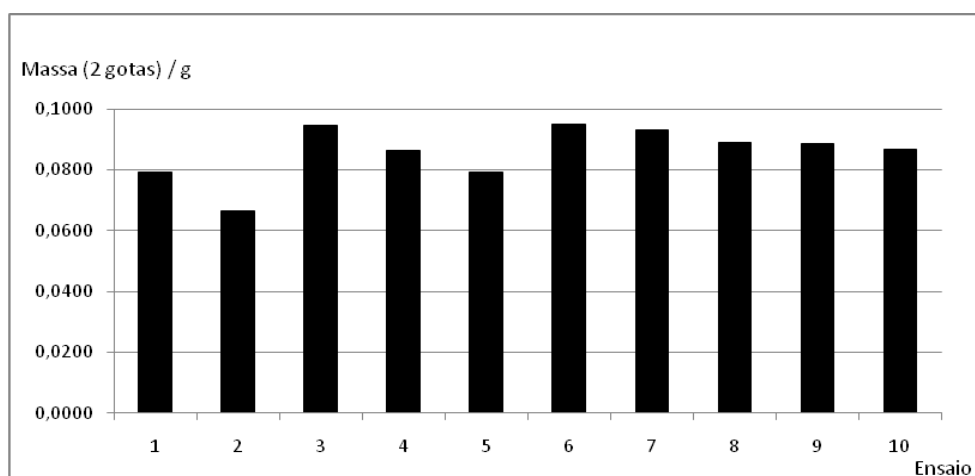


Figura 4.14 – Gráfico representativo da variação da massa das duas gotas adicionadas ao longo de 10 ensaios

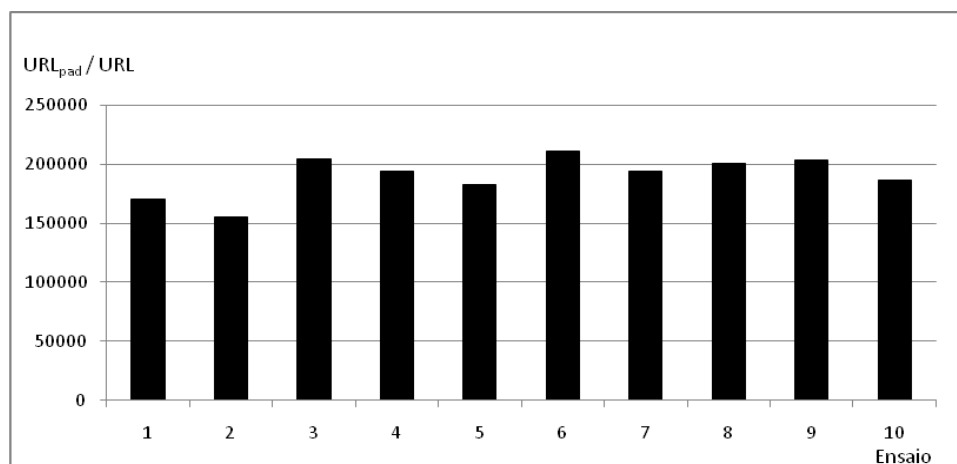


Figura 4.15 – Gráfico representativo da variação do valor de calibração obtido ao longo de 10 ensaios

Foram ainda calculados os coeficientes de variação para ambos os parâmetros, sendo que os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.20.

Tabela 4.20 – Cálculo do coeficiente de variação para a massa das duas gotas e para o valor de calibração

	massa (2 gotas)	URL _{pad}
N	10	10
X _m	0,0859	190117
s _x	0,0088	17139
CV / %	10,3	9,0

Os resultados foram considerados satisfatórios após verificação da influência do valor da calibração no resultado final descrita no ponto 4.2.2.

4.2.2. Influência do valor da calibração no resultado final

Uma vez que a massa das gotas adicionadas ao tubo de ensaio afeta o valor de calibração obtido, foi efetuado um estudo para verificar de que forma iria afetar o resultado final nas amostras. Para tal, foram aplicados os valores de calibração dos 10 ensaios a resultados simulados em URL de três amostras nas diferentes gamas: < 100, 100 – 1000 e > 1000.

Na Tabela 4.21 podem-se observar os resultados simulados para uma amostra na gama < 100, a partir dos 10 ensaios realizados anteriormente para a calibração. Os resultados simulados para as restantes gamas encontram-se no apêndice B, nas Tabelas B1.

Tabela 4.21 – Resultados simulados para uma amostra na gama < 100, com 10 ensaios de calibração obtidos

Ensaio	URL _{pad} / URL	tATP / URL	dATP / URL	cATP / pg.mL ⁻¹	cATP / EM.mL ⁻¹
1	170506	28	4	14	14076
2	154817	28	4	16	15502
3	203873	28	4	12	11772
4	193685	28	4	12	12391
5	182521	28	4	13	13149
6	210710	28	4	11	11390
7	194233	28	4	12	12356
8	200668	28	4	12	11960
9	203794	28	4	12	11777
10	186365	28	4	13	12878

Foram ainda calculados os coeficientes de variação para os resultados de ATP intracelular em unidades de picogramas por mililitro, para cada uma das gamas, tal como se pode observar na Tabela 4.22.

Tabela 4.22 – Coeficientes de variação obtidos para os valores de cATP em pg/mL para as amostras simuladas nas diferentes gamas, bom, ação preventiva e ação corretiva

	< 100	100 – 1000	> 1000
N	10	10	10
X_m / pg.mL ⁻¹	12,7	284	2294
s_x / pg.mL ⁻¹	1,3	28	226
CV / %	9,9	9,9	9,9

Estes resultados foram considerados satisfatórios, uma vez que também se encontram dentro do critério de aceitação imposto internamente pelo laboratório. Deste modo podemos concluir que a variação provocada pelo valor da calibração, que por sua vez é provocada pela variação da massa das gotas adicionadas, não é significativa.

4.2.3. Ruído de fundo

Tal como mencionado no capítulo anterior, existem três níveis diferentes de ruído de fundo, sendo que o primeiro é o ruído de fundo do luminómetro, o segundo é o ruído de fundo originado pelos tubos de ensaio e o terceiro é o ruído de fundo originado pela luminase. Ao longo do tempo foram algumas as ocasiões em que foram determinados os diferentes níveis de ruídos de fundo, de forma a verificar a existência de contaminação na câmara de leitura, nos tubos de ensaios e/ou na luminase. Os valores obtidos em sete dias testados encontram-se registados na Tabela 4.23. Recorde-se que, caso os valores sejam superiores a 10 URL, devem ser subtraídos aos valores de ATP determinados posteriormente e, em caso de valores elevados, tal é representativo de contaminação.

Tabela 4.23 – Resultados obtidos para os diferentes níveis de ruído de fundo em sete dias

Dia	URL _{bg} (1º nível) / URL	URL _{bg} (2º nível) / URL	URL _{bg} (3º nível) / URL
Dia 1	1	9	8
Dia 2	1	9	10
Dia 3	1	7	7
Dia 4	3	8	10
Dia 5	3	9	6
Dia 6	1	8	5
Dia 7	1	9	8

Uma vez que os primeiros resultados se mantiveram consistentemente iguais ou inferiores a 10 URL, por decisão interna, foram apenas efetuadas análises de ruído de fundo periodicamente. Tal como se pode observar na Tabela 4.23, todos os valores obtidos para os diferentes níveis de ruído de fundo foram sempre iguais ou inferiores a 10 URL, podendo concluir que não houve vestígios de poluição até à data da última análise.

4.2.4. Calibração

Tal como mencionado no capítulo anterior, para o mesmo frasco de luminase reidratada, o valor de URL_{pad} decai ao longo do tempo devido à diminuição da atividade enzimática da

luciferase. De recordar que caso o valor de URL_{pad} obtido seja igual ou inferior a 50000 URL é recomendado reidratar um novo frasco de luminase para obter máxima sensibilidade.

Na Figura 4.16 encontram-se os resultados obtidos para a calibração diária correspondente a cada frasco de luminase reidratada ao longo de alguns dias, sendo que cada letra maiúscula corresponde a um novo frasco de luminase. No apêndice B, na Tabela B2 podem-se encontrar os resultados correspondentes aos restantes dias de trabalho.

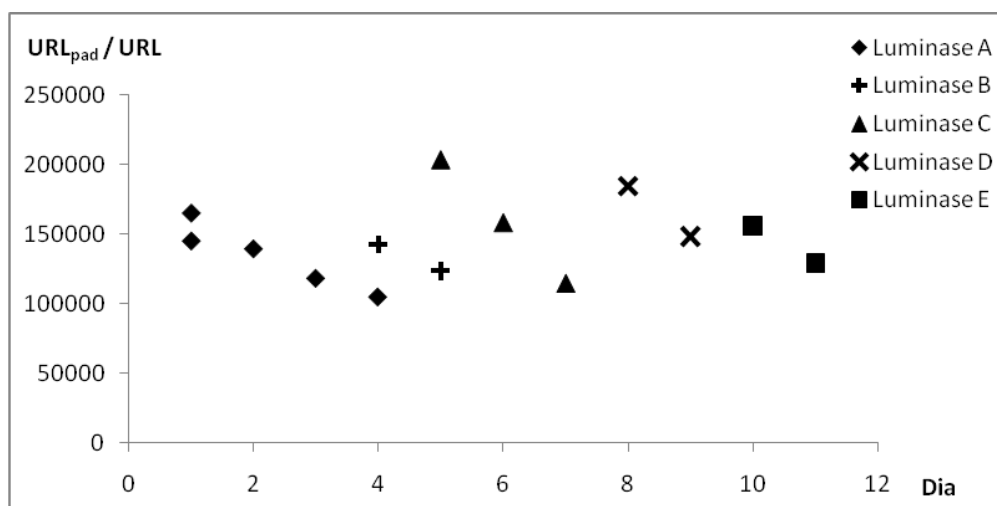


Figura 4.16 – Gráfico representativo dos resultados obtidos para a calibração, ao longo do tempo, para cada luminase

Sempre que foi necessário reidratar um novo frasco de luminase, tal foi provocado pelo término do conteúdo do frasco anterior, uma vez que nunca foram registados valores inferiores a 50000 URL, tal como demonstrado na Figura 4.16. Nesta mesma figura observa-se ainda o decaimento do valor de calibração ao longo do tempo, correspondente ao mesmo frasco de luminase, tal como esperado. Segundo o fornecedor, a luminase pode ser armazenada no frigorífico até 3 meses, mas não foi possível comprová-lo.

4.2.5. Ensaio comparativos

Após a realização dos estudos anteriormente mencionados, foram realizados vários ensaios em paralelo com a análise por *Dip Slides*, com o intuito de validar este novo método de avaliação através do kit de análise microbiológica rápida. Nas Tabelas 4.24, 4.25 e 4.26 encontram-se, respetivamente, os ensaios comparativos em que o resultado pelo kit de análise rápida foi bom (< 100), indicou a necessidade de uma ação preventiva (100 – 1000) ou a necessidade de uma ação corretiva (> 1000).

Tabela 4.24 – Resultados dos ensaios efetuados em paralelo entre avaliação por *Dip Slides* e pelo kit de análise rápida em que este último demonstrou um bom resultado de uma amostra

Amostra	cATP / pg.mL ⁻¹	<i>Dip slides</i> 48h
Resina 1, amostra A	0	Negativo
Produto 4, amostra A	2	Negativo
Resina 2, amostra A	36	Negativo
Resina 3, amostra A	54	Negativo
Produto 1, amostra A	56	Negativo
Produto 1, amostra C	73	Negativo
Produto 1, amostra B	77	Negativo
Produto 5, amostra A - repetição	81	Negativo
Resina 3, amostra B	90	Negativo

Tabela 4.25 – Resultados dos ensaios efetuados em paralelo entre avaliação por *Dip Slides* e pelo kit de análise rápida em que este último demonstrou um resultado de uma amostra que necessitaria de uma ação preventiva

Amostra	cATP / pg.mL ⁻¹	<i>Dip slides</i> 48h
Produto 5, amostra B	120	Negativo
Resina 4, amostra A	145	Negativo
Produto 5, amostra A	180	Positivo (4 UFC)

Tabela 4.26 – Resultados dos ensaios efetuados em paralelo entre avaliação por *Dip Slides* e pelo kit de análise rápida em que este último demonstrou um resultado de uma amostra que exigiria de uma ação corretiva

Amostra	cATP / pg.mL ⁻¹	<i>Dip slides</i> 48h
Produto 6, amostra C	2434	Positivo (incontável)
Produto 6, amostra B	2626	Positivo (incontável)
Resina 5, amostra A	13345	Positivo (50-200 UFC)
Produto 7, amostra B	14207	Positivo (incontável)
Produto 6, amostra A	22135	Positivo (incontável)
Produto 7, amostra A	53028	Positivo (incontável)
Resina 5, amostra A - 2ª entrada	58001	Positivo (> 200 UFC)
Resina 5, amostra B	268399	Positivo (> 200 UFC)

Sempre que uma amostra foi analisada através de um *Dip Slide* e obteve um resultado negativo, o kit de análise rápida demonstrou um bom controlo. Não foram apresentadas todas as análises efetuadas (171) mas, devido à grande disponibilidade de amostras nesta gama, estes ensaios em paralelo são concordantes e bastante satisfatórios.

Foram efetuadas três análises em que o kit demonstrou a necessidade de uma ação preventiva, tendo-se obtido dois *Dip Slides* com resultado negativo e um com uma contagem

de 4 UFC. Devido à falta de disponibilidade de amostras com este resultado, é necessário efetuar mais ensaios no futuro, sendo que, de momento, não é possível proceder a conclusões para esta gama.

Relativamente a ensaios em que kit de análise rápida evidenciou a necessidade de uma ação corretiva, foram sempre obtidos *Dip Slides* com resultado positivo, desde 50-200 UFC a incontável. Estes ensaios comparativos são concordantes e satisfatórios.

4.3. Espectroscopia FT-NIR

Neste subcapítulo será descrito o desenvolvimento de um modelo PLS em geral e serão ainda apresentados os resultados obtidos ao longo deste projeto através da técnica analítica de espectroscopia NIR. De forma a que os resultados sejam sucintos e explícitos, será apenas apresentado um exemplo de uma calibração desenvolvida ou otimizada para cada produto/matéria-prima.

4.3.1. Desenvolvimento de um modelo PLS

No desenvolvimento de todos os modelos PLS o procedimento seguido apresentou sempre os mesmos contornos que serão mencionados seguidamente.

Inicialmente, foram introduzidos os espectros NIR previamente traçados acompanhados com os valores de referência 0 e 1 para a identificação de amostras. Uma vez que os espectros NIR obtidos apresentam diferenças ao nível da intensidade das bandas ou bandas diferentes devidas a diferentes constituintes nas formulações, tornou-se necessário a utilização de um conjunto de pré-tratamentos adequados no desenvolvimento da calibração, nomeadamente, SNV, normalização e correção da linha de base. De seguida, ainda com o intuito de tornar a calibração mais robusta e mais precisa em produções futuras, procedeu-se também à determinação do número de fatores e seleção das regiões espectrais que evidenciam uma maior correlação. Ao aplicar estas escolhas, deve-se ter em atenção o valor de R^2 obtido. A região espectral selecionada pode ser ajustada no caso em que se observe que é necessário adicionar mais informação espectral ou retirar informação que se verifique que esteja a adicionar ruído ou ainda regiões espectrais que interferem com o desenvolvimento do modelo.

Após serem selecionados todos estes parâmetros, são então retirados da calibração os *outliers* observados através dos gráficos do resíduo espectral e de propriedades residuais, tal como ilustrado na Figura 4.17.

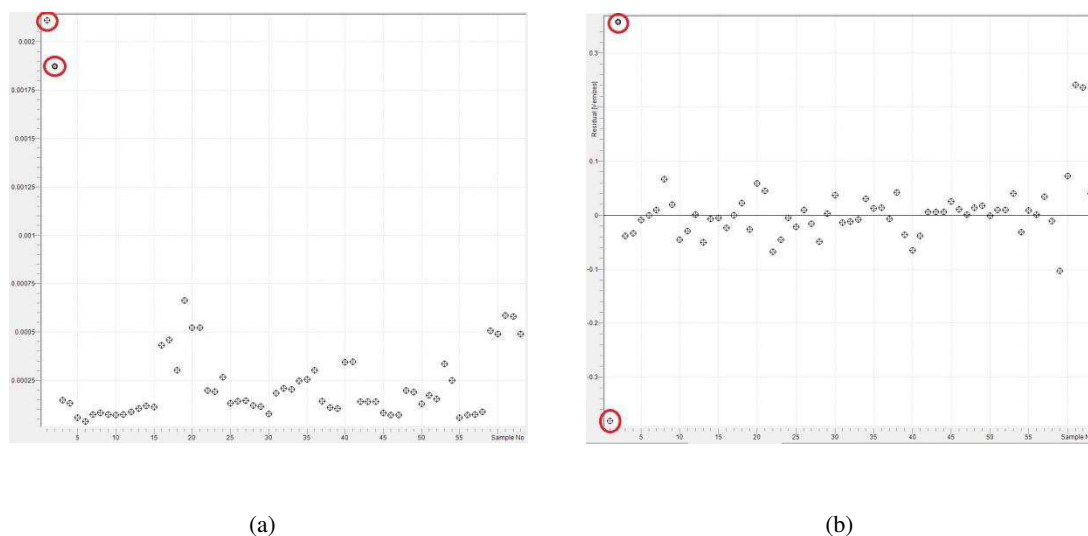


Figura 4.17 – Detecção de *outliers* em modelos lineares através do gráfico do resíduo espectral (a) e através do gráfico das propriedades residuais (b)

De seguida, procedeu-se à análise do gráfico 3D para os *scores* dos três fatores onde o conjunto de amostras deve ser dividido em grupos consoante as semelhanças químicas que cada amostra apresenta. Nesta análise é possível observar quais as amostras que se aproximam ou se distanciam da amostra pretendida, podendo ser necessário proceder ao reajuste de alguns parâmetros da calibração, caso se verifique que as amostras não se conseguem diferenciar umas das outras devido a estarem muito próximas espacialmente. Esta etapa torna o modelo mais robusto, capaz de responder a alterações que possam eventualmente surgir.

4.3.2. Modelos PLS desenvolvidos para cada matéria-prima/produto

Nas Figuras 4.18 a 4.22 encontram-se representados os espectros NIR do diluente A1, do endurecedor A1, da resina A1, do secante A1 e do verniz A1, respetivamente, bem como os espectros de outros seis diluentes (diluente A2 a A7), cinco endurecedores (endurecedor A2 a

A6), quatro resinas (resina A2 a A5), dois secantes (secante A2 e A3) e quatro vernizes (verniz A2 a A5), que foram igualmente introduzidos nas respectivas calibrações.

Por observação dos espectros, constata-se que na região 9000-10000 cm^{-1} não ocorre nenhuma absorção significativa para nenhuma das amostras ensaiadas para as calibrações do diluente A1, do endurecedor A1, da resina A1 e do verniz A1. Relativamente às amostras ensaiadas para a calibração do secante A1, não se observa absorção significativa na região 1100-1300 cm^{-1} .

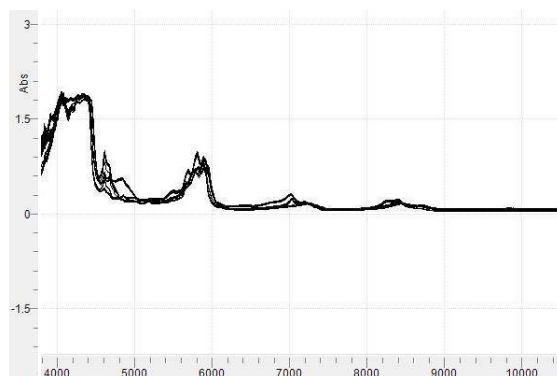


Figura 4.18 – Espectros NIR empregues na biblioteca espectral para o desenvolvimento da calibração do diluente A1

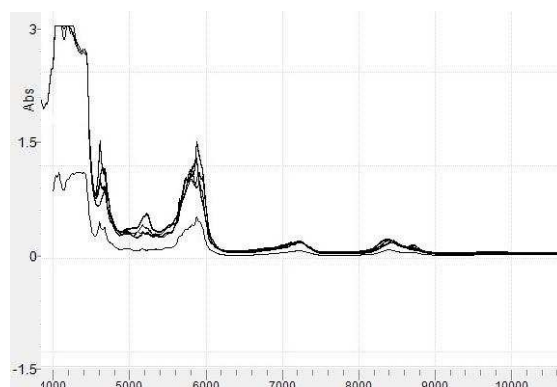


Figura 4.19 – Espectros NIR empregues na biblioteca espectral para o desenvolvimento da calibração do endurecedor A1

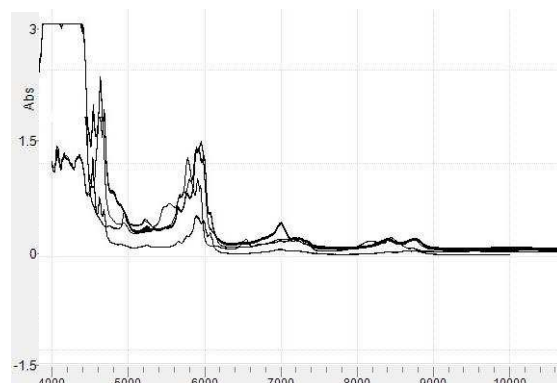


Figura 4.20 – Espectros NIR empregues na biblioteca espectral para o desenvolvimento da calibração da resina A1

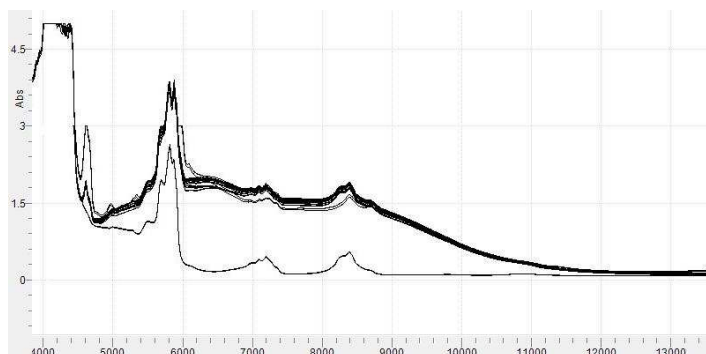


Figura 4.21 – Espectros NIR empregues na biblioteca espectral para o desenvolvimento da calibração do secante A1

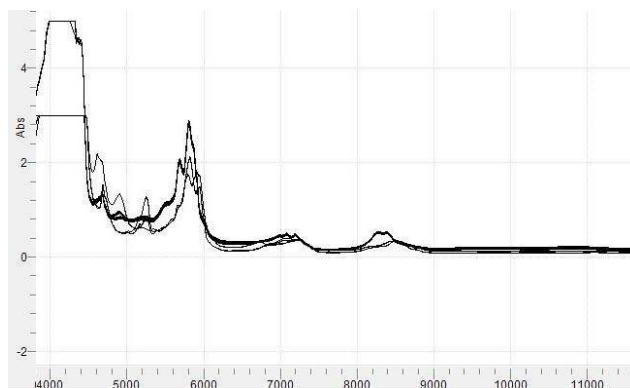


Figura 4.22 – Espectros NIR empregues na biblioteca espectral para o desenvolvimento da calibração do verniz A1

As vibrações de interesse para as calibrações do diluente A1, do endurecedor A1, da resina A1 e do verniz A1 ocorrem na zona espectral compreendida entre 4500-8900 cm^{-1} . Relativamente à calibração do secante A1, tal como se pode observar na Figura 4.21, as vibrações de interesse ocorrem na região espectral de 4400-9200 cm^{-1} .

No desenvolvimento dos diferentes modelos foi necessário determinar o número de componentes principais sendo que foram selecionados, respetivamente, onze, seis, cinco, seis e dez fatores, para as calibrações do diluente A1, do endurecedor A1, da resina A1, do secante A1 e do verniz A1. Uma vez que quando se aumentou o número de componentes principais a calibração perdeu linearidade, tal não justificou a utilização de mais fatores.

Alguns pré-tratamentos espectrais, tais como SNV, normalização e correção da linha de base, foram aplicados a todos os espectros NIR, isolados ou em conjunto, com o intuito de verificar qual seria o mais adequado para a posterior construção do modelo. As Figuras 4.23 a

4.27 mostram os espectros NIR resultantes da aplicação dos respectivos pré-tratamentos, e ainda evidenciam as regiões espectrais selecionadas para a construção das calibrações.

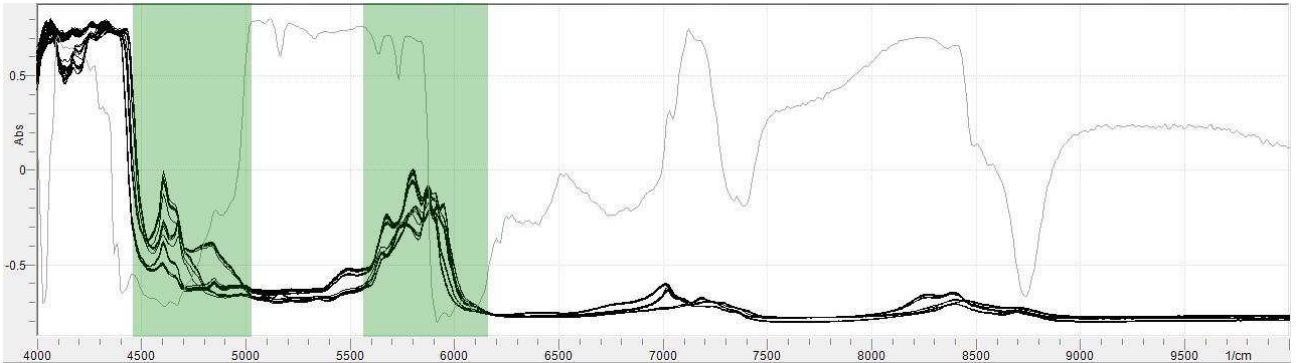


Figura 4.23 – Espectros NIR pré-tratados e demonstração da região espectral selecionada para a calibração do diluente A1

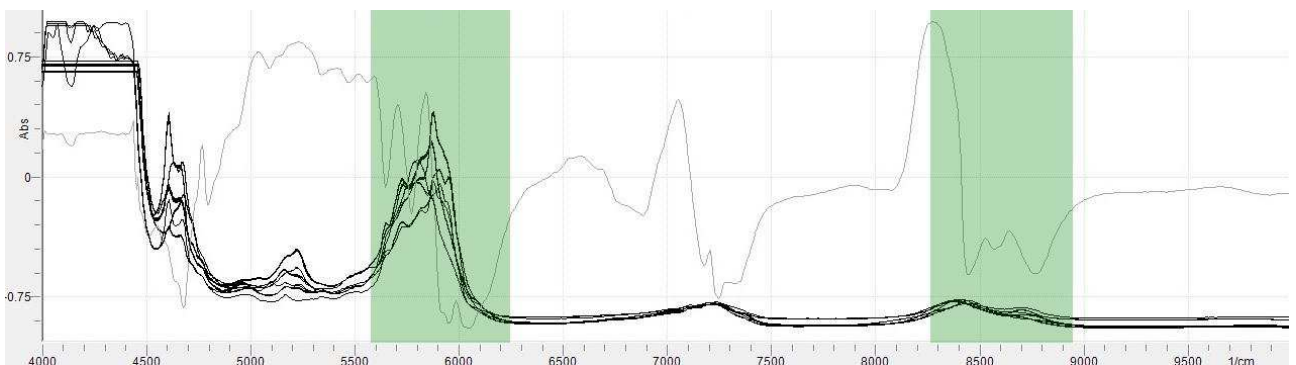


Figura 4.24 – Espectros NIR pré-tratados e demonstração da região espectral selecionada para a calibração do endurecedor A1

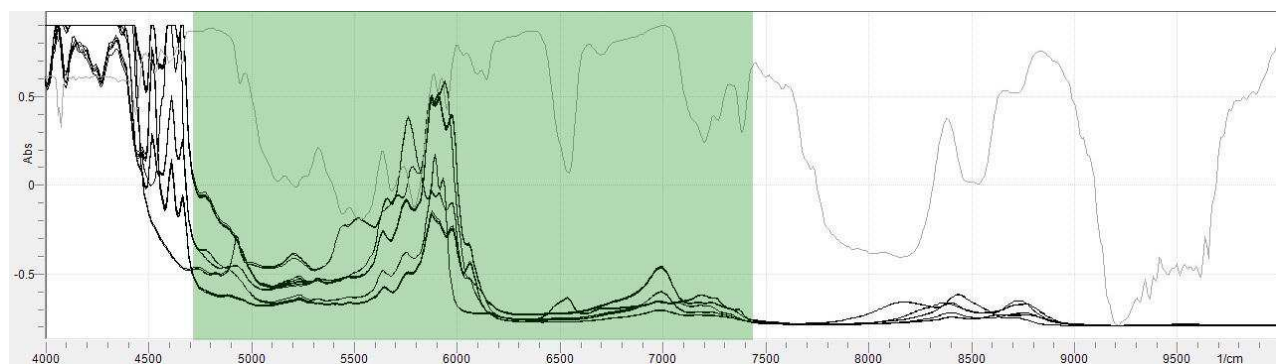


Figura 4.25 – Espectros NIR pré-tratados e demonstração da região espectral selecionada para a calibração da resina A1

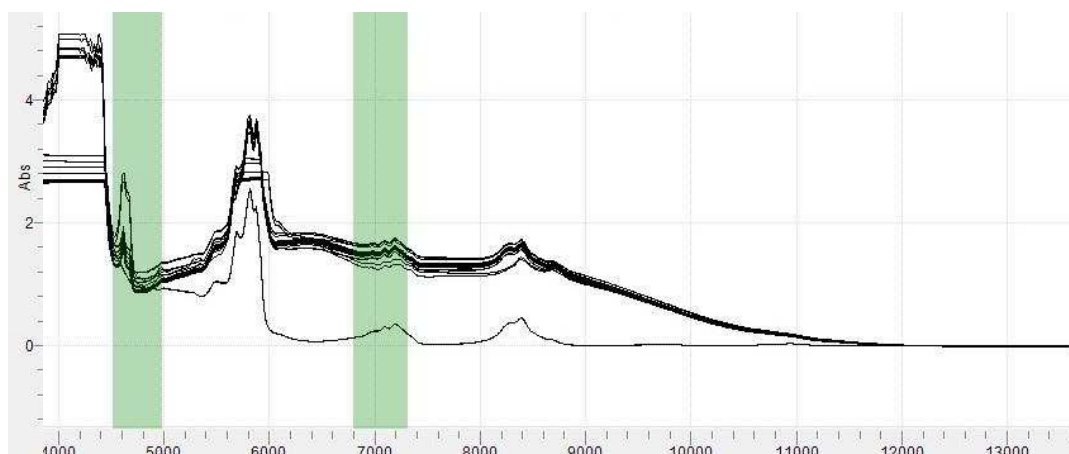


Figura 4.26 – Espectros NIR pré-tratados e demonstração da região espectral selecionada para a calibração do secante A1

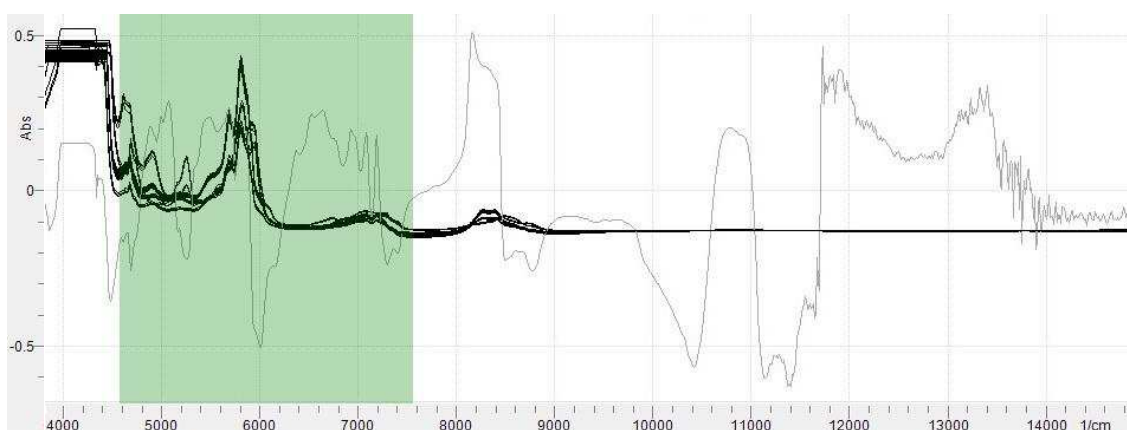


Figura 4.27 – Espectros NIR pré-tratados e demonstração da região espectral selecionada para a calibração do verniz A1

O pré-tratamento efetuado aos espectros NIR das calibrações do diluente A1 e do endurecedor A1 foi o SNV, enquanto para o modelo da resina A1 foi utilizada a normalização, para o secante A1 efetuou-se a correção da linha de base e para a calibração do verniz A1 utilizaram-se dois pré-tratamentos, o SNV e a correção da linha de base. Estas escolhas basearam-se no fato de que os pré-tratamentos selecionados foram os mais adequados por conduzirem a calibrações com menor número de componentes principais e maior coeficiente de correlação. Além disso, reduziram o ruído observado nos espectros iniciais.

Como o desenvolvimento das calibrações se baseou na análise multivariada por PLS, o valor do coeficiente de correlação é crucial no que diz respeito à avaliação dos modelos

desenvolvidos. Nas Figuras 4.28 a 4.30 encontram-se representadas as retas de calibração obtidas para as diferentes calibrações.

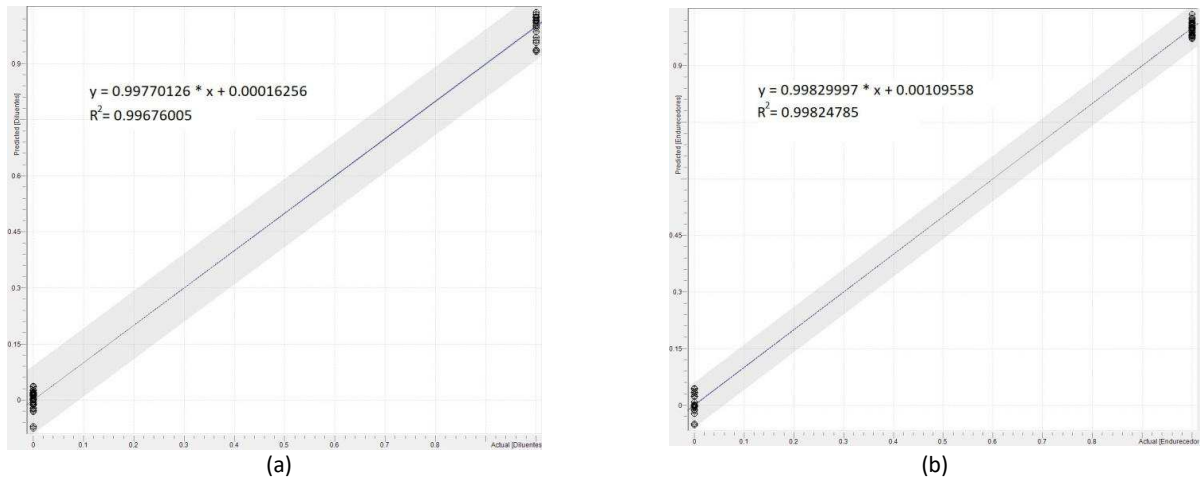


Figura 4.28 – Retas de calibração obtidas para as calibrações do diluente A1 (a) e do endurecedor A1 (b)

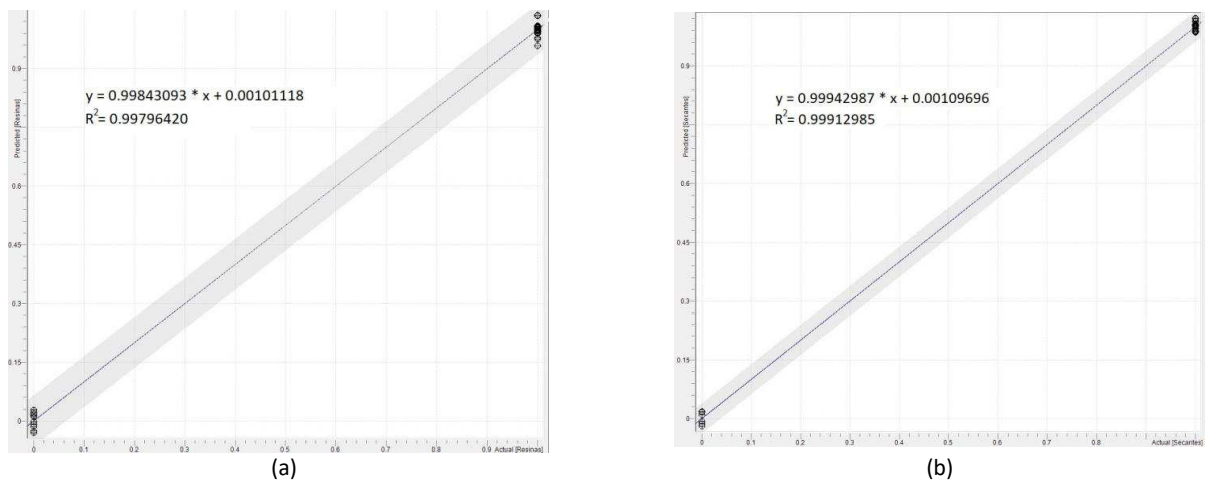


Figura 4.29 – Retas de calibração obtidas para as calibrações da resina A1 (a) e do secante A1 (b)

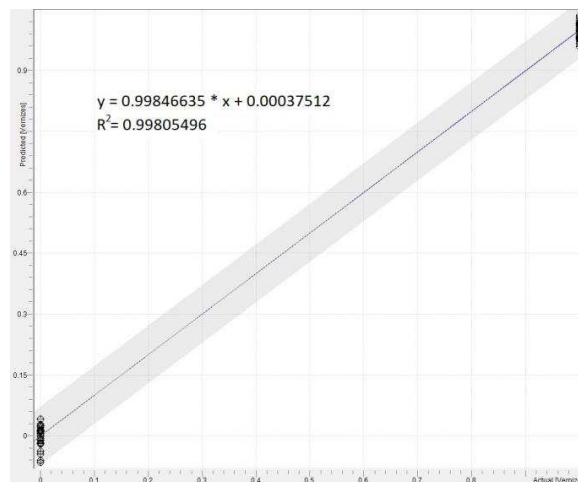


Figura 4.30 – Retas de calibração obtida para a calibração do verniz A1

Tal como se pode verificar nas Figuras 4.28, 4.29 e 4.30, para a calibração do diluente A1 obteve-se $R^2 = 0,9968$, para a calibração do endurecedor A1 obteve-se $R^2 = 0,9982$, para a calibração da resina A1 obteve-se $R^2 = 0,9979$, para a calibração do secante A1 obteve-se $R^2 = 0,9991$ e para a calibração do verniz A1 obteve-se $R^2 = 0,9981$.

Nas Figuras 4.31 a 4.35 encontram-se evidenciados os gráficos de *scores* obtidos para os diferentes modelos desenvolvidos/otimizados. Com o objetivo de analisar a relação existente entre as diferentes variáveis, procedeu-se à sua análise.

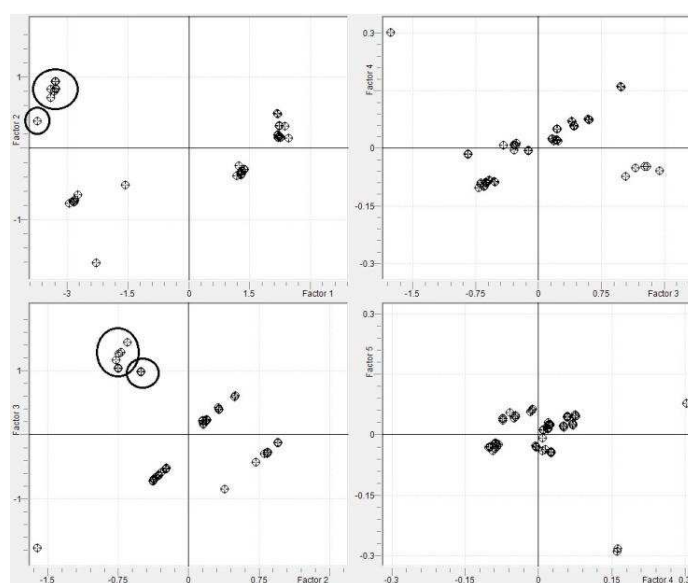


Figura 4.31 – Gráfico de *scores* obtidos para a calibração do diluente A1

Por análise da Figura 4.31, constata-se que os fatores 1 e 2 conseguem discriminar as sete amostras da calibração através da distância que se verifica entre elas. No entanto, é necessário salientar que existem dois grupos de amostras, marcados com círculos, que se encontram mais próximas mas que a distância entre elas não coloca em causa a calibração desenvolvida. Quando a análise é efetuada para os fatores 2 e 3, a conclusão é a mesma.

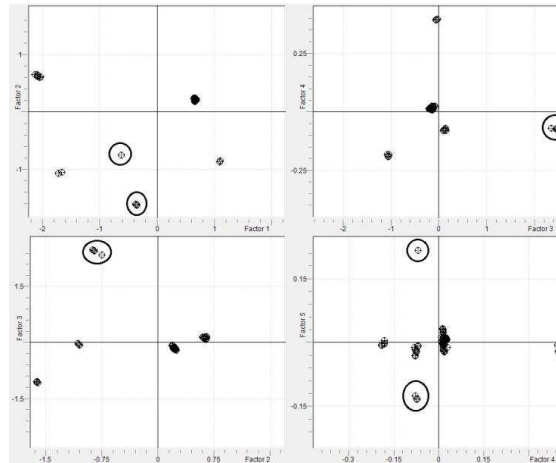


Figura 4.32 – Gráfico de *scores* obtidos para a calibração do endurecedor A1

Através da análise da Figura 4.32, tendo em consideração os fatores 1 e 2, é possível verificar que as seis amostras da calibração se encontram devidamente separadas. Analisando os fatores 2 e 3 constata-se que duas amostras não se encontram devidamente separadas, embora essas se distingam bastante bem das restantes quatro, uma vez que os valores do fator 2 são bastante semelhantes, havendo apenas uma ligeira separação pelo fator 3. A separação destas duas amostras volta a ocorrer nos fatores 4 e 5, tal como demonstrado pelos círculos marcados na Figura 4.30.

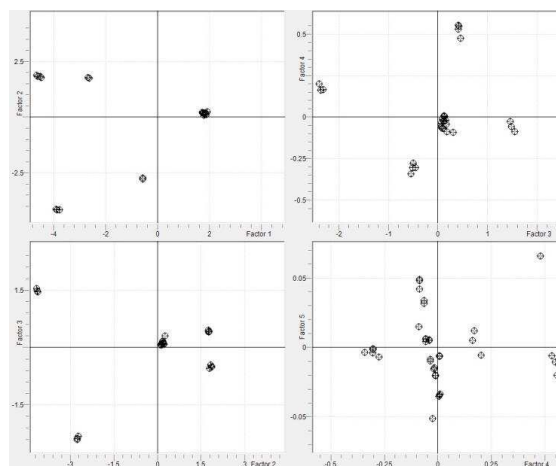


Figura 4.33 – Gráfico de *scores* obtidos para a calibração da resina A1

Por análise da Figura 4.33, constata-se que os fatores 1 e 2 conseguem discriminar as cinco amostras da calibração através da distância que se verifica entre elas. O mesmo se verifica quando se analisam os fatores 2 e 3 e os fatores 3 e 4.

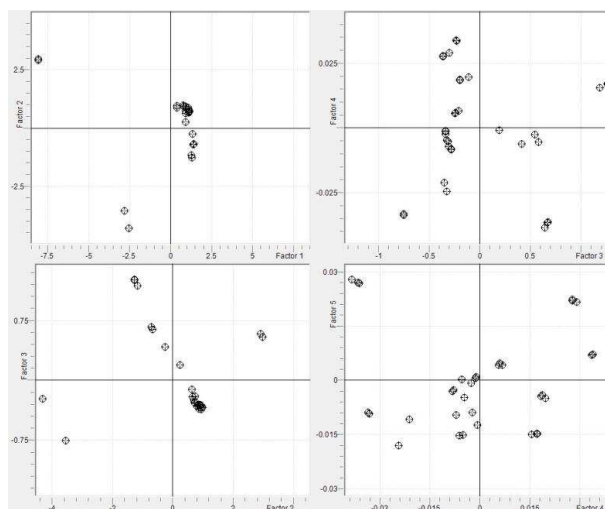


Figura 4.34 – Gráfico de scores obtidos para a calibração do secante A1

Por análise da Figura 4.34, verifica-se que os fatores 1 e 2 conseguem discriminar as três amostras da calibração através da distância que se verifica entre elas. O mesmo se verifica quando se analisam os fatores 2 e 3, embora uma das amostras esteja mais dispersa, devido aos valores do fator 3 serem bastante diferentes.

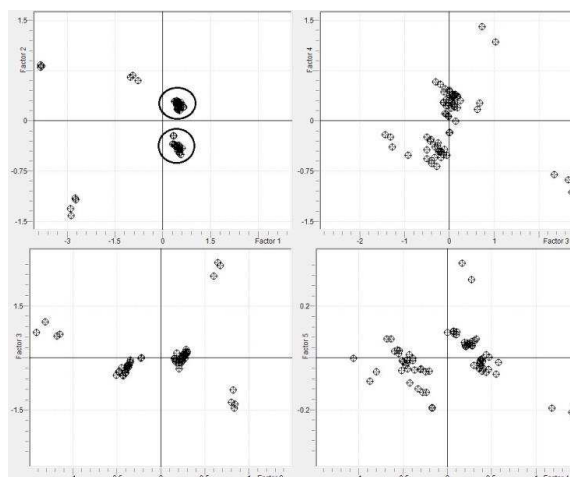


Figura 4.35 – Gráfico de scores obtidos para a calibração do verniz A1

Através da análise da Figura 4.35, verifica-se que os fatores 1 e 2 conseguem discriminar as cinco amostras da calibração através da distância que se verifica entre elas. Embora duas amostras apresentem valores do fator 2 um pouco semelhantes, verifica-se a separação pelo fator 1, tal como demonstrado pelos círculos marcados na Figura 4.35. Quando se analisam os fatores 2 e 3, observa-se também a separação das cinco amostras.

Como a composição química e estrutural das amostras se reflete nos espectros NIR e dado que as amostras incluídas nos modelos se diferenciam por possuírem pequenas diferenças na composição química, espera-se que as amostras se diferenciem umas das outras através do afastamento espacial que é observado pela análise 3D para o scores dos três primeiros fatores, o que se encontra ilustrado nas Figuras 4.36 a 4.38.

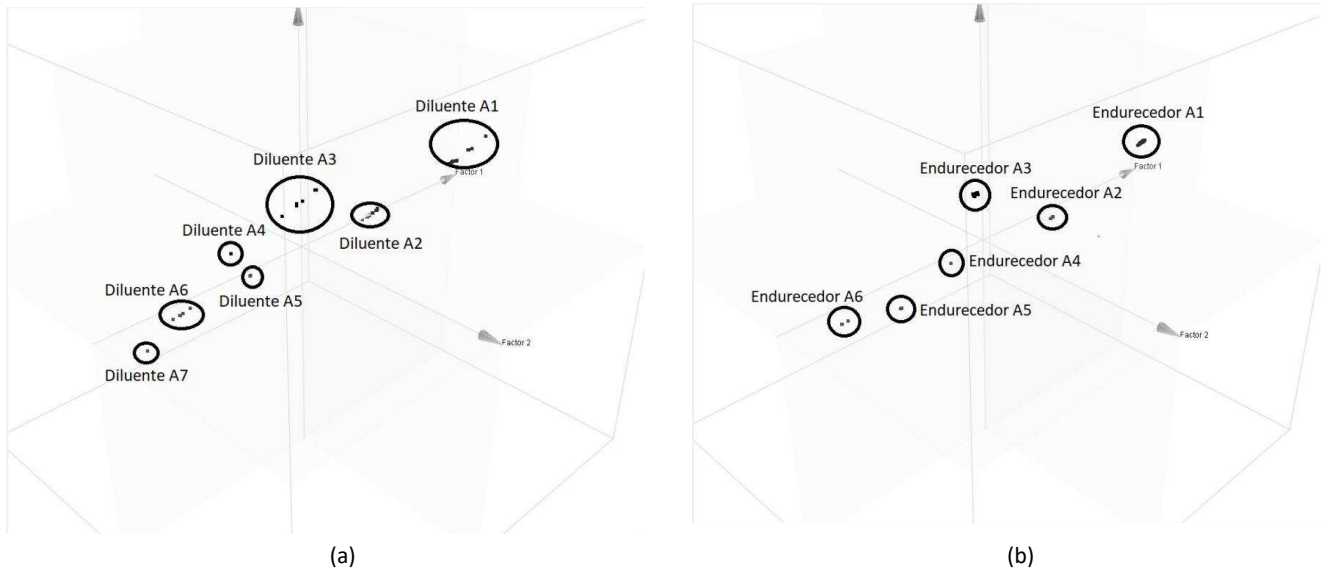


Figura 4.36 – Gráfico 3D obtido para a calibração do diluente A1 (a) e do endurecedor A1 (b)

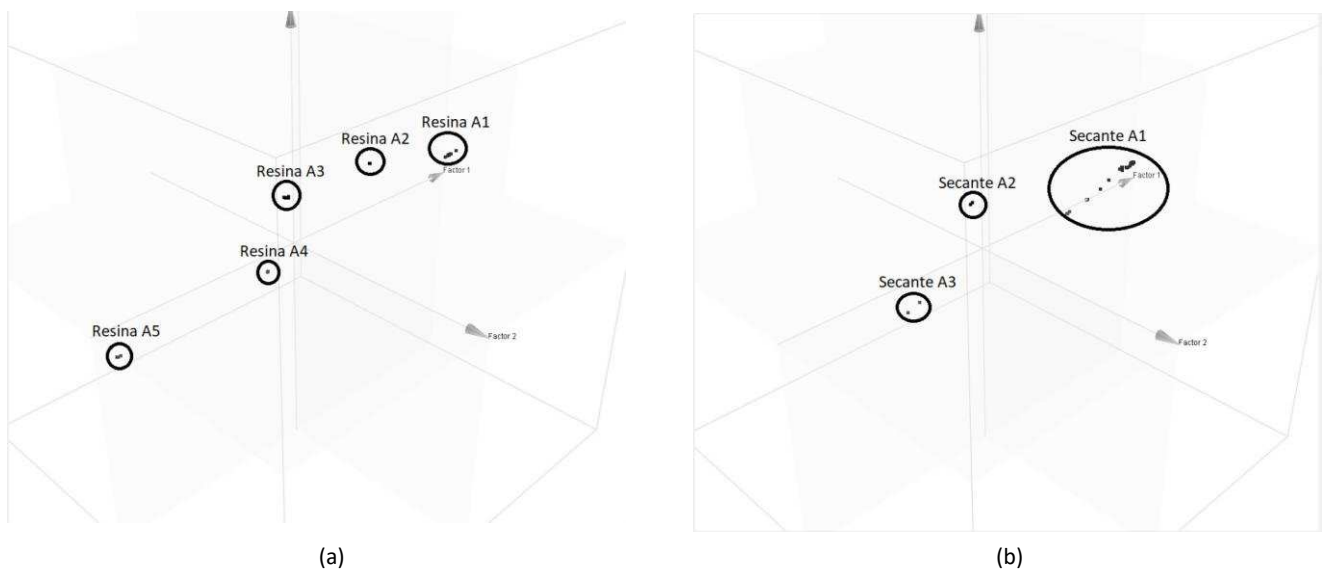


Figura 4.37 – Gráfico 3D obtido para a calibração da resina A1 (a) e do secante A1 (b)

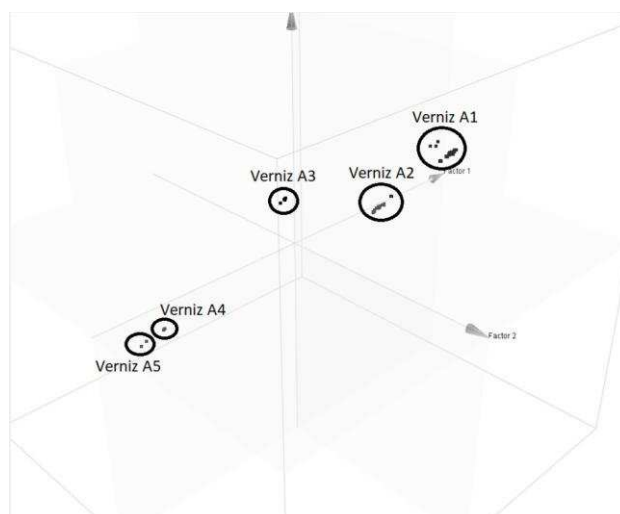



Figura 4.38 – Gráfico 3D obtido para a calibração do verniz A1

Nas Figuras 4.36 a 4.38, além de se observar a divisão das amostras é ainda possível visualizar a identificação das mesmas. Analisando estas figuras, pode-se verificar que os grupos de amostras utilizados nos diferentes modelos se encontram bem separados entre si e do produto que se pretende identificar, ou seja, o A1. Pela análise da Figura 4.38, verifica-se que os vernizes A4 e A5 apresentam semelhanças a nível estrutural mas, estes vernizes não apresentam qualquer tipo de importância uma vez que a calibração desenvolvida é para o verniz A1. Dado que os produtos/matérias-primas A1 se encontram distanciados dos restantes em todas as calibrações, é possível constatar que os modelos desenvolvidos/otimizados são robustos e adequados para a identificação dos respetivos produtos/matérias-primas.



CAPÍTULO 5

5. Conclusão

No presente trabalho, utilizou-se a técnica HPLC para o desenvolvimento e otimização de métodos de quantificação de biocidas em tintas e matérias-primas. Foi possível desenvolver o método 1 que permite a quantificação simultânea dos biocida A, B e C, sendo que foram determinadas as condições operacionais do método e traçadas retas de calibração para os três biocidas, tendo-se verificado que para o biocida B foi necessário dividir a gama analítica em baixa (GB) e alta (GA). Com o desenvolvimento do método 1 foi obtida uma diminuição no tempo de análise dos três biocidas em cerca de 80 %. Com a otimização dos métodos X e Y, já existentes, foi obtida uma redução de 70 e 60 %, respetivamente, para os novos métodos 2 e 3. Otimizando o método Z para a quantificação do biocida D, foi criado o método 4 que resultou numa diminuição do tempo de análise de 50 %, tendo-se verificado que foi também necessário dividir a gama analítica em baixa (GB) e alta (GA) para este biocida.

Relativamente à seletividade, nas condições analíticas estabelecidas e para a análise deste tipo de amostras, todos os métodos demonstraram ser seletivos uma vez que em todos os cromatogramas foi possível identificar as espécies nos tempos de retenção previstos, sem interferências de outros componentes. Quanto à homogeneidade das variâncias, verificou-se que todas as retas de calibração traçadas com os quatro métodos apresentam homocedasticidade. A partir do estudo da linearidade, constatou-se que a função polinomial de primeiro grau ajusta convenientemente o conjunto de pontos experimentais para todas as retas de calibração traçadas. O passo seguinte foi a avaliação dos valores discrepantes (*outliers*) pelo teste de Mandel sendo que, quando encontrados, foram retirados da respetiva reta e os testes de homocedasticidade e linearidade foram repetidos, tendo-se constatado que se manteve homogeneidade das variâncias e linearidade das retas de clibração.

Foram ainda determinados os parâmetros das retas (b_0 e b_1), sendo que foi avaliado o seu significado estatístico. Em todos os casos se constatou que o declive apresenta significado estatístico. Pelo contrário, quanto à ordenada na origem, concluiu-se que não tem significado estatístico em nenhuma das situações. Posteriormente, determinaram-se os limites de deteção e quantificação, tendo-se obtido resultados satisfatórios para todas as retas traçadas uma vez que o padrão de menor concentração é superior ao limite de quantificação ou, no caso do método 1, biocida A, embora o primeiro padrão seja inferior ao limite de quantificação, é superior ao limite de deteção e o segundo padrão é superior ao limite de

quantificação, o que é também uma situação aceitável. Assim definiram-se as gamas finais de trabalho como tendo início em LQ e termo no padrão de maior concentração. Como todas as curvas de calibração obtidas apresentam valores de R^2 superiores a 0,995, os resultados foram considerados satisfatórios.

Relativamente ao estudo da repetibilidade, todas as retas traçadas apresentaram valores de coeficientes de variação abaixo dos 5 %, à exceção do biocida D (GA). Este último obteve $CV_r = 44,7 \%$, sendo que uma possível explicação poderá ser o facto de esta gama abranger concentrações bastante elevadas, que leva a áreas significativamente maiores, aumentando o erro sistemático, logo aumentando a variância dos resultados. Assim, todos os resultados foram considerados satisfatórios. Prosseguiu-se com o estudo da precisão intermédia, tendo-se variado os analistas e os dias. Constatou-se que apenas existe interação dos fatores para o biocida B (GA) através do método 1 e para o biocida D (GB) através do método 4. Alguns métodos não apresentaram diferenças entre analistas ou dias, sendo que não foi possível determinar a precisão intermédia. Nos métodos em que foi possível calcular a variabilidade para ambos os fatores verificou-se que o fator “analistas” introduz mais erros em termos de variabilidade do que o fator “dias”.

Quanto à exatidão dos métodos, foram realizados alguns ensaios de recuperação, tendo-se obtido resultados inconclusivos pelo que, futuramente, será necessário repetir as taxas de recuperação para todos os métodos de modo a ser possível tirar conclusões.

Relativamente à robustez, este parâmetro foi estudado para apenas algumas das retas traçadas. Constatou-se, assim, que os métodos 1, 2 e 3 são robustos quanto a variações no fluxo para as retas de calibração dos biocidas A, B (gama alta) e C.

Como trabalho futuro em HPLC, uma vez que foram efetuados poucos ensaios para o estudo da exatidão dada a pouca disponibilidade de amostras e de tempo, e uma vez que os resultados foram inconclusivos, futuramente será necessário repetir as taxas de recuperação para todos os métodos de modo a ser possível tirar conclusões quanto à exatidão dos mesmos. Caso os métodos sejam considerados exatos, a validação dos mesmos fica completa, estando estes prontos a ser usados para quantificações exatas e precisas.

Além da técnica HPLC, neste projeto foi também abordado um método inovador de avaliação microbiológica rápida através de um kit ATP-2G. Após alguns estudos efetuados, constatou-se que o volume das gotas do padrão não influencia o valor da calibração que, por sua vez, também não influencia o resultado final das amostras, uma vez que se obtiveram coeficientes de variação de 9,9 % para as três gamas do kit (<100, 100–1000 e > 1000 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Estes resultados são bastante satisfatórios, dado que se encontram dentro do critério de aceitação imposto internamente pelo laboratório.

Relativamente aos valores obtidos para os diferentes níveis de ruídos de fundo, verificou-se a inexistência de contaminações pelo que, por decisão interna, alargou-se a periodicidade destas análises.

Após vários ensaios em paralelo com a análise por *Dip Slides*, constatou-se que os resultados obtidos pelos dois métodos foram concordantes nas gamas < 100 e > 1000 pg.ml^{-1} , dado que ambos permitem indicar da mesma forma as amostras como apresentando ou não contaminação, pelo que se considerou o novo método validado para as gamas referidas.

Como trabalho futuro, será necessário efetuar mais ensaios na gama 100-1000 pg.ml^{-1} dado que, devido à falta de disponibilidade de amostras com este resultado não foi possível proceder a conclusões para esta gama.

No decorrer deste projeto, foi ainda utilizada a técnica analítica FT-NIR, tendo sido desenvolvidas treze calibrações novas e otimizadas trinta e uma calibrações para a identificação de produtos/matérias-primas.

Verificou-se que os pré-tratamentos utilizados para a correção do sinal, variações da linha de base e na normalização dos dados foram adequados visto que permitiram desenvolver calibrações mais robustas e precisas, melhorando significativamente a análise qualitativa.

Relativamente aos modelos desenvolvidos/otimizados para os diversos grupos de amostras concluiu-se que estes são capazes de identificar corretamente as amostras e rejeitar todas as outras, uma vez que em todas as análises em 3D dos componentes principais foi possível observar a separação espacial entre elas.

Como trabalho futuro, é importante continuar a realizar otimizações periódicas, cerca de uma vez por ano, para que pequenas variações que ocorrem de fabrico para fabrico sejam inseridas na calibração, a fim de não interferirem com o resultado, continuando a responder de acordo com o pretendido.

Referências bibliográficas

- [1] aqua-tools, Rapid Microbial Solutions,
<http://www.aqua-tools.com/en/>, acedido em janeiro de 2018
- [2] Regulamento (UE) n.º 528/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de maio de 2012
- [3] ECHA – European Chemicals Agency,
<https://echa.europa.eu/pt/home>, acedido em dezembro de 2017
- [4] APT – Associação Portuguesa de Tintas; *Guia para a utilização de Biocidas nas Tintas Decorativas*, fevereiro de 2011
- [5] Laub-Ekgreen, M. H.; Martinez-Lopez, B.; Jessen, F.; Skov, T.; *Non-destructive Measurement of Salt Using NIR Spectroscopy in the Herring Marinating Process*, LWT- Food Science and Technology, 2018
- [6] Beganovic, A.; Bec. K. B.; Henn, R.; Huck, C. W.; *Handling of Uncertainty due to Interference Fringe in FT-NIR Transmittance Spectroscopy - Performance Comparison of Interference Elimination Techniques Using Glucose-water System*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 197, 208-215
- [7] CIN portal:
<http://www.cin.pt/portal/cin/cor/ferramentas?contentid=4980808380CO&page=corferramentas.psmi&nl=pt>, acedido em novembro de 2017
- [8] CIN Protective Coatings:
<http://www.cincoatings.com/portalc/>, acedido em novembro de 2017
- [9] CIN – Corporação Industrial do Norte, S.A.; *Manual de Construção Civil e Decoração*, maio de 2009
- [10] NOGUEIRA, J. L.; *Noções Básicas de Tintas e Vernizes*, Porto: ARCP - Associação Rede Competências em Polímeros
- [11] Decreto-Lei n.º 112/2010, de 20 de outubro
- [12] Coulthwaite, L.; Bayley, K.; Liauw, C.; Craig, G.; Verran, J.; *The effect of free and encapsulated OIT on the biodeterioration of plasticised PVC during burial in soil for 20 months*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2005, 56, 86-93
- [13] Sorensen, G.; Nielsen, A. L.; Pedersen, M. M.; Poulsen, S.; Nissen, H.; Poulsen, M.; Nygaard, S. D.; *Controlled Release of Biocide From Silica Microparticles in Wood Paint*, Progress in Organic Coatings, 2010, 68, 299–306
- [14] Contant, S.; Júnior, G.C.; Machado, P.F.; Lona, L.M.; *Evaluation of the effect of dry-film biocides on paint film preservation using neural networks*, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2010, 27(4)

- [15] Park, S.; Kwon, J.; *The fate of two isothiazolinone biocides, 5-chloro-2-methylisothiazol-3(2H)-one (CMI) and 2-methylisothiazol-3(2H)-one (MI), in liquid air fresheners and assessment of inhalation exposure*, Chemosphere, 2016, 144, 2270-2276
- [16] Miranda, M.S.; Matos, M.A.R; Morais, V.M.F; Liebman, J.F.; *Combined experimental and computational study on the energetics of 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one and 1,4-benzothiazin-3(2H, 4H)-one*, The Journal of Chemical Thermodynamics, 2011, 43, 635-644
- [17] Williams, T.M.; *The Mechanism of Action of Isothiazolone Biocides*, PowerPlant Chemistry, 2007, 9(1), 14-22
- [18] Viani, F.; Rossi, B.; Panzeri, W.; Merlini, L.; Martorana, A.; Polissi, A.; Galante, Y. M.; *Synthesis and anti-bacterial activity of a library of 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (BIT) derivatives amenable of crosslinking to polysaccharides*, Tetrahedron, 2017, 73, 1745-1761
- [19] Sadasivan, L.; Gandhi, U.; *A "two-for-one" Biocide For Latex Coatings Provides Effective In-Can and Dry Film Preservation*. Paint & Coatings Industry, 2003, 7
- [20] Jayjock, M.A.; Hazelton, G.A.; Lewis, P.G.; Wooder, M.F.; *Formulation Effect on the Dermal Bioavailability of Isothiazolone Biocide*, Food and Chemical Toxicology, 1996, 34(3), 277-282
- [21] Alexander, B.R.; *An assessment of the comparative sensitization potential of some common isothiazolinones*, Contact Dermatitis, 2002, 46(4), 191-196
- [22] Sigma-Aldrich,
<https://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>, acedido em fevereiro de 2018
- [23] Wakita, M.; Shoudai, K.; Oyama, Y.; Akaike, N.; *4,5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) modifies synaptic transmission in hippocampal CA3 neurons of rats*, Chemosphere, 2017, 184, 337-346
- [24] Fukuto, T.R.; *Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides*, Environmental Health Perspectives, 1990, 87, 245-254
- [25] Nunes, G. S.; Barceló, D.; *Analysis of Carbamate Insecticides in Foodstuffs Using Chromatography and Immunoassay Techniques*, trends in analytical chemistry, 1999, 18(2), 99-107
- [26] Xu T.; Wang, J.; Wang, X.; Slawecki, R.; Rubio, F.; Li, J.; Li, Q. X.; *Comparison of Four Commercial Enzymatic Assay Kits for the Analysis of Organophosphate and Carbamate Insecticides in Vegetables*, Food Control, 2012, 27, 94-99
- [27] Jardim, A. N. O.; Brito, A. P.; Donkersgoed, G.; Boon, P. E.; Caldas, E. D.; *Dietary Cumulative Acute Risk Assessment of Organophosphorus, Carbamates and Pyrethroids Insecticides for the Brazilian Population*, Food and Chemical Toxicology, 2018, 112, 108-117
- [28] Jagielski T.; Bakula, Z.; Mauro, S.; Casciari, C.; Cambiotti, V.; Krukowski, H.; Turchetti, B.; Ricchi, M.; Manuali, E.; Buzzini, P.; *A Comparative Study of the In Vitro Activity of Iodopropynyl Butylcarbamate and Amphotericin B Against Prototheca spp. Isolates from European Dairy Herds*, Journal of Dairy Science, 2017, 100(9), 7435 - 7445
- [29] Shin, M. S.; Kim, H.; *Solubility of Iodopropynyl Butylcarbamate in Supercritical Carbon Dioxide*, Fluid Phase Equilibria, 2008, 270, 45-49

- [30] Jensen, C. D.; Thormann, J.; Andersen, K. E.; *Airborne Allergic Contact Dermatitis from 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate at a Paint Factory*, Contact Dermatitis, 2003, 48, 155-157
- [31] Wang, J.; Lin, K.; Taylor, A.; Gan, J.; *In Vitro Assessment of Pyrethroid Bioaccessibility Via Particle Ingestion*, Environment International, 2018, 119, 125-132
- [32] Tang, W.; Wang, D.; Wang, J.; Wu, Z.; Li, L.; Huang, M.; Xu, M.; Yan, D.; *Pyrethroid Pesticide Residues in the Global Environment: An Overview*, Chemosphere, 2018, 191, 990-1007
- [33] Sharma, N.; Banerjee, S.; Mazumder, P. M.; *Evaluation of the Mechanism of Anticancer Activity of Deltamethrin in Jurkat-J6 Cell Line*, Pesticide Biochemistry and Physiology, 2018
- [34] Fecko, A., *Environmental Fate of Bifenthrin*, Department of Pesticide Regulation: Environmental Monitoring and Pest Management Branch, Sacramento, 1999
- [35] Morgan, M. K.; MacMillan, D.K.; Zehr, D.; Sobus, J. R.; *Pyrethroid Insecticides and Their Environmental Degradates in Repeated Duplicate-diet Solid Food Samples of 50 Adults*, Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology, 2018, 28(1), 40-45
- [36] Korkmaz, V.; Güngördü, A.; Ozmen, M.; *Comparative Evaluation of Toxicological Effects and Recovery Patterns in Zebra Fish (Danio rerio) After Exposure to Phosalone-based and Cypermethrin-based Pesticides*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 160, 265-272
- [37] Li, M.; Wu, Q.; Wang, Q.; Xiang, D.; Zhu, G.; *Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Bioavailability and Neurotoxicity of Cypermethrin in Zebra Fish Larvae*, Aquatic Toxicology, 2018, 199, 212-219
- [38] Latorre, N.; Silvestre, J. F.; Monteagudo, A. F.; *Allergic Contact Dermatitis Caused by Formaldehyde and Formaldehyde Releasers*, Actas Dermo-Sifiliográficas, 2011, 102(2), 86-97
- [39] Pontel, L.; *Formaldehyde Metabolism and its Impact on Human Health*, Current Opinion in Toxicology, 2018
- [40] Chust, R. B.; *Introdução à Cromatografia de Líquidos*, Boletim SPQ. 39, 1990
- [41] Harvey, D.; *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education, DePauw University, 2000
- [42] Chang, R.; *Química*, 8ª edição, Mcgraw-Hill, 2005
- [43] Harris, D. C.; *Quantitative Chemical Analysis*, 8ª edição, Nova Iorque, W. H. Freeman and Company, 2010
- [44] Montanez, G., Passman, F., Machtiger, N., Montemayor R., Whalen P., *Bioluminescence Testing for Rapid Detection of Microbial Contamination in Aqueous Polymer Emulsions*; International Biodeterioration & Biodegradation; 114 (2016) 216-221
- [45] Oliveira T., Canettieri A.C.V., *Eficiência dos Métodos Microbiológicos e de ATP-bioluminescência na Detecção da Contaminação de Diferentes Superfícies*; Revista do Instituto Adolfo Lutz; São Paulo; 2010; 69(4): 467-74

- [46] LuminUltra: Microbial Monitoring, <https://www.luminultra.com/>, acessado em janeiro de 2018
- [47] ECHA Microbiology, <https://www.echamicrobiology.com/products/test-kits/dip-slides>, acessado em fevereiro de 2018
- [48] Norma ISO 18593:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
- [49] Thermo Fisher, <https://www.thermofisher.com/pt/en/home.html>, acessado em julho de 2018
- [50] Shafiee, S.; Minaei, S.; *Combined Data Mining/NIR Spectroscopy for Purity Assessment of Lime Juice*, *Infrared Physics & Technology*, 2018, 91, 193-199
- [51] Mills, R.; *NIR for Routine Analysis of Food and Agricultural Products*, FOSS analytics, 2017
- [52] Reich, G.; *Near-Infrared Spectroscopy and Imaging: Basic Principles and Pharmaceutical Applications*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57, 1109-1143
- [53] Stuart, B.; *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley, 2004
- [54] Bakeev, K. A.; *Process Analytical Technology*, Blackwell Publishing, 2005
- [55] Helfer, G. A.; Ferrão, M. F.; Ferreira, C. V.; Hermes, N.; *Aplicação de Métodos de Análise Multivariada no Controle Qualitativo de Essências Alimentícias Empregando Espectroscopia no Infravermelho Médio*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2006, 26(4), 779-786
- [56] Pasquini, C.; *Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003, 14(2)
- [57] Osborne, B. G.; *Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2006
- [58] Viera, M. S.; Bohrer, S. D.; Rotta, R. E.; Gerbase, A. E.; Ferrão, M. F.; *Aplicação do Método da Adição Padrão para a Quantificação de Biodiesel em Blendas Comerciais de Biodiesel/Diesel*, Salvador, outubro de 2009
- [59] Assumpção, M. H. M. T.; Freitas, K. H. G.; Souza, F. S.; Fatibelo-Filho, O.; *Construção e adaptação de materiais alternativos em titulação ácido-base*, volume 35, número 4, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2010
- [60] Martinez, W. L.; Moonjung, C.; *Statistics in Matlab, a primer*, Taylor & Francis Group, 2015
- [61] D'Hainaut, L.; *Conceitos e Métodos da Estatística*, Volume I, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1997
- [62] Vieira S., *Introdução à Bioestatística*, 4ª edição, Elsevier, 2008
- [63] Miller, J. N.; Miller, J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6ª edição, Pearson Education Limited, 2010

- [64] Rawski, R. I.; Sanecki, P. T.; Kijowska, K. M.; Skital, P. M.; Saletnik, D. E.; Regression Analysis in Analytical Chemistry. Determination and Validation of Linear and Quadratic Regression Dependencies, *South African Journal of Chemistry*, 2016, 69, 166–173
- [65] Qi, M.; Fu, Z.; Chen, F.; *Outliers Detection Method of Multiple Measuring Points of Parameters in Power Plant Units*, *Applied Thermal Engineering*, 2015, 85, 297-303
- [66] Wang, C.; Gómez, J. C. E.; *Comparison of Methods for Outlier Identification in Surface Characterization*, *Measurement*, 2018, 117, 312-325
- [67] Lam, R.; *Scrutiny of Variance Results for Outliers: Cochran's Test Optimized*, *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, 2010, 659, 68–84
- [68] Morton, M. J.; *Within-Laboratory Variance Outlier Detection: An Alternative to Cochran's Test*, Altria Client Services LLC, 2017, 27 (7)
- [69] Faraway, J. J.; *Linear Models with R*, Chapman & Hall, 2005
- [70] Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, 2000
- [71] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures – Text and Methodology, 2005
- [72] Norma ISO 8466-1:1990 – Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function
- [73] Norma ISO 8466-2:2001 – Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions
- [74] Desimoni, E.; Brunetti, B.; *About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach*, *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2015, 6(3)
- [75] Walczak, B.; *Outlier Detection in Multivariate Calibration*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1995, 28, 259-272
- [76] Siegel, A. F.; *Robust Regression using Repeated Medians*, Department of Statistics, Princeton University, 1980
- [77] Shrivastava, A.; Gupta, V. B.; *Methods for the Determination of Limit of Detection and Limit of Quantitation of the Analytical Methods*, *Chronicles of Young Scientists*, 2011, 2(1), 21-25
- [78] Cock, B.; Dejaegher, B.; Stiens, J.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V.; *Precision Evaluation of Chiral Capillary Electrophoretic Methods in the Context of Inter-instrumental Transfer: Constant Current versus Constant Voltage Application*, *Journal of Chromatography A*, 2014, 1353, 140-147
- [79] Harvey, D.; *Modern Analytical Chemistry*, vol. 381, McGraw-Hill, Nova Iorque, 2000

- [80] Blanco, M.; Villarroya, I.; *NIR Spectroscopy: A Rapid-Response Analytical Tool*, Trends in Analytical Chemistry, 2002, 21(4), 240-250
- [81] Xiaobo, Z.; Jiewen, Z.; Povey, M. J. W.; Holmes, M.; Hanpin, M.; *Variables Selection Methods in Near-Infrared Spectroscopy*, Analytica Chimica Acta, 2010, 667, 14-32
- [82] Roggo, Y.; Chalus, P.; Maurer, L.; Lema-Martinez, C.; Edmond, A.; Jent, N.; *A Review of Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics in Pharmaceutical Technologies*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44, 683–700
- [83] Castro-Suarez, J. R.; Ortiz-Rivera, W.; Galan-Freyte, N.; Figueroa-Navedo, A.; Pacheco-Londoño, L. C.; Hernández-Rivera, S. P.; *Multivariate Analysis in Vibrational Spectroscopy of Highly Energetic Materials and Chemical Warfare Agents Simulants*, Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences, 2012, 162-188
- [84] Rinnan, A.; Berg, F.; Engelsen, S. B.; *Review of the Most Common Pre-Processing Techniques for Near-Infrared Spectra*, Trends in Analytical Chemist, 2009, 28(10), 1201-1222
- [85] Tavassoli, N.; Tsai, W.; Bicho, P.; Grant, E. R.; *Multivariate Classification of Pulp NIR Spectra for End-Product Properties Using Discrete Wavelet Transform with Orthogonal Signal Correction*, The Royal Society of Chemistry, 2014, 6, 8906-8914
- [86] Souza, A. M.; Poppi, R. J.; *Experimento Didático de Quimiometria para Análise Exploratória de Óleos Vegetais Comestíveis por Espectroscopia no Infravermelho Médio e Análise de Componentes Principais: Um Tutorial, Parte I*, Química Nova, 2012, 35(1), 223-229
- [87] Huang, J.; Romero-Torres, S.; Moshgbar, M.; *Practical Considerations in Data Pre-treatment for NIR and Raman Spectroscopy*, American Pharmaceutical Review, 2010, 13(6), 116-127
- [88] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial*, Química Nova, 1999, 22(5), 724-731
- [89] ASTM D1193-06(2018), Standard Specification for Reagent Water, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2018

Apêndice A

Neste apêndice serão abordados os resultados de validação de métodos analíticos que não foram apresentados no capítulo 4 relativamente à técnica analítica HPLC.

Tabelas A1 – Repetibilidade

Nas Tabelas A1 encontram-se os resultados obtidos para o estudo da repetibilidade que não foram apresentados no subcapítulo 4.1.

Tabela A1.1 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com o método 2, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,2492	1,9611	3,6988
Ensaio 2	0,2544	1,9645	3,6993
Ensaio 3	0,2589	1,9708	3,7192
Ensaio 4	0,2610	1,9709	3,7329
Ensaio 5	0,2643	1,9953	3,7201
Variância	0,000035	0,00018	0,00022

Acerca dos valores obtidos para o biocida A, através do método 2, determinou-se a variância máxima, 0,00022, e ainda a soma das variâncias, tendo-se obtido um valor de 0,00043. De seguida, calculou-se o valor de teste, sendo que se obteve um valor de 0,503.

Tabela A1.2 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama baixa com o método 1, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,0321	0,0808	0,1239
Ensaio 2	0,0318	0,0759	0,1234
Ensaio 3	0,0290	0,0734	0,1267
Ensaio 4	0,0323	0,0745	0,1218
Ensaio 5	0,0312	0,0784	0,1222
Variância	0,0000018	0,0000090	0,0000037

Tabela A1.3 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama baixa com o método 3, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,0947	0,1880	0,3775
Ensaio 2	0,0946	0,1885	0,3810
Ensaio 3	0,0920	0,1930	0,3864
Ensaio 4	0,0909	0,1994	0,3652
Ensaio 5	0,1028	0,2128	0,4097
Variância	0,000022	0,00011	0,00027

Quanto à gama baixa do biocida B, determinaram-se as variâncias máximas, 0,0000090 e 0,00027, e ainda as somas das variâncias, 0,000015 e 0,00040, respetivamente, para os métodos 1 e 3. De seguida, calcularam-se os valores de teste, sendo que se obtiveram valores de 0,619 e 0,678 para os mesmos métodos.

Tabela A1.4 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com o método 1, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,1612	1,1398	2,1643
Ensaio 2	0,1540	1,1287	2,1835
Ensaio 3	0,1725	1,1751	2,1802
Ensaio 4	0,1677	1,1038	2,1610
Ensaio 5	0,1673	1,1811	2,2050
Variância	0,000051	0,0010	0,00031

Tabela A1.5 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com o método 3, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão maior
Ensaio 1	0,4973	6,3912
Ensaio 2	0,4951	6,3821
Ensaio 3	0,4838	6,3899
Ensaio 4	0,4989	6,4199
Ensaio 5	0,4997	6,4191
Variância	0,000042	0,00031

Relativamente à gama alta do biocida B, observaram-se as variâncias máximas de 0,0010 e 0,00031, e ainda se calcularam as somas das variâncias, sendo que se obtiveram valores de 0,0014 e 0,00036, respetivamente, para os métodos 1 e 3. De seguida, determinaram-se os valores de teste, tendo-se obtido 0,744 e 0,882 para os mesmos métodos.

De notar que, para a reta da gama alta do biocida B traçada pelo método 3, uma vez que os ensaios com o padrão intermédio obtiveram sempre uma variância muito alta, impedindo assim de prosseguir com a ANOVA, exclusivamente para esta reta o estudo da repetibilidade foi apenas efetuado com as concentrações menor e maior.

Tabela A1.6 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com o método 1, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,0970	0,2428	0,3747
Ensaio 2	0,0951	0,2296	0,3717
Ensaio 3	0,0867	0,2210	0,3859
Ensaio 4	0,0972	0,2096	0,3664
Ensaio 5	0,0936	0,2362	0,3696
Variância	0,000018	0,00017	0,000056

Tabela A1.7 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com o método 3, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,1836	0,3662	0,7450
Ensaio 2	0,1860	0,3683	0,7481
Ensaio 3	0,1772	0,3801	0,7580
Ensaio 4	0,1779	0,3899	0,7195
Ensaio 5	0,2019	0,4182	0,7863
Variância	0,00010	0,00045	0,00058

Quanto ao biocida C, as variâncias máximas obtidas foram 0,00017 e 0,00058, e as somas das variâncias 0,00024 e 0,0011, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Os valores de teste obtidos correspondem a 0,694 e 0,517 para os mesmos métodos.

Tabela A1.8 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida D para a gama baixa com o método 4, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	0,3956	1,2954	2,0702
Ensaio 2	0,3989	1,2478	2,0726
Ensaio 3	0,3980	1,2469	2,0800
Ensaio 4	0,3998	1,2559	2,0895
Ensaio 5	0,4050	1,2644	2,0965
Variância	0,000012	0,00040	0,00012

Tabela A1.9 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida D para a gama alta com o método 4, para o estudo da repetibilidade

	Padrão menor	Padrão intermédio	Padrão maior
Ensaio 1	2,4326	7,2887	12,2937
Ensaio 2	2,4687	7,3325	12,2762
Ensaio 3	2,4659	7,3933	12,3801
Ensaio 4	2,4775	7,4458	12,4206
Ensaio 5	2,4969	7,4738	12,4099
Variância	0,00055	0,0059	0,0045

Por fim, quanto ao método 4, observaram-se variâncias máximas de 0,00040 e 0,0059, e ainda se calcularam as somas das variâncias, sendo que se obtiveram valores de 0,00053 e 0,011, respetivamente, para as gamas baixa e alta do biocida D. Depois, determinaram-se os valores de teste, tendo-se obtido 0,744 e 0,541 para as mesmas gamas.

O valor crítico de Cochran para um nível de significância de 5 %, três ensaios e cinco réplicas é igual a 0,746. Para a análise da gama alta do biocida B com o método 3 é necessário considerar o valor crítico de Cochran para um nível de significância de 5 %, dois ensaios e cinco réplicas, sendo que é igual a 0,906. Deste modo, todos os valores de teste obtidos são inferiores aos respetivos valores críticos pelo que se conclui que existe homocedasticidade para todas as retas de calibração traçadas.

Tabelas A2 – Precisão intermédia

Nas Tabelas A2 encontram-se os resultados obtidos para o estudo da precisão intermédia que não foram apresentados no subcapítulo 4.1. Será considerados o valor crítico de Cochran para 5 % de significância, cinco ensaios e cinco réplicas, igual a 0,544.

Tabela A2.1 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com o método 2, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	1,9332	1,9970	1,9955	1,9487	1,9007
	Ensaio 2	1,8898	1,9426	1,9372	1,9007	1,8332
	Ensaio 3	1,9024	1,9391	1,9638	1,9012	1,8834
	Ensaio 4	1,7899	1,9974	2,0115	1,9479	2,0177
	Ensaio 5	1,9423	1,6438	2,2215	2,0302	2,0236
Analista 2	Ensaio 1	1,8696	1,8548	1,9089	1,8868	1,8542
	Ensaio 2	1,8265	1,8001	1,8567	1,8404	1,7987
	Ensaio 3	1,8383	1,7771	1,8675	1,8629	1,7454
	Ensaio 4	1,8858	1,8611	1,9303	1,8871	1,8624
	Ensaio 5	1,7211	1,8711	2,0703	2,0381	1,9186

Relativamente ao biocida A, método 2, de modo a avaliar os *outliers* intra-diários através do teste de Cochran, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0037; 0,022; 0,013; 0,0028 e 0,0072, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,0042; 0,0017; 0,0073; 0,0061 e 0,0044, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. Os valores de teste determinados foram 0,453 e 0,310, correspondentes aos analistas 1 e 2. Dado que o valor crítico de Cochran acima mencionado é superior aos valores de teste calculados, conclui-se que não existem *outliers* intra-diários.

Tabela A2.2 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama baixa com o método 1, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	0,0816	0,0770	0,0783	0,0774	0,0822
	Ensaio 2	0,0774	0,0755	0,0778	0,0711	0,0800
	Ensaio 3	0,0745	0,0723	0,0766	0,0756	0,0756
	Ensaio 4	0,0777	0,0744	0,0763	0,0801	0,0895
	Ensaio 5	0,0742	0,0810	0,0819	0,0779	0,0774
Analista 2	Ensaio 1	0,0827	0,0823	0,0840	0,0833	0,0803
	Ensaio 2	0,0792	0,0796	0,0788	0,0814	0,0765
	Ensaio 3	0,0799	0,0775	0,0763	0,0779	0,0743
	Ensaio 4	0,0787	0,0763	0,0826	0,0813	0,0753
	Ensaio 5	0,0688	0,0828	0,0875	0,0769	0,0782

Quanto à gama baixa do biocida B, método 1, foram avaliados os *outliers* através do teste de Cochran, tendo-se calculado as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0000090; 0,000011; 0,0000050; 0,000011 e 0,000029, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,000028; 0,0000082; 0,000019; 0,0000071 e 0,0000057, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. De seguida, calcularam-se os valores de teste, sendo que se obteve 0,448 e 0,410, correspondentes aos analistas 1 e 2. Considerando o valor crítico de Cochran anteriormente referido, e dado que os valores de teste calculados para cada analista são ambos inferiores a esse valor, conclui-se que não existem *outliers* intra-diários.

Tabela A2.3 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama baixa com o método 3, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	0,1871	0,1835	0,1884	0,1872	0,1899
	Ensaio 2	0,1804	0,1795	0,1856	0,1822	0,1852
	Ensaio 3	0,1870	0,1823	0,1849	0,1826	0,1785
	Ensaio 4	0,1719	0,1648	0,1766	0,1957	0,1859
	Ensaio 5	0,1880	0,1671	0,1753	0,1987	0,1957
Analista 2	Ensaio 1	0,1896	0,1814	0,1906	0,1898	0,1912
	Ensaio 2	0,1885	0,1774	0,1862	0,1869	0,1884
	Ensaio 3	0,1906	0,1789	0,1863	0,1868	0,1892
	Ensaio 4	0,1841	0,1550	0,1722	0,1981	0,1911
	Ensaio 5	0,1823	0,1487	0,1803	0,2091	0,1952

Em relação à gama baixa do mesmo biocida mas através do método 3, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,000047; 0,000078; 0,000034; 0,000057 e 0,000040, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,000013; 0,00023; 0,000051; 0,000091 e 0,000069, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. Depois, obtiveram-se valores de teste de 0,304 e 0,589, correspondentes aos analistas 1 e 2. Dado que o valor de teste calculado para o analista 2 excede o valor crítico de Cochran previamente mencionado, conclui-se que existem *outliers* intra-diários, nomeadamente, o dia 2. Deste modo, o dia 2 foi retirado e o teste de Cochran) foi repetido para os restantes ensaios, tendo-se concluído que não existem mais *outliers* intra-diários.

Tabela A2.4 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com o método 1, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	1,1398	1,1686	1,1235	1,1474	1,1386
	Ensaio 2	1,1287	1,1588	1,1274	1,1111	1,1404
	Ensaio 3	1,1986	1,1572	1,1039	1,1228	1,1368
	Ensaio 4	1,1038	1,1670	1,1148	1,2011	1,1364
	Ensaio 5	1,3198	1,1717	1,1218	1,0730	1,1336
Analista 2	Ensaio 1	1,1837	1,2175	1,2052	1,1641	1,2118
	Ensaio 2	1,1564	1,2110	1,1982	1,1506	1,2065
	Ensaio 3	1,0821	1,2147	1,2019	1,1704	1,2080
	Ensaio 4	1,2040	1,2136	1,1973	1,1847	1,2101
	Ensaio 5	1,2141	1,2145	1,1984	1,1986	1,2097

Quanto à gama alta do biocida B, método 1, com o intuito de avaliar os *outliers* intra-diários de ambos os analistas, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0075; 0,000040; 0,000085; 0,0023 e 0,0000065, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,0028; 0,0000055; 0,000011; 0,00034 e 0,0000041, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. De seguida, calcularam-se os valores de teste, sendo que se obteve 0,758 e 0,885, correspondentes aos analistas 1 e 2. Como os valores de teste calculados para cada analista são ambos superiores ao valor crítico de Cochran previamente indicado, conclui-se que existem *outliers* intra-diários, nomeadamente, o dia 1. Este dia foi removido e o teste de Cochran foi repetido até não existirem mais *outliers*, sendo que se verificou que o dia 4 é também um *outlier* de variância excessiva.

Tabela A2.5 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com o método 3, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	3,3965	3,4644	3,4587	3,3381	3,4739
	Ensaio 2	3,2249	3,3856	3,3685	3,2335	3,3575
	Ensaio 3	3,4608	3,4045	3,2529	3,3637	3,3530
	Ensaio 4	2,9491	3,4576	3,5977	3,7311	3,4996
	Ensaio 5	3,2540	3,7563	3,6382	4,3648	3,5205
Analista 2	Ensaio 1	3,4514	3,4235	3,4462	3,3901	3,4486
	Ensaio 2	3,3717	3,2334	3,3669	3,2600	3,2994
	Ensaio 3	3,4378	3,4518	3,4341	3,4124	3,4306
	Ensaio 4	3,2372	3,0040	3,6448	3,6608	3,2889
	Ensaio 5	3,1562	3,7899	3,8962	4,0363	3,5963

Em relação à gama alta do mesmo biocida mas através do método 3, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,039; 0,023; 0,025; 0,22 e 0,0064, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,017; 0,084; 0,047; 0,094 e 0,016, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. Posteriormente, determinaram-se os valores de teste, tendo-se obtido 0,696 e 0,366, correspondentes aos analistas 1 e 2. Considerando o valor crítico de Cochran anteriormente mencionado, e uma vez que o valor de teste calculado para o analista 1 excede esse valor, conclui-se que existem *outliers* intra-diários, nomeadamente, o dia 4. Deste modo, o dia 4 foi retirado e o teste de Cochran foi repetido para os restantes ensaios, tendo-se concluído que não existem mais *outliers* intra-diários.

Tabela A2.6 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com o método 1, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	0,2435	0,2349	0,2378	0,2355	0,2476
	Ensaio 2	0,2320	0,2280	0,2306	0,2120	0,2387
	Ensaio 3	0,2244	0,2147	0,2293	0,2267	0,2284
	Ensaio 4	0,2327	0,2215	0,2286	0,2406	0,2685
	Ensaio 5	0,2211	0,2438	0,2452	0,2346	0,2319
Analista 2	Ensaio 1	0,2504	0,2481	0,2496	0,2527	0,2429
	Ensaio 2	0,2378	0,2406	0,2390	0,2446	0,2257
	Ensaio 3	0,2396	0,2339	0,2311	0,2354	0,2227
	Ensaio 4	0,2339	0,2317	0,2485	0,2445	0,2243
	Ensaio 5	0,2061	0,2499	0,2604	0,2296	0,2327

Em relação ao biocida C, método 1, foram calculadas as variâncias de cada dia, sendo que se obteve 0,000075; 0,00013; 0,000051; 0,00012 e 0,00026, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,00027; 0,000067; 0,00012; 0,000081 e 0,000069, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. De seguida, calcularam-se os valores de teste, tendo-se obtido 0,404 e 0,445, correspondentes aos analistas 1 e 2. Considerando o valor crítico de Cochran, e dado que os valores de teste calculados não excedem esse valor, conclui-se que não existem *outliers*.

Tabela A2.7 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com o método 3, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	0,3677	0,3605	0,3711	0,3699	0,3741
	Ensaio 2	0,3565	0,3521	0,3607	0,3582	0,3638
	Ensaio 3	0,3707	0,3609	0,3649	0,3567	0,3474
	Ensaio 4	0,3374	0,3241	0,3422	0,3850	0,3623
	Ensaio 5	0,3709	0,3294	0,3427	0,3902	0,3828
Analista 2	Ensaio 1	0,3746	0,3577	0,3734	0,3738	0,3788
	Ensaio 2	0,3728	0,3482	0,3688	0,3632	0,3719
	Ensaio 3	0,3736	0,3516	0,3672	0,3639	0,3709
	Ensaio 4	0,3628	0,3074	0,3406	0,3864	0,3723
	Ensaio 5	0,3579	0,2935	0,3555	0,4115	0,3832

Quanto ao biocida C, método 3, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,00020; 0,00031; 0,00017; 0,00023 e 0,00018, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,000057; 0,00085; 0,00017; 0,00040 e 0,000029, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. De seguida, calcularam-se os valores de teste, sendo que os valores obtidos foram 0,280 e 0,561, correspondentes aos analistas 1 e 2. Dado que o valor de teste calculado para o analista excede o valor crítico de Cochran anteriormente mencionado, conclui-se que existe um *outlier* de variância, nomeadamente, o dia 2. Este dia foi retirado e o teste de Cochran foi repetido para os restantes ensaios, tendo-se concluído que não existem mais *outliers*.

Tabela A2.8 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida D para a gama baixa com o método 4, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	1,3258	1,4091	1,3862	1,3308	1,2935
	Ensaio 2	1,2478	1,3127	1,3106	1,2560	1,3476
	Ensaio 3	1,2469	1,3155	1,2971	1,2626	1,2738
	Ensaio 4	1,2559	1,3421	1,2908	1,2684	1,3195
	Ensaio 5	1,2644	1,3070	1,2784	1,2728	1,2666
Analista 2	Ensaio 1	1,3390	1,3518	1,3485	1,4093	1,4413
	Ensaio 2	1,2609	1,2535	1,2547	1,4029	1,3956
	Ensaio 3	1,2661	1,2520	1,4055	1,3321	1,3936
	Ensaio 4	1,2747	1,2530	1,4034	1,3363	1,4084
	Ensaio 5	1,2952	1,2592	1,4137	1,3430	1,3915

Relativamente ao método 4, para a gama baixa do biocida D, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0011; 0,0018; 0,0018; 0,00091 e 0,0011, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,0010; 0,0019; 0,0045; 0,0014 e 0,00043, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. Posteriormente, calcularam-se os valores de teste, 0,271e 0,483, correspondentes aos analistas 1 e 2. Uma vez que os valores de teste calculados não excedem o valor crítico Cochran, conclui-se que não existem *outliers* de variância intra-diários.

Tabela A2.9 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida D para a gama alta com o método 4, para o estudo da precisão intermédia, e avaliação dos outliers intra-diários

Analista	Ensaio	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Analista 1	Ensaio 1	7,2887	8,0303	7,8910	8,1173	7,7882
	Ensaio 2	7,3325	8,4339	7,9810	7,7259	8,0040
	Ensaio 3	7,3933	7,5456	7,4760	7,7088	8,2408
	Ensaio 4	7,4458	7,5846	7,5989	7,7320	8,1848
	Ensaio 5	7,4738	8,1842	8,2196	7,6889	7,8575
Analista 2	Ensaio 1	8,0984	8,1720	8,5669	8,0931	8,4123
	Ensaio 2	8,1901	7,7279	8,0070	7,8487	8,4770
	Ensaio 3	8,1363	8,2288	8,0525	8,1236	7,9145
	Ensaio 4	7,6010	8,3979	8,0453	8,1929	8,1818
	Ensaio 5	7,7506	7,8074	7,9950	8,1981	7,9138

Quanto ao método 4, para a gama alta do biocida D, foram calculadas as variâncias de cada dia, tendo-se obtido 0,0059; 0,15; 0,089; 0,033 e 0,039, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 1, e 0,069; 0,082; 0,059; 0,020 e 0,071, respetivamente, para os dias 1 a 5 do analista 2. Depois, calcularam-se os valores de teste, 0,470 e 0,273, correspondentes aos analistas 1 e 2. Dado que o valor crítico de Cochran é inferior aos valores de teste calculados, conclui-se que não existem *outliers* de variância intra-diários.

Tabelas A3 – Robustez

Nas Tabelas A3 encontram-se os resultados obtidos para o estudo da robustez que não foram apresentados no subcapítulo 4.1.

Após uma diminuição do fluxo de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, foram traçadas novas retas de calibração para os quatro biocidas e foi avaliada a homogeneidade de variâncias, sendo que os resultados obtidos se encontram nas seguintes tabelas.

Tabela A3.1 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida A com os métodos 1 e 2 com fluxo alterado, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 2)	Padrão maior (método 2)
Ensaio 1	0,1156	1,5872	0,2870	3,4793
Ensaio 2	0,1104	1,5852	0,2887	3,4901
Ensaio 3	0,1112	1,5826	0,2918	3,4845
Ensaio 4	0,1114	1,5860	0,2934	3,4791
Ensaio 5	0,1143	1,5850	0,2880	3,4841
Variância	0,0000050	0,0000029	0,0000073	0,000020

Após o cálculo das variâncias determinaram-se os valores de teste, tendo-se obtido 0,57 e 2,80 para os métodos 1 e 2, respetivamente. Foram ainda determinados os valores de prova sendo que se obteve 0,701 para o método 1 e 0,171 para o método 2.

Tabela A3.2 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida B para a gama alta com os métodos 1 e 3 com fluxo alterado, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 3)	Padrão maior (método 3)
Ensaio 1	0,1815	2,3818	0,5318	7,1582
Ensaio 2	0,1801	2,3748	0,5353	7,1666
Ensaio 3	0,1819	2,3852	0,5339	7,1583
Ensaio 4	0,1787	2,3774	0,5329	7,1736
Ensaio 5	0,1830	2,3877	0,5507	7,1778
Variância	0,0000028	0,000028	0,000061	0,000078

Quanto à gama alta do biocida B, obtiveram-se valores de teste de 10,21 e 1,28, respectivamente, para os métodos 1 e 3, e valores de prova de 0,022 e 0,407.

Tabela A3.3 – Áreas obtidas em mAU.min para o biocida C com os métodos 1 e 3 com fluxo alterado, para o estudo da homogeneidade das variâncias

	Padrão menor (método 1)	Padrão maior (método 1)	Padrão menor (método 3)	Padrão maior (método 3)
Ensaio 1	0,1044	0,4258	0,2010	0,8101
Ensaio 2	0,1104	0,4257	0,2030	0,8048
Ensaio 3	0,1039	0,4285	0,2029	0,8051
Ensaio 4	0,1250	0,4242	0,2055	0,8041
Ensaio 5	0,1105	0,4288	0,2090	0,8093
Variância	0,000073	0,0000039	0,000010	0,0000078

Relativamente ao biocida C, determinaram também os valores de teste e de prova. Os resultados obtidos para os valores de teste foram 0,05 e 0,82 para os métodos 1 e 3, respectivamente, e para os valores de prova, 0,992 e 0,574.

Dado que este teste deve ser realizado com um nível de significância de 1 %, como se obteve valor de prova igual ou superior a 0,010 em todos os casos, há homogeneidade de variâncias para todas as retas de calibração efetuadas com os quatro métodos com fluxo alterado.

Como se concluiu que existe homocedasticidade em todas as retas de calibração, prosseguiu-se com o estudo da linearidade, sendo que os resultados obtidos encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela A3.4 – Valores obtidos para o estudo da linearidade das retas de calibração do biocida A com os métodos 1 e 2 com o fluxo alterado

Biocida	Método	Ajuste linear	SS	v	σ_{fit}
A	1	P ₀₁	0,012	5	0,049
		P ₀₁₂	0,0062	4	0,039
A	2	P ₀₁	0,017	5	0,059
		P ₀₁₂	0,0077	4	0,044

Tabela A3.5 – Valores obtidos para o estudo da linearidade das retas de calibração dos biocidas B (GA) e C com os métodos 1 e 3 com o fluxo alterado

Biocida	Método	Ajuste linear	SS	v	σ_{fit}
B (GA)	1	P_{01}	0,0024	5	0,022
		P_{012}	0,00096	4	0,015
B (GA)	3	P_{01}	0,23	5	0,22
		P_{012}	0,23	4	0,24
C	1	P_{01}	0,000078	5	0,0040
		P_{012}	0,000042	4	0,0032
C	3	P_{01}	0,0011	5	0,015
		P_{012}	0,00091	4	0,015

Os valores de teste foram calculados, tendo-se de seguida determinado os valores de prova. Para o biocida A obtiveram-se valores de teste de 3,73 e 5,06, respetivamente, para os métodos 1 e 2, e valores de prova de 0,126 e 0,088. Quanto à gama alta do biocida B, 6,13 e 0,08 foram os valores obtidos para valores de teste e 0,068 e 0,796 para valores de prova, respetivamente, para os métodos 1 e 3. Relativamente ao biocida C, foram também determinados os valores de teste para os métodos 1 e 3, tendo-se obtido 3,40 e 0,62. Os resultados para os mesmos métodos para os valores de prova foram, respetivamente, 0,139 e 0,476. Deste modo, pode-se constatar que os valores obtidos para o valor de prova são todos superiores a 0,010. Uma vez que este teste foi efetuado com um nível de significância de 1 %, pode-se concluir que a função polinomial de primeiro grau (P_{01}) ajusta convenientemente o conjunto de pontos experimentais para todas as retas de calibração traçadas.

Além do estudo da linearidade, é também importante avaliar a possível existência de *outliers*. Estes foram estudados através do teste de Mandel e os resultados encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela A3.6 – Valores obtidos para a avaliação de *outliers* da reta de calibração do biocida A com o método 1 com fluxo alterado

Biocida	Método	Pontos utilizados	SS	v	σ_{fit}
A	1	Todos	0,012	5	0,049
		Exceto X_4	0,0018	4	0,021
		Exceto X_7	0,000084	3	0,0053
		Exceto X_2	0,000031	2	0,0039

Tabela A3.7 – Valores obtidos para a avaliação de *outliers* das retas de calibração do biocida A com o método 2 com fluxo alterado, e dos biocidas B (GA) e C com os métodos 1 e 3 com fluxo alterado

Biocida	Método	Pontos utilizados	SS	v	σ_{fit}
A	2	Todos	0,017	5	0,059
		Exceto X_7	0,0015	4	0,020
		Exceto X_6	0,0013	3	0,021
B (GA)	1	Todos	0,0024	5	0,022
		Exceto X_7	0,00064	4	0,013
B (GA)	3	Todos	0,23	5	0,22
		Exceto X_4	0,033	4	0,091
		Exceto X_7	0,0057	3	0,043
C	1	Todos	0,000078	5	0,0040
		Exceto X_3	0,000047	4	0,0034
C	3	Todos	0,0011	5	0,015
		Exceto X_4	0,00036	4	0,0095

Os valores de teste foram calculados e, de seguida, foram determinados os respetivos valores de prova. Relativamente ao biocida A, quanto ao método 1, constatou-se que o quarto padrão é um *outlier* da reta, dado ter-se obtido um valor de prova de 0,009 para o respetivo valor de teste de 22,56. Este ponto foi retirado da reta de calibração e, de seguida, testou-se o sétimo padrão, sendo que também é um *outlier*, uma vez que o valor prova obtido foi de 0,004 para o respetivo valor de teste de 61,89. Posteriormente, foi testado o segundo padrão sendo que se constatou que esta reta não apresenta mais *outliers*, dado ter-se obtido um valor de prova de 0,206 para o correspondente valor de teste de 3,42. Quanto ao método 2, obtiveram-se valores de teste e de prova de 41,28 e 0,003, respetivamente, sendo que se concluiu que o sétimo padrão é efetivamente um *outlier* desta reta. De seguida, testou-se o sexto padrão, tendo-se concluído que a reta de calibração não apresenta mais *outliers*, uma vez que se obteve um valor de prova de 0,532 para o respetivo valor de teste de 0,50.

Relativamente à gama alta do biocida B, para o método 1 determinou-se um valor de teste de 11,23 e um valor de prova de 0,029, sendo que se concluiu a inexistência de *outliers*. Por outro lado, quanto ao método 3, obteve-se um valor de teste de 24,08 e respetivo valor de prova de 0,008 quando se testou o quarto padrão. Assim, como o valor de prova obtido excedeu o valor de 0,010, o quarto padrão foi considerado um *outlier* e foi retirado da reta de calibração. De seguida, testou-se o sétimo padrão, sendo que se obteve um valor de teste de 14,6 e respetivo valor de prova de 0,032 pelo que, conclui-se que esta reta de calibração apenas apresenta um *outlier*, o quarto padrão.

Relativamente ao biocida C, obtiveram-se valores de teste de 2,70 e 7,76 para os métodos 1 e 3, respetivamente, e valores de prova de 0,176 e 0,050. Como estes últimos valores obtidos são superiores a 0,010, concluiu-se que não existem *outliers* para ambas as retas do biocida C.

Sempre que se verificou a existência de *outliers*, o teste da linearidade foi repetido após serem retirados todos os *outliers* das retas traçadas, sendo que se voltou a obter linearidade.

Quanto ao estudo do significado estatístico dos parâmetros da reta, os valores de b_0 e b_1 foram determinados, assim como os respetivos erros padrão, sendo que os resultados obtidos encontram-se na seguinte tabela.

Tabela A3.8 – Valores obtidos para o estudo do significado estatístico dos parâmetros das retas de calibração com fluxo alterado

Biocida	Método	b_0 / mAU.min	SE (b_0)	b_1 / L.mg ⁻¹ min ⁻¹	SE (b_1)
A	1	-0,0239	0,0044	0,13734	0,00064
	2	-0,020	0,016	0,3092	0,0024
B (GA)	1	-0,014	0,017	0,1827	0,0021
	3	-0,002	0,071	0,5423	0,0086
C	1	-0,0012	0,0040	0,1769	0,0025
	3	0,010	0,015	0,3347	0,0091

Foram ainda determinados os valores de teste e de prova para cada uma das retas sendo que, seguidamente, serão mencionados os resultados obtidos relativamente à ordenada na origem.

Quanto ao biocida A, para o método 1 obteve-se um valor de teste de 5,45 e um valor de prova de 0,002, enquanto para o método 2 os respetivos resultados foram 1,26 e 0,255.

Quanto à gama alta do biocida B, os resultados obtidos para os métodos 1 e 3 foram, respetivamente, para os valores de prova, 0,433 e 0,976 para os respetivos valores de teste de 0,84 e 0,03. Relativamente ao biocida C, 0,775 e 0,537 foram os resultados obtidos para os valores de prova, respetivamente, para os métodos 1 e 3, correspondendo aos respetivos valores de teste de 0,30 e 0,66. Deste modo, relativamente à análise da ordenada na origem, como o valor de prova excedeu o valor de 0,050 em todos os casos à exceção de um, pode-se concluir que este parâmetro não tem significado estatístico. Esta conclusão força a exclusão da estimativa dos limiares analíticos através da ordenada na origem. Relativamente à reta do biocida A através do método 1, como o valor de prova é inferior a 0,010, conclui-se que neste caso a ordenada na origem tem significado estatístico. Neste caso, os limiares analíticos serão calculados através da ordenada na origem.

Seguidamente, serão mencionados os resultados obtidos para os valores de testes relativamente ao estudo do significado estatístico do declive. Para o biocida A obtiveram-se valores de 215,03 e 131,32, respetivamente, para os métodos 1 e 2. Relativamente à gama alta do biocida B, obtiveram-se valores de 88,04 e 63,11, correspondentes aos métodos 1 e 3. Relativamente ao biocida C, foram também determinados os valores de teste para os métodos 1 e 3, tendo-se obtido 71,19 e 36,64, respetivamente. Quanto aos resultados obtidos para os valores de prova, estes foram sempre iguais a 0,000 para todos os casos estudados. Deste modo, no estudo do declive obteve-se, em todas as retas de calibração, valores de prova inferiores a 5 % pelo que, conclui-se que este parâmetro tem significado estatístico.

Os limites de deteção e de quantificação foram determinados através do desvio padrão residual, à exceção da reta do biocida A através do método 1, em que os limiares analíticos foram calculados através do erro padrão da ordenada na origem. Os resultados obtidos encontram-se na seguinte tabela.

Tabela A3.9 – Valores obtidos de LD e LQ para as retas de calibração traçadas com os métodos com fluxo alterado

Biocida	Método	$b_1 / L \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	σ_{fit}	LD / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	LQ / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
A	1	0,13734	0,0053	0,1503	0,4508
	2	0,3092	0,020	0,2709	0,8127
B (GA)	1	0,1827	0,022	0,4855	1,456
	3	0,5423	0,091	0,7165	2,149
C	1	0,1769	0,0040	0,09007	0,2702
	3	0,3347	0,015	0,1750	0,5250

À exceção de ambas as retas de calibração da gama alta do biocida B, os limites de quantificação obtidos para as restantes retas são inferiores ao padrão de menor concentração. Relativamente às retas acima referidas, apesar de o limite de quantificação ser superior ao primeiro padrão, é inferior ao segundo padrão de menor concentração e o limite de deteção é inferior ao primeiro padrão de menor concentração. Uma vez que esta é também uma situação aceitável, todos os limites obtidos foram considerados satisfatórios.

Nas tabelas seguintes podem-se encontrar os resultados obtidos para os ensaios das amostras testadas para o estudo da robustez dos métodos 1, 2 e 3.

Tabela A3.10 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida A com o método 2 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra F1	10,98	10,41
Produto 1	Amostra F2	10,66	10,69
Produto 1	Amostra G1	10,72	10,88
Produto 1	Amostra G2	10,62	10,28
Produto 1	Amostra H1	5,778	5,520
Produto 1	Amostra H2	7,014	6,777
Produto 1	Amostra I1	4,523	4,356
Produto 1	Amostra I2	4,534	4,594
Produto 1	Amostra J1	5,796	5,506
Produto 1	Amostra J1	5,916	5,810
Produto 2	Amostra A	1,554	1,574
Produto 2	Amostra B	0,8497	0,8704
Produto 2	Amostra C1	2,632	2,603
Produto 2	Amostra D	2,991	2,937

Tabela A3.11 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida B para a gama alta com o método 1 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra I1	4,650	4,470
Produto 1	Amostra I2	4,570	4,423
Produto 1	Amostra F1	8,662	8,823
Produto 1	Amostra F2	8,470	8,886
Produto 1	Amostra G1	8,690	8,915
Produto 1	Amostra G2	8,668	8,734
Produto 1	Amostra M1	4,311	4,401
Produto 1	Amostra M2	4,355	4,663
Produto 1	Amostra N1	4,317	4,511

Tabela A3.12 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida B para a gama alta com o método 1 e com o método com fluxo alterado (continuação)

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra N2	4,159	4,312
Produto 1	Amostra O1	4,453	4,811
Produto 1	Amostra O2	4,301	4,414
Produto 1	Amostra P1	4,437	4,442
Produto 1	Amostra P2	4,502	4,508
Produto 2	Amostra A	12,72	12,52
Produto 2	Amostra C1	12,59	12,28
Produto 2	Amostra D	10,12	10,25
Produto 2	Amostra C2	9,836	9,539

Tabela A3.13 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida B para a gama alta com o método 3 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra D1	7,876	7,994
Produto 1	Amostra D2	8,155	8,267
Produto 1	Amostra E1	10,38	9,123
Produto 1	Amostra E2	9,235	9,335
Produto 1	Amostra F1	8,549	8,726
Produto 1	Amostra F2	8,585	8,627
Produto 1	Amostra G1	8,716	8,782

Tabela A3.14 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida B para a gama alta com o método 3 e com o método com fluxo alterado (continuação)

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra G2	8,644	8,283
Produto 1	Amostra M1	4,254	4,196
Produto 1	Amostra M2	4,401	4,294
Produto 1	Amostra N1	4,459	4,180
Produto 1	Amostra N2	4,193	4,107
Produto 1	Amostra O1	4,468	4,479
Produto 1	Amostra O2	4,357	4,260
Produto 1	Amostra P1	4,336	4,498
Produto 1	Amostra P2	4,509	4,236

Tabela A3.15 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida C com o método 1 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra I3	0,3786	0,3351
Produto 1	Amostra I4	0,3319	0,3326
Produto 1	Amostra J3	0,5183	0,4836
Produto 1	Amostra J4	0,6114	0,4855
Produto 1	Amostra L3	0,6353	0,5656
Produto 1	Amostra L4	0,5238	0,5243
Produto 1	Amostra M3	0,9033	0,7811
Produto 1	Amostra M4	0,8503	0,7041
Produto 1	Amostra N3	0,7976	0,6643
Produto 1	Amostra N4	0,6837	0,5664
Produto 1	Amostra O3	0,8999	0,6791
Produto 1	Amostra O4	0,7586	0,7176
Produto 1	Amostra P3	0,6958	0,7056
Produto 1	Amostra P4	0,7575	0,7376
Produto 3	Amostra A1	1,330	1,341
Produto 3	Amostra A2	1,415	1,416

Tabela A3.16 – Valores obtidos em mg.L^{-1} para as amostras analisadas do biocida C com o método 3 e com o método com fluxo alterado

Produto	Amostra	$X_{\text{ref}} / \text{mg.L}^{-1}$	$X_{\text{alt}} / \text{mg.L}^{-1}$
Produto 1	Amostra I3	0,2480	0,2315
Produto 1	Amostra I4	0,2559	0,2511
Produto 1	Amostra J3	0,4108	0,3912
Produto 1	Amostra J4	0,4038	0,4005
Produto 1	Amostra L3	0,4413	0,4259
Produto 1	Amostra L4	0,4425	0,4434
Produto 1	Amostra M3	0,5920	0,5820
Produto 1	Amostra M4	0,5953	0,5930
Produto 1	Amostra N3	0,5156	0,4951
Produto 1	Amostra N4	0,4999	0,4790
Produto 1	Amostra O3	0,6200	0,5992
Produto 1	Amostra O4	0,6036	0,5833
Produto 1	Amostra P3	0,5844	0,5428
Produto 1	Amostra P4	0,5557	0,5394
Produto 3	Amostra A1	1,316	1,437
Produto 3	Amostra A2	1,374	1,345

Apêndice B

Neste apêndice serão abordados os resultados que não foram apresentados no capítulo 4 relativamente ao método de avaliação microbiológica rápida.

Tabelas B1 – Influência do valor da calibração no resultado final

Nas Tabelas B1 encontram-se os resultados obtidos para as gamas 100-1000 e > 1000 pg.mL⁻¹ relativamente ao estudo da influência do valor da calibração no resultado final.

Tabela B1.1 – Resultados simulados para uma amostra na gama 100 – 1000, com os 10 ensaios de calibração obtidos

Ensaio	URL _{pad} / URL	tAPT / URL	dATP / URL	cATP / pg.mL ⁻¹	cATP / EM.mL ⁻¹
1	170506	591	56	314	313772
2	154817	591	56	346	345569
3	203873	591	56	262	262418
4	193685	591	56	276	276222
5	182521	591	56	293	293117
6	210710	591	56	254	253903
7	194233	591	56	275	275442
8	200668	591	56	267	266610
9	203794	591	56	263	262520
10	186365	591	56	287	287071

Tabela B1.2 – Resultados simulados para uma amostra na gama > 1000, com os 10 ensaios de calibração obtidos

Ensaio	URL _{pad} / URL	tAPT / URL	dATP / URL	cATP / pg.mL ⁻¹	cATP / EM.mL ⁻¹
1	170506	4464	138	2537	2537154
2	154817	4464	138	2794	2794267
3	203873	4464	138	2122	2121909
4	193685	4464	138	2234	2233524
5	182521	4464	138	2370	2370138
6	210710	4464	138	2053	2053059
7	194233	4464	138	2227	2227222
8	200668	4464	138	2156	2155800
9	203794	4464	138	2123	2122732
10	186365	4464	138	2321	2321251

Tabela B2 – Calibração

Na Tabela B2 encontram-se os resultados obtidos para a calibração diária correspondente a cada frasco de luminase reidratada ao longo de dos dias que não foram apresentados no capítulo 4.

Tabela B2 – Resultados obtidos para a calibração, ao longo do tempo, para cada luminase

Luminase	Dia	URL _{pad} / URL	
Luminase F	Dia 11	172691	
	Dia 12	166925	
	Dia 12	155403	
	Dia 13	111724	
	Dia 14	106308	

Luminase G	Dia 15	176647	
	Dia 16	175625	
	Dia 17	154113	
Luminase H	Dia 18	133285	

	Dia 19	230332	
Luminase I	Dia 20	190068	

	Dia 21	197539	
	Dia 22	184593	
	Dia 23	166701	
	Dia 24	153521	
	Dia 25	119594	
Dia 26	119078		
Luminase J	Dia 27	119022	

	Dia 27	190234	
	Dia 28	177144	
	Dia 29	169311	
Luminase L	Dia 30	166518	
	Dia 31	145936	

	Dia 32	181711	
Luminase L	Dia 33	175792	
	Dia 34	161463	

Apêndice C

Neste apêndice encontra-se a tabela estatística utilizada para a determinação dos valores críticos de Cochran.

Tabela C1 – Tabela de valores críticos para o teste de Cochran para um nível de significância de 0,05

Tabela C1 – Valores críticos para o teste de Cochran ($\alpha = 0,05$)

M \ n	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000