



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NITRATOS E/OU NITRITOS EM
AMOSTRAS DO ESTUDO DE DIETA TOTAL (TDS) POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)
CONTRIBUIÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO A
NITRATOS/NITRITOS**

CLÁUDIA DIAS DE CARVALHO

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica**

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Elsa Reis Vasco

Júri:

Presidente: Doutora Isabel João

Vogais: Doutora Graça Dias

Doutora Celeste Serra

Lisboa

Janeiro de 2018



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NITRATOS E/OU NITRITOS EM
AMOSTRAS DO ESTUDO DE DIETA TOTAL (TDS) POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC)
CONTRIBUIÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO A
NITRATOS/NITRITOS**

CLÁUDIA DIAS DE CARVALHO

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

**Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica**

Orientadores:

Doutora Maria Celeste Serra

Doutora Elsa Reis Vasco

Júri:

Presidente: Doutora Isabel João

Vogais: Doutora Graça Dias

Doutora Celeste Serra

Lisboa

Janeiro de 2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P., por me ter oferecido a oportunidade de realizar o meu trabalho final de mestrado, assim como ao projeto *TDS Exposure*, que me permitiu concretizar o mesmo.

Gostaria de também agradecer às minhas orientadoras, a Doutora Elsa Vasco e a Doutora Celeste Serra, pela paciência demonstrada, pelo apoio, orientação e amizade demonstrados ao longo de todo o trabalho.

A todas os colaboradores do DAN, por me terem ajudado ao longo dos meses de estágio, nomeadamente a Doutora Sílvia, a Doutora Cristina Flores, a Doutora Graça e o Francisco (um dos meus colegas de gabinete e laboratório).

Aos meus colegas de laboratório, obrigada por terem ouvido todos os meus medos e dúvidas e pelo apoio e amizade demonstrados.

Quero agradecer também aos meus amigos e à minha família por acreditarem em mim, mesmo quando eu própria não acreditava e por me incentivarem a lutar por dar sempre o meu melhor.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi a otimização e validação de um método de HPLC de troca iónica para a determinação de teores de nitratos e nitritos em amostras de alimentos à base de carne, fundamentado na norma europeia EN 12014-4 com vista à aplicação na análise de amostras destes produtos.

Os ensaios de otimização permitiram confirmar que os parâmetros indicados na norma eram os adequados. A única alteração foi a preparação dos padrões, que foram preparados em fase móvel, o que permitiu uma melhor visualização e integração dos picos de interesse nos cromatogramas.

A determinação analítica decorreu num equipamento de HPLC com detetor UV-Vis DAD, utilizando fase móvel à base de tampão gluconato de borato de lítio e acetonitrilo. A extração das amostras foi efetuada com água quente e a clarificação foi realizada com acetonitrilo. A deteção foi realizada a 205 nm.

O processo de validação do método consistiu na avaliação de parâmetros como a seletividade/especificidade, gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, repetibilidade e linearidade do injetor, limites de deteção (3,3 mg nitrato/kg amostra e 1,7 mg nitrito/kg amostra) e quantificação (10 mg nitrato/kg amostra e 5 mg nitrito/kg amostra), precisão (coeficientes de variação abaixo dos 10%) e exatidão.

A partir da análise das amostras, foi possível constatar que apenas duas amostras continham teores acima dos limites de nitrato de potássio permitidos com valores de 647,69 e 1 189,66 mg/kg amostra, nas amostras de paté de porco e salame, respetivamente.

Ao aplicar um teste ANOVA a diferentes lotes de uma mesma amostra foi possível concluir que os lotes diferiam significativamente, provavelmente devido à interconversão dos analitos durante o armazenamento.

Por fim, avaliou-se a exposição da população aos analitos em estudo, verificando-se que o consumo de alimentos à base de carne não contribui significativamente para a exposição a nitratos e nitritos, uma vez que foram obtidos valores inferiores a 0,01 mg/kg massa corporal/dia.

Palavras-chave: HPLC, nitratos, nitritos, TDS, validação de métodos, exposição da população

Abstract

The main purpose of this work was the optimization and validation of an ion exchange HPLC method for the determination of nitrate and nitrite contents in meat food samples, based on the European Standard EN 12014-4, for application in the analysis of these products.

The analytical determination was run on an HPLC equipment with UV-Vis DAD detector, using mobile phase based on lithium borate gluconate buffer and acetonitrile. The samples were extracted with hot water, while clarification was achieved with acetonitrile. Detection was performed at 205 nm.

The optimization tests confirmed that the parameters indicated in the European Standard were adequate. The only change was in the preparation of the standards, which were prepared in mobile phase instead of water that allow a better visualization and integration of the peaks of interest.

The method validation procedure consisted in the evaluation of parameters such as selectivity/specificity, range of work, linearity, sensitivity, repeatability and linearity of the injector, detection limits (3,3 mg nitrate/kg sample and 1,7 mg nitrite/kg sample) and quantification (10 mg nitrate/kg sample and 5 mg nitrite/kg sample), precision (coefficients of variation below 10%) and accuracy.

From the analysis of the samples it was possible to verify that only two samples were above the limits of potassium nitrate allowed, with contents of 647,7 and 1 189 mg/kg sample, in the samples of pork pate and salami, respectively.

It was possible to compare different batches of the same sample through an ANOVA test and to conclude that the batches differed significantly, probably due to interconversion of the analytes during storage.

Finally, the exposure of the population to the analyzed analytes was evaluated and it was verified that the consumption of meat products does not contribute for the exposure of the population to nitrates and nitrites, since were found values below 0,01 mg/body weight/day.

Keywords: HPLC, nitrates, nitrites, TDS, validation of methods, population exposure.

Lista de abreviaturas

| | |
|---------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AHNDMS | <i>4-amino-5-hydroxynapthalene-2,7-dissulphonic acid monossodium salt</i> - Sal monossódico do ácido 4-amino-5-hidroxinaftaleno-2,7-dissulfónico |
| ANOVA | <i>Analysis of Variance</i> - Análise de variância |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| ATSDR | <i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i> – Agência de Substâncias Tóxicas e Registo de Doenças |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DAN | Departamento de Alimentação e Nutrição |
| DDA | Dose Diária Admissível |
| DDR | Dose Diária Recomendada |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar |
| EN | <i>European Standard</i> - Norma Europeia |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization</i> - Organização da Agricultura e Alimentação |
| FIA | <i>Flow Injection Analysis</i> - Análise de Injeção em Fluxo |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografia Líquida de Alta Resolução |
| IEC | <i>International Electrochemical Commission</i> - Comissão Internacional Eletroquímica |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| INSA | Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> - Organização Internacional de Normalização |

| | |
|------------------------------|---|
| JECFA | <i>Joint Expert Committee of Food Additives</i> - Comité Especialista em Aditivos Alimentares conjunto da FAO/WHO |
| KNO ₃ | Nitrato de potássio |
| LD | Limite de Detecção |
| LMU | Limite Máximo de Utilização |
| LQ | Limite de Quantificação |
| MRC | Material de Referência Certificado |
| NaNO ₂ | Nitrito de sódio |
| NO ₂ ⁻ | Ião nitrito |
| NO ₃ ⁻ | Ião nitrato |
| NOAEL | <i>Non-Observable Adverse Effect Level</i> - Efeito de Nível Adverso Não Observável |
| NOEL | <i>Non-Observable Effect Level</i> - Efeito de Nível Não Observável |
| PVDF | <i>Polyvinylidene Fluoride</i> - Fluoreto de polivinilideno |
| RELACRE | Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal |
| rpm | Rotações por minuto |
| SCF | <i>Scientific Committee on Food</i> - Comité Científico de Alimentos |
| TDS | <i>Total Diet Studies</i> - Estudo de Dieta Total |
| UE | União Europeia |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | <i>World's Health Organization</i> - Organização Mundial de Saúde |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura III-1: Categorias dos aditivos alimentares e respetivos códigos..... | 6 |
| Figura III-2: Estrutura química do nitrato (1) e do nitrito (2) (ATSDR 2013; Omar <i>et al.</i> 2012). ... | 11 |
| Figura III-3: Alimentos/bebidas contribuidores para a ingestão de nitratos (1) e nitritos (2) no Reino Unido (EFSA 2008)..... | 17 |
| Figura III-4: Alimentos/bebidas contribuidores para a ingestão de nitratos (1) e nitritos (2) em França (EFSA 2008)..... | 17 |
| Figura III-5:Exposição total da população ao nitrito no Reino Unido (1) e França (2), incluindo a conversão de nitrato em nitrito (EFSA 2008) | 18 |
| Figura III-6: Principais componentes de um sistema de HPLC (Giri 2015)..... | 22 |
| Figura V-1: Cromatograma dos padrões de nitrato de potássio (20 mg/mL) e nitrito de sódio (10 mg/mL), preparados em água..... | 51 |
| Figura V-2: Espectros de absorção do nitrato (1) e do nitrito (2) entre o comprimento de onda de 200 e 300 nm..... | 52 |
| Figura V-3:Cromatograma dos padrões de nitrato de potássio (20 mg/mL) e nitrito de sódio (10 mg/mL) preparados em fase móvel. | 53 |
| Figura V-4: Cromatograma da amostra A9 sem adição de padrão. | 58 |
| Figura V-5: Cromatograma da amostra A9 com adição de padrão de nitrato de potássio e nitrito de sódio..... | 58 |
| Figura V-6: Curvas de calibração do nitrato e nitrito. | 62 |
| Figura V-7: Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada ponto da curva de calibração do padrão de nitrato de potássio..... | 63 |
| Figura V-8: Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada ponto da curva de calibração do padrão de nitrito de sódio. | 63 |
| Figura V-9: Correlação linear entre as médias dos valores do sinal obtido e os volumes de injeção. | 70 |
| Figura V-10: Curvas de calibração obtidas nos diferentes dias de injeção para o ião nitrato. | 72 |
| Figura V-11: Curvas de calibração obtidas nos diferentes dias de injeção para o ião nitrito. | 72 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela III-1: Principais propriedades físico-químicas dos sais nitrato de potássio, nitrato de sódio, nitrito de potássio e nitrito de sódio (Merck 2017; Sigma-Aldrich 2017). | 11 |
| Tabela III-2: LMU dos sais de nitratos e nitritos a alimentos à base de carne em mg/kg de amostra (Regulamento Europeu 1129/2011). | 12 |
| Tabela III-3: Média dos teores de nitrato e nitritos obtidos na análise de amostras de produtos à base de carne (Dennis et al. 1990). | 20 |
| Tabela III-4: Média dos teores de nitrato e nitritos obtidos na análise de amostras de produtos à base de carne (Hsu et al. 2009). | 20 |
| Tabela III-5: Teores de nitrato e nitrito obtidos em amostras de produtos à base de carne consoante o tipo de amostra (Iammarino et al. 2013). | 21 |
| Tabela IV-1: Fórmula química, marca e pureza de cada reagente utilizado. | 41 |
| Tabela IV-2: Amostras analisadas ao longo do trabalho, quantidade de lotes e tipo de amostras. | 43 |
| Tabela IV-3: Concentração de cada ião na respetiva solução padrão e volume final de solução. | 45 |
| Tabela IV-4: Condições cromatográficas após a otimização do método. | 46 |
| Tabela IV-5: Parâmetros de validação do método avaliados e respectivo procedimento. | 48 |
| Tabela V-1: Valor médio da concentração em nitrato e nitrito, em mg/kg de amostra, na amostra A1 e A2 sujeita a diferentes procedimentos de extração. | 55 |
| Tabela V-2: Valores médios de concentração de nitrato e nitrito e respetivos desvios padrão, em mg/kg amostra, para as amostras A1 e A2 consoante o procedimento de extração utilizado. | 56 |
| Tabela V-3: Valores de variância calculados para cada analito, amostra e procedimento em estudo. | 57 |
| Tabela V-4: Valores experimentais de t. | 57 |
| Tabela V-5: Número de réplicas preparadas para cada ponto da curva de calibração. | 60 |
| Tabela V-6: Valores médios do sinal obtido, em unidades de absorvância, para cada réplica do primeiro e último ponto da curva de calibração e da variância associada. | 60 |
| Tabela V-7: Valores calculados de PG. | 61 |

| | |
|---|----|
| Tabela V-8: Sensibilidade média do método, desvio padrão e coeficiente de variação para nitratos e nitritos. | 64 |
| Tabela V-9: Valores obtidos, em UA, em dez réplicas injetadas em duplicado de uma solução de padrão de nitrito de sódio 0,25 µg/mL e nitrato de potássio 0,5 µg/mL..... | 65 |
| Tabela V-10: Limites de quantificação e detecção considerados..... | 66 |
| Tabela V-11: Limites de quantificação e detecção confirmados..... | 66 |
| Tabela V-12: Limites de quantificação e detecção do método. | 67 |
| Tabela V-13: Concentração média, desvio padrão e coeficiente de variação da repetibilidade e da precisão intermédia para o nitrato. | 67 |
| Tabela V-14: Concentração média, desvio padrão e coeficiente de variação da repetibilidade e da precisão intermédia para o nitrito. | 68 |
| Tabela V-15: Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do injetor, em UA. | 69 |
| Tabela V-16: Média dos valores das áreas dos picos obtidos para cada volume injetado e para cada analito de interesse, em UA. | 69 |
| Tabela V-17: Variação do declive das curvas de calibração do nitrato e nitrito ao longo de uma semana, em (UA mL)/mg. | 73 |
| Tabela V-18: Variação do r^2 das curvas de calibração do nitrato e nitrito ao longo de uma semana. | 73 |
| Tabela V-19: Valores de pH da fase móvel ao longo de duas semanas..... | 74 |
| Tabela V-20: Concentração média e taxa de recuperação nas amostras para o nitrato e o nitrito. | 75 |
| Tabela V-21: Indicações dos rótulos das amostras A 5 e A 6 relativamente aos compostos adicionados como conservantes. | 76 |
| Tabela V-22: Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ obtidos para o nitrato e o nitrito..... | 78 |
| Tabela V-23: Dados de consumo, teor de nitratos e resultados da exposição da população a nitratos..... | 79 |

Índice

| | |
|--|-----|
| Agradecimentos..... | i |
| Resumo..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Lista de abreviaturas..... | vii |
| Índice de figuras..... | ix |
| Índice de tabelas..... | xi |
| Índice | xv |
| I – Objetivos do trabalho..... | 1 |
| II – Enquadramento do tema..... | 3 |
| III – Introdução..... | 5 |
| III.1 – Aditivos alimentares..... | 5 |
| III.1.1 – Conservantes..... | 6 |
| III.2 – Legislação/regulamentação de aditivos alimentares..... | 8 |
| III.2.1 – Processo de aprovação de novos aditivos..... | 9 |
| III.3 – Nitratos e nitritos..... | 10 |
| III.3.1 – Efeitos na saúde..... | 13 |
| III.4 – Estudos de dieta total (<i>Total Diet Studies</i> - TDS)..... | 15 |
| III.5 – Métodos para determinar o teor de nitratos e nitritos em amostras de alimentos..... | 18 |
| III.6 – Fundamentos gerais de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC)..... | 21 |
| III.6.1 – HPLC de troca iónica..... | 22 |
| III.7 – Validação de métodos..... | 24 |
| III.7.1 – Validação direta..... | 25 |
| III.7.1.1 – Materiais de Referência Certificados (MRC)..... | 25 |
| III.7.1.2 – Ensaio interlaboratoriais..... | 27 |
| III.7.1.3 – Testes comparativos..... | 27 |

| | |
|--|----|
| III.7.2 – Validação indireta..... | 28 |
| III.7.2.1 – Especificidade/seletividade..... | 28 |
| III.7.2.2 – Gama de trabalho..... | 29 |
| III.7.2.3 – Linearidade..... | 30 |
| III.7.2.4 – Sensibilidade..... | 31 |
| III.7.2.5 – Limiares analíticos..... | 32 |
| III.7.2.6 – Precisão..... | 33 |
| III.7.2.7 – Exatidão..... | 36 |
| III.7.2.8 – Robustez..... | 37 |
| IV – Parte experimental..... | 39 |
| IV.1 – Material..... | 39 |
| IV.2 – Equipamento..... | 40 |
| IV.3 – Reagentes..... | 41 |
| IV.4 – Soluções..... | 42 |
| IV.5 – Amostras..... | 43 |
| IV.6 – Procedimento experimental..... | 44 |
| IV.6.1 – Preparação e extração das amostras..... | 44 |
| IV.6.2 – Preparação das soluções padrão de calibração..... | 45 |
| IV.6.3 – Condições cromatográficas..... | 46 |
| IV.6.4 – Identificação e quantificação dos analitos..... | 46 |
| IV.7 – Processo de validação do método..... | 47 |
| IV.8 – Testes estatísticos..... | 49 |
| V – Apresentação e discussão de resultados..... | 51 |
| V.1 – Otimização do processo analítico..... | 51 |
| V.1.1 – Comprimento de onda..... | 51 |
| V.1.2 – Preparação das soluções padrão..... | 52 |
| V.1.3 – Composição da fase móvel..... | 53 |
| V.1.4 – Fluxo da fase móvel..... | 53 |

| | |
|--|-----|
| V.1.5 – Temperatura de extração | 54 |
| V.2 – Validação do método | 58 |
| V.2.1 – Especificidade e Seletividade | 58 |
| V.2.2 – Gama de trabalho..... | 59 |
| V.2.3 – Linearidade das curvas de calibração | 61 |
| V.2.4 – Sensibilidade..... | 64 |
| V.2.5 – Limites analíticos de deteção e quantificação..... | 64 |
| V.2.6 – Precisão | 67 |
| V.2.7 – Repetibilidade e linearidade do injetor | 68 |
| V.2.8 – Exatidão | 70 |
| V.3 – Estabilidade das curvas de calibração e da fase móvel | 71 |
| V.4 – Análise das amostras..... | 74 |
| V.4.1 – Avaliação da homogeneidade dos lotes | 77 |
| V.5 – Exposição da população | 78 |
| VI – Conclusão | 81 |
| VII – Perspetivas futuras..... | 83 |
| VIII – Referências bibliográficas | 85 |
| Anexos | 95 |
| Anexo 1 – Folha de cálculo utilizada na avaliação da homogeneidade de variâncias da gama de trabalho do método | 95 |
| Anexo 2 - Relatório obtido através do Software Empower relativo às curvas de calibração (exemplo)..... | 97 |
| Anexo 3 – Folha de cálculo utilizada para o teste de linearidade (Mandel) | 101 |
| Anexo 4 – Exemplo dos cromatogramas obtidos na confirmação dos limites analíticos | 103 |
| Anexo 5 - Folha de cálculo para o cálculo da concentração de analito nos ensaios de repetibilidade..... | 105 |
| Anexo 6 – Folha de cálculo do desvio padrão relativo de repetibilidade..... | 109 |
| Anexo 7 - Folha de cálculo utilizada para estudar a precisão do método | 113 |

| | |
|--|-----|
| Anexo 8 – Folha de cálculo utilizada para a determinação do teor de analitos na amostra e da respetiva taxa de recuperação | 117 |
| Anexo 9 – Teores de nitrato e nitrito obtidos para cada lote utilizado para testar a homogeneidade dos lotes de amostras | 119 |
| Anexo 10 – Avaliação da homogeneidade dos teores de nitrato e nitrito em vários lotes (ANOVA) | 121 |
| Anexo 11 – Poster exposto no Fórum de Engenharia Química e Biológica'17, ISEL (2017).. | 124 |
| Anexo 12 – Poster exposto na 10ª Reunião Anual Portfir, INSA (2017) | 125 |

I – Objetivos do trabalho

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no âmbito do projeto *TDS Exposure*.

Os principais objetivos do trabalho foram:

- Implementação, otimização, e validação de um método de HPLC de troca iónica para a determinação de nitritos e nitratos em produtos à base de carne, com base na norma 12014-4 (EN 12014-4 2005).
- Análise de amostras do projeto *TDS Exposure*, para determinação dos teores de nitratos e nitritos e comparação com os valores máximos permitidos na legislação em vigor.
- Contributo para a avaliação da exposição da população a nitratos e nitritos.

II – Enquadramento do tema

Atualmente, os nitratos e nitritos são vistos como contaminantes alimentares. Podem existir naturalmente nos alimentos, por exemplo no caso de vegetais, ou ser adicionados como conservantes, como por exemplo, a alimentos à base de carne (Hsu *et al.* 2009; lammarino *et al.* 2013). Neste último caso, os nitratos e nitritos são principalmente adicionados sob a forma de nitrito de potássio ou sódio, de modo a conservar estes alimentos através da sua ação antimicrobiana e a manter a cor característica destes produtos e as suas propriedades organolépticas (Dennis *et al.* 1990; lammarino *et al.* 2013).

Embora o nitrato seja relativamente estável, o nitrito é extremamente reativo (Dennis *et al.* 1990). Assim, forma facilmente compostos N-nitrosos, que são prejudiciais à saúde, podendo causar alguns tipos de cancro ou inibir o transporte de oxigénio para os tecidos celulares através da oxidação da hemoglobina (Hsu *et al.* 2009; lammarino *et al.* 2013).

Assim, é importante desenvolver um método prático, rápido e eficiente para a determinação destes compostos em amostras de produtos à base de carne de forma a avaliar a exposição da população a estes contaminantes (Hsu *et al.* 2009).

III – Introdução

III.1 – Aditivos alimentares

A partir da Segunda Guerra Mundial, o comportamento dos consumidores mudou drasticamente. Logo após a Segunda Guerra Mundial, havia a exigência de produtos alimentares que fossem suficientes para responder apenas às necessidades. De seguida, passaram a exigir alimentos em quantidade suficiente e com uma maior qualidade. Atualmente, os consumidores requerem que os produtos alimentares sejam saudáveis, em quantidade suficiente e com uma elevada qualidade. Como tal, foi necessário criar uma abordagem consistente relativamente a estas exigências, de modo a assegurar a satisfação e confiança dos consumidores (Andrée et al. 2010; Brul & Coote 1999). Foi então possível observar o crescimento da indústria alimentar, com o conseqüente aumento de produtos processados no mercado, cuja produção requer a utilização de aditivos alimentares.

Um aditivo alimentar é definido como “qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional, aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios” (Porto 2010; Regulamento 1333/2008 2008).

Os aditivos podem ser adicionados para cumprir várias funções, como: melhorar as propriedades organolépticas; conservar; facilitar a preparação ou o processamento; manter ou melhorar o valor nutricional; fornecer os ingredientes ou componentes essenciais para um grupo de consumidores com necessidades nutricionais específicas. Vários destes aditivos podem ter mais do que uma função (Msagati 2012; Regulamento 1333/2008 2008; Wickens 2001).

Os aditivos alimentares encontram-se divididos em vários grupos: edulcorantes, corantes, antioxidantes, conservantes, emulsionantes, estabilizantes, espessantes e gelificantes e outros (reguladores de pH e antiaglomerantes, intensificadores de sabor, ceras, agentes de revestimento e brilho sintético, melhorantes, gases de embalagem, agentes de espuma e químicos adicionais), como mostra a figura III-1 (Msagati 2012).

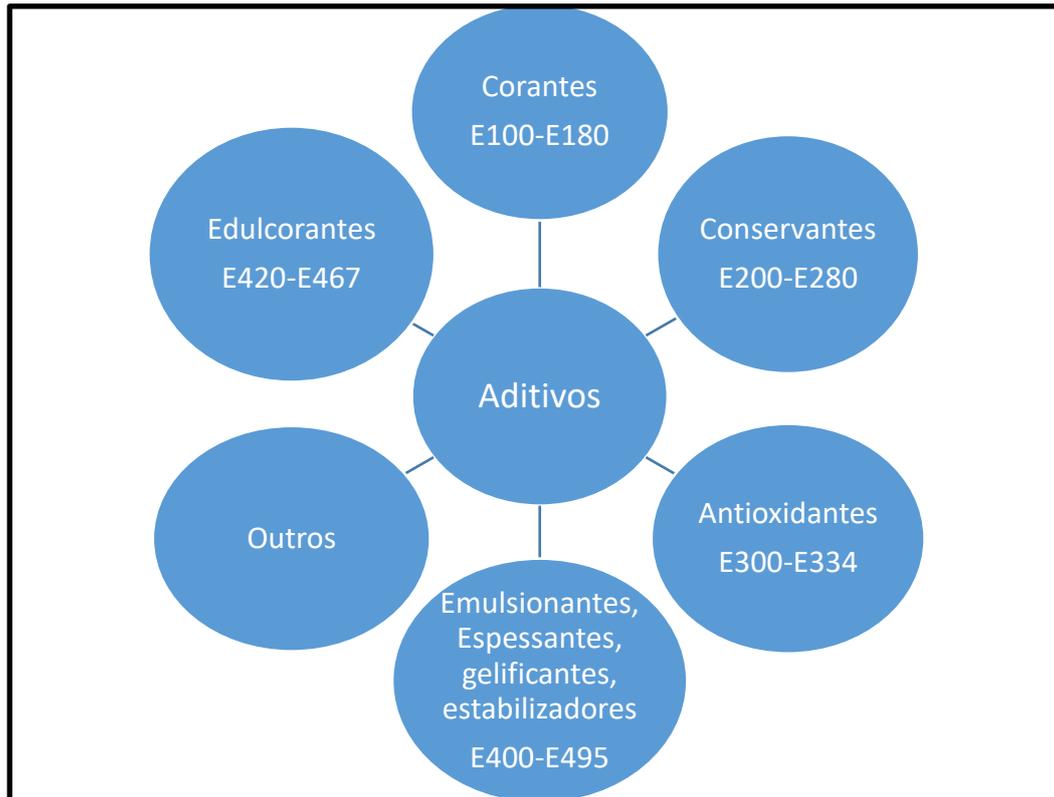


Figura III-1: Categorias dos aditivos alimentares e respetivos códigos.

De modo a facilitar os processos de comunicação e a garantir a confiança dos consumidores na segurança dos aditivos alimentares autorizados, os aditivos permitidos na União Europeia (UE) são designados por “E”, seguido de números (“E-número”), consoante a sua função. No caso específico dos conservantes, o código atribuído varia entre E-200 e E-299 (Costa 2015; EUFIC 2014; Wickens 2001).

III.1.1 – Conservantes

Desde há bastante tempo que a ideia de conservar alimentos existe, sendo que algumas técnicas de conservação podem ter sido utilizadas até na pré-história, como a utilização de sal, vinagre, açúcar, fumo, etc. (Costa 2015; Msagati 2012; Sindelar & Milkowski 2012; Wickens 2001).

A diretiva 95/2/CE define conservante como “substâncias que prolongam a durabilidade dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos”.

Os conservantes podem ser naturais ou artificiais. Os conservantes naturais podem ser, por exemplo, extratos de plantas (óleos essenciais, extratos fenólicos, entre outros), derivados de

insetos ou quitosano complexado com outros compostos. Os conservantes artificiais incluem benzoatos, nitritos, sulfitos, sorbatos, entre outros (Msagati 2012).

Para alimentos à base de carne é típico o processo de cura com nitrito e nitrato de potássio ou sódio, ou seja, adição dos conservantes nitrato e nitrito. Embora existam preocupações relacionadas com o uso destes compostos para preservar alimentos, os nitratos e nitritos continuam a ser bastante utilizados, uma vez que conseguem impedir o crescimento da bactéria *Clostridium botulinum*, inibindo o crescimento dos esporos germinados. Esta bactéria, se o alimento não for bem processado, pode provocar uma intoxicação alimentar que pode ser fatal (Msagati 2012).

Os conservantes têm alguns modos de atuação possíveis para o impedimento do crescimento de microrganismos, tais como ao nível (Cammack et al. 1999):

- de proteínas e enzimas;
- genético;
- da ligação de elementos essenciais;
- das paredes e/ou membranas celulares.

No caso dos nitratos e nitritos, estes podem atuar de 3 formas. Ao atuar ao nível das proteínas e enzimas, impedem a ação de determinadas enzimas ou podem ligar-se a proteínas essenciais do metabolismo do microrganismo, impedindo a formação de ATP (adenosina trifosfato); a nível genético não têm qualquer influência no ADN (ácido desoxirribonucleico) do microrganismo, mas os seus metabolitos podem quebrar o mesmo; relativamente à parede e/ou membrana celular, os nitritos e os nitratos podem impedir a sua formação, afetar o equilíbrio osmótico da célula, ou até mesmo reagir diretamente com constituintes da parede e/ou membrana celular, alterando a permeabilidade das mesmas (Cammack et al. 1999).

Atualmente, embora as técnicas antigas de conservação continuem a ser aplicadas, também existem processos inovadores como tecnologia de alta pressão, embalagens com atmosfera modificada, campos de pulso elétrico, utilização de conservantes, etc. Estes novos processos têm estado a substituir os conservantes utilizados nos alimentos em que tal processamento é possível de realizar (Msagati 2012).

III.2 – Legislação/regulamentação de aditivos alimentares

Ao contrário dos Estados Unidos da América (EUA), que desde cedo estabeleceu na sua legislação os aditivos alimentares considerados “seguros” para consumo nos alimentos, na União Europeia (UE), inicialmente, cada estado-membro tinha a sua própria legislação de utilização de aditivos alimentares (Branen *et al.* 2001; Costa 2015).

Na União Europeia, após várias tentativas, a harmonização da legislação dos vários estados-membros foi possível com a diretiva 89/107/CEE do Conselho, mais tarde alterada pela diretiva 94/34/CEE do Parlamento e do Conselho Europeu. Estas diretivas regulamentam quais os aditivos alimentares que podem ser utilizados na União Europeia, assim como definem quais os princípios gerais que regulam o processo de aprovação de um novo aditivo (Branen *et al.* 2001; Costa 2015; Sanchez 2014). Esta diretiva foi complementada por outras três diretivas do Parlamento Europeu e do Conselho: a diretiva 94/35/CE relativa a edulcorantes, a diretiva 94/36/CE relativa a corantes e a diretiva 95/2/CE relativa aos restantes aditivos alimentares (EUFIC 2015; Costa 2015). Este quadro é ainda reforçado com três diretivas da Comissão que estabelecem os critérios de pureza específicos para os aditivos alimentares autorizados (diretivas 95/31/CE e 96/77CE).

Em 2006, surgiu a diretiva 2006/52/CE do Parlamento e Conselho Europeu, que altera as diretivas 95/2/CE e 94/35/CE em vários aspetos, especificamente reduzindo a quantidade máxima permitida para utilização de nitratos e nitritos nos alimentos, entre outros aditivos, a adicionar aos alimentos. Esta diretiva também revê as condições para a aprovação de novos aditivos, tendo em conta a evolução técnica que existiu neste domínio.

Em 2008, a UE reuniu estas diretivas num só regulamento: 1333/2008, do Parlamento Europeu e do Conselho Europeu. Este novo regulamento inclui todos os aditivos alimentares autorizados, as respetivas condições de utilização e rotulagem, e simplifica o processo de autorização de aditivos.

Por fim, surgiu o regulamento 1129/2011 da Comissão, que alterou o anexo II do regulamento 1333/2008/CE, onde está a lista dos aditivos autorizados para utilização na UE e as respetivas condições de utilização.

Segundo estas diretivas, no rótulo de cada alimento deve estar presente a categoria do aditivo, assim como o seu nome ou o seu E-número (por exemplo: conservantes nitrito de sódio, ou conservantes: E 250) (Branen *et al.* 2001; Costa 2015; Porto 2010; Sanchez 2014).

Em Portugal, o uso de aditivos alimentares está regulamentado pelo decreto-lei nº 63/2011 de 9 de maio, que veio completar os decretos-lei 365/98 e 121/98, que estabeleciam as condições de utilização e os critérios de pureza que devem ser cumpridos na utilização de aditivos alimentares em Portugal, exceto edulcorantes e corantes. Este decreto foi baseado nas diretivas 2010/69/EU e 2010/67/EU de 22 e 20 de outubro, respetivamente, que definiam a pureza dos aditivos alimentares e alargavam a gama de utilização dos mesmos na UE, exceto edulcorantes e corantes, alterando a diretiva 95/2/CE.

Hoje em dia, a EFSA (*European Food Safety Authority*) é responsável pela avaliação da segurança da utilização de cada aditivo e por lhe atribuir o respetivo “E-número”. Em termos internacionais, existe um comité de especialistas da FAO (*Food and Agriculture Organization*) e da WHO (*World’s Health Organization*) em aditivos alimentares, a JECFA (*Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives*) (Branen *et al.* 2001; Costa 2015; EUFIC 2015; Sanchez 2014). A JECFA é responsável pela avaliação dos riscos do consumo de aditivos alimentares, toxinas naturais, entre outras substâncias presentes nos alimentos, avaliação da exposição da população e definição dos métodos de análise a estes compostos (FAO n.d.).

III.2.1 – Processo de aprovação de novos aditivos

Inicialmente, não existia um procedimento rígido para a aprovação de novos aditivos, apenas existiam linhas gerais (Branen *et al.* 2001). Estas definiam que era necessário conduzir estudos de toxicidade aguda, genotoxicidade, toxicidade subcrónica e toxicidade crónica. Seriam ainda necessários estudos metabólicos, farmacocinéticos, de reprodução, carcinogénicos e teratogénicos. No caso de se acrescentarem outros estudos ou de algum destes estudos não ser apresentado, devia justificar-se esse facto devidamente (Branen *et al.* 2001).

Hoje em dia, segundo a legislação em vigor, para que um aditivo seja aprovado para a sua utilização na UE, é necessário que (EUFIC 2014; Regulamento 1333/2008 2008):

- não apresente um risco de segurança para os consumidores com o nível de utilização proposto e com base nos dados científicos que se encontrem disponíveis até à data;
- exista uma grande necessidade tecnológica de utilização desse produto, que não possa ser satisfeita por outros meios viáveis;
- a utilização do aditivo não deve deixar margem para causar dúvidas no consumidor;
- traga algum benefício para o consumidor ao ser utilizado.

De seguida, estes dados são submetidos ao comité científico para alimentos (*Scientific Committee on Food* - SCF), que estabelece um nível de efeito adverso não observável (*Non Observable Adverse Effect Level* - NOAEL) e/ou um nível de efeito não observável (*Non Observable Effect Level* - NOEL). A partir destes dois parâmetros é estabelecida a dose diária aceitável (DDA) de ingestão deste composto, que serve de guia para a atribuição dos níveis máximos permitidos a adicionar aos alimentos (Branen et al. 2001; EUFIC 2014; Sargaço 2013).

A DDA pode ser definida como a quantidade estimada, à luz dos conhecimentos atuais, de uma determinada substância que pode ser ingerida todos os dias, durante toda a vida, sem apresentar efeitos de saúde adversos para os consumidores. Este valor é expresso em mg/kg massa corporal/dia ou em g/kg massa corporal/dia, no caso de a DDA ser muito elevada (Branen et al. 2001; Costa 2015).

Após a definição da DDA, a Comissão Europeia cria uma proposta de nova diretiva, com base no parecer obtido a partir do SCF, e apresenta-a ao Conselho e Parlamento Europeu. Se este novo aditivo for aprovado, é promulgada uma nova diretiva Comunitária, que obriga cada estado-membro a alterar a sua legislação nacional de modo a incluir o novo aditivo (Costa 2015; EUFIC 2014; Sargaço 2013).

Entretanto, durante todo este processo, o produtor com interesse no aditivo pode pedir ao estado-membro de origem uma autorização nacional provisória. Este pedido é avaliado pelo comité de peritos do respetivo estado-membro, que toma a decisão de autorizar ou não a utilização do aditivo durante dois anos. Se, entretanto, o aditivo não for autorizado pelo SCF, este é banido de todos os estados-membros da UE (Costa 2015; Sargaço 2013).

III.3 – Nitratos e nitritos

Os nitratos e os nitritos existem sob duas formas: orgânica e inorgânica. Os nitratos e nitritos na sua forma orgânica são maioritariamente sintetizados em laboratório para uso medicinal. Costumam ser mais complexos do que a forma inorgânica, pois estão ligados a grupos alifáticos ou aromáticos. Já a forma inorgânica dos nitratos e nitritos ocorre naturalmente (figura III-2) (ATSDR 2013; Omar et al. 2012).

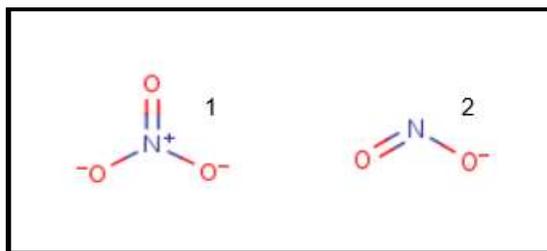


Figura III-2: Estrutura química do nitrato (1) e do nitrito (2) (ATSDR 2013; Omar *et al.* 2012).

Enquanto que o nitrito é bastante reativo, o nitrato é um ião mais estável. Embora facilmente transformado em nitrito através de ação microbiana segundo a reação **3.1**, sendo por vezes utilizado como uma “reserva” de nitrito (Dennis *et al.* 1990; Dionex 1998; Omar *et al.* 2012).



Algumas das principais propriedades físico-químicas dos sais de nitrato e nitrito mais utilizados encontram-se reunidas na tabela III-1 (Merck 2017; Sigma-Aldrich 2017).

Tabela III-1: Principais propriedades físico-químicas dos sais nitrato de potássio, nitrato de sódio, nitrito de potássio e nitrito de sódio (Merck 2017; Sigma-Aldrich 2017).

| | Nitrato de Potássio | Nitrato de sódio | Nitrito de potássio | Nitrito de sódio |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Fórmula Química | KNO ₃ | NaNO ₃ | KNO ₂ | NaNO ₂ |
| Massa Molar (g/mol) | 101,1 | 84,99 | 85,11 | 69 |
| Descrição | Branco cristalino | Incolor | Amarelo | Branco |
| Número CAS | 7757-79-1 | 7631-99-4 | 7758-09-0 | 7632-00-0 |
| Solubilidade em água a 20 °C (g/L) | 320 | 874 | 2,810 | 820 |
| Ponto de fusão (°C) | 334 | 306 | 407 | 271 |

Os nitratos e os nitritos podem aparecer no nosso organismo por duas vias: endógena ou exógena. Por via exógena, os nitratos e nitritos resultam da ingestão de água ou alimentos que contêm estes compostos, enquanto que a sua presença por via endógena provém de processos de biossíntese (ATSDR 2013; Omar *et al.* 2012; WHO 2010).

As vias biossintéticas permitem obter nitratos e nitritos através da oxidação do óxido nítrico resultante da degradação enzimática da L-arginina ou da redução do nitrato a nitrito pela enzima redutase (ATSDR 2013; Omar *et al.* 2012; WHO 2010).

Os nitratos e nitritos inorgânicos são adicionados, sob a forma de sais (nitrito e nitrato de potássio ou sódio), aos alimentos à base de carne durante o seu processamento (Dennis *et al.* 1990). Estes compostos são utilizados como aditivos alimentares, pois possuem uma forte capacidade anti-microbiana contra a bactéria *Clostridium botulinum*, impedindo o crescimento de esporos já germinados, tal como mantém as propriedades organoléticas do alimento, além de conferir a sua cor característica. Isto deve-se ao facto de que os nitratos e nitritos são transformados em óxido nítrico, que por sua vez reage com a mioglobina, originando nitromioglobina, conferindo a cor e propriedades organoléticas a estes produtos. (Dennis *et al.* 1990; Dionex 1998; Govari & Pexara 2015).

Os seus limites máximos de utilização (LMU) dependem do tipo de alimento a que são adicionados (tabela III-2).

Tabela III-2: LMU dos sais de nitratos e nitritos a alimentos à base de carne em mg/kg de amostra (Regulamento Europeu 1129/2011).

| Designação | KNO ₂ - E249 | NaNO ₂ - E250 | NaNO ₃ - E251 | KNO ₃ - E252 |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Nitrito de potássio | Nitrito de sódio | Nitrato de sódio | Nitrato de potássio |
| Alimentos à base de carne não tratada termicamente | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Alimentos à base de carne tratada termicamente | 150 | 150 | 150 | 150 |
| Alimentos à base de carne tratados tradicionalmente por imersão | 175 | 175 | 250 | 250 |
| Alimentos à base de carne tratados tradicionalmente a seco | 175 | 175 | 250 | 250 |
| Alimentos à base de carne tratados tradicionalmente por cura a seco e com imersão | 50 | 50 | 250 | 250 |

A principal via metabólica para os nitratos e nitritos inorgânicos é a via nitrato-nitrito-óxido nítrico (ATSDR 2013; Bryan & Ivy 2015; Omar *et al.* 2012; WHO 2010).

Após ingestão, os nitratos e nitritos são diretamente absorvidos pelo organismo, uma vez que são sais hidrofílicos. O nitrato é imediatamente absorvido pelo trato gastrointestinal superior (boca, faringe, esófago e estômago), sendo que aproximadamente 65% deste é excretado pelos rins, 25% fica concentrado nas glândulas salivares e os restantes 10% não se conhece o destino. Cerca de 5% a 10% do nitrato também pode ser reduzido a nitrito pelas bactérias comensais da base língua, no estômago ou no intestino (ATSDR 2013; Bryan & Ivy 2015; Gorenjak & Cencic 2013; Omar *et al.* 2012; WHO 2010).

De seguida, ao chegar ao estômago, o nitrito reage com aminas e amidas, formando compostos N-nitrosos (cancerígenos) ou é rapidamente protonado, dando origem a ácido nitroso. Estas reações são potenciadas pelo pH ácido do estômago (ATSDR 2013; Bryan & Ivy 2015; Gorenjak & Cencic 2013; Hsu et al. 2009; Omar et al. 2012). Parte do ácido nitroso pode ainda decompor-se em óxido nítrico e outros derivados, o que pode ser potenciado tanto pela presença de ascorbato e polifenóis como pelo pH baixo do estômago (ATSDR 2013; Gorenjak & Cencic 2013; Omar et al. 2012).

Uma outra via de circulação do nitrato pelo organismo é a via enterosalivar. Nesta via, o nitrato é absorvido pelo organismo e entra no sistema circulatório. De seguida, volta para as glândulas salivares e o ciclo repete-se. Esta via serve para que o nitrato atue como sistema antimicrobiano no organismo, devido às suas propriedades anti-microbianas (ATSDR 2013; Healthline 2017).

III.3.1 – Efeitos na saúde

Desde cedo que os benefícios da cura de produtos à base de carne com nitratos e nitritos foram reconhecidos. Foi na década de 60 que a utilização destes compostos começou a receber alguma atenção, uma vez que surgiram vários casos de meta-hemoglobinemia infantil (provoca anemia funcional e apoxia dos tecidos) associados a uma elevada ingestão de nitratos através de água contaminada. Foi ainda descoberta a formação de nitrosaminas e compostos-nitrosos (considerados carcinogénicos) a partir destes compostos. Assim, foi posta em causa a segurança da utilização de nitratos e nitritos para curar alimentos à base de carne (Bryan et al. 2012; De Smet & Vossen 2016; Govari & Pexara 2015; Hord et al. 2011).

Hoje em dia, existem opiniões divergentes: estes compostos são considerados benéficos para o organismo em certas condições, enquanto que noutras condições são considerados prejudiciais. Existem cada vez mais estudos que relacionam o consumo de carnes vermelhas e/ou carnes processadas com doenças crónicas, entre as quais cancro colo-retal, diabetes tipo II e doença arterial coronária. No entanto, outros estudos sugerem que os nitratos e os nitritos ajudam a regular a função cardiovascular, imunológica e a neuro-transmissão (Bryan & Ivy 2015; De Smet & Vossen 2016).

Relativamente a efeitos adversos na saúde dos consumidores, alguns autores relacionaram o elevado consumo de nitritos com o aparecimento de cancro na tiroide. No entanto, nestes estudos, não foi possível encontrar uma relação entre a ingestão de nitratos em excesso e o aparecimento de cancro na tiroide, hipotiroidismo e hipertiroidismo, possivelmente devido à diferente exposição

da população a nitrato, razão pela qual se aconselha que esta relação seja estudada mais a fundo (Bahadoran *et al.* 2015).

Um outro estudo tentou relacionar o consumo elevado de nitratos e nitritos com a incidência de cancro colo-retal utilizando ratos para este estudo, não tendo sido possível estabelecer uma relação entre ambos (Chenni *et al.* 2013).

Alguns autores procuraram conhecer o impacto que o consumo de carne já contaminada com nitratos e nitritos teria na saúde humana. No entanto, chegou-se à conclusão de que os animais herbívoros, ao ingerirem ervas contaminadas com estes compostos não punham em risco a saúde humana. Isto deve-se ao facto de que estes animais metabolizam e excretam rapidamente estes compostos e os seus derivados. No entanto, ao ingerirem uma dose demasiado elevada (estimada em 3,3 mg/kg massa corporal) o seu metabolismo pode ficar comprometido (Cockburn *et al.* 2013).

Apesar destes resultados, existem bastantes ensaios que relacionam vários benefícios com o consumo de nitratos e nitritos.

Um ensaio publicado em 2015 estabeleceu que, embora o consumo de nitrato diminua o risco de cancro no estômago, o consumo de nitritos aumenta este mesmo risco, uma vez que os nitritos são metabolizados e dão origem a nitrosaminas (composto N-nitroso carcinogénico) (Song *et al.* 2015; WHO 2010).

Um outro estudo publicado em 2016 mostrou, em resultados preliminares, que a realização de uma dieta rica em nitrato aumenta o desempenho do organismo durante a prática de exercício físico, ao reduzir as necessidades energéticas e aumentar o esforço muscular (Porcelli *et al.* 2016).

De acordo com um estudo publicado em 2015, existe uma dose ideal de consumo de nitrato e nitrito, que ao ser cumprida promove a saúde dos consumidores e ainda pode tratar várias doenças. Um dos estudos mais importantes feito a este nível incluiu uma fórmula farmacêutica patenteada (patente 8 303 995, 8 298 589, 8 435 578 e 8 982 038 (Bryan & Ivy 2015)). A ingestão de uma dose de 0,17 mg/kg de nitrito de sódio, incluído na fórmula patenteada, por pacientes com mais de 40 anos em risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, permitiu observar uma redução significativa de triglicéridos e da pressão arterial. Noutros estudos, utilizando esta fórmula, foi ainda possível observar um efeito anti-inflamatório, de proteção da função hepática, reversão de doenças como hipertensão, e reduzir os riscos de doenças cardiovasculares. Relativamente ao nitrato, a dose a administrar para observar efeitos semelhantes é superior, uma vez que este ainda tem de ser transformado em nitrito. Estes estudos foram realizados em ratos e em humanos (Bryan & Ivy 2015).

Existem outros estudos que referem as mesmas conclusões, embora não estabeleçam uma dose mínima para se obter estes benefícios (ATSDR 2013; Hord *et al.* 2009).

Como se pode ver, existem bastantes benefícios associados ao consumo de nitratos e nitritos em doses controladas, razão pela qual alguns autores referem que estes benefícios e os efeitos adversos devem ser mais estudados mais, para se poder concluir se os benefícios compensam os possíveis efeitos adversos (Bryan & Ivy 2015; Hord *et al.* 2009; Sindelar & Milkowski 2012).

Os grupos de consumidores mais suscetíveis de desenvolver efeitos adversos por ingerirem demasiado nitrito e nitrato são os bebés com menos de 4 meses, através do consumo de água contaminada utilizada principalmente nas fórmulas infantis, grávidas perto da 30^a semana e indivíduos que já tenham o organismo comprometido, como pessoas com anemia, problemas metabólicos, sepsia, etc. Um outro grupo de risco são indivíduos que consomem drogas como cocaína, etc. (ATSDR 2013).

Os valores da DDA recomendados para o nitrato e o nitrito têm vindo a variar ao longo do tempo. Assim, foi possível encontrar valores de DDA para o nitrato de 5 mg/kg massa corporal e de 0,1 mg/kg massa corporal para o nitrito, no entanto estes valores são referentes à década de 90 (Sanchez 2014; Comissão Europeia 1997). Entretanto, foram feitos estudos mais precisos ao longo do tempo, o que levou à alteração destes valores de DDA. Atualmente, a DDA para o nitrato encontra-se em 3,7 mg ião/kg massa corporal, enquanto que para o nitrito é de 0,07 mg nitrito/kg massa corporal (ATSDR 2013; Bryan & Ivy 2015; EFSA 2008; Govari & Pexara 2015).

III.4 – Estudos de dieta total (*Total Diet Studies* - TDS)

Os primeiros TDS foram realizados na década de 60, de modo a avaliar o impacto dos testes de bombas nucleares na saúde dos cidadãos dos EUA (Pennington 2000; Pennington 1998; EFSA *et al.* 2011). Estes estudos iniciais eram realizados com uma amostra composta por vários pratos que faziam parte da dieta de indivíduos que ultrapassavam a ingestão diária de calorias (de modo a avaliar a situação mais extrema (Moy & Vannoort 2013; Pennington 1998; Pennington 2000).

Desde então, nos EUA, os estudos de dieta total evoluíram bastante, continuando a ser realizados numa base anual. Hoje em dia, além dos contaminantes radioativos, também são analisadas muitas mais substâncias, como resíduos de pesticidas, contaminantes não reativos e nutrientes de interesse (Moy & Vannoort 2013; Pennington 1998; Pennington 2000).

O primeiro TDS na Europa foi realizado pelo Reino Unido e pela Holanda, também na década de 60. Estes estudos têm vindo a ser realizados anualmente, sendo que os grupos químicos analisados variam consoante o ano, de acordo com a informação recolhida no TDS anterior, uma vez que o estudo de todos os analitos em todos os TDS anuais é, do ponto de vista económico, impossível (EFSA *et al.* 2011; Moy & Vannoort 2013).

Apenas a partir da década de 90 os restantes países europeus reconheceram a importância destes estudos, sendo que alguns destes países começaram a fazê-los regularmente (EFSA *et al.* 2011; Moy & Vannoort 2013).

Os principais objetivos de estudos TDS são a monitorização da segurança e qualidade nutricional da dieta de grupos específicos; a identificação de possíveis problemas de saúde pública; o fornecimento de informação relativamente ao uso de pesticidas, a identificação dos alimentos a fortificar, e com quais nutrientes, etc, de modo a criar regulamentações adequadas às necessidades das populações (EFSA *et al.* 2011; Moy & Vannoort 2013; Pennington 1998; Vin *et al.* 2014).

Para realizar um TDS é necessário comprar, processar e analisar amostras de alimentos representativos do consumo da população em estudo. Isto quer dizer que, nos casos necessários, vários alimentos são combinados, de modo a formar amostras compostas. Podem-se misturar vários pratos de bacalhau, de sopas diferentes, entre outros, de modo a formar uma amostra de pratos de bacalhau, sopas, etc. A água que é ingerida diretamente ou indiretamente através dos cozinhados também é incluída (Arnich *et al.* 2012; Moy & Vannoort 2013; Pennington 1998; Pennington 2000; Vin *et al.* 2014).

De seguida, avalia-se a exposição da população aos analitos em questão. A avaliação da exposição da população consiste na estimativa do consumo de espécies benéficas ou prejudiciais contidas nos alimentos ingeridos. Tem como objetivo determinar qual a probabilidade e a extensão da DDA ser ultrapassada (no caso de analitos prejudiciais à saúde do consumidor) ou verificar se a dose diária recomendada (DDR) é atingida (no caso de analitos benéficos) (Branen *et al.* 2001; Food Standards of Australia and New Zealand 2015; Moy & Vannoort 2013).

Estes estudos são do interesse público, uma vez que podem ser utilizados para diversos propósitos, como por exemplo, para estabelecer prioridades para futuros TDS e verificar se a população está a ingerir determinados analitos em excesso (Branen *et al.* 2001).

A exposição da população é determinada através da combinação dos valores obtidos na análise de amostras do TDS com dados de consumo dos respetivos alimentos para cada grupo de estudo

(Arnich *et al.* 2012; Food Standards of Australia and New Zealand 2015; Moy & Vannoort 2013; Pennington 1998; Pennington 2000; Vin *et al.* 2014).

Em termos matemáticos, a exposição é determinada através da aplicação da equação 3.2 (Food Standards of Australia and New Zealand 2015; Jiang *et al.* 2015; Moy & Vannoort 2013):

$$Exposição = \sum (consumo \times concentração) \quad 3.2$$

Os principais contribuidores para a exposição da população a nitratos e nitritos podem ser vistos nas figuras III-3, III-4 e III-5.

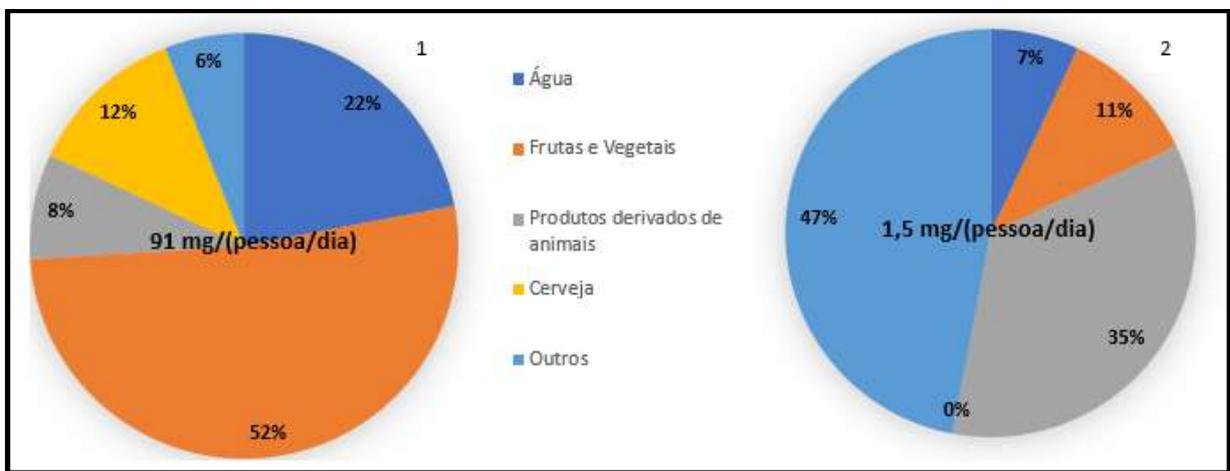


Figura III-3: Alimentos/bebidas contribuidores para a ingestão de nitratos (1) e nitritos (2) no Reino Unido (EFSA 2008).

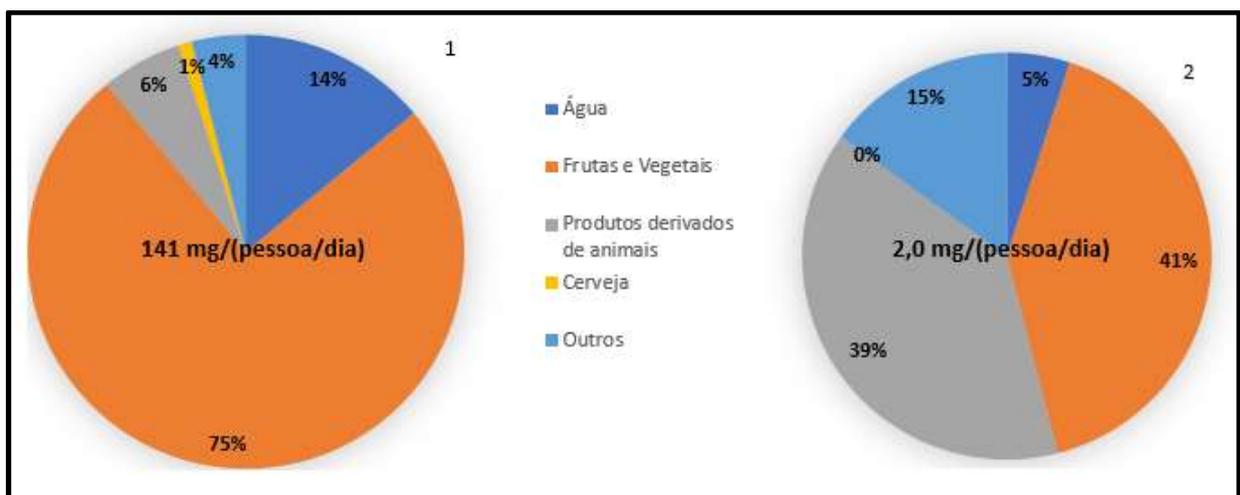


Figura III-4: Alimentos/bebidas contribuidores para a ingestão de nitratos (1) e nitritos (2) em França (EFSA 2008).

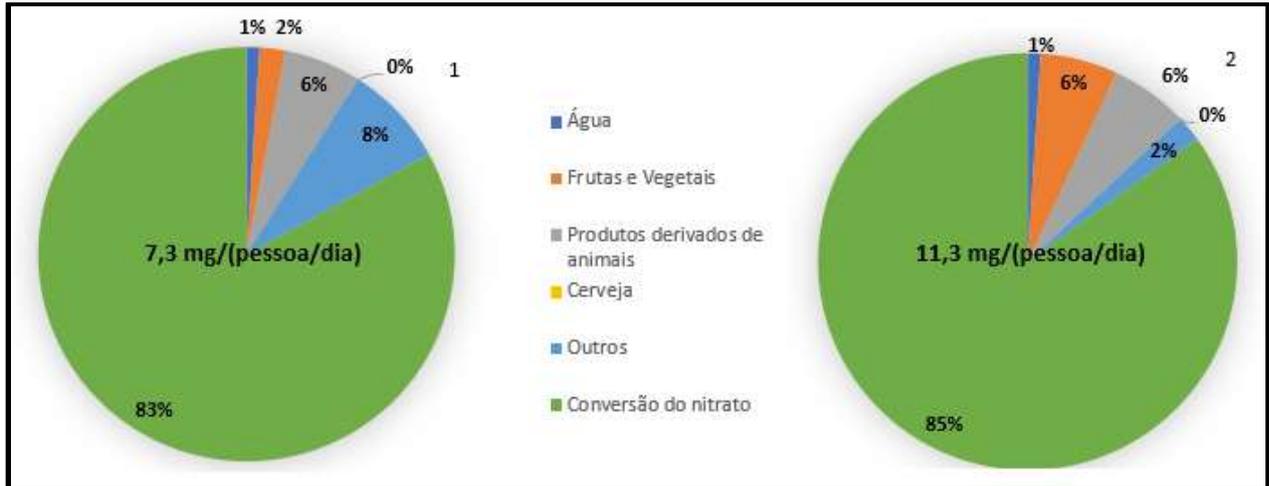


Figura III-5:Exposição total da população ao nitrito no Reino Unido (1) e França (2), incluindo a conversão de nitrato em nitrito (EFSA 2008)

Como se pode constatar, a maior parte da exposição da população nestes dois países a nitratos é exterior ao organismo humano (fonte exógena), enquanto que a exposição da população a nitritos é principalmente através da conversão de nitrato em nitrito (fonte endógena). Os principais contribuidores para a exposição das pessoas a nitratos são as frutas e vegetais, seguidos pela água. Os produtos de base animal contribuem muito pouco, especificamente cerca de 8% no Reino Unido e 6% em França. Em termos gerais, pode-se ver que a população francesa está mais exposta a estes compostos do que a população do Reino Unido.

III.5 – Métodos para determinar o teor de nitratos e nitritos em amostras de alimentos

Como referido anteriormente, o consumo de nitratos e nitritos em níveis excessivos podem levar a sérios problemas de saúde. Assim, é importante desenvolver métodos de determinação destes compostos em matrizes alimentares, de modo a promover a saúde pública.

Atualmente é possível encontrar referências a inúmeros métodos para a determinação destes compostos em amostras de alimentos, como espectrofotométricos, enzimáticos, eletroquímicos e cromatográficos. Destes, destacam-se os métodos cromatográficos devido à sua rapidez, processamento simples de amostras e redução de interferências de matriz na análise (Merusi *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2014). No entanto, foi desenvolvido recentemente um método de electroforese capilar que também demonstra bastante potencial, uma vez que é um método

simples, rápido, preciso e barato (Zhang *et al.* 2014). Este método foi utilizado na análise de várias amostras de presunto e salsichas, obtendo-se resultados entre 12,92-87,02 μg nitrato/g amostra e 10,19-39,03 μg nitritos/g amostra nas amostras de presunto, e 13,24-31,80 μg nitrato/g amostra e 12,47-57,26 02 μg nitrito/g amostra nas amostras de salsichas. É de salientar que algumas amostras de presunto e salsichas não apresentaram nitratos (Zhang *et al.* 2014).

Dentro dos métodos espectrofotométricos, foram encontrados alguns procedimentos baseados na reação de Griess, (na qual o nitrato é reduzido a nitrito utilizando cloreto de vanádio, onde se forma um composto de cor) seguindo-se uma análise espectrofotométrica a 538 nm para alimentos à base de carne e espinafres (Bahadoran *et al.* 2016; Jaworska 2005), reação do grupo amina do AHNDMS (Sal monossódico do ácido 4-amino-5-hidroxi-naftaleno-2,7-dissulfónico) com nitrito, formando um composto diazotado que é detetado a 560 nm, para amostras de água (Nagaraj *et al.* 2008; Nagaraja *et al.* 2010).

Alguns dos autores que utilizaram um método baseado na reação de Griess analisaram vários tipos de amostras alimentares, nomeadamente legumes, produtos lácteos, produtos à base de carne processados e não processados, frutas, leguminosas, etc. Os valores de nitratos e nitritos encontrados nas amostras de carne não processada variaram entre 0,05-0,13 mg nitrato/100 g amostra e 3,39-4,96 mg nitrito/100 g amostra, enquanto que nos produtos de carne processados foram determinados valores entre 0,06-0,19 mg nitrato/100 g amostra e 2,75-13,9 mg nitritos/100 g amostra. Na discussão dos resultados é ainda referido que o teor de nitratos e nitritos nas amostras à base de carne (processadas ou não) são muito mais reduzidos do que os teores dos mesmos analitos em amostras de vegetais (Bahadoran *et al.* 2016).

Os métodos enzimáticos baseados na norma ISO 20541: 2008 consistem na redução de nitrato a nitrito com uma enzima redutase, seguida de uma análise espectrofotométrica, também com base num corante diazotado. No entanto, este método apenas serve para a análise de nitratos (Arneth & Herold 1988; International Organization for Standardization 2008).

O procedimento eletroquímico com mais potencial baseia-se no desenvolvimento de um sensor electroquímico de platina com uma membrana de acetato de celulose ou poli-(1,8-diaminonaftaleno), seguindo-se uma análise por FIA (*Flow Injection Analysis* – Análise de injeção em fluxo), uma vez que é rápido, simples e não precisa de reagente tóxicos. Este autor analisou amostras de água da torneira (Badea *et al.* 2001).

Foram ainda encontradas referências a outros dois métodos eletroquímicos: um utiliza um sensor amperométrico e o outro é baseado na imobilização covalente de nanotubos de carvão (Sousa *et al.* 2008; Xian *et al.* 2010).

Dentro dos métodos cromatográficos, foi possível encontrar algumas divergências, mesmo nos métodos baseados na mesma norma europeia (EN 12014-4: 2005), principalmente ao nível do processamento das amostras. Em termos de matrizes analisadas e resultados obtidos, estes variam consoante os autores.

Um dos trabalhos consultados que utilizava um método cromatográfico, analisava apenas amostras à base de carne, dando principal ênfase a amostras de *bacon* e presunto, por estas terem um teor mais elevado de nitratos e nitritos. Foram, no entanto, analisadas amostras de outros produtos a base de carne, como patê de frango e *corned beef*. No que diz respeito a resultados obtidos, estes encontram-se reunidos na tabela III-3 (Dennis *et al.* 1990).

Tabela III-3: Média dos teores de nitrato e nitritos obtidos na análise de amostras de produtos à base de carne (Dennis *et al.* 1990).

| | Nitrato (mg/kg amostra) | Nitrito (mg/kg amostra) |
|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Presunto | 3 - 414 | <0,2 - 112 |
| <i>Bacon</i> | <1,0 - 309 | <0,2 - 76 |
| Outros | <1,0 - 82 | <0,2 - 134 |

Um outro artigo consultado analisava amostras de derivados de leite (Reece & Hird 2000) ou amostras de vegetais (Iammarino *et al.* 2014), utilizando ambos um método cromatográfico.

Um artigo diferente analisava amostras de vegetais e produtos à base de carne. Os teores obtidos para os produtos à base de carne por este autor encontram-se reunidos a tabela III-4. Com base nos resultados obtidos, o autor concluiu que de facto os produtos à base de carne curada não contribuem significativamente para a exposição da população a nitratos, apenas contribuem para a exposição a nitritos (Hsu *et al.* 2009).

Tabela III-4: Média dos teores de nitrato e nitritos obtidos na análise de amostras de produtos à base de carne (Hsu *et al.* 2009).

| | Nitrato (mg/kg amostra) | Nitrito (mg/kg amostra) |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| Cachorro quente | 69,9 | 78,6 |
| Presunto | 19,0 | 34,2 |
| Salame | 142,5 | 0 |
| <i>Bacon</i> | 23,3 | 15,7 |
| Salsichas Frankfurt | 54,9 | 83,9 |
| Bife | 18,7 | 0 |
| Medalhões | 38,5 | 0 |

Outros autores, basearam o seu método cromatográfico na mesma norma (EN 12014-4), e analisaram vários tipos de amostras: produtos à base de carne curados, outros produtos à base de carne, produtos à base de carne fresca, queijos, vegetais, ameijoas e mexilhões. Relativamente aos resultados obtidos para os produtos à base de carne fresca, foi possível verificar que estes não continham nitritos, sendo que apenas as carnes de porco, vaca e cavalo apresentaram teores de nitratos abaixo de 40 mg nitrato/kg amostra. Quanto aos outros tipos de amostras de produtos à base de carne, os resultados encontram-se expostos na tabela III-5 (Iammarino *et al.* 2013).

Tabela III-5: Teores de nitrato e nitrito obtidos em amostras de produtos à base de carne consoante o tipo de amostra (Iammarino *et al.* 2013).

| | Nitrato (mg/kg amostra) | Nitrito (mg/kg amostra) |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Preparações de carne fresca | 10,6-31,3 | 2218,0-3116,8 |
| Carnes curadas | 17,5-694,7 | 14,4-101,4 |
| Outros | 19,1-143,4 | 12,6-80,2 |

III.6 – Fundamentos gerais de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*)

Os primeiros equipamentos de HPLC surgiram nos anos 70, e desde então, esta técnica analítica evoluiu muito rapidamente, sendo atualmente um dos métodos analíticos mais utilizados, devido à sua versatilidade, sensibilidade e precisão (Giri 2015; Nakatani *et al.* 2012; Nolle 2000; Skoog *et al.* 2007). Através desta metodologia, é possível separar, identificar e quantificar compostos de uma amostra, como aminoácidos, antibióticos, esteroides, hidrocarbonetos, terpenóides, proteínas, substâncias inorgânicas, entre outros (Linde 2017; Skoog *et al.* 2007).

O seu princípio básico consiste em separar os componentes de uma determinada amostra com base nas diferentes interações do analito com as fases móvel e estacionária (Giri 2015; Linde 2017). A fase móvel é um fluido que passa através da fase estacionária, sendo que este pode ser um gás, líquido ou fluido supercrítico (Nolle 2000).

O sistema de HPLC é constituído principalmente por reservatórios para a fase móvel, bomba de alta pressão, coluna e forno, sistema de injeção, detetor e sistema de aquisição e tratamento de resultados, como está representado na figura III-6 (Giri 2015; Linde 2017).

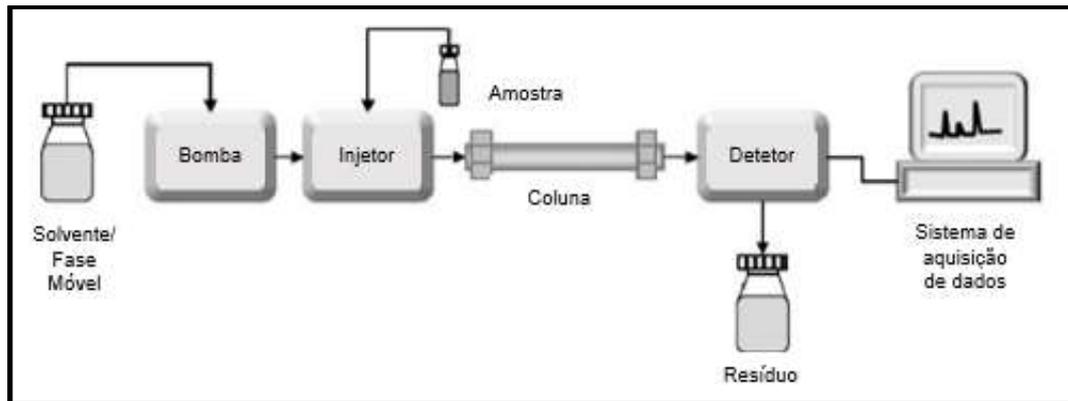


Figura III-6: Principais componentes de um sistema de HPLC (Giri 2015).

A fase móvel, contida num reservatório, é bombeada para o sistema de HPLC, de modo a permitir atingir um determinado fluxo e pressão determinados no software do sistema (Giri 2015; Linde 2017; Waters n.d.).

O sistema de injeção pode ser manual ou automático. Hoje em dia, a maioria destes sistemas são automáticos, de modo a que não exista uma dependência do operador e a permitir uma maior reprodutibilidade (Skoog *et al.* 2007).

A amostra é inserida na fase móvel através do sistema de injeção e segue para a coluna, onde os seus analitos são separados. Para que esta resolução ocorra, a coluna contém um enchimento específico (fase estacionária) para o tipo de separação que se pretende (Skoog *et al.* 2007).

Os analitos vão sendo eluídos da coluna e passam por um detetor. Os detetores mais utilizados são os de espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-Vis), rede de díodos, fluorescência, eletroquímicos e de espectroscopia de massa. O detetor envia um sinal, o qual é tratado e processado de modo a obter um cromatograma no monitor do computador (Giri 2015; Linde 2017; Waters n.d.).

Alguns sistemas de HPLC podem ainda incluir um sistema de degaseificação para que se possam remover gases dissolvidos na fase móvel, pois estes podem afetar o funcionamento da coluna e do detetor (Skoog *et al.* 2007).

III.6.1 – HPLC de troca iónica

Consoante a massa molar e a polaridade/carga dos analitos, a técnica de HPLC a aplicar pode ser: partição, adsorção, exclusão por tamanho, iónica e afinidade. Dentro do HPLC para a

separação de espécies iónicas, existem algumas metodologias disponíveis: troca iónica, interação iónica, exclusão iónica, supressão iónica e par iónico (Nollet 2000).

A cromatografia de troca iónica é um método bastante eficiente e moderno utilizado para separar espécies iónicas ou compostos ionizáveis e solúveis em água, com uma massa molar inferior a 1500 g/mol (G.E. Healthcare 1968; Pharmacopeia n.d.; Skoog *et al.* 2007; Williams & Frasca 1999).

Durante décadas foi possível utilizar zeólitos e alguns tipos de argilas naturais e reconhecidos como fase estacionária para este tipo de cromatografia. No entanto, foi necessário começar a sintetizá-las, para se poder realizar o tratamento de águas e a purificação de algumas soluções (Skoog *et al.* 2007).

O princípio base da separação deste tipo de cromatografia é a troca de iões de carga igual (positiva ou negativa) entre a fase móvel e a fase estacionária. O equilíbrio que se estabelece entre estas duas fases depende da densidade da carga, da carga total e da distribuição da carga à superfície das espécies a separar (G.E. Healthcare 1968; Skoog *et al.* 2007).

A fase estacionária deve ser insolúvel na fase móvel e ter uma elevada massa molecular (G.E. Healthcare 1968; Skoog *et al.* 2007). Esta é composta por uma estrutura base (matriz) e grupos ativos (iões fixos). No caso de querermos separar aniões, a fase estacionária deve ter carga positiva, enquanto que no caso de querermos separar catiões, esta deve ter carga negativa (Pharmacopeia n.d.; Nollet 2000; Skoog *et al.* 2007).

A matriz da fase estacionária pode ser sílica, vários tipos de poliacrilato, agarose ou poliestireno ligado de forma cruzada com divinilbenzeno (G.E. Healthcare 1968; Nollet 2000; Skoog *et al.* 2007).

Hoje em dia, as resinas mais utilizadas são poliméricas ou à base de agarose, uma vez que conseguem atingir uma elevada capacidade de interação com os analitos e uma estabilidade física e química. O tamanho das partículas obtidas é variado, o que se traduz num leque abrangente de possíveis aplicações (G.E. Healthcare 1968).

Os grupos ativos são constituídos por iões fixos, ligados de forma covalente à matriz, e contra-íões, que interagem com a fase móvel (Nollet 2000; Skoog *et al.* 2007). Consoante o tipo de cromatografia, os tipos de grupos ativos mudam. No caso de uma cromatografia para separação aniónica, pode-se utilizar uma base forte ou uma base fraca, sendo mais comum aminas terciárias ($-N(CH_3)_3OH$) ou aminas primárias ($-NH_3OH$), respetivamente (Skoog *et al.* 2007).

Quando as duas fases entram em contacto, é estabelecido um equilíbrio entre os aniões e os contra-íões, como mostra a equação **3.3** (Skoog *et al.* 2007):



Através de experiências realizadas com íões de referência, como H^+ , foi possível determinar que a interação dos analitos com a fase estacionária depende da carga do analito, das condições cromatográficas (pH, temperatura, fase móvel) e do tipo de fase estacionária (Nollet 2000; Skoog *et al.* 2007).

III.7 – Validação de métodos

O conceito de validação foi desenvolvido em 1978, nos EUA. Desde essa época, este conceito evoluiu, sendo que hoje em dia é aplicado nas mais diversas áreas, como na química analítica ou na computação (Pallastrelli 2013; Ribani *et al.* 2004).

Assim, existem várias definições de validação de métodos. Segundo a norma ISO/IEC 17025 – 2005, consiste na “confirmação através de testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso específico e intencional” (Barros 2016; International Standard Organization 2005; Ribani *et al.* 2004).

A validação deve então avaliar se um determinado método é adequado para o fim em que é utilizado, devendo-se comparar os resultados experimentais com as questões que o método propõe responder (Brito *et al.* 2003).

Deve-se proceder à validação/revalidação cada vez que são desenvolvidos novos métodos; se o método já existente passa a ser realizado num novo laboratório e/ou quando o método sofre alterações significativas nas condições ou parâmetros (ex. equipamento, ampliação do método para novas matrizes de amostra, entre outros) (Coordenação Geral de Acreditação 2010; International Standard Organization 2005; Pallastrelli 2013). Este procedimento é fundamental para a garantia da qualidade analítica, de modo a assegurar que os resultados experimentais obtidos numa determinação de rotina são próximos o suficiente do conteúdo “verdadeiro” do analito na amostra (Barros 2016; González & Herrador 2007).

Existem dois tipos de validação de métodos: direta e indireta, sendo que consoante o tipo de validação há variação dos parâmetros a analisar. Estes métodos são considerados validados

quando os seus parâmetros vão de encontro aos pré-requisitos estabelecidos inicialmente. Contudo, apesar da validação de métodos ser cara e carecer de muito tempo torna-se uma mais-valia pois reduz a necessidade de repetir ensaios e permite uma melhor gestão do tempo despendido (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; International Standard Organization 2005; Pallastrelli 2013; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

III.7.1 – Validação direta

Neste tipo de validação, o principal objetivo é conhecer a exatidão do método. Esta é definida como o grau de concordância entre o valor de referência que é aceite como “real” e os valores experimentais obtidos a partir do método (RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

A exatidão é associada a uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos, aparecendo associada a valores de precisão (RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

Para avaliar a exatidão de uma técnica através de uma validação direta, normalmente são utilizados Materiais de Referência Certificados (MRC), ensaios interlaboratoriais e/ou testes comparativos (RELACRE 2000).

III.7.1.1 – Materiais de Referência Certificados (MRC)

Para validar um método de ensaio, sempre que for possível, deve-se utilizar um MRC. Estes materiais têm um certificado que especifica o valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro, e a sua respetiva incerteza. Quando um MRC é multi-componente, alguns parâmetros podem não ter incerteza atribuída. Os MRC são fornecidos por entidades reconhecidas e credíveis, como o LGC e o NIST (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

No caso de se utilizarem os MRC, os resultados experimentais obtidos (a média e o desvio padrão de uma série de replicados) devem ser comparados com os valores do certificado do MRC. Podem ser adotados critérios de aceitação para os valores obtidos experimentalmente, consoante o rigor definido para os resultados (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

Para fazer esta comparação podem-se utilizar vários critérios de decisão, como: erro relativo, erro normalizado e factor de desempenho (Coordenação Geral de Acreditação 2010).

Se o valor experimental não estiver dentro do intervalo de aceitação do certificado do respetivo MRC, as causas do desvio devem ser identificadas e eliminadas (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

O erro relativo traduz a componente dos erros sistemáticos e é expresso em percentagem. É determinado como mostra a equação **3.4** (RELACRE 2000):

$$E_r (\%) = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100 \quad \mathbf{3.4}$$

Onde:

X_{lab} – Valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética dos valores obtidos);

X_v – Valor certificado do MRC (valor aceite como “real”).

O factor de desempenho também é conhecido como índice z ou z-score. É uma outra forma de avaliar o desempenho do método, sendo determinado como mostra a equação **3.5** (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000):

$$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{s} \quad \mathbf{3.5}$$

Onde:

s – Valor do desvio-padrão, que pode ser a incerteza do MRC.

De acordo com a norma ISO Guia 43, o critério de aceitação é (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000):

$|Z| \leq 2$ – Resultado satisfatório;

$2 < |Z| < 3$ – Resultado questionável;

$|Z| \geq 3$ – Resultado insatisfatório.

O erro normalizado é uma das outras formas de calcular a exatidão de um método. Na eventualidade de se calcular a incerteza do resultado experimental, o valor real deve encontrar-se nesse intervalo de incerteza. No caso de isso não se verificar, o intervalo pode estar subestimado, utilizando-se assim a equação **3.6** (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000):

$$E_n = \frac{X_{lab} - X_v}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad 3.6$$

Onde:

U_{lab} – Incerteza associada ao resultado experimental;

U_{ref} – Incerteza associada ao valor de referência.

Se o valor do erro normalizado for inferior a um, então a incerteza associada ao valor experimental está bem estimada. No caso de não se verificarem condições satisfatórias, deve-se reavaliar o ensaio, procurando as causas e corrigindo-as (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

Deve-se definir a periodicidade da análise dos MRC's consoante a frequência das análises efetuadas, o grau de conhecimento das amostras, a complexidade do método e o grau de confiança exigido para o resultado final (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

III.7.1.2 – Ensaio interlaboratoriais

Existem distinções entre as utilizações dos ensaios interlaboratoriais. Estes podem ser realizados para determinar o desempenho do laboratório tal como para estabelecer a eficácia de um novo método e compará-lo (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

Para comparar e avaliar os resultados obtidos nos diversos laboratórios, é possível utilizar também o erro relativo, o erro normalizado e o factor de desempenho (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

III.7.1.3 – Testes comparativos

Ao realizar a validação de um método é importante fazer testes comparativos entre o método em estudo e um método que seja considerado de referência. O objetivo é determinar a exatidão do método, avaliando a proximidade dos resultados obtidos com ambas as técnicas. Estes testes podem ser feitos numa gama de concentrações restrita ou na totalidade da gama de concentrações onde se pretende validar o método. As análises devem ser feitas em duplicado (RELACRE 2000).

III.7.2 – Validação indireta

Consoante o método a validar, é necessário estudar diferentes parâmetros característicos do método, tais como: especificidade/seletividade; quantificação, onde se inclui a sensibilidade, curva de calibração, limiares analíticos de deteção e quantificação e gama de trabalho; precisão, que abrange a repetibilidade, a reprodutibilidade e a precisão intermédia; exatidão e robustez (RELACRE 2000).

Estes critérios variam ainda com a referência bibliográfica utilizada, sendo que algumas referem ainda a incerteza dos resultados (Coordenação Geral de Acreditação 2010; González & Herrador 2007).

III.7.2.1 – Especificidade/seletividade

Afirmar que um método analítico é seletivo significa que é capaz de identificar e quantificar um determinado analito de interesse inserido numa matriz complexa, sem a interferência de outros componentes (EMA 2012; Pallastrelli 2013; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

No caso de o método em estudo não ser seletivo, a linearidade, a exatidão e a precisão estão comprometidas, razão pela qual este é um parâmetro bastante importante (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004).

Existem vários procedimentos para a avaliação da seletividade de um método (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

Um dos métodos é comparar a matriz sem o analito (branco) com a matriz com a substância de interesse (padrão). Neste caso, considerando a cromatografia como exemplo, o método é considerado seletivo se não existir nenhuma interferência na matriz ao eluir no tempo de retenção do analito de interesse, obtendo-se um cromatograma com uma boa resolução (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004).

Uma outra opção é recorrer à utilização de detetores, que comparam o espectro obtido na separação da amostra com o de um padrão (Coordenação Geral de Acreditação 2010).

No caso de não ser possível obter uma matriz sem interferentes, utiliza-se o método da adição padrão, onde se comparam as curvas de calibração obtidas com e sem a adição do padrão à matriz, e se estas forem paralelas, pode-se dizer que não existem interferentes (Brito *et al.* 2003; Ribani *et al.* 2004).

Por fim, ainda é possível realizar uma nova análise com um método específico para a substância de interesse e comparar com o resultado experimental do método a validar (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004).

III.7.2.2 – Gama de trabalho

A gama de trabalho a utilizar depende de cada método. Inicialmente deve-se escolher uma gama de trabalho, definida pela gama de aplicação do método. O limite inferior da gama de trabalho é definido pelo limite de quantificação do método (Coordenação Geral de Acreditação 2010).

Para avaliar a adequação da gama de trabalho ao método é possível utilizar o teste de homogeneidade de variâncias. Para tal, calculam-se as variâncias associadas ao primeiro e ao último padrão através da equação **3.7** (RELACRE 2000):

$$S_i^2 = \frac{\sum_1^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \mathbf{3.7}$$

Onde:

i – Número do padrão (neste caso 1 e 10);

j – Número de repetições realizadas para cada padrão.

Entretanto, avaliam-se as variâncias, para ver se existem diferenças significativas entre estas nos limites da gama de trabalho. Existem duas expressões possíveis de ser utilizadas, consoante a situação, como mostram as equações **3.8** e **3.9** (RELACRE 2000):

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \mathbf{3.8}$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \mathbf{3.9}$$

Deve-se utilizar a equação **3.8** quando $S_{10}^2 > S_1^2$, e a equação **3.9** é para quando $S_{10}^2 < S_1^2$.

Por fim, compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade. Consoante o que se obtém, tem-se (RELACRE 2000):

$PG \leq F$: A gama de trabalho está bem ajustada, pois a diferença de variâncias não é significativa;

$PG > F$: A gama de trabalho não está bem ajustada e, portanto, deve ser reduzida, uma vez que as diferenças de variâncias são significativas.

III.7.2.3 – Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade para produzir resultados que são proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada faixa de trabalho. Esta proporcionalidade pode ser direta, ou através de uma expressão matemática bem conhecida (Coordenação Geral de Acreditação 2010; EMA 2012; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

Na maioria dos casos, a relação entre o sinal e a concentração ou massa dos analitos é determinada empiricamente. No geral, esta relação é traduzida numa reta, à qual se chamou curva de calibração. Esta deve ser definida, no mínimo, por cinco ou seis pontos diferentes, não incluindo o zero/branco devido aos possíveis erros associados. A equação da reta está representada pela equação **3.10** (Coordenação Geral de Acreditação 2010; EMA 2012; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

$$y = a x + b \quad \mathbf{3.10}$$

Onde:

y – Resposta/sinal medido;

x – Concentração ou massa do analito;

a – Declive da reta (sensibilidade do método);

b – Ordenada na origem.

O coeficiente de determinação, r^2 , deve ser o mais perto possível de um, de modo a garantir a menor dispersão dos resultados. Assim, garante-se uma maior qualidade da curva de calibração e uma menor incerteza dos coeficientes de regressão (Ribani *et al.* 2004).

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico (teste de Mandel), através do qual se pode determinar a função linear ou não linear que define a curva de calibração, assim como os desvios padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_{y^2} (RELACRE 2000).

Para a realização do teste de Mandel, determina-se a diferença das variâncias através da equação **3.11** (RELACRE 2000):

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y^2}^2 \quad \mathbf{3.11}$$

Onde

N - Número de padrões;

$S_{y/x}^2$ e $S_{y^2}^2$ – Desvios-padrão residuais das funções linear e não linear da curva de calibração.

De seguida, calcula-se o valor teste, PG, através da equação **3.12** (RELACRE 2000):

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad \mathbf{3.12}$$

Por fim, compara-se o valor de PG com o valor tabelado na distribuição F de Snedecor/Fischer, de onde vem (RELACRE 2000):

$PG \leq F$: A função de calibração é linear;

$PG > F$: A função de calibração não é linear. Neste caso, deve-se considerar reduzir a gama de trabalho.

Em cada análise deve ser traçada uma curva de calibração. No entanto, se existirem dados que provem que a curva de calibração é estável durante determinado tempo, é possível não construir uma curva em cada análise (EMA 2012; RELACRE 2000).

Este parâmetro também pode ser avaliado através da representação gráfica dos resultados obtidos, comparando o valor do coeficiente de determinação e dos resíduos percentuais verificados para cada ponto da curva de calibração com os valores que foram estabelecidos como aceitáveis. No geral, o coeficiente de correlação, r , deve ser superior a 0,995 (Sargaço 2013).

III.7.2.4 – Sensibilidade

A sensibilidade de um determinado método consiste na capacidade deste em distinguir duas concentrações próximas com um certo nível de confiança (Brito *et al.* 2003).

Na prática, pode ser definida como o quociente entre a diferença dos valores lidos, ΔL , e a variação da concentração que corresponde a esta diferença, ΔC , como mostra a equação **3.13** (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad \mathbf{3.13}$$

No caso de a curva de calibração ser linear, a sensibilidade é dada pelo declive da reta de calibração (RELACRE 2000).

A avaliação deste parâmetro é bastante importante, principalmente quando se pretende: avaliar a sua evolução ao longo do tempo; comparar a sensibilidade de vários métodos para um mesmo analito, baseados em modelos lineares; ou comparar a sensibilidade do método para os vários analitos (RELACRE 2000).

III.7.2.5 – Limiares analíticos

Consoante a situação, existem várias formas de determinar os limiares analíticos (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000).

O limite de deteção consiste no teor mínimo medido a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. No entanto, o analito não é necessariamente quantificado como um valor exato (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000).

Em termos qualitativos, pode-se definir o limite de deteção como a concentração mínima que o método consegue distinguir do branco (amostra com a mesma matriz, mas sem o analito de interesse) (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000).

A existência de uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito, apenas se pode considerar que a concentração do componente é inferior ao valor do limite de deteção, com uma determinada probabilidade (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000).

Uma das formas de calcular o limite de deteção, LD, com uma calibração linear, é a partir da equação **3.14** (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000).

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad \mathbf{3.14}$$

Onde:

$S_{y/x}$ – Desvio padrão residual da curva de calibração (calculado através do método dos mínimos quadrados);

b – Declive da curva de calibração.

No entanto, também se pode calcular o limite de deteção a partir da relação sinal/ruído. Este procedimento pode ser utilizado apenas em métodos analíticos com ruído de base. Consiste na comparação do sinal medido numa amostra com uma pequena concentração conhecida do analito com um branco. De seguida, calcula-se a concentração mínima a que o analito pode ser detetado, sendo que uma relação de 3:1 no geral chega (ICH 1996).

O limite de quantificação, LQ, define qual a menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar o analito, associado a uma determinada exatidão e precisão consideradas aceitáveis (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000). Na prática, corresponde à concentração do padrão de menor concentração, com exceção do branco. Este parâmetro é frequentemente inserido em relatórios de métodos, razão pela qual deve ser identificado e quantificado de forma clara (RELACRE 2000).

Para o cálculo deste parâmetro, no caso de uma calibração linear, pode-se utilizar a equação 3.15 (RELACRE 2000).

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad 3.15$$

Para a determinação deste parâmetro também é possível utilizar a relação sinal/ruído. Este método consiste na comparação do sinal de amostras com concentrações baixas e conhecidas do analito com um branco. De seguida, a partir da relação 10:1 de sinal/ruído, é possível determinar a concentração mínima quantificável de analito (ICH 1996).

III.7.2.6 – Precisão

A precisão de um método avalia a proximidade de medidas independentes realizadas experimentalmente, em ensaios repetidos sobre uma determinada amostra, amostras semelhantes ou padrões. Este parâmetro, no geral, varia com a gama de concentrações, sendo que é avaliado através da repetibilidade, precisão intermédia, e reprodutibilidade (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão (se forem feitas mais de 20 medições) ou pelo coeficiente de variação (Ribani *et al.* 2004).

- Repetibilidade

A repetibilidade avalia a precisão do método num pequeno intervalo de tempo, em condições de operação iguais (mesmo laboratório, operador, equipamento, tipo de reagentes, etc) (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

Pode ser estimada através de uma série de medições (no mínimo dez), sobre uma série de amostras/padrões, em vários níveis de concentração, cobrindo toda a gama de aplicação do método (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

A repetibilidade pode ser expressa através do desvio padrão relativo (RSD)/coeficiente de variação (CV), como mostra a equação **3.16** (Ribani *et al.* 2004).

$$CV(\%) = RSD(\%) = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad \mathbf{3.16}$$

Onde:

s – Desvio padrão absoluto;

\bar{x} – Média aritmética das medições.

- Precisão Intermédia

A precisão intermédia avalia a precisão do método utilizando a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, e utilizando o mesmo método, mas variando algumas condições, como o analista, equipamento, com ou sem calibrar o equipamento, etc. É conhecida como a medida mais representativa da variabilidade dos resultados experimentais, sendo a mais aconselhável a ser adotada (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004; RELACRE 2000).

Para calcular este parâmetro é necessário realizar n medições em replicado, duplicado ou ensaio único sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Quando é aplicável, repete-se este procedimento com mais amostras, abrangendo uma determinada gama de concentrações (RELACRE 2000). Na maior parte das vezes, o cálculo é efetuado após a eliminação de possíveis resultados aberrantes (se visualizarmos graficamente os resultados, pode simplificar a

identificação destes resultados). Pode-se determinar a precisão intermédia de várias maneiras, consoante o ensaio e o tipo de aplicação do estudo deste parâmetro (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

Uma das formas é a realização de n medições ($n \geq 15$) em condições pré-definidas. De seguida, utiliza-se a equação **3.17** que permite determinar o desvio padrão da precisão intermédia (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000):

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{n-1}} \times \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y}) \quad \mathbf{3.17}$$

Onde:

n – Número de padrões ou amostras;

y_k – Resultado individual obtido;

\bar{y} – Média aritmética dos resultados obtidos.

Pode-se ainda expressar esta medida através do desvio padrão relativo, como mostra a equação **III-16** (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000).

- Reprodutibilidade

A reprodutibilidade consiste no grau de concordância dos resultados obtidos a partir da análise de uma mesma amostra em condições diferentes (operador, local, equipamento, etc). Este parâmetro é geralmente obtido a partir de ensaios interlaboratoriais. É enviada uma determinada amostra a determinado número de laboratórios, para que estes realizem as análises necessárias sobre a mesma amostra (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

A reprodutibilidade é expressa pelo coeficiente de variação de reprodutibilidade, CV_R , como se mostra na equação **3.18** (Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

$$CV_{R(\%)} = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad \mathbf{3.18}$$

Onde:

S_{Ri} – Desvio padrão da reprodutibilidade associada aos resultados considerados de cada laboratório;

\bar{x} – Média dos valores determinados.

III.7.2.7 – Exatidão

A exatidão, como dito anteriormente no ponto 7.1, capítulo III, representa a concordância entre o valor aceite como verdadeiro e os valores encontrados através do método a validar. Este parâmetro pode ser determinado através de uma avaliação direta (ponto II.7.1), ou através de ensaios de recuperação (Brito *et al.* 2003; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

A recuperação do analito pode ser avaliada com recurso à análise de amostras fortificadas com uma quantidade conhecida de um padrão, uma substância modificada isotopicamente ou, em último caso, um composto substituto que represente o comportamento do analito de interesse (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004).

A recuperação é então determinada através da equação 3.19 (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad \mathbf{3.19}$$

Onde:

C_1 – Concentração do analito na amostra fortificada;

C_2 – Concentração do analito na amostra não fortificada;

C_3 – Concentração adicionada de analito à amostra para fortificação.

Estes ensaios têm a limitação de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma em que se encontra na amostra. Assim, podemos involuntariamente adicionar uma substância numa forma em que esta seja mais facilmente detetada, obtendo-se uma recuperação mais otimista do que a realidade (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani *et al.* 2004). Para determinar a exatidão do método, a recuperação calculada deve sofrer uma retificação através de um factor de correlação, que deve de ser determinado para cada analito com base na sua pureza (Ribani *et al.* 2004).

III.7.2.8 – Robustez

A robustez de um método é definida como a capacidade que este tem de permanecer inalterado quando existem pequenas variações nos parâmetros do método. Assim, é considerado que um método é robusto quando é insensível a estas pequenas alterações (Brito *et al.* 2003; Coordenação Geral de Acreditação 2010; RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

No caso de métodos cromatográficos, pode-se variar parâmetros como a temperatura, concentração do solvente orgânico, tempo de extração, etc (Brito *et al.* 2003; Ribani *et al.* 2004).

Para avaliar a robustez, o INMETRO e a RELACRE recomendam o teste de Youden. Este permite ordenar a influência de cada um dos parâmetros estudados/variados, além de avaliar a robustez do método. Este teste consiste em oito ensaios com uma combinação dos parâmetros a variar, e na análise do efeito da alteração dos mesmos (RELACRE 2000; Ribani *et al.* 2004).

Em métodos/trabalhos onde existem mudanças de marcas, fornecedores ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação do método, sem uma diferença significativa nos resultados, pode-se dizer que o método tem uma robustez intrínseca, pois foi capaz de manter a sua resposta quando existiram mudanças no ambiente da análise (Ribani *et al.* 2004).

IV – Parte experimental

O procedimento seguido teve como base a Norma Europeia EN 12014-4 de maio de 2005, que descreve um método cromatográfico de troca iônica para a determinação de nitrato e nitrito em amostras à base de carne.

A extração dos nitratos e nitritos foi realizada com água quente (entre 50 e 60 °C) e a respetiva clarificação foi feita com acetonitrilo, tal como recomendado pela norma. Os volumes utilizados foram reduzidos para metade, de modo a concentrar os teores de nitrato e nitrito (EN 12014-4 2005).

As condições cromatográficas não foram alteradas, tendo-se utilizado uma unidade de Cromatografia Líquida de Alta Resolução com a coluna de troca iônica referida na norma (ponto 6.3, capítulo IV). Os analitos foram detetados na região do UV a 205 nm (EN 12014-4 2005).

Por fim, relativamente à curva de calibração utilizada para a quantificação pelo método do padrão externo, fez-se alterações comparativamente à norma europeia: não se considerou o zero como primeiro ponto da curva de calibração e utilizou-se fase móvel em vez de água para preparar as soluções dos padrões, pois melhorava a resolução do cromatograma (EN 12014-4 2005).

IV.1 – Material

Para desenvolver este trabalho foi necessário utilizar os seguintes materiais:

- balões volumétricos certificados de 10, 20, 25, 50, 100 e 200 mL;
- barquinhas para pesagem;
- erlenmeyers de 100 mL;
- filtros de membrana 0,45 µm, de polipropileno hidrofílico, da marca *Pall*;
- filtros de papel nº 2 e nº 4 da marca *Whatman*;
- filtros de seringa 0,45 µm, em PVDF;
- *vials* de HPLC;
- funis;
- kit de filtração;

- medidores de *Kipp* de 5, 20 e 50 mL;
- pipetas volumétricas certificadas de 1, 2, 5, 10, 25 e 50 mL;
- seringas;
- tubos *Falcon* de 15 mL;
- vidros de relógio.

IV.2 – Equipamento

Para realizar este procedimento foi necessário:

- arca congeladora com temperatura ≤ -20 °C da marca *Sanyo*;
- balança da marca *Mettler Toledo*, modelo XP205;
- banho de água com refluxo da marca *Trade Raypa*;
- banho de ultrassons da marca *Bransonic*, modelo Branson 3510;
- câmara frigorífica com temperatura 4 °C da marca *Labmetro*;
- coluna cromatográfica com resina de polimetacrilato com uma amina quaternária como grupo funcional, 4,6 mm x 150 mm, partículas de 10 μ m, da marca *Waters*, modelo IC-PAK Anion HC;
- homogeneizador (ultra-turrax) da marca *Yellowline*, modelo DI25 basic;
- moinho de faca da marca *Grindomix*, modelo GM 200;
- placa com agitador da marca *Heidolph*, modelo HG 3001;
- placa com agitador magnético da marca *Ikalabortechnik*, modelo RCT basic;
- potenciômetro da marca *Metrohm*, modelo 780;
- sistema de HPLC da marca *Waters*, modelo A2695, com bomba quaternária, forno de coluna, sistema de injeção automática e detetor de díodos UV-Vis DAD da marca *Waters*, modelo 2996. *Software Empower*;
- sistema de purificação de água da marca *Millipore*, modelo Milli-Q.

IV.3 – Reagentes

Os reagentes utilizados nesta metodologia, assim como as especificações dos respectivos fabricantes estão resumidos na tabela IV-1.

Para a preparação da fase móvel foi utilizada água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação Mili-Q (*Millipore*). Para o processamento das amostras foi utilizada água destilada, também obtida a partir de um sistema da *Millipore*.

Tabela IV-1: Fórmula química, marca e pureza de cada reagente utilizado.

| Reagente | Fórmula | Marca | Pureza |
|---------------------------|----------------|---------------|----------|
| Acetonitrilo | C_2H_3N | VWR Chemicals | ≥ 99,9 % |
| Ácido Bórico | H_3BO_3 | Merck | - |
| Ácido Clorídrico | HCl | Merck | 25 % |
| Ácido Glucónico | $C_6H_{12}O_7$ | Merck | 50 % |
| Glicerol | $C_3H_8O_3$ | Merck | 85 % |
| Hidróxido de Lítio Anidro | LiOH | Merck | 98 % |
| Nitrato de Potássio | KNO_3 | Merck | 99,995 % |
| Nitrito de Sódio | $NaNO_2$ | Sigma Aldrich | ≥ 99,9 % |

IV.4 – Soluções

Tampão Gluconato de Borato de Lítio: Num copo de 1 L adicionou-se cerca de 500 mL de água, 34 g de ácido bórico e 19,6 mL de ácido glucónico a 50%. De seguida dissolveram-se 11,22 g de hidróxido de lítio a 98%. Por fim, acrescentaram-se 148 mL de glicerol a 85%, transferiu-se e completou-se o volume com água ultrapura num balão volumétrico de 1 L.

Solução de Ácido Clorídrico 1,8 M: Pipetaram-se 22,3 mL de ácido clorídrico a 25% para um balão de 100 mL e perpez-se o volume com água ultrapura.

Solução de Ácido Clorídrico 0,1 N: Pipetaram-se 10 mL de ácido clorídrico 1 N para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água ultrapura.

Fase Móvel: Mediram-se 34 mL de tampão gluconato de borato de lítio para um copo de 2 L e adicionaram-se 250 mL de acetonitrilo. Juntou-se alguma água ultrapura e acertou-se o pH a 6,5 \pm 0,1 com as soluções de ácido clorídrico a 1,8 M e 0,1 N. Completou-se o volume (2 L) em balão volumétrico, filtrou-se a solução num kit de filtração com um filtro de membrana de 0,45 μ m e desgaseificou-se o filtrado no banho de ultrassons por 30 minutos.

Solução *stock* de nitrato de potássio (1 mg de ião nitrato/mL): Pesaram-se 37,5 mg de nitrato de potássio para um balão volumétrico de 50 mL. Dissolveu-se o nitrato de potássio com fase móvel e perpez-se o volume do balão.

Solução *stock* de nitrito de sódio (0,5 mg de ião nitrito/mL): Pesaram-se 81,5 mg de nitrito de sódio para um balão volumétrico de 50 mL e dissolveu-se o nitrito de sódio com fase móvel. O volume foi aferido com fase móvel.

IV.5 – Amostras

Para a validação do método foram adquiridas 9 embalagens de fiambre da pá, 6 latas de salsichas e 3 embalagens de patê de porco. Assim, analisaram-se amostras de 5 lotes diferentes de fiambre, 3 lotes diferentes de salsichas e 2 lotes diferentes de patê.

A tabela IV-2 mostra quais as amostras analisadas ao longo do trabalho e respetivos códigos atribuídos, assim como o número de lotes e o tipo de amostra.

Tabela IV-2: Amostras analisadas ao longo do trabalho, quantidade de lotes e tipo de amostras.

| Amostra | Descrição | Amostra composta | Nº de lotes analisados |
|---------|------------------------------------|------------------|------------------------|
| A1 | Fiambre da pá | x | 5 |
| A2 | Salsichas | x | 3 |
| A3 | Salsichas | x | 1 |
| A4 | Fiambre | x | 1 |
| A5 | Salame | x | 1 |
| A6 | Patê de porco | x | 2 |
| A7 | Bolo e queques | ✓ | - |
| A8 | Massa | ✓ | - |
| A9 | Carapau fresco | ✓ | - |
| A10 | Maruca fresca | ✓ | - |
| A11 | Presunto e Bacon | ✓ | - |
| A12 | Fiambre | ✓ | - |
| A13 | Chouriço, alheira, paio, chourição | ✓ | - |
| A14 | Salsichas | ✓ | - |
| A15 | Fiambre de peru | ✓ | - |
| A16 | Fiambre da pá | ✓ | - |
| A17 | Fiambre da perna | ✓ | - |

As amostras A7 a A14 são amostras compostas por 12 sub-amostras, fazendo estas parte do projeto *TDS Exposure*.

As amostras A15, A16 e A17 contêm cada uma 12 sub-amostras de fiambre de várias marcas e fazem parte de um estudo para a obtenção de dados para a tabela da composição dos alimentos.

IV.6 – Procedimento experimental

IV.6.1 – Preparação e extração das amostras

As amostras utilizadas na validação do método (A1 e A2) foram processadas com a ajuda de um moinho de facas. A amostra de fiambre foi exposta a 3 ciclos de 2500 rpm, com a duração de 10 segundos cada, enquanto que na amostra de salsichas foram feitos 2 ciclos de 2500 rpm, 10 segundos cada. Os vários lotes nunca foram misturados entre si. Cada lote foi separado por frascos e congelado numa arca congeladora a -20°C. A amostra A6 não precisou deste tipo de processamento.

No dia anterior a cada análise, procedeu-se ao descongelamento das amostras necessárias (no frigorífico). Pesaram-se cerca de 10 g de cada amostra para um erlenmeyer de 100 mL. De seguida, adicionaram-se 25 mL de água destilada quente, entre os 50 e os 60 °C, a cada erlenmeyer e homogeneizou-se a amostra com um homogeneizador. Juntaram-se 25 mL de acetonitrilo a cada erlenmeyer e esperou-se que a mistura arrefecesse (se necessário). Transferiu-se a mistura anterior para um balão volumétrico de 100 mL e aferiu-se o volume com água destilada. Por fim, filtrou-se toda a solução com papel de filtro e através de um filtro de seringa de 0,45 µm.

Uma alíquota do filtrado foi transferida para *vials* de HPLC, que foram introduzidos no injetor automático para análise.

Todas as amostras foram analisadas em triplicado, sendo que a terceira amostra foi fortificada com 1 mL das soluções *stock* de nitrato de potássio e nitrito de sódio, de modo a determinar a taxa de recuperação dos analitos em estudo.

IV.6.2 – Preparação das soluções padrão de calibração

A partir das soluções *stock* de cada um dos padrões, nitrito de sódio e nitrato de potássio, foi realizada uma diluição intermédia (DI K e DI Na) de 1:10 em fase móvel. Por fim, a partir desta diluição foram efetuadas as soluções de calibração que correspondem aos 6 pontos da curva de calibração como mostra a tabela IV-3, para um volume final de 10 mL:

Tabela IV-3: Concentração de cada ião na respetiva solução padrão e volume final de solução.

| | Concentração de ião NO_2^- ($\mu\text{g/mL}$) | Concentração de ião NO_3^- ($\mu\text{g/mL}$) |
|----|--|--|
| P1 | 0,5 | 1 |
| P2 | 2 | 2 |
| P3 | 3,5 | 4 |
| P4 | 5 | 6 |
| P5 | 6,5 | 8 |
| P6 | 8 | 10 |

IV.6.3 – Condições cromatográficas

Através do estudo de otimização do método (ponto 1, capítulo V), foi possível estabelecer as condições cromatográficas descritas na tabela IV-4.

Tabela IV-4: Condições cromatográficas após a otimização do método.

| Parâmetro | Condição |
|--------------------------------------|--|
| Modo de separação | Troca iônica |
| Coluna | Resina de polimetacrilato com uma amina quaternária como grupo funcional, 4,6 mm x 150 mm, partículas de 10 µm |
| Fase móvel | Tampão gluconato de borato de lítio diluído em água com acetoniirilo a 12,5% |
| Volume de injeção | 40 µL |
| Deteção | 205 nm |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Temperatura do forno da coluna | 37 °C |
| Temperatura das amostras | 15 °C |
| Tempo de cada corrida cromatográfica | 30 min |

Quando necessário, o volume de injeção de cada amostra foi ajustado de modo a que a concentração dos analitos se encontrasse dentro dos limites da curva de calibração. Uma vez que os tempos de retenção foram diminuindo com o tempo, o tempo da corrida cromatográfica foi sendo ajustado, uma vez que inicialmente se realizavam corridas de 40 min.

IV.6.4 – Identificação e quantificação dos analitos

A identificação dos analitos nas amostras foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das soluções padrão com os picos dos cromatogramas das amostras.

Para a quantificação, foi utilizada uma curva de calibração com seis pontos – método do padrão externo. Esta curva relaciona a concentração dos analitos com a área dos picos obtidos nos cromatogramas. Assim, a equação da curva de calibração permitiu a quantificação dos analitos com base na área dos picos.

Cada solução padrão ou amostra foi injetada duas vezes, sendo que a área do pico utilizada para determinar a concentração de cada analito foi a média das áreas de ambas as injeções. Todos estes cálculos foram feitos no *software Empower*.

De seguida, os dados obtidos foram inseridos numa folha de *Excel*, onde foram processados de acordo com o recomendado pela norma EN 12014-4. Para a determinação da fração mássica de nitrito e nitrato (mg ião/kg amostra) foi utilizada a equação 4.1 (EN 12014-4 2005).

$$w(\text{analito}) = \frac{100 \times A_{(\text{analito})}}{m} \times F \quad 4.1$$

Onde:

W (analito) – Fração mássica do analito na amostra analisada;

A_(analito) – Concentração do analito na amostra analisada (mg/L);

m – Massa de amostra pesada no inicio do procedimento (g);

100 – Volume em que a amostra foi diluída (mL);

F – Factor de diluição.

IV.7 – Processo de validação do método

O processo de validação deste método incluiu a avaliação de parâmetros como a gama de trabalho, linearidade do método na gama de trabalho, sensibilidade, limites analíticos (LQ e LD), precisão. Os estudos de precisão foram realizados em condições de repetibilidade e precisão intermédia. Estes parâmetros foram estudados seguindo procedimentos de guias de referência, como a RELACRE, e o guia de validação de métodos cromatográficos do INSA. Foram também avaliadas a linearidade e repetibilidade do injetor. Os procedimentos adotados encontram-se na tabela IV-5.

No tratamento de resultados foram utilizadas folhas de *Excel* validadas e implementadas no DAN.

Tabela IV-5: Parâmetros de validação do método avaliados e respectivo procedimento.

| | |
|-------------------------------|---|
| Seletividade e Especificidade | Consistiu na preparação e injeção de duas amostras, uma com nitratos e nitritos, e outra sem estes analitos. |
| Gama de trabalho | A partir da diluição intermédia, foram preparadas dez réplicas das soluções equivalentes ao primeiro e ao último ponto das curvas de calibração (0,5-8 µg/mL para nitritos e 1-10 µg/mL para nitratos) e uma réplica para cada ponto intermédio (2; 3,5; 5; 6,5 µg/mL para nitritos e 2; 4; 6; 8 µg/mL para nitratos). De seguida calculou-se a variância (S_r^2) das dez réplicas e o valor PG e, por fim, comparou-se este último valor com o valor da distribuição F de Snedecor/Fisher. |
| Linearidade | Para avaliar este parâmetro foram construídas as duas curvas de calibração. Analisaram-se os valores dos coeficientes de correlação (r^2) e os resíduos e por fim fez-se o teste de Mandel para verificar a adequação do modelo linear. |
| Sensibilidade | A partir das curvas de calibração obtidas nos ensaios realizados, obteve-se o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) do declive de ambas as retas. |
| Limites analíticos | Os limites analíticos do método foram calculados com base na relação sinal/ruído. Para o limite de quantificação foi adotada uma relação de 10:1, enquanto que para o limite de deteção adotou-se uma relação de 3:1. De seguida, confirmaram-se os limites analíticos através da realização de um ensaio com adição de padrão correspondente ao primeiro ponto da curva de calibração para o limite de quantificação, e a injeção de 1/3 do volume para o limite de deteção. |
| Repetibilidade | Realizaram-se seis réplicas de cada amostra em condições de repetibilidade, e calculou-se o respetivo desvio padrão relativo (RSD_r). |
| Precisão intermédia | Realizaram-se três ensaios de repetibilidade e calcularam-se os respetivos desvios padrão relativos (RSD_R). |
| Exatidão | Fizeram-se três tomas de 5 g da amostra do ensaio interlaboratorial e realizou-se o procedimento normal de análise. |
| Repetibilidade do injetor | Programou-se o sistema de HPLC para injetar dez vezes 40 µL do padrão P1 e P6 (ver tabela IV-3). |
| Linearidade do injetor | Programou-se o sistema de HPLC para injetar 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200 µL do padrão P4 (tabela IV-3) |

IV.8 – Testes estatísticos

Ao longo do trabalho foram realizados os seguintes testes estatísticos:

- Teste t emparelhado – Para comparar os modos de extração dos analitos de interesse, na parte do trabalho de otimização do método;
- Homogeneidade de variâncias – Para comparar as variâncias das réplicas dos padrões P1 e P6;
- Teste de Mandel – De forma a avaliar se o modelo linear era adequado ou não às curvas de calibração;
- Teste ANOVA – De modo a comparar a homogeneidade dos teores de analitos nos diferentes lotes analisados.

V – Apresentação e discussão de resultados

V.1 – Otimização do processo analítico

Como referido anteriormente, este trabalho teve como um dos principais objetivos a otimização de um método de HPLC de troca iônica para a determinação de nitritos e nitratos em amostras à base de carne. O procedimento foi baseado na Norma EN 12014-4 (maio de 2005), tendo sido estudadas, de forma crítica, algumas modificações a fazer, nomeadamente a nível do comprimento de onda de deteção, preparação das soluções padrão, composição da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura de extração dos analitos de interesse.

V.1.1 – Comprimento de onda

A norma EN 12014-4 aconselhava a utilização de um comprimento de onda de deteção de nitratos e nitritos de 205 nm, o que se veio a comprovar como sendo o adequado. Após a primeira injeção, obteve-se um cromatograma do tipo da figura V-1.

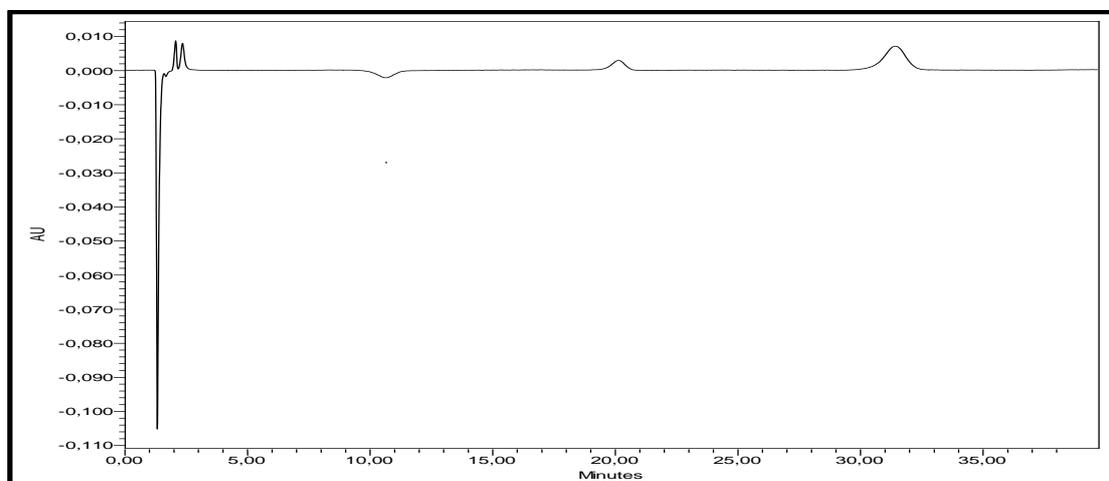


Figura V-1: Cromatograma dos padrões de nitrato de potássio (20 mg/mL) e nitrito de sódio (10 mg/mL), preparados em água.

Pensou-se que o problema poderia ser o comprimento de onda de deteção, uma vez que em alguma da bibliografia consultada, o comprimento de onda utilizado para a deteção era de 214 nm (Dennis *et al.* 1990; Hsu *et al.* 2009; Reece & Hird 2000).

Assim, foram realizados espectros de varrimento para ambos os analitos, de modo a compreender se este parâmetro deveria ser alterado. Obtiveram-se dois espectros com os

máximos de absorção a 201,2 nm para o nitrato e 209,4 nm para o nitrito, como se pode ver na figura V-2.

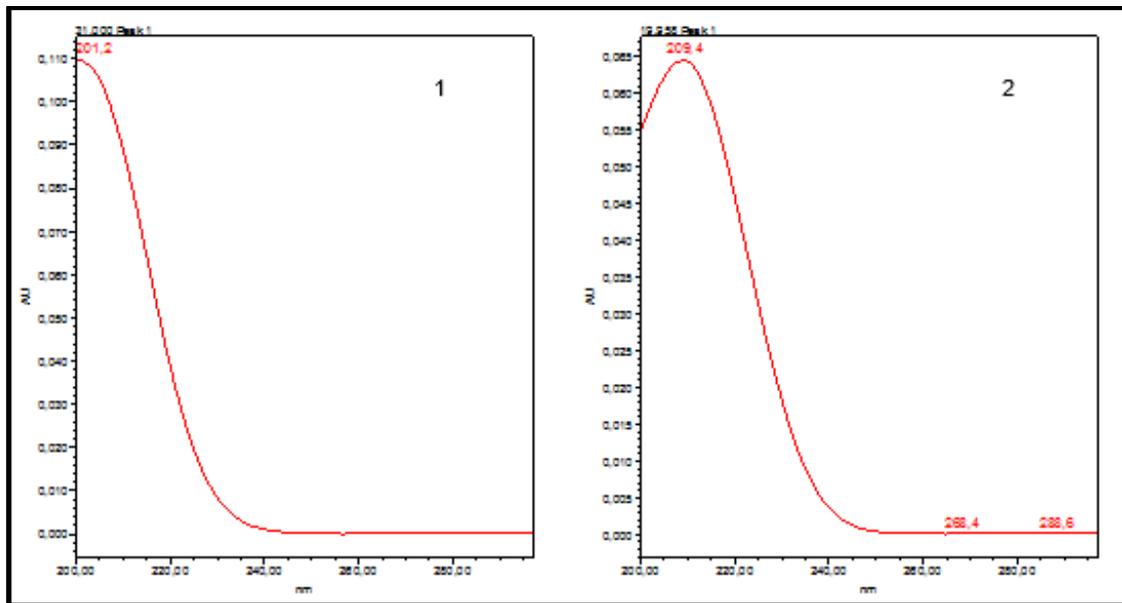


Figura V-2: Espectros de absorção do nitrato (1) e do nitrito (2) entre o comprimento de onda de 200 e 300 nm.

Assim, decidiu-se manter o comprimento de onda recomendado pela norma como o comprimento de onda utilizado no método, uma vez que os 205 nm é um comprimento de onda intermédio entre a absorção máxima de ambos os analitos.

V.1.2 – Preparação das soluções padrão

A norma EN 12014-4 aconselhava a que os padrões fossem dissolvidos em água e preparados diretamente a partir da solução-mãe. De acordo com os cálculos, teriam de se medir volumes muito reduzidos, pelo que se recorreu a uma diluição intermédia de 1:10 de cada solução-mãe.

O cromatograma obtido (figura V-1) da solução padrão de nitrato em conjunto com a solução padrão de nitrito apresentava uma altura dos picos muito pequena, devido à existência de um pico de fase no início do cromatograma, o que levava a dificuldades na visualização e na integração dos picos dos analitos.

Logo, alterou-se a preparação dos padrões e começou a utilizar-se fase móvel como solvente. A melhoria no cromatograma é visível na figura V-3.

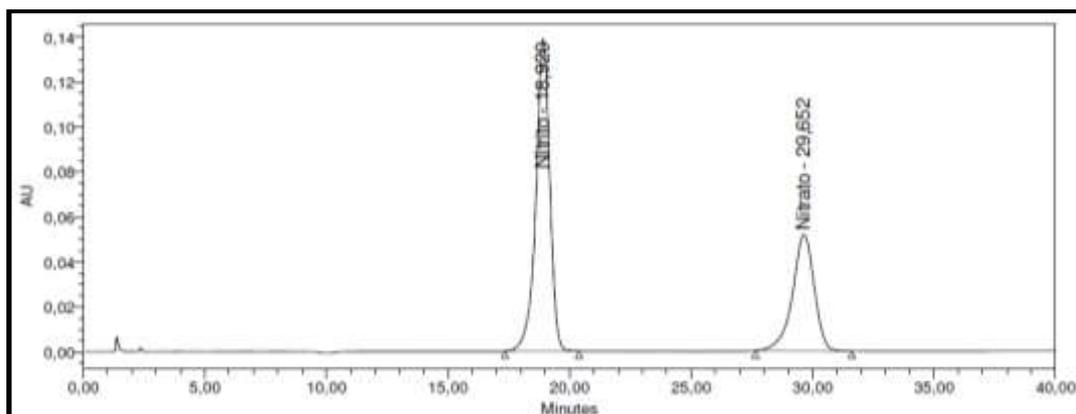


Figura V-3: Cromatograma dos padrões de nitrato de potássio (20 mg/mL) e nitrito de sódio (10 mg/mL) preparados em fase móvel.

V.1.3 – Composição da fase móvel

A composição da fase móvel neste trabalho foi, mais uma vez, a composição referida na norma adotada, ou seja, 12,5% de acetonitrilo e 1,7% de tampão gluconato de borato de lítio em água. Na bibliografia consultada utilizavam como base da fase móvel tampão fosfatos ou carbonato de sódio (EN 12014-4 2005; Dennis et al. 1990; Hsu et al. 2009; lammarino et al. 2013; lammarino et al. 2014; Lopez-Moreno et al. 2016; Reece & Hird 2000; Vasco & Alvito 2011). No entanto, uma vez que a coluna utilizada neste trabalho vinha com a recomendação da utilização da fase móvel referida anteriormente, estes dois tipos de fases móveis (tampão fosfatos e carbonato de sódio) não foram testados.

Uma vez que o acetonitrilo é bastante dispendioso e tóxico, tentou-se diminuir a percentagem de acetonitrilo utilizado na fase móvel. Assim, realizaram-se ensaios com fase móvel com 12,5% e 6,25% de acetonitrilo com os padrões da gama de trabalho. Através destes ensaios concluiu-se que consoante se diminuía a percentagem de acetonitrilo, maior se tornava o tempo das corridas, razão pela qual se decidiu manter os 12,5% de acetonitrilo.

V.1.4 – Fluxo da fase móvel

O fluxo da fase móvel foi também um dos parâmetros estudados ao longo da otimização deste método. A norma europeia na qual o trabalho se baseou sugeria a utilização de um fluxo de 1 mL/min. No entanto, com este fluxo, as corridas cromatográficas tinham uma duração de 30/40 minutos cada. Uma vez que não foi possível reduzir a quantidade de acetonitrilo utilizado na constituição da fase móvel, como referido no ponto anterior, estudou-se a hipótese de diminuir o

tempo de corrida através do aumento do fluxo, uma vez que a pressão da coluna, com um fluxo de 1 mL/min, era baixa.

Assim, experimentou-se um fluxo de 1,5 mL/min, o que resultava numa pressão ainda relativamente baixa da coluna. Com esta alteração, os tempos de corrida diminuía de 40 minutos para 30 minutos, o que levava à poupança de fase móvel.

No entanto, à medida que se foram realizando injeções da curva de calibração e de algumas amostras com um fluxo de 1,5 mL/min, foi possível chegar à conclusão que o resultado obtido em cada injeção não era reprodutível. Por esta razão, resolveu-se manter o fluxo aconselhado na norma de 1 mL/min.

V.1.5 – Temperatura de extração

Nesta etapa do processo de otimização utilizaram-se as amostras A1 e A2.

A norma EN 12014-4 refere que a temperatura de extração dos analitos deve ser entre os 50 e os 60 °C. No entanto, as taxas de recuperação obtidas nos testes iniciais eram muito baixas (entre 50% e 60%). Assim, estudou-se o efeito da temperatura e o modo de extração. Segundo a bibliografia consultada, existiam extrações feitas com água quente a uma temperatura de 100 °C, e outras de extrações também efetuadas com água a 100 °C, num banho de água fervente durante 15 min e com refluxo (Dennis *et al.* 1990; Iammarino *et al.* 2013; Iammarino *et al.* 2014; Merusi *et al.* 2010; Reece & Hird 2000). Assim, as metodologias de extração foram testadas.

A extração apenas com água a 100 °C não apresentou grandes melhorias em relação à extração efetuada com água a 100 °C num banho de água fervente durante 15 minutos, e com refluxo, razão pela qual foi posta de parte (tabela V-1).

Tabela V-1: Valor médio da concentração em nitrato e nitrito, em mg/kg de amostra, na amostra A1 e A2 sujeita a diferentes procedimentos de extração.

| Procedimento | Amostra | Nitrato (mg/kg amostra) | Nitrito (mg/kg amostra) |
|---|---------|-------------------------|-------------------------|
| Adição de água entre 50 e 60 °C | A1 | 24 | 15 |
| | A2 | 39 | 3,1 |
| Adição de água a 100°C | A1 | 26 | 16 |
| | A2 | 31 | 3,3 |
| Adição de água a 100 °C, 15 minutos em banho de água fervente e refluxo | A1 | 31 | 17 |
| | A2 | 43 | 10 |

Para decidir qual o melhor procedimento, entre a extração com água entre os 50 e 60 °C e a extração com água a 100 °C, num banho de água fervente com refluxo, foi realizado um teste de hipóteses. Este teste pode ser utilizado para comparar um método de referência com um novo método ou para ver se é vantajoso adotar uma determinada mudança de procedimento (Miller & Miller 1993).

Começou-se por definir o número de ensaios a realizar com cada método, tendo-se decidido que cinco ensaios independentes seriam um bom ponto de partida.

Estabeleceu-se a hipótese nula: expor a amostra a água a 100 °C, seguido de 15 minutos num banho de água fervente com refluxo não altera de forma significativa o teor de nitrito e nitrato obtido para cada amostra.

De seguida, calcularam-se os desvios padrão e as médias do teor de nitrato e nitrito de cada procedimento. Estes valores encontram-se resumidos na tabela V-2.

Tabela V-2: Valores médios de concentração de nitrato e nitrito e respectivos desvios padrão, em mg/kg amostra, para as amostras A1 e A2 consoante o procedimento de extração utilizado.

| | | Nitrato (mg/kg amostra) | | Nitrito (mg/kg amostra) | |
|---|---------------|-------------------------|-----|-------------------------|-----|
| | | A1 | A2 | A1 | A2 |
| Adição de água entre 50 e 60 °C | Média | 23 | 30 | 14 | 3,2 |
| | Desvio padrão | 5,2 | 3,6 | 1,4 | 0,8 |
| Adição de água a 100 °C, 15 minutos em banho de água fervente e refluxo | Média | 29 | 29 | 15 | 3,9 |
| | Desvio padrão | 9,3 | 3,6 | 1,8 | 1,1 |

Calcula-se então a variância de cada método, para cada analito em cada amostra através da equação **5.1**.

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) \times S_1^2 + (n_2 - 1) \times S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \mathbf{5.1}$$

Onde

S^2 – Variância do método;

n_1 e n_2 – número de ensaios realizados para cada método (cinco);

S_1 e S_2 – desvio padrão dos teores obtidos em cada método de extração.

Por fim, calculou-se o valor de t experimental através da equação **5.2** para cada amostra e cada analito e comparou-se esse valor com o valor de t tabelado, para 8 graus de liberdade (calculados com base no número de ensaios realizados com cada método – Equação **5.3**).

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \mathbf{5.2}$$

$$G.L. = n_1 + n_2 - 2 \quad \mathbf{5.3}$$

Onde:

x_1 e x_2 – Média dos teores de nitrato e nitritos obtidos em cada método de extração.

A tabela V-3 mostra os valores de variância determinados, enquanto que a tabela V-4 mostra os valores experimentais de t.

Tabela V-3: Valores de variância calculados para cada analito, amostra e procedimento em estudo.

| | Nitrato | | Nitrito | |
|---|---------|----|---------|-----|
| | A1 | A2 | A1 | A2 |
| Adição de água entre 50 e 60 °C | 27 | 13 | 2,0 | 0,6 |
| Adição de água a 100 °C, 15 minutos em banho de água a 100 °C e refluxo | 86 | 13 | 3,3 | 1,2 |

Tabela V-4: Valores experimentais de t.

| | t tabelado = 2,31 | | Valor experimental de t | |
|---------|-------------------|----|-------------------------|------|
| | A1 | A2 | A1 | A2 |
| Nitrato | | | 1,32 | 0,53 |
| Nitrito | | | 0,32 | 1,10 |

Como se pode observar, os valores de t experimental são sempre mais baixos do que o valor de t tabelado para 8 graus de liberdade (2,31), razão pela qual se aceita a hipótese nula como sendo verdadeira, ou seja, não existe uma diferença significativa nos resultados ao seguir o procedimento da bibliografia. Assim, continuou-se a realizar a extração dos analitos de interesse com a adição de água quente entre 50 e 60°C.

Após os estudos descritos acima, a única alteração adotada relativamente ao aconselhado na norma foi a preparação das soluções padrão, passando estas a ser preparadas em fase móvel em vez de água.

Ao longo do tempo de vida de uma coluna de troca iónica, o tempo de retenção dos analitos vai diminuindo. Tal facto verificou-se neste trabalho, uma vez que a coluna era nova e teve de estabilizar. Assim, o tempo de corrida inicial era de cerca de 40 minutos, e no fim do estudo era cerca de 30 minutos.

V.2 – Validação do método

V.2.1 – Especificidade e Seletividade

Para a avaliação deste parâmetro foi realizada a análise de duas amostras de peixe fresco: maruca (A10) e carapau (A9). Ambos não têm indicação de ser adicionado nitrito ou nitrato. Uma vez que a maruca apresentou uma pequena quantidade de nitrato, escolheu-se então a amostra de carapau (A9) para a realização deste ensaio. As figuras V-4 e V-5 mostram a diferença entre a amostra A9 sem e com a adição dos padrões de nitrato e nitrito.

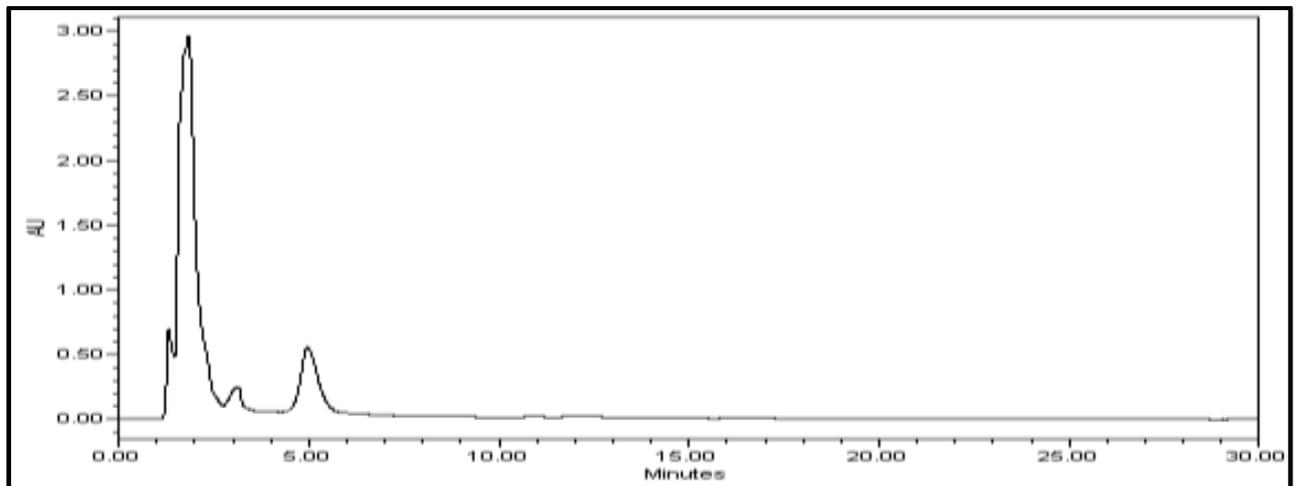


Figura V-4: Cromatograma da amostra A9 sem adição de padrão.

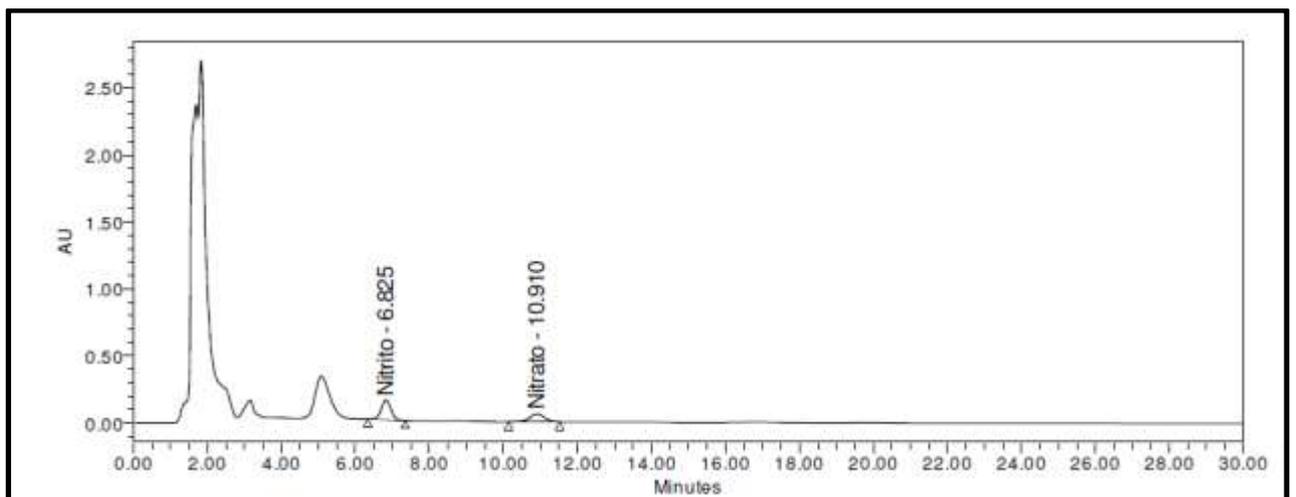


Figura V-5: Cromatograma da amostra A9 com adição de padrão de nitrato de potássio e nitrito de sódio.

É possível observar que não existiu nenhuma substância interferente com os analitos de interesse, razão pela qual se pode afirmar que este método é específico e seletivo para a detecção e quantificação dos analitos em questão.

V.2.2 – Gama de trabalho

A norma EN 12014-4 sugere uma gama de trabalho de 0 a 10 µg de nitrito/mL e de 0 a 20 µg de nitrato/mL. Segundo a norma, o ponto 0 também deverá ser incluído na gama de trabalho.

No entanto, uma vez que existiam fontes bibliográficas que referiam que a inclusão do ponto 0 na curva de calibração levava a erros, pois estamos a forçar a curva de calibração a passar pelo ponto zero, fez-se a experiência: traçaram-se duas curvas de calibração, uma cujo primeiro ponto era o 0 µg /mL e outra cujo primeiro ponto era 0,5 µg de nitrito/mL e 1 µg de nitrato/mL (Coordenação Geral de Acreditação 2010; Ribani et al. 2004). A diferença do declive (sensibilidade) das curvas foi tão elevada, que se optou por não incluir o ponto zero, uma vez que diminuía bastante a sensibilidade do método.

Entretanto, estudou-se a extensão das duas gamas de trabalho. Fizeram-se vários ensaios com amostras de fiambre e salsichas enlatadas (A1 e A2) e chegou-se à conclusão que ambas as gamas de trabalho eram demasiado extensas, principalmente a do nitrato. Optou-se então por trabalhar numa gama de 0,5 a 8,5 µg de nitrito/mL e 1 a 10 µg de nitrato/mL.

Desta forma, para a validação desta nova gama de trabalho, prepararam-se várias réplicas do primeiro e último padrão, e uma réplica por cada ponto intermédio, tal como descrito no ponto 7.2.2 do capítulo III e na tabela IV-5. A tabela V-5 mostra um resumo das réplicas preparadas por cada ponto da curva de calibração para ambos os analitos em estudo.

Tabela V-5: Número de réplicas preparadas para cada ponto da curva de calibração.

| | Número de réplicas |
|--|--------------------|
| P1 (1 µg nitrato/mL e 0,5 µg nitrito/mL) | 10 |
| P2 (2 µg nitrato/mL e 2 µg nitrito/mL) | 1 |
| P3 (4 µg nitrato/mL e 3,5 µg nitrito/mL) | 1 |
| P4 (6 µg nitrato/mL e 5 µg nitrito/mL) | 1 |
| P5 (8 µg nitrato/mL e 6,5 µg nitrito/mL) | 1 |
| P6 (10 µg nitrato/mL e 8 µg nitrito/mL) | 10 |

Pela aplicação do teste de homogeneidade de variâncias numa folha de cálculo de Excel validada no INSA (exemplo no anexo 1) foi possível verificar se existia ou não homogeneidade de variâncias na gama de trabalho. Para tal, através da equação **3.7**, calcularam-se as variâncias associadas às réplicas.

Na tabela V-6 encontram-se reunidos os valores de sinal obtidos para cada réplica e o valor da variância calculado.

Tabela V-6: Valores médios do sinal obtido, em unidades de absorvância, para cada réplica do primeiro e último ponto da curva de calibração e da variância associada.

| Réplica | Nitrato | | Nitrito | |
|-----------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| | P1 - 1 µg/mL | P6 - 10 µg/mL | P1 - 0,5 µg/mL | P6 - 8 µg/mL |
| 1 | 165 768,0 | 1 652 612 | 192 633,0 | 2 980 415 |
| 2 | 210 361,0 | 1 677 095 | 156 819,0 | 2 977 596 |
| 3 | 174 275,0 | 1 698 890 | 212 168,0 | 2 986 758 |
| 4 | 218 817,0 | 1 708 371 | 184 067,0 | 2 964 337 |
| 5 | 187 291,0 | 1 705 624 | 176 709,0 | 2 951 909 |
| 6 | 195 277,0 | 1 741 929 | 179 396,0 | 2 939 514 |
| 7 | 171 054,0 | 1 687 186 | 168 753,0 | 2 939 514 |
| 8 | 197 761,0 | 1 658 022 | 184 774,0 | 2 992 997 |
| 9 | 206 777,0 | 1 787 084 | 184 054,0 | 2 989 281 |
| 10 | 220 7112,0 | 1 722 133 | 205 240,0 | 2 945 067 |
| Variância | 391 913 551 | 1 608 829 813 | 262 583 342 | 413 466 080 |

Através da equação 3.8 ($S_6^2 > S_1^2$), foi possível calcular o valor de PG (tabela V-7)

Tabela V-7: Valores calculados de PG.

| | |
|---------|-----|
| Nitrato | 4,1 |
| Nitrito | 1,6 |

Estes valores foram comparados com o valor de F tabelado para n-1 graus de liberdade (9) de 5,35. Uma vez que os valores calculados são menores do que valor tabelado, conclui-se que a gama de trabalho está bem ajustada e que não existem diferenças de homogeneidade significativas.

Logo, a gama de trabalho foi definida de 1 a 10 μg ião/mL para o nitrato e de 0,5 a 8 μg ião/mL para o nitrito.

V.2.3 – Linearidade das curvas de calibração

Como referido no ponto 7.2.3 do capítulo III, para proceder à avaliação da linearidade das curvas de calibração, construíram-se as mesmas com base na relação entre o sinal medido e a concentração dos padrões (exemplo do relatório obtido a partir do *software Empower* no anexo 2). A linearidade das curvas foi verificada de três formas: através do coeficiente de determinação, através da análise dos resíduos e segundo o teste estatístico de Mandel.

Na figura V-6 encontra-se um exemplo das curvas de calibração para nitrato de potássio e nitrito de sódio.

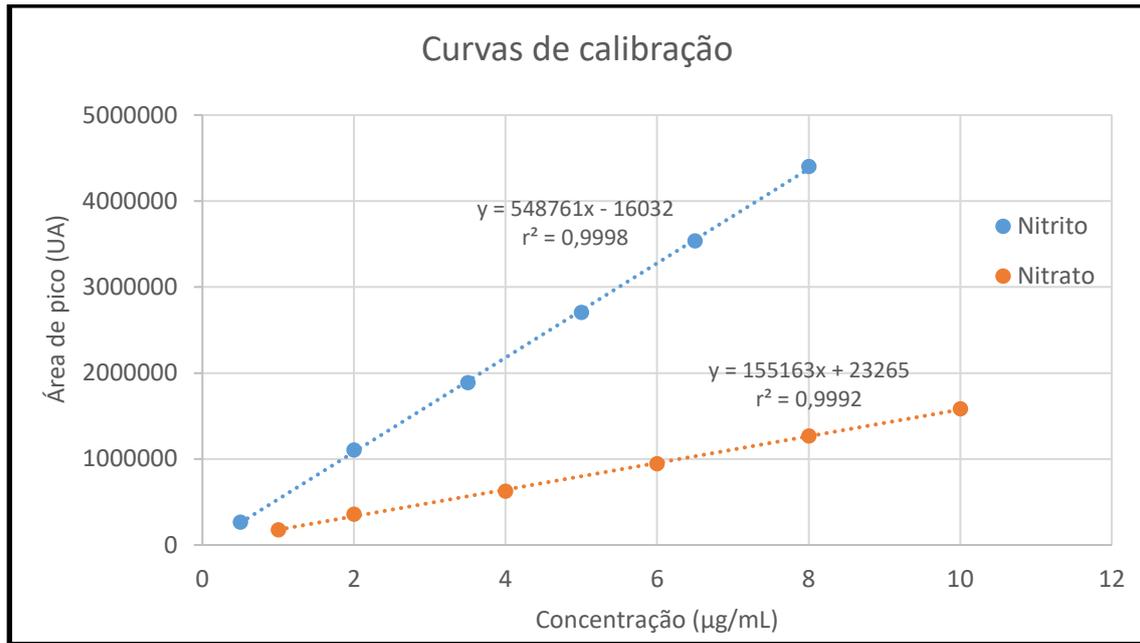


Figura V-6: Curvas de calibração do nitrato e nitrito.

Relativamente ao coeficiente de correlação, r , este deve ser superior a 0,995 (Costa 2015; Sargaço 2013). No entanto, em vez de se adotar este factor, utilizou-se antes o factor de determinação, r^2 , uma vez que este é mais fiável. Este critério (r^2 superior a 0,995) foi respeitado em todos os ensaios realizados.

Os resíduos obtidos para cada ponto da curva de calibração foram retirados do *Software Empower* e também foram analisados nesta etapa. Definiu-se que o valor máximo de cada resíduo deveria de ser 10%, de modo a que se pudesse considerar a curva linear. Este critério foi definido pelo guia de controlo de qualidade interno do INSA e foi cumprido, como se pode ver nas figuras V-7 e V-8.

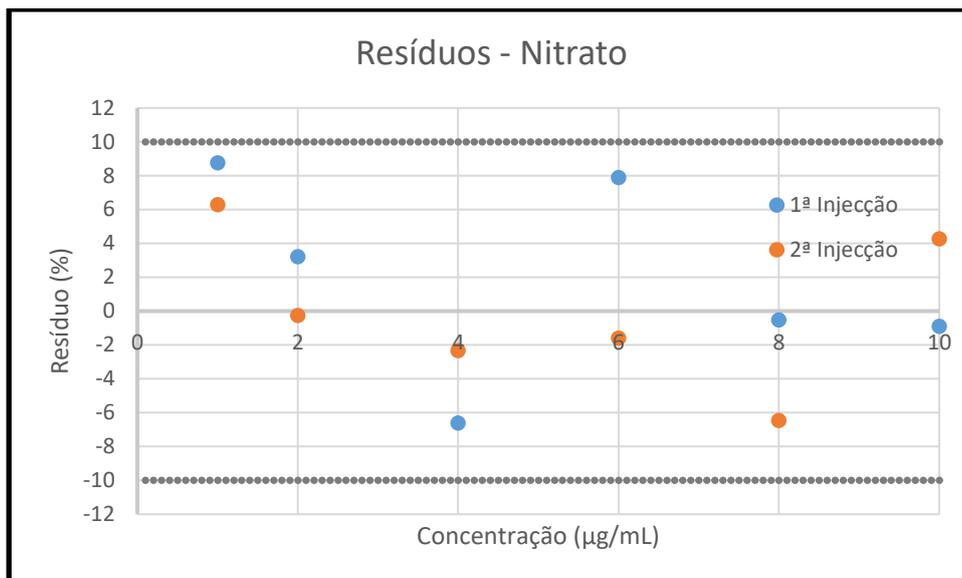


Figura V-7: Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada ponto da curva de calibração do padrão de nitrato de potássio.

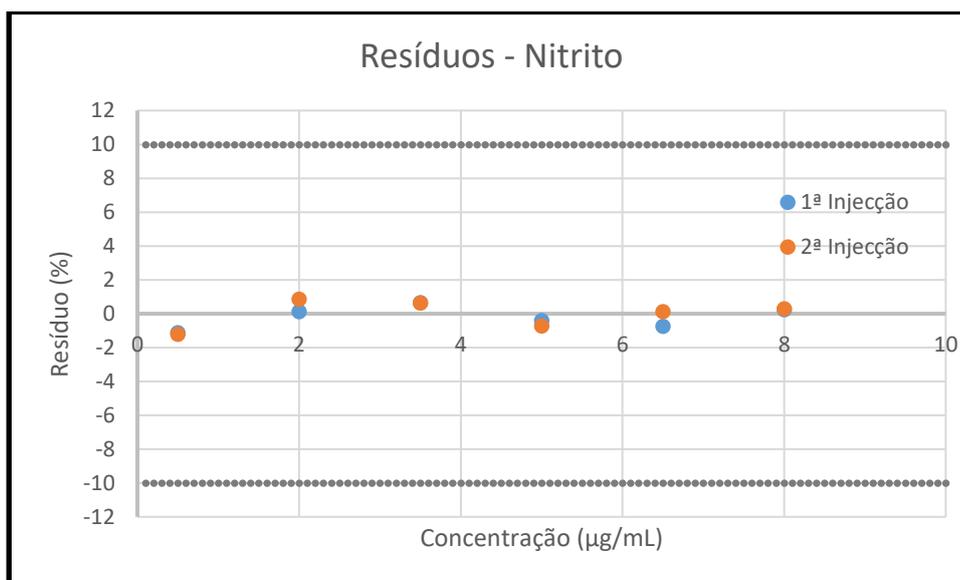


Figura V-8: Representação gráfica dos resíduos obtidos para cada ponto da curva de calibração do padrão de nitrito de sódio.

Como se pode ver por estas figuras, obtiveram-se resíduos mais elevados para o nitrato do que para o nitrito. É possível observar que existe alguma variação nos resíduos obtidos ao longo da curva, o que se pode dever à natureza dos analitos analisados.

Procedeu-se ainda à análise da linearidade das curvas de calibração através do teste de Mandel (folha utilizada no anexo 3). Para tal, calcularam-se as diferenças de variância e os desvios padrão residuais das funções de calibração linear e não linear, com a ajuda da equação 3.11. Por

fim, calculou-se o valor de PG (equação 3.12), obtendo-se 0,63 para o nitrato e 0,44 para o nitrito. Compararam-se estes valores com o valor de F tabelado para n-3 graus de liberdade (10,56).

Uma vez que os valores de PG obtidos foram inferiores ao valor de F tabelado, a função de calibração linear é a mais apropriada.

V.2.4 – Sensibilidade

Através da análise dos declives das curvas de calibração preparadas ao longo do trabalho, avaliou-se a variação da sensibilidade do método ao longo do tempo. Assim, calculou-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação deste parâmetro para ambas as curvas de calibração. Estes resultados encontram-se resumidos na tabela V-8.

Tabela V-8: Sensibilidade média do método, desvio padrão e coeficiente de variação para nitratos e nitritos.

| | Nitrato | Nitrito |
|--------------------------------|---------|---------|
| Sensibilidade (UA/ μ g/mL) | 157 739 | 556 348 |
| Desvio Padrão (UA/ μ g/mL) | 4 031 | 7 419 |
| CV (%) | 2,6 | 1,3 |

Como se pode ver pelos resultados expostos na tabela V-8, o método tem uma sensibilidade bastante elevada para ambos os analitos. Como os valores do coeficiente de variação, calculados com a equação 3.16, são relativamente baixos, 1,33 % para o nitrito e 2,56 % para o nitrato, também se pode afirmar que a sensibilidade do método se manteve aproximadamente constante ao longo do trabalho, embora o nitrito apresente uma maior estabilidade da sensibilidade ao longo do tempo.

V.2.5 – Limites analíticos de deteção e quantificação

Como dito anteriormente no ponto 7.2.5 do capítulo III, existem várias formas de calcular os limiares analíticos de um método. Embora a forma mais utilizada seja através dos parâmetros da curva de calibração, neste trabalho optou-se por calcular os limites do método através da relação sinal/ruído.

Assim, tendo como base o ensaio utilizado para validar a gama de trabalho (ponto 2.2 do capítulo V), fez-se uma média do sinal obtido para 10 réplicas, com 2 injeções cada, de padrão de nitrito de sódio e nitrato de potássio 0,25 $\mu\text{g NO}_2/\text{mL}$ e 0,5 $\mu\text{g NO}_3/\text{mL}$, respetivamente. Fez-se ainda uma média dos dois maiores sinais de ruído obtido nestes ensaios através de uma análise visual de todos os cromatogramas (tabela V-9).

Tabela V-9: Valores obtidos, em UA, em dez réplicas injetadas em duplicado de uma solução de padrão de nitrito de sódio 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e nitrato de potássio 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

| | Ruído | | | | Nitratos | | Nitritos | |
|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1ª injeção | 2ª injeção |
| 1 | 0,000193 | 0,000072 | 0,000112 | 0,000093 | 0,00198 | 0,00182 | 0,00350 | 0,00342 |
| 2 | 0,000203 | 0,000135 | 0,000193 | 0,000076 | 0,00171 | 0,00164 | 0,00344 | 0,00340 |
| 3 | 0,000258 | 0,000451 | 0,000041 | 0,000187 | 0,00166 | 0,00182 | 0,00363 | 0,00374 |
| 4 | 0,000208 | 0,000121 | 0,000142 | 0,000143 | 0,00198 | 0,00198 | 0,00380 | 0,00370 |
| 5 | 0,000197 | 0,000012 | 0,000115 | 0,000002 | 0,00238 | 0,00199 | 0,00356 | 0,00325 |
| 6 | 0,000152 | 0,000072 | 0,000090 | 0,000114 | 0,00266 | 0,00253 | 0,00358 | 0,00347 |
| 7 | 0,000042 | 0,000052 | 0,000062 | 0,000073 | 0,00168 | 0,00169 | 0,00341 | 0,00349 |
| 8 | 0,000101 | 0,000163 | 0,000068 | 0,000208 | 0,00155 | 0,00160 | 0,00380 | 0,00392 |
| 9 | 0,000094 | 0,000211 | 0,000056 | 0,000202 | 0,00171 | 0,00176 | 0,00317 | 0,00317 |
| 10 | 0,000075 | 0,000096 | 0,000086 | 0,000085 | 0,00163 | 0,00168 | 0,00370 | 0,00356 |
| Média | 0,000126 | | | | 0,00187 | | 0,00354 | |

Através destes valores e das relações indicadas no capítulo III, ponto 7.2.5, foi possível calcular os limites de quantificação e deteção. Os valores obtidos foram de 0,001264 UA para o limite de quantificação e 0,000379 UA para o limite de deteção, o que equivale a um LQ de 0,14 $\mu\text{g/mL}$ para o nitrato de potássio e 0,029 $\mu\text{g/mL}$ para o nitrito.

No entanto, neste trabalho, em vez de utilizarmos os valores indicados anteriormente, optou-se por utilizar o primeiro ponto de cada curva de calibração como o limite de quantificação e um terço deste valor como limite de deteção, por uma questão de segurança (tabela V-10).

Tabela V-10: Limites de quantificação e detecção considerados.

| | Nitrato ($\mu\text{g/mL}$) | Nitrito ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Limite de Quantificação | 1 | 0,5 |
| Limite de Detecção | 0,3 | 0,2 |

Para confirmar os valores dos limites propostos na tabela V-10 utilizou-se a amostra A9 (carapau) e seguiu-se o descrito na tabela IV-5, ou seja, fizeram-se 4 tomas da amostra: duas para se poder confirmar que a amostra não contém nitrato ou nitrito (ponto 2.1 do capítulo V) e duas para a confirmação dos limites, às quais adicionaram-se 1,53 mL de diluição intermédia de nitrato de potássio e 1,4 mL de diluição intermédia de nitrito de sódio, tendo em conta que a amostra era diluída em balões de 100 mL.

Na tabela V-11 encontram-se os valores de concentração obtidos para as soluções com adição de padrão e se foi possível confirmar visualmente o pico do limite de detecção nos respetivos cromatogramas (Anexo 4).

Tabela V-11: Limites de quantificação e detecção confirmados.

| | Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$) | | | | Recuperação média (%) | Confirmação do limite de detecção |
|---------|--|-----|---------|-----|-----------------------|-----------------------------------|
| | 1ª toma | | 2ª toma | | | |
| Nitrato | 1,0 | 1,0 | 1,1 | 1,1 | 105 | ✓ |
| Nitrito | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 115 | ✓ |

A partir dos resultados da tabela V-11, pode-se concluir que foi possível confirmar os limites de detecção e quantificação, tendo em conta que as recuperações médias para cada analito estão entre os 80% e os 120% (Costa 2015; Sargaço 2013). Assim, é possível definir $1 \mu\text{g NO}_3^-/\text{mL}$ e $0,33 \mu\text{g NO}_3^-/\text{mL}$ como limites de quantificação e detecção do nitrato e $0,5 \mu\text{g NO}_2^-/\text{mL}$ e $0,17 \mu\text{g NO}_2^-/\text{mL}$ como limites de quantificação e detecção do nitrito.

A partir dos limites analíticos da curva de calibração, foi possível obter os limites do método, tendo em conta as diluições realizadas, com a ajuda da equação 4.1. Estes limites são específicos para as condições utilizadas neste trabalho e encontram-se na tabela V-12.

Tabela V-12: Limites de quantificação e detecção do método.

| | Nitrato (mg/kg amostra) | Nitrito (mg/kg amostra) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Limite de Quantificação | 10 | 5,0 |
| Limite de Detecção | 3,3 | 1,7 |

V.2.6 – Precisão

Neste trabalho foram avaliados dois tipos de precisão: a repetibilidade (ou precisão intra-ensaio) e a precisão intermédia.

Para o estudo da repetibilidade foram analisadas no mesmo dia seis tomas independentes de uma mesma amostra, sob condições idênticas, como referido no ponto 7.2.6 no capítulo III. De modo a avaliar se o método é preciso para mais do que uma matriz, foram testadas duas matrizes representativas das amostras. Para a avaliação da precisão intermédia, realizaram-se os ensaios de repetibilidade em três dias diferentes, com as amostras A1 (fiambre) e A6 (patê de porco).

Em ambos os estudos foram calculados os coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia de acordo com as equações 3.16 e 3.17. Estes coeficientes foram obtidos através de folhas de Excel validadas, que se encontram nos anexos 5, 6 e 7. Os valores dos coeficientes de variação encontram-se nas tabelas V-13 e V-14.

Tabela V-13: Concentração média, desvio padrão e coeficiente de variação da repetibilidade e da precisão intermédia para o nitrato.

| | Dia | Concentração (mg/kg amostra) | Desvio-padrão (mg/kg amostra) | Coeficiente de variação da repetibilidade (%) | Coeficiente de variação da precisão intermédia (%) |
|----|-----|------------------------------|-------------------------------|---|--|
| A1 | 1 | 28 | 1,9 | 6,9 | 9,6 |
| | 2 | 25 | 2,2 | 8,9 | |
| | 3 | 24 | 1,6 | 6,5 | |
| A6 | 1 | 612 | 17 | 2,8 | 2,8 |
| | 2 | 633 | 19 | 3,0 | |
| | 3 | 633 | 4,8 | 0,8 | |

Tabela V-14: Concentração média, desvio padrão e coeficiente de variação da repetibilidade e da precisão intermédia para o nitrito.

| | Dia | Concentração média (mg/kg amostra) | Desvio-padrão (mg/kg amostra) | Coeficiente de variação da repetibilidade (%) | Coeficiente de variação da precisão intermédia (%) |
|----|-----|------------------------------------|-------------------------------|---|--|
| A1 | 1 | 8,4 | 0,04 | 0,53 | 1,9 |
| | 2 | 8,2 | 0,2 | 2,0 | |
| | 3 | 8,1 | 0,1 | 1,6 | |
| A6 | 1 | 8,7 | 0,1 | 1,7 | 3,1 |
| | 2 | 9,2 | 0,2 | 2,0 | |
| | 3 | 9,0 | 0,2 | 2,6 | |

Como mostram as tabelas anteriores, o método é preciso para ambas as matrizes, uma vez que os coeficientes de precisão intermédia são inferiores a 10%. Pode-se observar que no caso da amostra A1, o nitrato tem valores de coeficiente de variação mais elevados do que o nitrito, assim, como uma maior variação dos níveis de nitrato ao longo do tempo. Isto possivelmente deve-se ao facto de que os nitratos e os nitritos serem espécies interconvertíveis, transformando-se facilmente uma na outra e noutros compostos derivados. O nitrito, por sua vez, reage facilmente, transformando-se noutros compostos nitrosados, como ácido nítrico.

V.2.7 – Repetibilidade e linearidade do injetor

Para confirmar se o injetor do sistema de HPLC se encontrava bem calibrado, estudou-se a sua repetibilidade e linearidade em processos de injeção.

Assim, para o estudo da repetibilidade, programou-se o sistema para realizar 10 injeções sucessivas do primeiro e último padrão da curva de calibração. De seguida, calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada padrão com base na área de pico de cada analito. Os resultados encontram-se resumidos na tabela V-15.

Tabela V-15: Resumo dos resultados obtidos no estudo da repetibilidade do injetor, em UA.

| | Nitratos | | Nitritos | |
|---------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
| | P1 (1 µg/mL) | P6 (10 µg/mL) | P1 (0,5 µg/mL) | P6 (8 µg/mL) |
| Média | 185 729,0 | 1 629 807 | 277 957,0 | 4 475 474 |
| Desvio Padrão | 912,9 | 3 688 | 2 105 | 2 383 |
| CV (%) | 0,49 | 0,22 | 0,76 | 0,05 |

Como se pode ver na tabela V-15, o coeficiente de variação foi inferior a 1% para todos os casos. Assim, pode-se afirmar que o injetor apresenta um nível de repetibilidade bastante aceitável.

Foi também realizado um estudo à linearidade do injetor para confirmar a possibilidade de injeção de diferentes volumes. Para tal, programou-se o sistema de HPLC para injetar duas vezes diferentes volumes entre 20 µL e 200 µL de uma solução padrão com 6 µg/mL de ião nitrato e 5 µg/mL de ião nitrito. Para cada volume injetado, calculou-se a média das áreas de pico obtidas nas injeções dos diferentes volumes, o que pode ser observado na tabela V-16.

Tabela V-16: Média dos valores das áreas dos picos obtidos para cada volume injetado e para cada analito de interesse, em UA.

| | Nitrato | Nitrito |
|--------|-----------|------------|
| 20 µL | 470 793,0 | 1 386 672 |
| 40 µL | 953 385,0 | 2 792 765 |
| 60 µL | 1 419 738 | 4 195 696 |
| 80 µL | 1 894 465 | 5 591 351 |
| 100 µL | 2 380 436 | 6 983 444 |
| 120 µL | 2 859 536 | 8 384 933 |
| 140 µL | 3 338 525 | 9 776 211 |
| 160 µL | 3 817 677 | 11 156 615 |
| 180 µL | 4 296 213 | 12 559 616 |
| 200 µL | 4 785 488 | 13 959 744 |

De seguida, fez-se um gráfico representativo da variação do sinal obtido à medida que se aumentou o volume de injeção da solução padrão (figura V-9). A correlação linear deve ter um coeficiente de determinação igual ou superior a 0,995 para se considerar que o injetor é linear. Assim, se o injetor for linear, podemos utilizar o volume injetado para fazer diluições das amostras, aumentando ou diminuindo o volume injetado.

Como se pode ver pela figura V-9, existe uma clara variação linear do sinal obtido em função do volume injetado, obtendo-se um coeficiente de determinação, r^2 , de 1 para ambos os analitos.

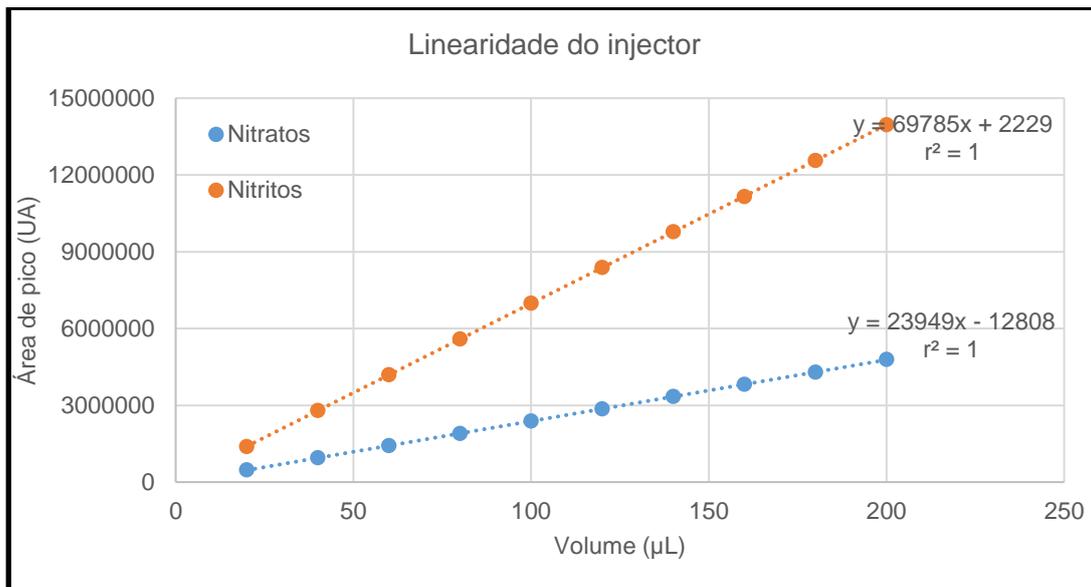


Figura V-9: Correlação linear entre as médias dos valores do sinal obtido e os volumes de injeção.

Com base nos resultados de repetibilidade e linearidade do injetor, pode-se dizer que este se encontra bem calibrado, sendo que pode ser utilizado para diluir ou concentrar a amostra, aumentando ou diminuindo o volume de injeção da amostra.

V.2.8 – Exatidão

A exatidão deste método foi avaliada através da participação num ensaio interlaboratorial. Assim, como referido no capítulo IV, tabela IV-5, a exatidão foi avaliada através de um ensaio com três tomas de cerca de 5 g de uma amostra de carne FAPAS nº 15123. Estas 3 tomas foram processadas da mesma forma que todas as outras amostras: adicionaram-se 25 mL de água entre 50 e 60 °C, homogeneizou-se, acrescentaram-se 25 mL de acetonitrilo, transferiu-se tudo para um balão de 100 mL, aferiu-se o volume e filtraram-se as soluções obtidas.

Após serem feitas as diluições necessárias, obteve-se um valor de 2 214 mg ião nitrato/kg de amostra e 51 mg ião nitrito/ kg de amostra, o que equivale a 3 607 mg de nitrato de potássio/ kg de amostra e 76 mg de nitrito de sódio/ kg de amostra.

Como ainda não existem resultados disponíveis de valores de referência, não foi possível até ao momento calcular o valor de z-score através da equação **3.5**.

V.3 – Estabilidade das curvas de calibração e da fase móvel

Após a validação e a otimização do método, foi considerado importante fazer estudos de estabilidade das curvas de calibração e da fase móvel.

Relativamente à estabilidade das curvas de calibração, a norma em que este trabalho se baseou recomendava que as soluções padrão e as curvas de calibração fossem construídas para cada análise realizada.

Assim, prepararam-se as soluções padrão e guardaram-se em 3 conjuntos de 6 *vials*. De seguida, um desses conjuntos foi injetado no HPLC (dia 1), enquanto que os outros dois conjuntos de 6 *viais* foram armazenados a 4°C. Estes conjuntos de *viais* foram injetados no HPLC dois dias e nove dias após a preparação das soluções, respetivamente dia 2 e dia 9.

Os resultados obtidos em cada análise encontram-se representados nas figuras V-10 e V-11.

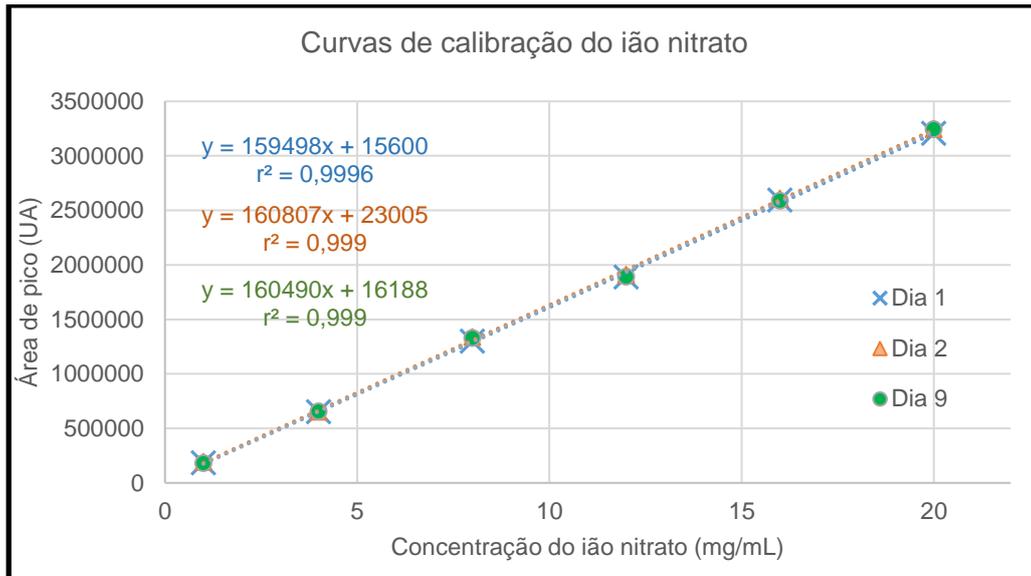


Figura V-10: Curvas de calibração obtidas nos diferentes dias de injeção para o íon nitrato.

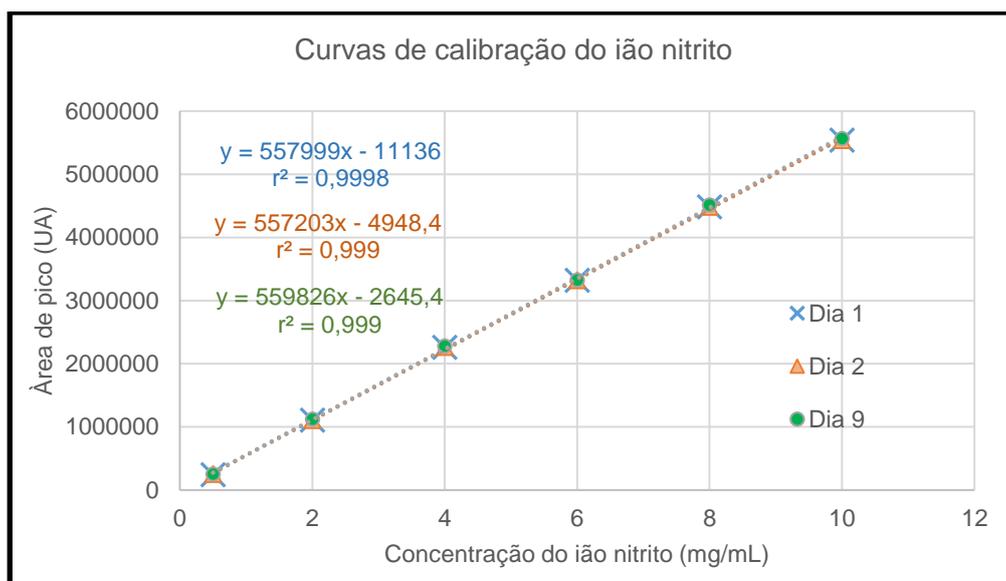


Figura V-11: Curvas de calibração obtidas nos diferentes dias de injeção para o íon nitrito.

Através das equações das curvas de calibração obtidas neste ensaio foram calculados a média, desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros da curva de calibração, como mostram as tabelas V-17 e V-18.

Tabela V-17: Variação do declive das curvas de calibração do nitrato e nitrito ao longo de uma semana, em (UA mL)/mg.

| | Nitrato | Nitrito |
|---------------|---------|---------|
| Média | 160 265 | 558 343 |
| Desvio padrão | 557,58 | 1098,06 |
| CV (%) | 0,35 | 0,20 |

Tabela V-18: Variação do r^2 das curvas de calibração do nitrato e nitrito ao longo de uma semana.

| | Nitrato | Nitrito |
|---------------|---------|---------|
| Média | 1 | 1 |
| Desvio padrão | 0,00005 | 0 |
| CV (%) | 0,00 | 0,00 |

Como se pode observar pelas figuras V-10 e V-11 e nas tabelas V-17 e V18, o declive das retas ao longo dos dias de análise não variou. Compararam-se ainda estes valores com os valores obtidos no estudo da sensibilidade do método (tabela V-8), concluindo-se que de facto, a variação do declive das curvas de calibração ao longo de uma semana não é muita.

Constatou-se então que era viável a construção de uma curva de calibração por cada semana, uma vez que os parâmetros da curva de calibração não variavam ao longo do tempo estudado. No entanto, optou-se por apenas seguir esse procedimento na análise das amostras, sendo que durante o processo de validação e otimização do método foram construídas novas curvas de calibração para cada ensaio realizado.

No que diz respeito à estabilidade da fase móvel, a norma referia que a fase móvel não era estável por mais do que uma semana, e que antes de cada utilização, o pH deveria ser medido para confirmar se estava dentro dos limites aceitáveis (entre 6,4 e 6,6). Assim, para confirmar esta informação, preparou-se fase móvel, da qual se recolhe uma fração que foi guardada em condições ambientais. No dia de preparação da fase móvel mediu-se o pH (dia 1), assim como 3 dias depois (dia 4), 9 dias depois (dia 10) e 15 dias depois (dia 16), cujos valores se apresentam na tabela V-19.

Tabela V-19: Valores de pH da fase móvel ao longo de duas semanas.

| | Valor de pH medido |
|--------|--------------------|
| Dia 1 | 6,5 |
| Dia 4 | 6,5 |
| Dia 10 | 6,6 |
| Dia 16 | 6,6 |

Como se pode ver pelos resultados apresentados na tabela V-19, o pH da fase móvel mantém-se estável por pelo menos 2 semanas à temperatura ambiente. Assim, foi possível preparar fase móvel para mais do que um ensaio de cada vez.

V.4 – Análise das amostras

Neste trabalho foram analisadas 17 amostras diferentes, sendo que para algumas delas foram analisados mais do que um lote (tabela IV-2). A análise foi feita de acordo com o descrito no capítulo IV, ponto 6. Cada amostra foi analisada em triplicado e adicionou-se 1 mL de cada solução-mãe padrão a cada terceira toma de amostra, de modo a calcular a taxa de recuperação segundo a equação 5.4 (anexo 8).

$$\text{Taxa de Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}}}{C_{\text{adicionada}}} \quad 5.4$$

Onde:

$C_{\text{fortificada}}$ – Concentração da amostra fortificada;

C_{matriz} – Concentração da amostra sem adição de analitos;

$C_{\text{adicionada}}$ – Concentração adicionada de analito.

A tabela V-20 reúne os resultados obtidos para cada amostra e para cada analito em estudo. Nesta tabela, para as amostras em que foram analisados mais do que um lote (A1, A2, A6), o valor apresentado corresponde ao valor médio de todos os lotes.

Tabela V-20: Concentração média e taxa de recuperação nas amostras para o nitrato e o nitrito.

| | Amostra | Concentração (mg KNO ₃ /kg amostra) | Taxa de recuperação (%) | Concentração (mg NaNO ₂ /kg amostra) | Taxa de recuperação (%) |
|------|-----------------------------------|--|-------------------------|---|-------------------------|
| A 1 | Fiambre da pá | 43 | 64 | 15 | 68 |
| A 2 | Salsichas | 92 | 74 | <LQ | 71 |
| A 3 | Salsichas | 48 | 63 | <LQ | 60 |
| A 4 | Fiambre | 31 | 59 | 20 | 66 |
| A 5 | Salame | 648 | 74 | <LQ | 59 |
| A 6 | Patê de porco | 1190 | 50 | 20 | 70 |
| A 7 | Bolo e queques | 29 | 59 | <LQ | 70 |
| A 8 | Massa | 19 | 55 | <LQ | 68 |
| A 9 | Carapau fresco | - | - | - | - |
| A 10 | Maruca fresca | 14 | - | - | - |
| A 11 | Presunto e Bacon | 196 | 50 | <LQ | 70 |
| A 12 | Fiambre | 142 | 51 | <LQ | 67 |
| A 13 | Chouriço, paio alheira, chourição | 173 | 79 | <LQ | 62 |
| A 14 | Salsichas | 60 | 62 | <LQ | 69 |
| A 15 | Fiambre de perú | 122 | 67 | <LQ | 66 |
| A 16 | Fiambre da pá | 121 | 61 | <LQ | 67 |
| A 17 | Fiambre da perna | 102 | 53 | <LQ | 63 |

Com se pode observar na coluna relativa às recuperações, estas encontram-se sempre acima de 50%. No entanto, esperar-se-iam recuperações mais elevadas, mas é possível que tal não aconteça devido à combinação de perdas dos analitos durante o procedimento experimental, uma vez que as amostras são transferidas várias vezes, assim como outros factores, como por exemplo, uma extração menos eficiente.

Como se pode observar pelas tabelas V-20, a maior parte das amostras analisadas não contém valores quantificáveis/possíveis de detectar de nitrito, o que pode ser devido ao facto de este ser muito reativo, transformando-se facilmente em nitrato (por oxidação) ou noutras espécies nitrosadas. Uma outra razão para este facto pode ser a adição de nitratos em maior quantidade do que os nitritos pelos fabricantes, de modo a que o nitrato se comporte como reserva de nitrito (Hsu *et al.* 2009).

No entanto, relativamente às amostras que têm níveis de nitrito quantificáveis estes encontram-se dentro dos valores permitidos por lei, de 50 mg/kg amostra (tabela III-2).

Já os teores de nitrato encontram-se dentro dos valores legislados, de 250 mg/kg amostra (tabela III-2), exceto para duas amostras: A5 (salame) e A6 (patê de porco), que têm níveis de nitrato de 648 e 1 190 mg de KNO_3 /kg amostra, respetivamente.

Como mostra a tabela V-21, o rótulo da amostra A5 (salame) informa o consumidor que este produto tem adição de E 250 (nitrito de sódio) e E 252 (nitrato de potássio) embora não refira as quantidades em que são adicionados. Assim, é suposto encontrar nitrato e nitrito nesta amostra. No entanto, apenas foi encontrado nitrato, embora não se possa dizer que todo o nitrato encontrado tenha sido adicionado nessa forma, uma vez que o nitrato e o nitrito se transformam um no outro.

Já o rótulo da amostra A6 (patê de porco) indica que existe apenas a adição de nitrito de sódio. No entanto, além de se ter encontrado nitrito, também se encontrou nitrato ao realizar a análise a esta amostra. É referida uma observação semelhante num estudo realizado em 2008, que mostrou que cerca de 10% a 40% do nitrito adicionado se transforma em nitrato (Honikel 2008). Embora o rótulo indique que não foi adicionado nitrato à amostra A 6, foram encontrados teores superiores ao permitido por lei, consegue-se presumir que de facto o nitrito se transforma facilmente em nitrato por oxidação. Outra hipótese para se encontrarem valores superiores ao permitido por lei pode ser um possível incumprimento pela parte do industrial ou até mesmo a contaminação prévia da carne utilizada para este produto com nitrato

Tabela V-21: Indicações dos rótulos das amostras A 5 e A 6 relativamente aos compostos adicionados como conservantes.

| | E 249 | E 250 | E 251 | E 252 |
|----|-------|-------|-------|-------|
| A5 | x | ✓ | x | ✓ |
| A6 | x | ✓ | x | x |

Comparando os teores de nitratos e nitritos obtidos neste trabalho com os teores obtidos por outros trabalhos, referidos na introdução, pode-se observar que os teores de nitrato são mais elevados do que os teores de nitritos obtidos, sendo que ao contrário do obtido no trabalho de alguns autores, várias amostras chegam mesmo a não apresentar níveis quantificáveis/possíveis de detectar de nitritos (Bahadoran *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2014).

V.4.1 – Avaliação da homogeneidade dos lotes

Como dito anteriormente, em algumas amostras, nomeadamente as amostras A1 (fiambre), A2 (salsichas) e A6 (patê de porco), analisou-se mais do que um lote. Assim, foi possível estudar a variância da homogeneidade entre cada lote da mesma amostra e entre cada amostra. Para tal, recorreu-se ao método estatístico ANOVA de um factor para comparar os vários ensaios que foram feitos a cada lote. Este teste avalia a variância que existe nos resultados comparando-os através das suas médias, sendo necessários pelo menos dois conjuntos de resultados. Baseia-se no estabelecimento de duas hipóteses:

- H_0 ou Hipótese nula – as médias dos resultados são iguais;
- H_1 ou Hipótese alternativa – as médias dos resultados têm uma diferença significativa.

É ainda necessário estabelecer um nível de confiança para o qual o teste é feito, neste caso, 0,05 (intervalo de confiança de 95%). De seguida, compara-se o valor de F obtido com o valor de $F_{\text{crítico}}$. Se o valor de F for superior ao valor de $F_{\text{crítico}}$, aceita-se a hipótese alternativa como verdadeira e rejeita-se a hipótese nula; se F for inferior ao $F_{\text{crítico}}$, aceita-se a hipótese nula como verdadeira (Miller & Miller 1993).

Os teores de nitrato e nitrito obtidos em cada lote encontram-se reunidos no anexo 9. A partir desses dados foi realizado o teste da ANOVA, obtendo-se os valores de F e $F_{\text{crítico}}$ que estão na tabela V-22.

Tabela V-22: Valores de F e $F_{\text{crítico}}$ obtidos para o nitrato e o nitrito.

| | Analito | F | $F_{\text{crítico}}$ |
|----|---------|-------|----------------------|
| A1 | Nitrato | 3,6 | 3,4 |
| | Nitrito | 7,0 | 3,4 |
| A2 | Nitrato | 11,2 | 4,5 |
| A6 | Nitrato | 574,2 | 10,1 |
| | Nitrito | 1872 | 10,1 |

As tabelas da análise ANOVA realizada para cada amostra e cada analito encontram-se no anexo 10.

Como se pode observar, em todas as situações, o $F_{\text{crítico}}$ é inferior ao valor de F, o que leva à conclusão de que é necessário rejeitar a hipótese nula e aceitar a hipótese alternativa, ou seja, as médias dos teores dos lotes são significativamente diferentes. Isto quer dizer que os lotes não apresentam homogeneidade entre si. Este facto pode dever-se à natureza interconvertível dos dois analitos, uma vez que consoante o tempo de armazenamento, os teores de nitratos e nitritos vão-se alterando.

V.5 – Exposição da população

Como visto anteriormente no ponto 4 do capítulo III, o consumo de nitratos e nitritos tem impacto na saúde dos consumidores, pelo que é importante conhecer a exposição da população a estes iões. Para tal, utilizaram-se dados de consumo de cada uma das amostras à base de carne do estudo *TDS- Exposure* (amostras A11 a A14), fornecidos pelo DAN (tabela V-23) (Poínhos et al. 2009).

Estes dados combinados com os dados obtidos a partir da análise das amostras, e utilizando a equação III-1, obtiveram-se os resultados expostos na tabela V-23.

Tabela V-23: Dados de consumo, teor de nitratos e resultados da exposição da população a nitratos.

| | Amostras | Consumo (g/(kg massa corporal/ dia)) | Teor de nitrato (mg/g amostra) | Exposição (mg/kg massa corporal/ dia)) |
|-----|---------------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| A11 | Presunto e bacon | 0,03 | 0,1206 | $3,979 \times 10^{-3}$ |
| A12 | Fiambre | 0,11 | 0,0871 | $9,331 \times 10^{-3}$ |
| A13 | Chouriço, paio, alheira, chourição | 0,05 | 0,1063 | $4,922 \times 10^{-3}$ |
| A14 | Salsichas | 0,02 | 0,03669 | $5,588 \times 10^{-4}$ |

Uma vez que não foram encontrados valores quantificáveis de nitritos na maioria das amostras, nomeadamente nas amostras do estudo *TDS-Exposure*, este cálculo foi apenas feito para os nitratos. Como se pode ver pelos valores obtidos, nenhum destes valores se aproxima da DDA de 3,7 mg/ kg massa corporal/dia para o nitrato.

Existem estudos recentes, que referem que os produtos à base de carne representam apenas cerca de 5% da ingestão de nitratos e nitritos (Bryan & Ivy 2015). Também existem referências que enfatizam que o consumo geral de nitratos e nitritos nos EUA é de cerca de 40 a 100 mg/dia, enquanto que na Europa é entre 50 e 140 mg/dia (na Europa são consumidos mais vegetais e frutas, que contêm bastantes nitratos) (ATSDR 2013). Comparando estes valores com os valores obtidos de exposição da população por parte dos alimentos à base de carne, pode-se observar que estes não contribuem significativamente para a exposição da população a nitratos e nitritos.

VI – Conclusão

Através da realização deste trabalho foi possível concluir que o método de HPLC de troca iônica utilizado é adequado para determinar teores de nitratos e nitritos em amostras à base de carne, assim como amostras à base de cereais e peixe.

Relativamente à otimização do método, foram estudados vários parâmetros, nomeadamente o comprimento de onda de deteção, a composição da fase móvel, a preparação dos padrões, fluxo da fase móvel e temperatura de extração dos analitos. Concluiu-se que seriam de manter os valores dos parâmetros indicados na norma de referência (EN 12014-4), exceto a preparação dos padrões, que em vez de serem preparados em água passaram a ser preparados em fase móvel, de modo a facilitar a visualização e integração dos picos dos analitos de interesse

Na fase de validação do método conseguiu-se mostrar que este é seletivo e/ou específico para os analitos de interesse. As curvas de calibração obtidas são lineares, o que foi confirmado através do teste de Mandel. Os limites de quantificação e deteção foram calculados, obtendo-se os valores de 10 mg ião nitrato/kg amostra e 5 mg ião nitrito/ kg amostra, e 3,3 mg ião nitrato/kg amostra e 1,7 mg ião nitrito/ kg amostra, respetivamente. Foram obtidos os valores abaixo de 10% para o coeficiente de variação nos estudos de precisão intermédia e de repetibilidade. Estudou-se ainda a repetibilidade do injetor e a sua linearidade, assim como a sensibilidade do método, podendo-se concluir que o método é sensível aos analitos, e que o injetor apresenta uma boa repetibilidade e linearidade. Por fim, realizou-se uma análise à amostra FAPAS nº 15 123, obtendo-se um valor de 2 214 mg de nitrato/kg amostra e 51 mg nitrito/kg amostra. Não foi possível comparar estes valores com valores de referência, pois até ao momento não foi recebida essa informação. Assim, não foi possível concluir para já o valor da exatidão do método.

Relativamente às amostras analisadas, a maior parte destas não apresenta valores de nitritos: apenas as amostras A 1, A 4 e A 6 mostraram níveis de nitrito quantificáveis. Os teores de nitrito encontrados nestas amostras estavam bastante abaixo dos níveis permitidos por lei.

Já em relação aos nitratos, todas as amostras apresentaram teores de nitratos quantificáveis, exceto a amostra A 9, utilizada para mostrar a seletividade e especificidade do método. As amostras A 5 e A 6 apresentam teores de nitrato de 648 e 1 190 mg de nitrato de potássio/kg amostra, respetivamente. Estes valores são bastante mais elevados do que os teores permitidos por lei.

Foi realizado um estudo à estabilidade da fase móvel e das curvas de calibração. Concluiu-se que a fase móvel é estável por, pelo menos, 2 semanas à temperatura ambiente, enquanto que as curvas de calibração do nitrato e do nitrito são estáveis, pelo menos, por uma semana.

Fez-se uma análise da homogeneidade dos vários lotes de três amostras diferentes, utilizando-se o teste estatístico ANOVA. Com base nos resultados obtidos a partir deste teste, foi possível constatar que os teores de nitratos e nitritos presentes nestas amostras diferiam significativamente de lote para lote. Isto provavelmente deve-se ao facto de que os nitratos e nitritos se interconverterem ao longo do tempo de armazenamento.

Por fim, estudou-se a exposição da população ao nitrato a partir dos resultados obtidos para as amostras do projeto *TDS exposure* à base de carne. Com base nos resultados pode-se concluir que embora sejam adicionados nitratos e nitritos aos alimentos à base de carne, estes não contribuem significativamente para a exposição da população a nitratos, pois obtêm-se valores inferiores a 0,01 mg nitrato/(kg massa corporal/dia), o que é bastante inferior à DDA de 3,7 mg nitrato/(kg massa corporal/dia).

Foi possível verificar através da pesquisa bibliográfica realizada no âmbito deste trabalho que existe bastante controvérsia no que diz respeito aos efeitos na saúde do consumidor destes dois compostos, pois alguns autores evidenciam os efeitos adversos, como a potencial relação com o aparecimento de vários tipos de cancro, enquanto de outros autores demonstram os efeitos benéficos do consumo destes analitos em doses moderadas, nomeadamente a nível cardiovascular, imunológico e na neuro-transmissão.

Este trabalho já deu origem a duas comunicações, ambas apresentadas sob a forma de poster (anexos 11 e 12).

VII – Perspetivas futuras

Apresentam-se em seguida algumas sugestões de trabalho futuro relacionadas com este trabalho, dando continuidade ao tema apresentado neste Trabalho Final de Mestrado:

- Fazer um estudo da variação da concentração de nitrato e nitrito nas amostras ao longo de vários tempos de armazenamento;
- Testar novas formas de armazenamento de amostras, como por exemplo, desidratar as mesmas antes de as congelar, uma vez que o nitrato e nitrito são extremamente solúveis em água;
- Estudar e implementar formas de melhorar as recuperações do método;
- Realizar mais estudos sobre a homogeneidade dos lotes de diferentes amostras, de modo a confirmar se é prática comum existirem diferenças significativas entre eles.

VIII – Referências bibliográficas

- Andrée, S., Jira, W., Achwind, K.-H., Wagner, H., Schwägele, F., 2010, Chemical safety of meat and meat products, *Meat Science*, 86 (1), pp.38–48.
- Arneth, W. & Herold, B., 1988,. Nitrate nitrite determination in sausages after enzymatic reduction, *Fleischwirtschaft*, 68, pp.761–764.
- Arnich, N., Sirot, V., Rivière, G., Jean, J., Noël, L., Guérin, T., Leblanc, J.-C., 2012, Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French Total Diet Study, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (7), pp.2432–2449.
- ATSDR, 2013, ATSDR Case Studies in environmental Medicine -Nitrate/Nitrite toxicity.
- Badea, M., Amine, A., Palleschi, G., Moscone, D., Volpe, G., Curulli, A., 2001, New electrochemical sensors for detection of nitrites and nitrates, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509 (1), pp.66–72.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Ghasemi, A., Kabir, A., Azizi, F., Hadaegh, F., 2015, Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis, *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 47 (24), pp.65–76.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Jeddi, S., Azizi, F., Ghasemi, A., Hadaegh, F., 2016, Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats, *Journal of Food Composition and Analysis* , 51, pp.93–105.
- Barros, C.B., 2016. Validação de Métodos Analíticos. , pp.175–177.
- Branen, A.L., Davidson, P. M., Salminen, S., Thorngate III, J. H., 2001, *Food Additives*, 2ª edição, Marcel Dekker, Inc.
- Brito, N.M., Junior, O. P. A., Polese, L., Ribeiro, M. L., 2003, Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão, *Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13, pp.129–146.
- Brul, S. & Coote, P., 1999, Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, 50 (1–2), pp.1–17.
- Bryan, N.S., Alexander, D. D., Coughlin, J. R., Milkowski, A. L., Boffetta, P., 2012, Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review., *Food and Chemical Toxicology*, 50 (10), pp.3646–3665.

- Bryan, N.S. & Ivy, J.L., 2015, Inorganic Nitrite and Nitrate: Evidence to Support Consideration as Dietary Nutrients, *Nutrition Research*, 35 (8), pp.643–654.
- Cammack, R., Joannou, C. L., Cui, X.-Y., Martinez, C. T., Maraj, S. R., Hughes, M. N., 1999, Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, pp.475–488.
- Chenni, F.Z., Taché, S., Naud, N., Guéraud, F., Hobbs, D., Kunhle, G. G. C., Pierre, F. H., Corpet, D. E. 2013, Heme-Induced Biomarkers Associated with Red Meat Promotion of colon Cancer Are Not Modulated by the Intake of Nitrite, *Nutrition and cancer*, 65(2), pp.227–233.
- Cockburn, A., Brambilla, G., Fernández, M.-L., Arcella, D., Bordajandi, L. R., Cottrill, B., Peteghem, C., Dorne, J.-L., 2013, Nitrite in feed: from animal health to human health, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 270 (3), pp.209–217..
- Comissão Europeia, 1997, Opinions of the scientific committee for food on: nitrates and nitrite, Draft Commission Directive Laying Down Specific Purity Criteria on Food Additives Other than Colours and Sweeteners, Cyclamic Acid and Its Sodium and Calcium Salts, The Safety in Use of 1,1,1,2-Tetrafluoroethane as a Solvent for Flavour Extraction Bovine Spongiform Encephalopathy, *Reports of the scientific committee for food*, 38.
- Coordenação Geral de Acreditação, 2010. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ-CGCRE-008.
- Costa, J.C.D., **Validação de um Método de Cromatografia de Alta Eficiência para Determinação de Conservantes em Géneros Alimentícios**, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2015.
- Decreto de Lei nº 121/98, Diário da República nº 106/1998, Série I-A, 08 de Maio de 1998.
- Decreto de lei nº 365/98, Diário da República nº 270/1998, Série I-A, 21 de Novembro de 1998.
- Decreto de Lei nº 64/2011, Diário da República nº 89/2011, Série I, 09 de Maio de 2011.
- Dennis, M.J., Key, P. E., Papworth, T., Pointer, M., Massey, R. C., 1990, The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC/UV, *Food Additives and Contaminants*, 7 (4), pp.455–461.
- De Smet, S. & Vossen, E., 2016, Meat: The balance between nutrition and health. A review., *Meat Science*, 120, pp.145–156.
- Dionex, 1998, *Determination of Nitrate and Nitrite in Meat Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography*, Application Note 112.

- EFSA, 2008, Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain, *EFSA Journal*, 689 (April), pp.1–79.
- EFSA, FAO & WHO, 2011, Technical Report of EFSA , FAO and WHO: State of the art on Total Diet Studies based on the replies to the EFSA/FAO/WHO questionnaire on national total diet study approaches, Geneva , Switzerland., 206, pp.1–38.
- EMA, 2012, Guideline on bioanalytical method validation, *Committee for Medicinal Products for Human Use*, 44 (July 2011), pp.1–23.
- EN 12014-4, European Committee for Standardization, Norma Europeia EN 12014-4, Foodstuffs – Determination of nitrate and/or nitrite content – Part 4: Ion-Exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products, 2005
- EUFIC, 2015, Food additives, Disponível em: <http://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/food-additives>, Consultado a 09 de Novembro de 2017
- EUFIC, 2014, Food additives and their re-evaluation in the EU, Disponível em: <http://www.eufic.org/en/whats-in-food/article/food-additives-and-their-re-evaluation-in-the-eu>, Consultado a 09 de Janeiro de 2018.
- FAO, Chemical risks and JECFA, Disponível em: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>., Consultado a 10 de Dezembro de 2017
- Food Standards of Australia and New Zealand, 2015, Survey of nitrates and nitrites in food and beverages in Australia.
- G.E. Healthcare, 1968, Ion exchange chromatography, *Analytical chemistry*, 40 (5).
- Giri, D., 2015, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications, Disponível em: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>, Consultado a 08 de Março de 2017.
- González, A.G. & Herrador, M.Á., 2007, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (3), pp.227–238.
- Gorenjak, A.H. & Cencic, A., 2013, Nitrate in vegetables and their impact on human health. A review., *Acta Alimentaria*, 42 (2), pp.158–172.
- Govari, M. & Pexara, A., 2015, Nitrates and nitrites in meat products, *Journal of the Hellenic*

Veterinary Medical Society, 66 (3), pp.127–140.

Healthline, 2017, Are nitrates and nitrites in foods harmful? Disponível em:

<https://www.healthline.com/nutrition/are-nitrates-and-nitrites-harmful>, Consultado a 17 de Novembro de 2017.

Honikel, K.-O., 2008, The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products, *Meat Science*, 78 (1–2), pp.68–76.

Hord, N.G., Ghannam, J. S., Garg, H. K., Berens, P. D., Bryan, N. S., 2011, Nitrate and Nitrite Content of Human, Formula, Bovine, and Soy Milks: Implications for Dietary Nitrite and Nitrate Recommendations, *Breastfeeding Medicine*, 6 (6), pp.393–399.

Hord, N.G., Tang, Y. & Bryan, N.S., 2009, Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic contact for potential health benefits, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (6), pp.1–10.

Hsu, J., Arcot, J. & Lee, N.A., 2009, Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians, *Food Chemistry*, 115 (1), pp.334–339.

Iammarino, M., Di Taranto, A. & Cristino, M., 2013, Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring, *Food Chemistry*, 140 (4), pp.763–771.

Iammarino, M., Di Taranto, A. & Cristino, M., 2014, Monitoring of nitrites and nitrates levels in leafy vegetables (spinach and lettuce): A contribution to risk assessment, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (4), pp.773–778.

ICH, 1996, Guidance for Industry: Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology.

ISO 20 541, International Standard Organization, ISO 20541: Milk and Milk products- determination of nitrate content - Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction, 2008.

ISO 17025, International Standard Organization, ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, 2005.

Jaworska, G., 2005, Content of nitrates, nitrites, and oxalates in New Zealand spinach, *Food Chemistry*, 89 (2), pp.235–242.

Jiang, J., Lu, S., Zhang, H., Liu, G., Lin, K., Huang, W., Luo, R., Zhang, X., Tang, C. Yu, Y., 2015, Dietary intake of human essential elements from a Total Diet Study in Shenzhen, Guangdong

- Province, China, *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, pp.1–7.
- Linde, 2017, High performance liquid chromatography (HPLC), Disponível em: http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/high_performance_liquid_chromatography.html, Consultado a 8 de Março de 2017.
- Lopez-Moreno, C., Pérez, I. V. & Urbano, A.M., 2016, Development and Validation of an Ionic Chromatography Method for the Determination of Nitrate, Nitrite and Chloride in Meat, *Food Chemistry*, 194, pp.687–694.
- Merck, 2017, Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/PT/en>, consultado a 15 de Novembro de 2017.
- Merusi, C., Corradini, C., Cavazza, A., Borromei, C., Salvadeo, P., 2010, Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal, *Food Chemistry*, 120 (2), pp.615–620.
- Miller, J.C. & Miller, J.N., 1993, *Statistics for Analytical Chemistry*, Pearson, 3ª edição.
- Moy, G.G. & Vannoort, R.W., 2013, *Total diet studies*, Springer.
- Msagati, T., 2012. *Chemistry of food additives and presevatives*, Wiley-Blackwell, 1ª edição.
- Nagaraj, P., Prakash, J. S., Shivakumar, A., Shrestha, A. K., 2008, Sensitive spectrophotometric methods for the assessment of nitrite in water sample, *Environmental Monitoring and Assessment*, 147 (1–3), pp.235–241.
- Nagaraja, P., Al-Tayar, N. G. S., Shivakumar, A., Shrestha, A. K., Gowda, A. K., 2010, A simple and sensitive spectrophotometric method for the determination of trace amounts of nitrite in environmental and biological samples using 4-amino-5-hydroxynaphthalene-2,7-disulphonic acid monosodium salt, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75 (5), pp.1411–1416.
- Nakatani, N., Kozaki, D., Mori, M., Tanaka, K., 2012, Recent Progress and Applications of Ion-Exclusion/Ion-Exchange Chromatography for Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations, *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 28 (9), pp.845–852.
- Nollet, L.M.L., 2000, *Food analysis by HPLC*, Marcel Dekker, inc., 2ª edição, NY, p.1170.
- Omar, S.A., Artime, E. & Webb, A.J., 2012, A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites,

Nitric Oxide - Biology and Chemistry, 26 (4), pp.229–240.

Pallastrelli, M.B., **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol** **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos enantiosseletivos para separação e determinação do esmolol e sotalol**, Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de S. Paulo, 2013.

Pennington, J.A.T., 1998, Dietary exposure models for nitrates and nitrites, *Food Control*, 9 (6), pp.385–395.

Pennington, J.A.T., 2000, Total Diet Studies — Experiences in the United States, *Journal of Food Composition and Analysis*, 13 (4), pp.539–544.

Pharmacopeia, U.S., High Pressure Liquid Chromatography, Disponível em:

http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c621s9.html, Consultado a 8 de Março de 2017.

Póinhos, R., Franchini, B. & Afonso, C., 2009, Alimentação e estilos de vida da população Humana Portuguesa: metodologia e resultados preliminares, *Alimentação*, 15 (3), pp.43–60.

Porcelli, S., Pugliese, L., Rejc, E., Pavei, G., Bonato, M., Montorsi, M., La Torre, A., Rasica, L., Marzorati, M., 2016, Effects of a Short-Term High-Nitrate Diet on Exercise Performance, *Nutrients*, 8 (9), pp.534–546.

Porto, A. A., **Contributo para a estimativa da prevalência da ingestão de edulcorantes intensos num grupo de jovens estudantes em Portugal continental**, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2010.

Reece, P. & Hird, H., 2000, Modification of the ion exchange HPLC procedure for the detection of nitrate and nitrite in dairy products, *Food Additives and Contaminants*, 17 (3), pp.219–222.

Regulamento 1129/2011 da Comissão, de 11 de Novembro de 2011, que altera o anexo II do regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares, *Jornal Oficial da União Europeia* L 295/1, 12 de Novembro de 2011.

Regulamento 1333/2008 do Parlamento europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares, *Jornal Oficial da União Europeia* L 354/16, 31 de Dezembro de 2008.

RELACRE, 2000, Guia RELACRE 13 - *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise*

Química,

- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Colins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., 2004, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, *Química Nova*, 27 (5), pp.771–780.
- Sanchez, M., 2014, Food Additives, *Food Law and Regulation for Non-Lawyers: A US Perspective*, Springer, pp. 165–195.
- Sargaço, B.R., **Otimização e calidação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa**, Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2013.
- Sigma-Aldrich, 2017. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>, Consultado a 15 de Novembro de 2017.
- Sindelar, J.J. & Milkowski, A.L., 2012, Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet, *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 26 (4), pp.259–266.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Crouch, S.R., Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, 6ª edição, 2007.
- Song, P., Wu, L. & Guan, W., 2015, Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis, *Nutrients*, 7 (12), pp.9872–9895.
- Sousa, A.L., Santos, W. J. R., Luz, R. C. S., Damos, F. S., Kubota, L.T., Tanaka, A. A., Tanaka, S. M. C. N., 2008, Amperometric sensor for nitrite based on copper tetrasulphonated phthalocyanine immobilized with poly-L-lysine film, *Talanta*, 75, pp.333–338.
- Vasco, E.R. & Alvito, P.C., 2011, Occurrence and infant exposure assessment of nitrates in baby foods marketed in the region of lisbon, Portugal, *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 4 (3), pp.218–225.
- Vin, K., Papadopoulos, A., Cubadda, F., Aureli, F., Basegmez, H. I. O., D'Amato, M., De Coster, S., D'Evoli, L., Esteban, M. T. L., Jurkovic, M., Lucarini, M., Ozer, H., San Juan, P. M. F., Sioen, I., Sokolic, D., Turrini, A., Sirot, V. 2014, TDS exposure project: Relevance of the Total Diet Study approach for different groups of substances, *Food and Chemical Toxicology*, 73, pp.21–34. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.035>.
- Waters, How Does High Performance Liquid Chromatography Work?, Disponível em: http://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US, Consultado a 8 de Março de 2017.

-
- WHO, 2010, Chemical fact sheets, *Guidelines for Drinking Water Quality*. pp. 307–442.
- Wickens, G.E., 2001, Human Food and Food Additives, Capitulo 9 - *Economic Botany - Principles and Practices*. New York: Springer, pp. 151–207.
- Williams, A. & Frasca, V., 1999, *Curent protocols in protein science*.
- Xian, H., Wang, P., Zhou, Y., Lu, Q., Wu, S., Li, Y., Wang, L., 2010, Electrochemical determination of nitrite via covalent immobilization of a single-walled carbon nanotubes and single stranded deoxyribonucleic acid nanocomposite on a glassy carbon electrode, *Microchimiica. Acta*, 171 (1–2), pp.63–69.
- Zhang, Y., Tian, X., Guo, Y., Li, H., Yu, A., Deng, Z., Sun, B. B., Zhang, S., 2014, Analysis of Nitrites and Nitrates in Hams and Sausages by Open-Tubular Capillary Electrochromatography with a Nanolatex-Coated Capillary Column, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (15), pp.3400–3404.

Anexos

Anexo 1 – Folha de cálculo utilizada na avaliação da homogeneidade de variâncias da gama de trabalho do método

Nitratos

| Conc. | | Sinal (y_{ij} =Área do pico i ;ensaio j) | | | | | | | | | |
|-------|---------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| i | x_i (mg/ml) | ensaio 1 | ensaio 2 | ensaio 3 | ensaio 4 | ensaio 5 | ensaio 6 | ensaio 7 | ensaio 8 | ensaio 9 | ensaio 10 |
| 1 | 1,000 | 165767,50000 | 210361,00000 | 174274,50000 | 218816,50000 | 187291,00000 | 195276,50000 | 171054,00000 | 197760,50000 | 206777,00000 | 220711,50000 |
| 2 | 2,000 | 322303,50000 | | | | | | | | | |
| 3 | 4,000 | 615693,50000 | | | | | | | | | |
| 4 | 6,000 | 1001820,00000 | | | | | | | | | |
| 5 | 8,000 | 1252921,00000 | | | | | | | | | |
| 6 | 10,000 | 1652612,00000 | 1677095,00000 | 1698889,50000 | 1708371,00000 | 1705623,50000 | 1741929,00000 | 1687185,50000 | 1658021,50000 | 1787084,00000 | 1722133,00000 |

| | |
|-----------------------|-----------|
| Média y_1 = | 194809,00 |
| Desvio Padrão y_1 = | 19796,81 |
| CV% y_1 = | 10,16 |
| Variância y_1 = | 391913551 |

| | |
|--------------------------|------------|
| Média y_{10} = | 1703894,40 |
| Desvio Padrão y_{10} = | 40110,22 |
| CV% y_{10} = | 2,35 |
| Variância y_{10} = | 1608829813 |

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^n y_{ij}}{n_i}$$

S_i^2 = Variância de y_i

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

SE

$$S_{10}^2 > S_1^2$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

SE

$$S_1^2 > S_{10}^2$$

PG = 4,105062987

$F_{(\alpha=0,1, \alpha=0,1, 99,0 \%)} = 5,35$

PG < F OK
PG > F .

Nitritos

| Conc. | | Sinal (y_{ij} =Área do pico i ;ensaio j) | | | | | | | | | |
|-------|---------------|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| i | x_i (mg/ml) | ensaio 1 | ensaio 2 | ensaio 3 | ensaio 4 | ensaio 5 | ensaio 6 | ensaio 7 | ensaio 8 | ensaio 9 | ensaio 10 |
| 1 | 0,500 | 192633,00000 | 156818,50000 | 212168,00000 | 184067,00000 | 176708,50000 | 179395,50000 | 168752,50000 | 184774,00000 | 184053,50000 | 205239,50000 |
| 2 | 2,000 | 754057,50000 | | | | | | | | | |
| 3 | 3,500 | 1314175,50000 | | | | | | | | | |
| 4 | 5,000 | 1850894,00000 | | | | | | | | | |
| 5 | 6,500 | 2409432,00000 | | | | | | | | | |
| 6 | 8,000 | 2980415,00000 | 2977596,00000 | 2986758,00000 | 2964337,00000 | 2951909,50000 | 2939514,00000 | 2992997,00000 | 2992462,50000 | 2989280,50000 | 2945067,00000 |

| | |
|-----------------------|-----------|
| Média y_1 = | 184461,00 |
| Desvio Padrão y_1 = | 16204,42 |
| CV% y_1 = | 8,78 |
| Variância y_1 = | 262583342 |

| | |
|--------------------------|------------|
| Média y_{10} = | 2972033,65 |
| Desvio Padrão y_{10} = | 20333,87 |
| CV% y_{10} = | 0,68 |
| Variância y_{10} = | 413466080 |

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^N (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^n y_{ij}}{n_i}$$

S_i^2 = Variância de y_i

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$$

SE

$$S_{10}^2 > S_1^2$$

PG = 1,574608947

$F_{(n_{10}-1, n_1-1, 99,0 \%)} = 5,35$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}$$

SE

$$S_1^2 > S_{10}^2$$

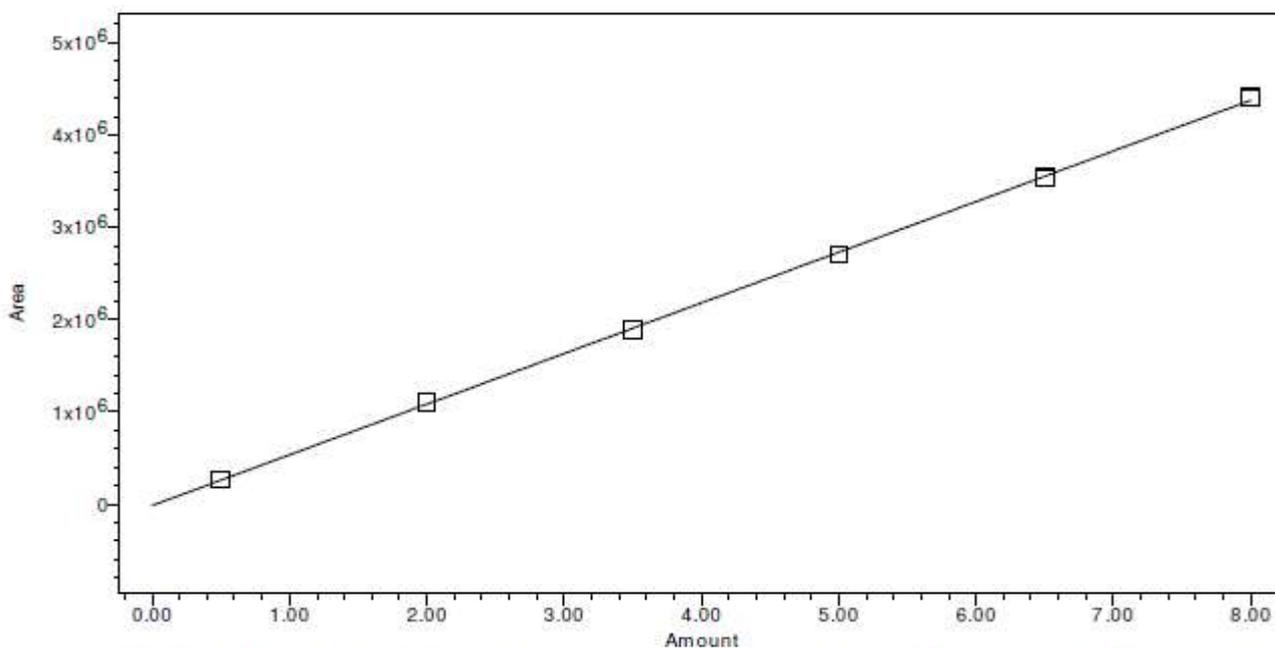
PG<F OK
PG>F .

Anexo 2 - Relatório obtido através do Software Empower relativo às curvas de calibração (exemplo)



LC Calibration Report

| | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| Processing Method: | SS20170929NN | System: | HPLC5 |
| Processing Method ID: | 75915 | Channel: | W2996 205.0nm-1.2 |
| Calibration ID: | 75917 | Proc. Chnl. Descr.: | W2996 PDA 205.0 nm at 1.2 |
| Date Calibrated: | 10/3/2017 11:27:19 AM Europe/Lisbon | | |



Peak Name: Nitrito; RT: 6.934; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 75918; R: 0.999899; R²: 0.999798; Weighting: None; Equation: $Y = 5.49e+005 X - 1.60e+004$; Standard Error 2.190983e+004

Peak: Nitrito

| | Sample Name | Result Id | Peak Name | Level | X Value | Response | Calc. Value | % Deviation | Manual |
|---|-----------------|-----------|-----------|-------|---------|-------------|-------------|-------------|--------|
| 1 | P1 KNO3 + NaNO2 | 75925 | Nitrito | | 0.500 | 265385.001 | 0.513 | -2.50 | No |
| 2 | P1 KNO3 + NaNO2 | 75928 | Nitrito | | 0.500 | 264046.250 | 0.510 | -2.03 | No |
| 3 | P2 KNO3 + NaNO2 | 75931 | Nitrito | | 2.000 | 1102999.003 | 2.039 | -1.92 | No |
| 4 | P2 KNO3 + NaNO2 | 75934 | Nitrito | | 2.000 | 1102269.004 | 2.038 | -1.86 | No |
| 5 | P3 KNO3 + NaNO2 | 75938 | Nitrito | | 3.500 | 1887142.566 | 3.468 | 0.92 | No |
| 6 | P3 KNO3 + NaNO2 | 75941 | Nitrito | | 3.500 | 1884304.412 | 3.463 | 1.07 | No |
| 7 | P4 KNO3 + NaNO2 | 75944 | Nitrito | | 5.000 | 2708354.004 | 4.965 | 0.71 | No |
| 8 | P4 KNO3 + NaNO2 | 75947 | Nitrito | | 5.000 | 2701604.508 | 4.952 | 0.96 | No |
| 9 | P5 KNO3 + NaNO2 | 75950 | Nitrito | | 6.500 | 3533464.521 | 6.468 | 0.49 | No |

Reported by User: Elsa Vasco (Evasco)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 13270
 Page: 1 of 4

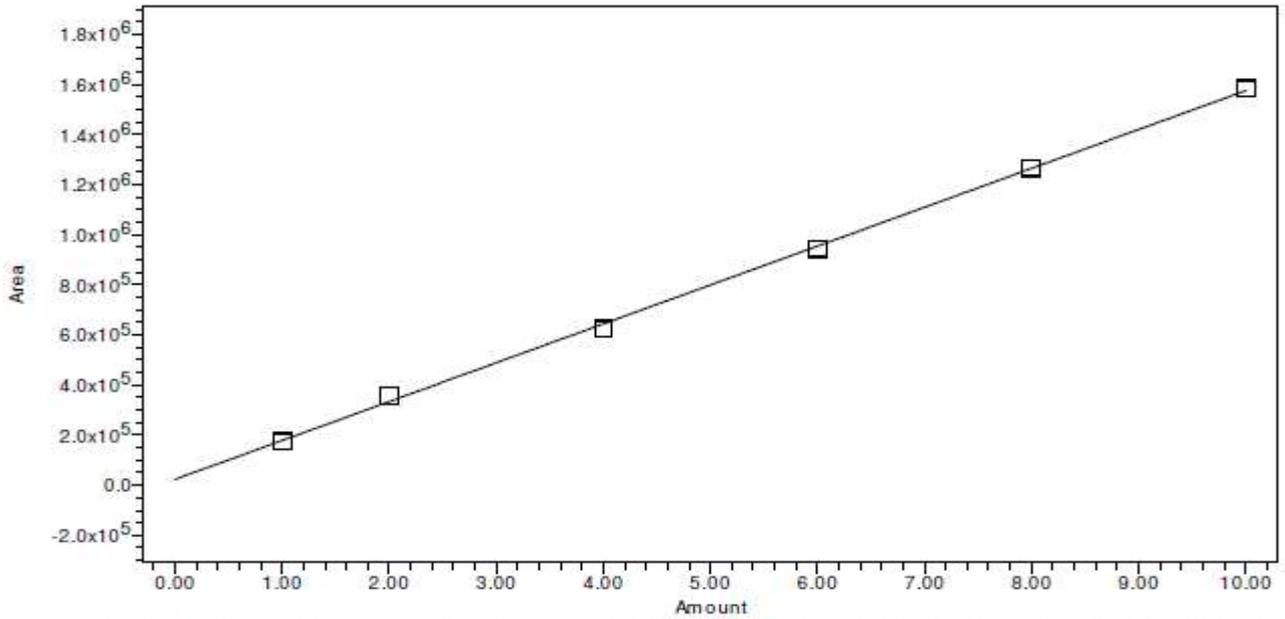
Project Name: Referencia/Nitratos
 Date Printed:
 10/3/2017
 11:27:58 AM Europe/Lisbon

Peak: Nitrito

| | Sample Name | Result Id | Peak Name | Level | X Value | Response | Calc. Value | % Deviation | Manual |
|----|-----------------|-----------|-----------|-------|---------|-------------|-------------|-------------|--------|
| 10 | P5 KNO3 + NaNO2 | 75953 | Nitrito | | 6.500 | 3540151.770 | 6.480 | 0.30 | No |
| 11 | P6 KNO3 + NaNO2 | 75954 | Nitrito | | 8.000 | 4399058.017 | 8.046 | -0.57 | No |
| 12 | P6 KNO3 + NaNO2 | 75955 | Nitrito | | 8.000 | 4405641.527 | 8.058 | -0.71 | No |

Peak: Nitrito

| | Ignore | Residual Sum of Squares |
|----|--------|-------------------------|
| 1 | No | 4.800406e+009 |
| 2 | No | 4.800406e+009 |
| 3 | No | 4.800406e+009 |
| 4 | No | 4.800406e+009 |
| 5 | No | 4.800406e+009 |
| 6 | No | 4.800406e+009 |
| 7 | No | 4.800406e+009 |
| 8 | No | 4.800406e+009 |
| 9 | No | 4.800406e+009 |
| 10 | No | 4.800406e+009 |
| 11 | No | 4.800406e+009 |
| 12 | No | 4.800406e+009 |



Peak Name: Nitrato; RT: 11.088; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 75919; R: 0.999577; R²: 0.999155; Weighting: None; Equation: $Y = 1.55e+005 X + 2.33e+004$; Standard Error 1.574218e+004

Peak: Nitrato

| | Sample Name | Result Id | Peak Name | Level | X Value | Response | Calc. Value | % Deviation | Manual |
|----|-----------------|-----------|-----------|-------|---------|-------------|-------------|-------------|--------|
| 1 | P1 KNO3 + NaNO2 | 75925 | Nitrato | | 1.000 | 172554.501 | 0.962 | 3.93 | No |
| 2 | P1 KNO3 + NaNO2 | 75928 | Nitrato | | 1.000 | 176768.943 | 0.989 | 1.08 | No |
| 3 | P2 KNO3 + NaNO2 | 75931 | Nitrato | | 2.000 | 357968.250 | 2.157 | -7.28 | No |
| 4 | P2 KNO3 + NaNO2 | 75934 | Nitrato | | 2.000 | 358260.500 | 2.159 | -7.36 | No |
| 5 | P3 KNO3 + NaNO2 | 75938 | Nitrato | | 4.000 | 622625.641 | 3.863 | 3.55 | No |
| 6 | P3 KNO3 + NaNO2 | 75941 | Nitrato | | 4.000 | 624259.001 | 3.873 | 3.27 | No |
| 7 | P4 KNO3 + NaNO2 | 75944 | Nitrato | | 6.000 | 946727.004 | 5.952 | 0.81 | No |
| 8 | P4 KNO3 + NaNO2 | 75947 | Nitrato | | 6.000 | 941134.503 | 5.916 | 1.43 | No |
| 9 | P5 KNO3 + NaNO2 | 75950 | Nitrato | | 8.000 | 1266055.507 | 8.010 | -0.12 | No |
| 10 | P5 KNO3 + NaNO2 | 75953 | Nitrato | | 8.000 | 1264884.259 | 8.002 | -0.03 | No |
| 11 | P6 KNO3 + NaNO2 | 75954 | Nitrato | | 10.000 | 1584772.005 | 10.064 | -0.63 | No |
| 12 | P6 KNO3 + NaNO2 | 75955 | Nitrato | | 10.000 | 1583269.511 | 10.054 | -0.54 | No |

Peak: Nitrato

| | Ignore | Residual Sum of Squares | | Ignore | Residual Sum of Squares |
|---|--------|-------------------------|---|--------|-------------------------|
| 1 | No | 2.478164e+009 | 3 | No | 2.478164e+009 |
| 2 | No | 2.478164e+009 | 4 | No | 2.478164e+009 |

Reported by User: Elsa Vasco (Evasco)
 Report Method: LC Calibration Report
 Report Method ID 13270
 Page: 3 of 4

Project Name: Referencia/Nitratos
 Date Printed: 10/3/2017
 11:27:58 AM Europe/Lisbon

Peak: Nitrato

| | Ignore | Residual Sum of Squares |
|----|--------|-------------------------|
| 5 | No | 2.478164e+009 |
| 6 | No | 2.478164e+009 |
| 7 | No | 2.478164e+009 |
| 8 | No | 2.478164e+009 |
| 9 | No | 2.478164e+009 |
| 10 | No | 2.478164e+009 |
| 11 | No | 2.478164e+009 |
| 12 | No | 2.478164e+009 |

Anexo 3 – Folha de cálculo utilizada para o teste de linearidade (Mandel)

Nitratos

| i | Ajuste Linear $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | Ajuste Polinomial $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | | |
|----------------------------|--|--|--|---|
| 1 | 1,824463E+08 | 1,312960E+06 | Ajuste Linear $Sy_1 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N-2}$ | $Sy_1 =$ Desvio padrão residual do ajuste linear |
| 2 | 9,370757E+07 | 7,188595E+06 | | |
| 3 | 1,041882E+08 | 6,796318E+07 | | |
| 4 | 6,951174E+05 | 7,823331E+06 | | |
| 5 | 1,815164E+09 | 1,007045E+09 | | |
| 6 | 2,254125E+08 | 1,716416E+07 | | |
| 7 | 5,855807E+09 | 8,030277E+09 | Ajuste Polinomial $Sy_2 = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N-3}$ | $Sy_2 =$ Desvio padrão residual do ajuste polinomial |
| 8 | 2,452592E+08 | 6,616153E+06 | | |
| 9 | 4,492701E+07 | 4,050931E+06 | | |
| 10 | 7,056800E+09 | 6,290820E+09 | | |
| 11 | 2,119869E+08 | 8,343130E+08 | | |
| 12 | 4,825001E+09 | 3,040146E+09 | | |
| $\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ | 2,066140E+10 | 1,931472E+10 | $Sy_1 = 4,545480811E+04$ $Sy_2 = 4,632580334E+04$ | |
| N | 12 | 12 | | |

Diferença das variâncias

$$DS^2 = (N-2) \cdot Sy_1^2 - (N-3) \cdot Sy_2^2$$

Valor do teste

$$PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2}$$

$$F_{(1, N-3, 99\%)} = 10,56143105$$

PG < F

OK

PG > F

.

$$DS^2 = 1,346675303E+09$$

$$PG = 0,627504691$$

Nitritos

| <i>i</i> | Ajuste Linear $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | Ajuste Polinomial $(y_i - \hat{y}_i)^2$ | |
|----------------------------|--|--|---|
| 1 | 4,698469E+06 | 2,149432E+07 | Ajuste Linear $Sy_1 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N-2}$ $Sy_1 =$ Desvio padrão residual do ajuste linear |
| 2 | 5,643453E+06 | 2,346624E+07 | |
| 3 | 8,368155E+05 | 1,983862E+06 | |
| 4 | 4,139348E+07 | 4,799021E+07 | |
| 5 | 7,115172E+07 | 1,083687E+08 | |
| 6 | 6,711128E+07 | 1,033685E+08 | Ajuste Polinomial $Sy_2 = \frac{\sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N-3}$ $Sy_2 =$ Desvio padrão residual do ajuste polinomial |
| 7 | 5,504870E+07 | 2,964367E+07 | |
| 8 | 1,815347E+08 | 1,322178E+08 | |
| 9 | 3,169151E+08 | 2,995803E+08 | |
| 10 | 9,168121E+06 | 1,240174E+07 | |
| 11 | 5,599921E+07 | 2,514682E+07 | |
| 12 | 7,658459E+07 | 3,947183E+07 | |
| $\sum (y_i - \hat{y}_i)^2$ | 8,860856E+08 | 8,451340E+08 | |
| N | 12 | 12 | $Sy_1 = 9,413212076E+03$ $Sy_2 = 9,690396109E+03$ |

| | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Diferença das variâncias | Valor do teste |
| $DS^2 = (N-2).Sy_1^2 - (N-3).Sy_2^2$ | $PG = \frac{DS^2}{Sy_2^2}$ |

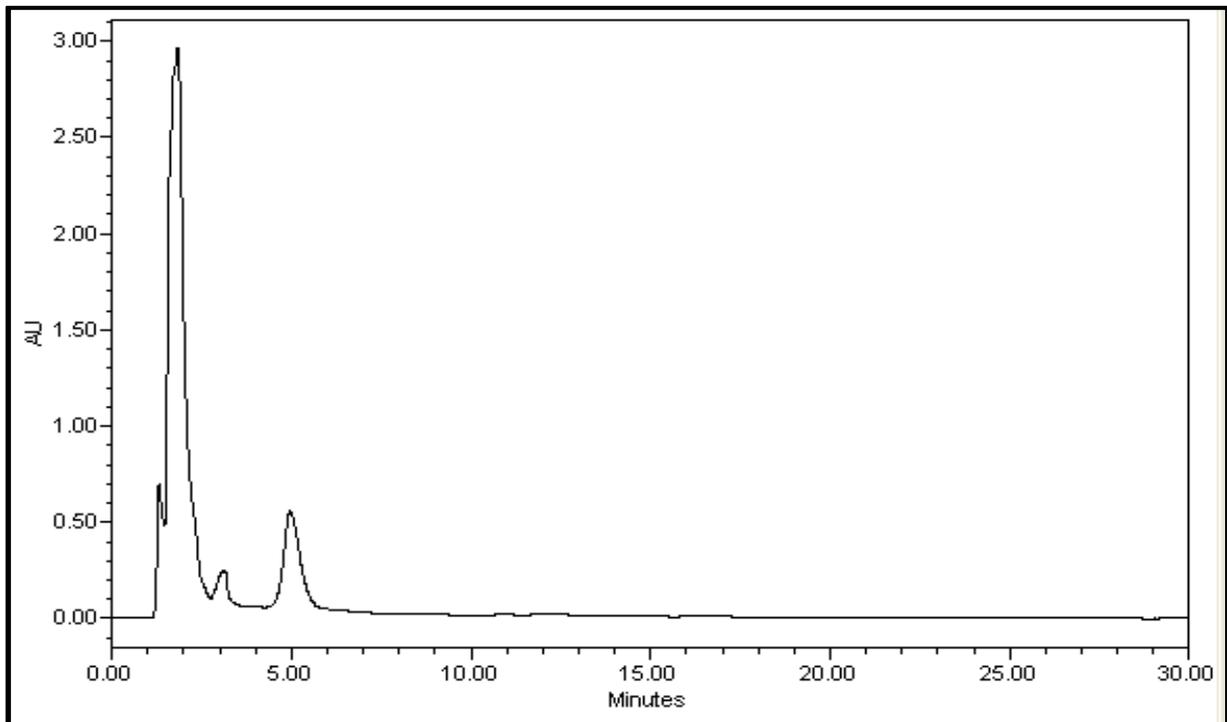
$DS^2 = 4,095162515E+07$ $PG = 0,436102003$

$F_{(1,N-3, 99\%)} = 10,56143105$

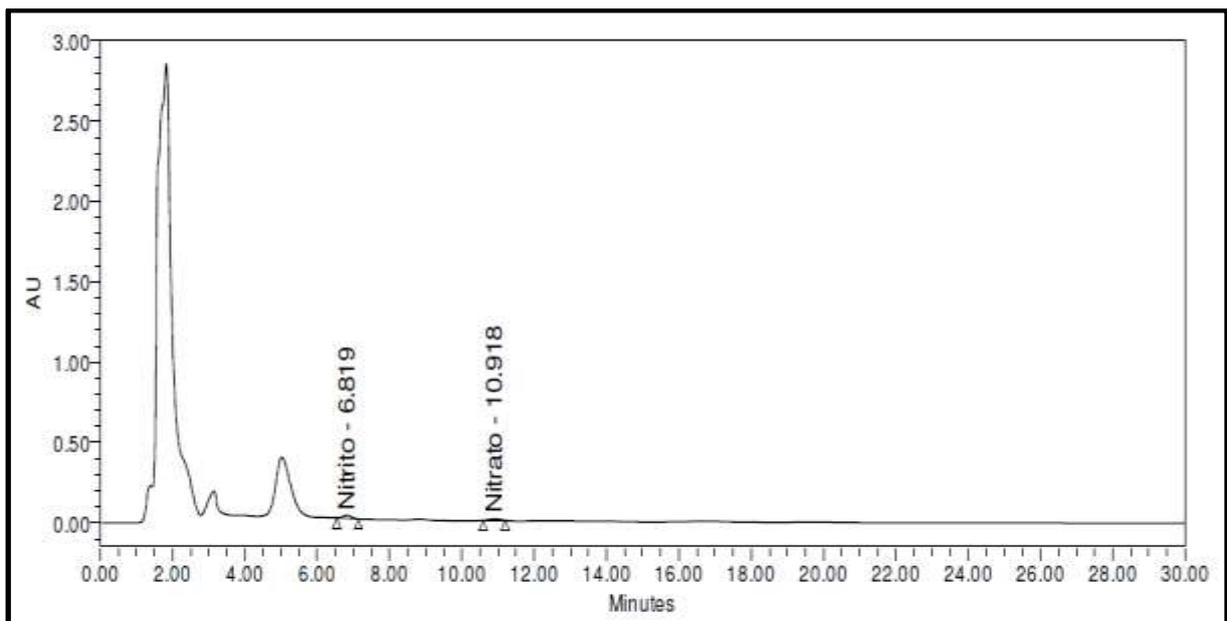
| | |
|--------|-----------|
| PG < F | OK |
| PG > F | . |

Anexo 4 – Exemplo dos cromatogramas obtidos na confirmação dos limites analíticos

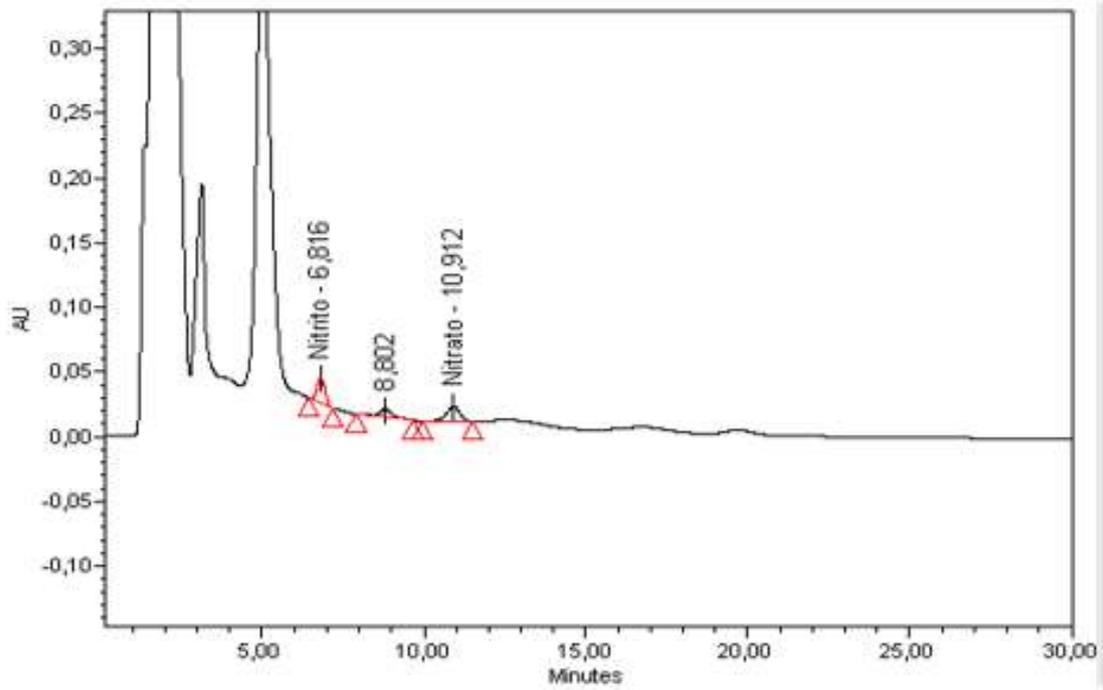
Cromatograma da amostra A 9 (carapau) sem adição de padrão



Cromatograma da amostra A 9 com adição do padrão para confirmar os limites analíticos



Cromatograma com adição de padrão para confirmação dos limites analíticos com aumento da escala (escala a que são vistos os padrões)



Anexo 5 - Folha de cálculo para o cálculo da concentração de analito nos ensaios de repetibilidade

Amostra A 1 – Nitratos



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|---------------------------|---|---|---|---|---|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 1 (novo lote: FP2D 1-6) | | | | | |
| Observações: | SS20170926NN, procedin | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início de análise: | 26.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r)≥0,99 | Sim | | | | | |

| | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Toma da amostra (g) | 10,0838 | 10,0649 | 10,1104 | 10,0977 | 10,0537 | 10,0220 |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 2,5950 | 2,8070 | 2,9740 | 3,0150 | 2,7500 | 2,5180 |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 25,7343 | 27,8890 | 29,4153 | 29,8583 | 27,3531 | 25,1247 |
| Concentração Media da Amostra (mg/kg Amostra) | 27,5625 | | | | | |
| repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | | | |
| r (repetibilidade) | 5,5125 | | | | | |

Amostra A 1 - Nitritos



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 1 (novo lote: FP2D 1-6) | | | | | |
| Observações: | SS20170926NN, procedin | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início de análise: | 26.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r)≥0,99 | Sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 10,0838 | 10,0649 | 10,1104 | 10,0977 | 10,0537 | 10,0220 |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 0,8420 | 0,8470 | 0,8450 | 0,8380 | 0,8460 | 0,8390 |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 8,3500 | 8,4154 | 8,3577 | 8,2989 | 8,4148 | 8,3716 |
| Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra) | 8,3681 | | | | | |
| repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | | | |
| r (repetibilidade) | 1,6736 | | | | | |
| Data de fim de análise | | | | | | |

Amostra A 6 - Nitratos



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 6 (novo lote: FG 1-6) | | | | | |
| Observações: | SS20170926NN, procedin | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início de análise: | 26.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r)≥0,99 | Sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 10,0155 | 10,0433 | 10,0123 | 10,0123 | 10,0211 | 10,1058 |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Diluição posterior | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/10 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 6,2630 | 6,1690 | 6,1270 | 5,8140 | 6,2910 | 6,1560 |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 625,3307 | 614,2403 | 611,9473 | 580,6858 | 627,7754 | 609,1551 |
| Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra) | 611,5224 | | | | | |
| repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | | | |
| r (repetibilidade) | 122,3045 | | | | | |

Amostra A 6 - Nitritos



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 6 (novo lote: FG 1-6) | | | | | |
| Observações: | SS20170926NN, procedin | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início de análise: | 26.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r)≥0,99 | Sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 10,0155 | 10,0433 | 10,0123 | 10,0123 | 10,0211 | 10,1058 |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 0,8760 | 0,8780 | 0,8870 | 0,8550 | 0,8500 | 0,8650 |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 8,7464 | 8,7421 | 8,8591 | 8,5395 | 8,4821 | 8,5594 |
| Concentração Media da Amostra (mg/kg Amostra) | 8,6548 | | | | | |
| repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | | | |
| r (repetibilidade) | 1,7310 | | | | | |

Anexo 6 – Folha de cálculo do desvio padrão relativo de repetibilidade

Amostra A 1 - Nitratos

| DADOS DE PRECISÃO | | Natureza da amostra | A 1 | | |
|---------------------------------|------------|-------------------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | Descrição da amostra | FP2D 1-18 | | |
| | | Método | Norma, volumes/2 | | |
| Preencher as células verdes | | DADOS / série data de análise | SS20170926NN | SS20170927NN | SS20170928NN |
| | | série(i) | 1 | 2 | 3 |
| | | n | | | |
| | | 1 | 25,7343 | 22,8956 | 24,9044 |
| | | 2 | 27,8890 | 23,5266 | 23,9293 |
| | | 3 | 29,4153 | 22,5371 | 23,0094 |
| | | 4 | 29,8583 | 24,6513 | 25,9841 |
| | | 5 | 27,3531 | 27,3577 | 23,4057 |
| | | 6 | 25,1247 | 27,4669 | 21,5027 |
| Nº ensaios por Operador | n | | 6 | 6 | 6 |
| Média | \bar{x} | | 27,5625 | 24,7392 | 23,7893 |
| Desvio Padrão | S | | 1,904688959 | 2,191945258 | 1,55332724 |
| Variância | S^2 | | 3,627840031 | 4,804624016 | 2,412825515 |
| CV% | CV% | | 6,910448669 | 8,860210752 | 6,529529732 |
| Desvio padrão da repetibilidade | S_{ri} | 2,191945258 | | | |
| Variância da repetibilidade | S_{ri}^2 | 4,804624016 | | | |
| Limite de repetibilidade | r | 6,137446724 | | | |

$$S_{ri}^2 = \text{Máx.}(S_i^2)$$

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

Amostra A 1 - Nitritos

| DADOS DE PRECISÃO | | Natureza da amostra | A 1 | | |
|---------------------------------|------------|-------------------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | Descrição da amostra | FP2D 1-18 | | |
| | | Método | Norma, volumes/2 | | |
| Preencher as células verdes | | DADOS / série data de análise | SS20170926NN | SS20170927NN | SS20170928NN |
| | | série(i) | 1 | 2 | 3 |
| | | n | | | |
| | | 1 | 8,3500 | 7,9450 | 8,1551 |
| | | 2 | 8,4154 | 8,1484 | 8,0262 |
| | | 3 | 8,3577 | 8,3792 | 8,3117 |
| | | 4 | 8,2989 | 8,0855 | 8,2541 |
| | | 5 | 8,4148 | 8,1137 | 8,0051 |
| | | 6 | 8,3716 | 8,3128 | 8,0275 |
| Nº ensaios por Operador | n | | 6 | 6 | 6 |
| Média | \bar{x} | | 8,3681 | 8,1641 | 8,1300 |
| Desvio Padrão | S | | 0,043942766 | 0,158334532 | 0,131092635 |
| Variância | S^2 | | 0,001930967 | 0,025069824 | 0,017185279 |
| CV% | CV% | | 0,525124471 | 1,939399712 | 1,612465454 |
| Desvio padrão da repetibilidade | S_{ri} | 0,158334532 | | | |
| Variância da repetibilidade | S_{ri}^2 | 0,025069824 | | | |
| Limite de repetibilidade | r | 0,443336689 | | | |

$$S_{ri}^2 = \text{Máx.}(S_i^2)$$

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

Amostra A 6 - Nitratos

| | | | | | |
|---------------------------------|------------|-------------------------------|------------------|---------------|--------------|
| DADOS DE PRECISÃO | | Natureza da amostra | A 6 | | |
| | | Descrição da amostra | FG 1-18 | | |
| | | Método | Norma, volumes/2 | | |
| Preencher as células verdes | | DADOS / série data de análise | SS20170926NN | SS20170927NN | SS20170928NN |
| | | série(i) | 1 | 2 | 3 |
| | | n | | | |
| | | 1 | 625,3310 | 624,1650 | 632,4510 |
| | | 2 | 614,2400 | 628,1610 | 641,3630 |
| | | 3 | 611,9470 | 622,7960 | 632,3220 |
| | | 4 | 580,0686 | 666,3040 | 635,9860 |
| | | 5 | 627,7750 | 612,0150 | 629,1740 |
| | | 6 | 609,1550 | 641,4400 | 628,5940 |
| Nº ensaios por Operador | n | | 6 | 6 | 6 |
| Média | \bar{x} | | 611,4194 | 632,4802 | 633,3150 |
| Desvio Padrão | S | | 17,07203901 | 19,10357895 | 4,755477095 |
| Variância | S^2 | | 291,454516007 | 364,946728567 | 22,614562400 |
| CV% | CV% | | 2,792197644 | 3,020423399 | 0,750886541 |
| Desvio padrão da repetibilidade | S_{ri} | 19,10357895 | | | |
| Variância da repetibilidade | S_{ri}^2 | 364,946728567 | | | |
| Limite de repetibilidade | r | 53,49002105 | | | |

$$S_{ri}^2 = \text{Máx.}(S_i^2)$$

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

Amostra A 6 - Nitritos

| DADOS DE PRECISÃO | | Natureza da amostra | A 6 | | |
|---------------------------------|------------|----------------------|------------------|--------------|--------------|
| | | Descrição da amostra | FG 1-18 | | |
| | | Método | Norma, volumes/2 | | |
| Preencher as células verdes | | DADOS / série | | | |
| | | data de análise | SS20170926NN | SS20170927NN | SS20170928NN |
| | | série(i) | 1 | 2 | 3 |
| | | n | | | |
| | | 1 | 8,7464 | 9,0001 | 9,2327 |
| | | 2 | 8,7421 | 9,2250 | 8,9567 |
| | | 3 | 8,8591 | 8,9452 | 8,9989 |
| | | 4 | 8,5395 | 9,3999 | 8,6148 |
| | | 5 | 8,4821 | 9,0787 | 9,1674 |
| | | 6 | 8,5594 | 9,3210 | 8,7837 |
| Nº ensaios por Operador | n | | 6 | 6 | 6 |
| Média | \bar{x} | | 8,6548 | 9,1617 | 8,9590 |
| Desvio Padrão | S | | 0,148304331 | 0,182207802 | 0,232010031 |
| Variância | S^2 | | 0,021994175 | 0,033199683 | 0,053828655 |
| CV% | CV% | | 1,713556667 | 1,988809894 | 2,589677064 |
| Desvio padrão da repetibilidade | S_{ri} | 0,232010031 | | | |
| Variância da repetibilidade | S_{ri}^2 | 0,053828655 | | | |
| Limite de repetibilidade | r | 0,649628088 | | | |

$$S_{ri}^2 = \text{Máx.}(S_i^2)$$

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

Anexo 7 - Folha de cálculo utilizada para estudar a precisão do método

Amostra A 1 - Nitratos

| | | | | | | | | |
|--|------------------------|----------------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------|-----------------|
| | | Natureza da amostra | Fiambre | | | | | |
| | | Descrição da amostra | FP2D 1-18 | | | | | |
| DADOS DE PRECISÃO | | Método | Norma, volumes/2 | | | | | |
| | | DADOS / série | 0 | | 0 | | 0 | |
| | | data de análise | SS20170926NN | | SS20170927NN | SS20170928NN | | |
| | | série(i) | 1 | | 2 | | 3 | |
| | | n | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ |
| | | 1 | 25,7343 | 0,370661111 | 22,8956 | -2,46803889 | 24,9044 | -0,45923889 |
| | | 2 | 27,889 | 2,525361111 | 23,5266 | -1,83703889 | 23,9293 | -1,43433889 |
| | | 3 | 29,4153 | 4,051661111 | 22,5371 | -2,82653889 | 23,0094 | -2,35423889 |
| | | 4 | 29,8583 | 4,494661111 | 24,6513 | -0,71233889 | 25,9841 | 0,620461111 |
| | | 5 | 27,3531 | 1,989461111 | 27,3577 | 1,994061111 | 23,4057 | -1,95793889 |
| | | 6 | 25,1247 | -0,23893889 | 27,4669 | 2,103261111 | 21,5027 | -3,86093889 |
| Nº de ensaios por operador | n | | 6 | | 6 | | 6 | |
| Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios) | \bar{y} | 25,36363889 | | | | | | |
| Numero total de determinações total | N | 18 | | | | | | |
| | $\sum (y - \bar{y})^2$ | 100,4465005 | | | | | | |
| Desvio padrão da precisão intermédia | S_{Pi} | 2,430764834 | | | | | | |
| Variância da precisão intermédia | S_{Pi}^2 | 5,908617679 | | | | | | |
| Limite de precisão intermédia | P_i | 6,806141536 | | | | | | |
| CV% | CV% | 9,583659682 | | | | | | |

$$Spi_{(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{Pi}^2}$$

Amostra A 1 - Nitritos

| | | | | | | | | |
|--|------------------------|----------------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------|-----------------|
| | | Natureza da amostra | Fiambre | | | | | |
| | | Descrição da amostra | FP2D 1-18 | | | | | |
| DADOS DE PRECISÃO | | Método | Norma, volumes/2 | | | | | |
| | | DADOS / série | 0 | | 0 | | 0 | |
| | | data de análise | SS20170926NN | | SS20170927NN | SS20170928NN | | |
| | | série(i) | 1 | | 2 | | 3 | |
| | | n | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ |
| | | 1 | 8,35 | 0,129294444 | 7,945 | -0,27570556 | 8,1551 | -0,06560556 |
| | | 2 | 8,4154 | 0,194694444 | 8,1484 | -0,07230556 | 8,0262 | -0,19450556 |
| | | 3 | 8,3577 | 0,136994444 | 8,3792 | 0,158494444 | 8,3117 | 0,090994444 |
| | | 4 | 8,2989 | 0,078194444 | 8,0855 | -0,13520556 | 8,2541 | 0,033394444 |
| | | 5 | 8,4148 | 0,194094444 | 8,1137 | -0,10700556 | 8,0051 | -0,21560556 |
| | | 6 | 8,3716 | 0,150894444 | 8,3128 | 0,092094444 | 8,0275 | -0,19320556 |
| Nº de ensaios por operador | n | | 6 | | 6 | | 6 | |
| Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios) | \bar{y} | 8,220705556 | | | | | | |
| Numero total de determinações total | N | 18 | | | | | | |
| | $\sum (y - \bar{y})^2$ | 0,419866689 | | | | | | |
| Desvio padrão da precisão intermédia | S_{Pi} | 0,157156103 | | | | | | |
| Variância da precisão intermédia | S_{Pi}^2 | 0,024698041 | | | | | | |
| Limite de precisão intermédia | P_i | 0,440037087 | | | | | | |
| CV% | CV% | 1,911710637 | | | | | | |

$$S_{pi(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{Pi}^2}$$

Amostra A 6 - Nitratos

| | | | | | | | | |
|--|------------------------|----------------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | | Natureza da amostra | paté porco | | | | | |
| | | Descrição da amostra | FG 1-18 | | | | | |
| DADOS DE PRECISÃO | | Método | Norma, volumes/2 | | | | | |
| | | DADOS / série | 0 | | 0 | | 0 | |
| | | data de análise | SS20170926NN | | SS20170927NN | | SS20170928NN | |
| | | série(i) | 1 | | 2 | | 3 | |
| | | n | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ |
| | | 1 | 625,331 | -0,4072 | 624,165 | -1,5732 | 632,451 | 6,7128 |
| | | 2 | 614,24 | -11,4982 | 628,161 | 2,4228 | 641,363 | 15,6248 |
| | | 3 | 611,947 | -13,7912 | 622,796 | -2,9422 | 632,322 | 6,5838 |
| | | 4 | 580,0686 | -45,6696 | 666,304 | 40,5658 | 635,986 | 10,2478 |
| | | 5 | 627,775 | 2,0368 | 612,015 | -13,7232 | 629,174 | 3,4358 |
| | | 6 | 609,155 | -16,5832 | 641,44 | 15,7018 | 628,594 | 2,8558 |
| Nº de ensaios por operador | n | | 6 | | 6 | | 6 | |
| Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios) | \bar{y} | 625,7382 | | | | | | |
| Numero total de determinações total | N | 18 | | | | | | |
| | $\sum (y - \bar{y})^2$ | 5242,413585 | | | | | | |
| Desvio padrão da precisão intermédia | S_{Pi} | 17,56067395 | | | | | | |
| Variância da precisão intermédia | S_{Pi}^2 | 308,3772697 | | | | | | |
| Limite de precisão intermédia | P_i | 49,16988707 | | | | | | |
| CV% | CV% | 2,806393145 | | | | | | |

$$S_{pi(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{Pi}^2}$$

Amostra A 6 - Nitritos

| | | | | | | |
|--|------------------------|----------------------|------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | | Natureza da amostra | paté porco | | | |
| | | Descrição da amostra | FG 1-18 | | | |
| DADOS DE PRECISÃO | | Método | Norma, volumes/2 | | | |
| | | DADOS / série | 0 | | 0 | |
| | | data de análise | SS20170926NN | | SS20170927NN | SS20170928NN |
| | | série(i) | 1 | | 2 | 3 |
| | | n | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ | $y_{i,n}$ | $(y - \bar{y})$ |
| | | 1 | 8,7464 | -0,17875 | 9,0001 | 0,07495 |
| | | 2 | 8,7421 | -0,18305 | 9,225 | 0,29985 |
| | | 3 | 8,8591 | -0,06605 | 8,9452 | 0,02005 |
| | | 4 | 8,5395 | -0,38565 | 9,3999 | 0,47475 |
| | | 5 | 8,4821 | -0,44305 | 9,0787 | 0,15355 |
| | | 6 | 8,5594 | -0,36575 | 9,321 | 0,39585 |
| Nº de ensaios por operador | n | | 6 | | 6 | 6 |
| Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios) | \bar{y} | 8,92515 | | | | |
| Numero total de determinações total | N | 18 | | | | |
| | $\sum (y - \bar{y})^2$ | 1,326237425 | | | | |
| Desvio padrão da precisão intermédia | S_{Pi} | 0,279309803 | | | | |
| Variância da precisão intermédia | S_{Pi}^2 | 0,078013966 | | | | |
| Limite de precisão intermédia | P_i | 0,782067449 | | | | |
| CV% | CV% | 3,129469009 | | | | |

$$S_{pi(T.O.)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^N (y_k - \bar{y})^2}$$

$$P_i = 2,8 \sqrt{S_{Pi}^2}$$

Anexo 8 – Folha de cálculo utilizada para a determinação do teor de analitos na amostra e da respetiva taxa de recuperação

Amostra A 4 - Nitratos



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|---------------------------------|---------|----------|---------|---------|---------|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 4 (F Por 1-3) | | | | | |
| Observações: | SS20170929NN; procedimento da r | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início análise: | 29.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r) ≥ 0,99 | Sim | | | | | |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | | | |
| Concentração do padrão (µg/mL) | | | 1629 | | | |
| Volume do padrão adicionado (mL) | | | 1,0 | | | |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1/2 | | | |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 1,8910 | 1,9760 | 5,7780 | | | |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 18,6616 | 19,7131 | 114,8822 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| Concentração Media da Amostra (mg/kg Amostra) | 19,1873 | | | #DIV/0! | | |
| Repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | #DIV/0! | | |
| Taxa de recuperação (%) | 59,1 | | | #DIV/0! | | |
| r (repetibilidade) | 9,3481 | | | #DIV/0! | | |

Amostra A 4 - Nitritos



Departamento de Alimentação e Nutrição
Laboratório de Química

| | | | | | | |
|--|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| PARÂMETRO: | Nitratos | | | | | |
| Nº/Data de Entrada: | | | | | | |
| Amostra: | A 4 (F Por 1-3) | | | | | |
| Observações: | SS20170929NN; procedimento da r | | | | | |
| Toma de Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Data de início análise: | 29.09.2017 | | | | | |
| Executante: | CDC | | | | | |
| Pasta Nº: | | | | | | |
| Diluição na técnica | 1 | | | | | |
| Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL) | | | | | | |
| Resíduos ≤ 10 % | Sim | | | | | |
| Coefficiente correlação (r)≥0,99 | Sim | | | | | |
| Toma da amostra (g) | 10,1331 | 10,0238 | 10,0590 | | | |
| Volume em que a amostra é diluída (mL) | 100 | 100 | 100 | | | |
| Concentração do padrão (µg/mL) | | | 750 | | | |
| Volume do padrão adicionado (mL) | | | 1,0 | | | |
| Diluição posterior | 1 | 1 | 1 | | | |
| Concentração Sol. Analisadas (µg/mL) | 1,3550 | 1,3500 | 6,2650 | | | |
| Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra) | 13,3720 | 13,4679 | 62,2825 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| Concentração Media da Amostra (mg/kg Amostra) | 13,4200 | | | #DIV/0! | | |
| Repetibilidade (CV _r =5%) | OK | | | #DIV/0! | | |
| Taxa de recuperação (%) | 65,5 | | | #DIV/0! | | |
| r (repetibilidade) | 5,2958 | | | #DIV/0! | | |

Anexo 9 – Teores de nitrato e nitrito obtidos para cada lote utilizado para testar a homogeneidade dos lotes de amostras

Amostra A 1 – Teor de Nitrato (mg/kg amostra)

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| 29,57547 | 39,02807 | 30,79429 | 23,34748 | 44,89931 |
| 33,6527 | 26,94203 | 36,63816 | 22,94658 | 40,30016 |
| | 30,74558 | 32,21804 | | 38,75277 |
| | 48,59975 | 36,54955 | | |
| | 39,51074 | | | |

Amostra A 1 – Teor de Nitrito (mg/kg amostra)

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
|----------|----------|---------|---------|----------|
| 16,71555 | 22,851 | 12,7155 | 8,4171 | 12,55215 |
| 15,77595 | 22,29675 | 15,402 | 7,44345 | 12,24615 |
| | 22,9971 | 26,3565 | | 12,195 |
| | 20,42445 | 16,1085 | | |
| | 18,0489 | | | |

Amostra A 2 – Teor de Nitrato (mg/kg amostra)

| Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 |
|----------|----------|----------|
| 68,29729 | 45,27545 | 46,75474 |
| 63,60626 | 30,74558 | 48,85143 |
| | 50,58648 | 50,12433 |
| | 48,49533 | 50,0463 |
| | 41,36292 | |

Amostra A 6 - Teor de Nitrato (mg/kg amostra)

| Lote 1 | Lote 2 |
|----------|----------|
| 1380,571 | 996,0022 |
| 1385,551 | 1030,31 |
| | 1031,67 |

Amostra A 6 - Teor de Nitrito (mg/kg amostra)

| Lote 1 | Lote 2 |
|----------|----------|
| 25,9761 | 12,9822 |
| 26,15565 | 13,74255 |
| | 13,4385 |

Anexo 10 – Avaliação da homogeneidade dos teores de nitrato e nitrito em vários lotes (ANOVA)

Amostra A 1 - Teor de Nitrato

| Anova: factor único | | | | | | |
|---------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| SUMÁRIO | | | | | | |
| Grupos | Contagem | Soma | Média | Variância | | |
| Coluna 1 | 2 | 63,22817 | 31,61408 | 8,311878 | | |
| Coluna 2 | 5 | 184,8262 | 36,96524 | 71,31138 | | |
| Coluna 3 | 4 | 136,2 | 34,05001 | 8,967357 | | |
| Coluna 4 | 2 | 46,29406 | 23,14703 | 0,080359 | | |
| Coluna 5 | 3 | 123,9522 | 41,31741 | 10,2211 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Fonte de varia | SQ | gl | MQ | F | valor P | F crítico |
| Entre grup | 444,6742 | 4 | 111,1686 | 3,586272 | 0,041725 | 3,35669 |
| Dentro de | 340,982 | 11 | 30,99837 | | | |
| Total | 785,6563 | 15 | | | | |

Amostra A 1 - Teor de Nitrito

| Anova: factor único | | | | | | |
|---------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|-----------|
| SUMÁRIO | | | | | | |
| Grupos | Contagem | Soma | Média | Variância | | |
| Coluna 1 | 2 | 32,4915 | 16,24575 | 0,441424 | | |
| Coluna 2 | 5 | 106,6182 | 21,32364 | 4,403176 | | |
| Coluna 3 | 4 | 70,5825 | 17,64563 | 35,86069 | | |
| Coluna 4 | 2 | 15,86055 | 7,930275 | 0,473997 | | |
| Coluna 5 | 3 | 36,9933 | 12,3311 | 0,037301 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| Fonte de varia | SQ | gl | MQ | F | valor P | F crítico |
| Entre grup | 320,6041 | 4 | 80,15101 | 6,987063 | 0,004724 | 3,35669 |
| Dentro de | 126,1848 | 11 | 11,47135 | | | |
| Total | 446,7889 | 15 | | | | |

Amostra A 2 - Teor de Nitrato

| | | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|----------------|------------------|
| Anova: factor único | | | | | | |
| SUMÁRIO | | | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> | | |
| Coluna 1 | 2 | 131,9036 | 65,95178 | 11,00289 | | |
| Coluna 2 | 5 | 216,4658 | 43,29315 | 61,33801 | | |
| Coluna 3 | 4 | 195,7768 | 48,9442 | 2,469886 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| <i>Fonte de varia</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grup | 735,171 | 2 | 367,5855 | 11,1489 | 0,004861 | 4,45897 |
| Dentro de | 263,7646 | 8 | 32,97057 | | | |
| Total | 998,9356 | 10 | | | | |

Amostra A 6 - Teor de Nitrato

| | | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|----------------|------------------|
| Anova: factor único | | | | | | |
| SUMÁRIO | | | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> | | |
| Coluna 1 | 2 | 2766,121 | 1383,061 | 12,39947 | | |
| Coluna 2 | 3 | 3057,983 | 1019,328 | 408,5154 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| <i>Fonte de varia</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grup | 158762,2 | 1 | 158762,2 | 574,2335 | 0,000159 | 10,12796 |
| Dentro de | 829,4303 | 3 | 276,4768 | | | |
| Total | 159591,7 | 4 | | | | |

Amostra A 6 - Teor de Nitrito

| | | | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|--------------|------------------|----------------|------------------|
| Anova: factor único | | | | | | |
| SUMÁRIO | | | | | | |
| <i>Grupos</i> | <i>Contagem</i> | <i>Soma</i> | <i>Média</i> | <i>Variância</i> | | |
| Coluna 1 | 2 | 52,13175 | 26,06588 | 0,016119 | | |
| Coluna 2 | 3 | 40,16325 | 13,38775 | 0,146465 | | |
| ANOVA | | | | | | |
| <i>Fonte de varia</i> | <i>SQ</i> | <i>gl</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>valor P</i> | <i>F crítico</i> |
| Entre grup | 192,8818 | 1 | 192,8818 | 1872,345 | 2,72E-05 | 10,12796 |
| Dentro de | 0,309049 | 3 | 0,103016 | | | |
| Total | 193,1909 | 4 | | | | |

Anexo 11 – Poster exposto no Fórum de Engenharia Química e Biológica'17, ISEL (2017)







Optimização de um método para a determinação de nitratos e nitritos por HPLC de troca iónica

C. D. Carvalho ^{a, b}, M. C. Serra ^a, E. R. Vasco ^b

^a ISEL, Departamento de Engenharia Química, Rua Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal
^b Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
 e-mail: elsa.vasco@insa.min-saude.pt



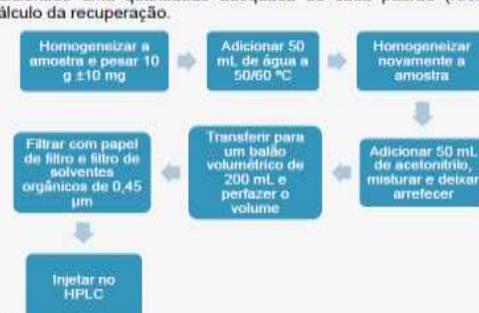
Introdução

Hoje em dia, os nitratos e nitritos, embora sejam utilizados como conservantes, são também vistos como contaminantes alimentares. Apesar de a principal fonte alimentar de nitratos e nitritos serem vegetais e frutas, os produtos à base de carne podem ter elevados níveis destes contaminantes. Os nitratos e nitritos são os principais conservantes utilizados neste tipo de produtos alimentares. Além da função de conservantes, através da sua ação antimicrobiana contra organismos como *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus*, contribuem, também, para manter a cor característica destes produtos e as suas propriedades organolépticas. O nitrito é extremamente reativo, enquanto que o nitrato é mais estável. No entanto, o nitrato pode ser reduzido a nitrito, que por sua vez, ao reagir com outros compostos como aminas, forma metabolitos e produtos reativos, que têm efeitos adversos na saúde humana, como a inibição do transporte de oxigénio, cancro gástrico, entre outros. Assim, é importante desenvolver um método prático, rápido e eficiente para a determinação destes compostos em amostras de produtos à base de carne de forma a avaliar a exposição da população a estes contaminantes

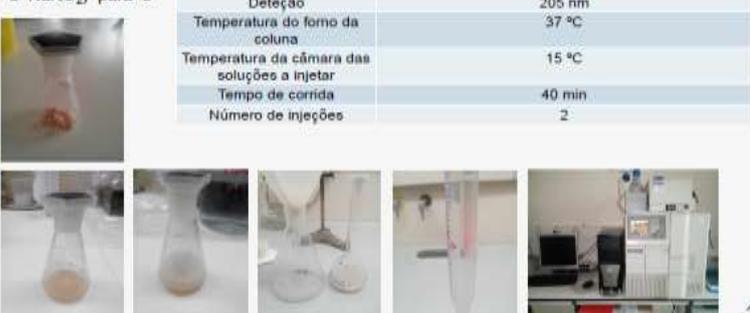
Procedimento experimental

O método de HPLC de troca iónica utilizado neste trabalho, baseado na norma EN 12014-4 (2005), encontra-se ainda em desenvolvimento. O nitrato e o nitrito são extraídos da amostra com água quente e as substâncias interferentes removidas com acetone. A separação é realizada num cromatógrafo de HPLC com uma coluna de troca iónica e deteção UV a 205 nm. O nitrato e o nitrito são identificados comparando os tempos de retenção dos padrões com os das amostras e quantificados através de uma curva de calibração.

Todas as amostras são analisadas em triplicado, sendo que na terceira toma é adicionado uma quantidade adequada de cada padrão (KNO_3 e NaNO_2) para o cálculo da recuperação.



| Condições cromatográficas | |
|--|---|
| Equipamento de HPLC | Waters com injetor automático, forno de coluna e detetor DAD |
| Coluna | Troca iónica, 4,6 x 150 mm, partículas de 10 µm |
| Fase móvel | Tampão gluconato de borato de lítio diluído em água com acetone a 12,5% |
| Volume de injeção | 40 µL |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Deteção | 205 nm |
| Temperatura do forno da coluna | 37 °C |
| Temperatura da câmara das soluções a injetar | 15 °C |
| Tempo de corrida | 40 min |
| Número de injeções | 2 |



Resultados Experimentais

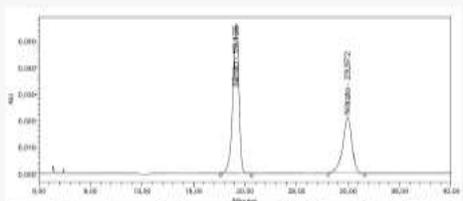


Figura 1: Cromatograma obtido a partir do padrão de 4 mg/mL de NaNO_2 e 8 mg/mL de KNO_3

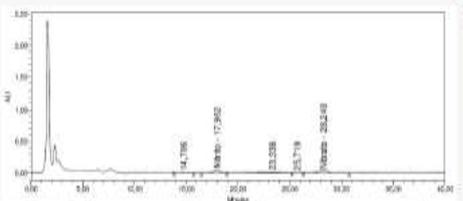


Figura 2: Cromatograma obtido a partir de uma amostra composta de flambé da perna extra com adição de ambos os padrões.

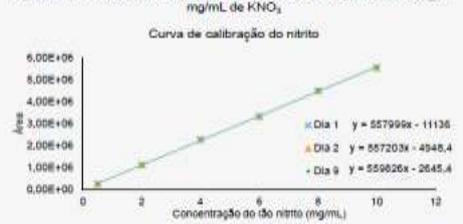


Figura 3: Representação gráfica da curva de calibração obtida a partir do nitrito para o primeiro, segundo e nono dia após a realização dos padrões.

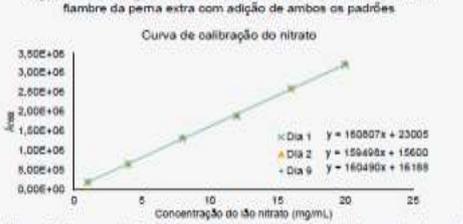


Figura 4: Representação gráfica da curva de calibração obtida a partir do nitrato para o primeiro, segundo e nono dia após a realização dos padrões.

Conclusões

Como se pode observar, o método permite separar os analitos com uma boa resolução e é bastante sensível a ambos, sendo mais sensível principalmente para ao nitrito. A curva de calibração é estável, uma vez que nas análises realizadas ao longo de nove dias, as curvas de calibração não se alteraram e as áreas dos picos também se mantiveram constantes. Os estudos realizados até ao momento revelam ser promissor a aplicação deste método na análise de amostras à base de carne.

Referências

M. J. Dennis, H. E. Key, T. Paothorn, M. Porter, R. C. Massey (1992). The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC. *Food Additives and Contaminants*, 7, 489-491.

M. Iannarino, D. T. Aurelia, M. Cristina (2013). Endogenous levels of nitrate and nitrite in wide consumption foodstuff: Results of five years of office control and monitoring. *Food Chemistry*, 142, 763-771.

European Committee for Standardization, Norma Europeia EN 12014-4. Foodstuffs – Determination of nitrate and nitrite content – Part 4: Ion-exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products, 2008.

Anexo 12 – Poster exposto na 10ª Reunião Anual Portfir, INSA (2017)



Análise de nitratos e nitritos em alimentos à base de carne Otimização de um método de HPLC

C. D. Carvalho ^{a, b}, M. C. Serra ^a, E. R. Vasco ^b

^a ISEL, Área Departamental de Engenharia Química, Rua Conselheiro Emídio Navarro 1, 1959-007 Lisboa, Portugal

^b Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal
e-mail: elsa.vasco@insa.min-saude.pt

Objetivo

Este estudo teve como objetivo a otimização de um método com base na norma europeia EN 12014-4 para determinar nitratos e nitritos em alimentos à base de carne por HPLC.

Introdução

Os nitratos e os nitritos, embora utilizados como aditivos alimentares nos produtos à base de carne (fiambre, chouriço, presunto, entre outros) são também considerados contaminantes. Além da função de conservantes, através da sua ação antimicrobiana, conferem ainda a cor característica destes produtos, contribuindo para as suas propriedades organolépticas.

O nitrito é extremamente reativo, enquanto que o nitrato é mais estável. No entanto, este pode ser reduzido a nitrito, que por sua vez, ao reagir com outros compostos como aminas, forma metabolitos e produtos reativos, que têm efeitos adversos na saúde humana, como a inibição do transporte de oxigénio, cancro gástrico, entre outros.

Assim, é importante desenvolver um método de análise rápido e eficiente para a determinação de nitratos e nitritos em amostras de produtos à base de carne de forma a avaliar a exposição da população a estes contaminantes.

Procedimento Experimental

Amostras - Fiambre e salsichas enlatadas.

Método – HPLC com coluna de troca iónica e deteção UV.

Extração – Água a 50/60°C.
Clarificação – Acetonitrilo.

Identificação – Comparação dos tempos de retenção do padrão de nitrato e nitrito com os das amostras.

Quantificação – Método do padrão externo (seis pontos de calibração).

Método estatístico – Teste de hipóteses: teste t emparelhado. Foram realizados 5 ensaios com cada um dos métodos em estudo: o procedimento de extração referido na norma, com água a 50/60°C, e o mais utilizado na bibliografia, com adição de água a 100°C, seguida de um banho com refluxo a 100°C por 15 minutos.

Tabela 1 - Condições cromatográficas.

| Equipamento de HPLC | Waters com injetor automático, forno de coluna e detetor DAD |
|-----------------------------|--|
| Coluna | *IC-PAK Anion HC* 4,6 x 150 mm, 10 µm |
| Fase móvel | Tampão gluconato de borato de lítio diluído em água com acetonitrilo a 12,5% |
| Volume de injeção | 40 µL |
| Fluxo | 1 mL/min |
| Deteção | 205 nm |
| Temperatura forno da coluna | 37°C |
| Temperatura amostras | 15°C |
| Tempo de corrida | 40 min |

Resultados

O processo de otimização abordou os seguintes parâmetros:

Comprimento de onda de deteção

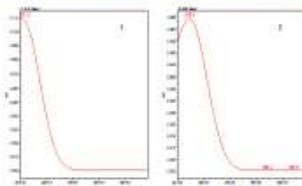


Figura 1 - Espectros de absorção do nitrato (1) e do nitrito (2).

Confirma-se, com os espectros de absorção, a utilização do comprimento de onda intermédio de 205 nm.

Preparação das soluções padrão

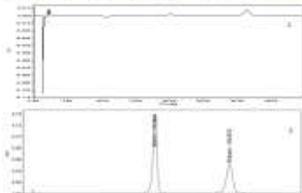


Figura 2 - Cromatogramas de uma solução padrão de nitrito de sódio (10 mg/mL) e nitrato de potássio (20 mg/mL) em água (1) e em fase móvel (2).

A preparação dos padrões com fase móvel (figura 2.2), melhorou a performance do cromatograma em relação aos preparados com água (figura 2.1).

Processo de extração

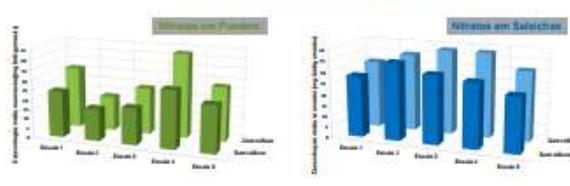


Figura 3 - Resultados da aplicação do teste estatístico à análise de nitrato numa amostra de fiambre. Figura 4 - Resultados da aplicação do teste estatístico à análise de nitrito numa amostra de salsichas enlatadas.

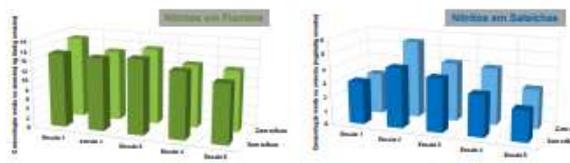


Figura 5 - Resultados da aplicação do teste estatístico à análise de nitrato numa amostra de fiambre. Figura 6 - Resultados da aplicação do teste estatístico à análise de nitrito numa amostra de salsichas enlatadas.

Tabela 2 - Valores de t calculados e partir dos resultados obtidos.

| $t_{\text{tabelado}} = 2,31$ | Salsichas | Fiambre |
|------------------------------|-----------|---------|
| Nitrato | 0,57 | 1,32 |
| Nitrito | 1,09 | 0,32 |

Os resultados obtidos nos ensaios realizados para efetuar o teste estatístico estão resumidos nas figuras 3 a 6.

Considerando um intervalo de confiança de 5%, para 8 graus de liberdade, o valor de t tabelado é de 2,31.

Os valores de t experimentais foram calculados e encontram-se na tabela 2.

Como se pode ver, o t experimental é inferior ao t tabelado, não existem diferenças significativas entre os dois métodos, logo, optou-se por seguir o método de extração proposto pela norma.

Fluxo da fase móvel

A norma recomenda um fluxo da fase móvel de 1 mL/min. Testou-se o fluxo de 1,5 mL/min com o objetivo de diminuir o tempo de corrida. No entanto, a concordância dos resultados diminuiu, razão pela qual se voltou ao fluxo de 1 mL/min.

Composição da fase móvel

Realizaram-se ensaios com a fase móvel recomendada pela norma (12,5 % de acetonitrilo) e com uma fase móvel com menor percentagem de acetonitrilo (6,25 %), uma vez que este reagente é tóxico e dispendioso. A fase móvel com menor percentagem de acetonitrilo fez aumentar os tempos de retenção dos analitos, pelo que não melhoraria o desempenho do método.

Conclusões

Os ensaios para otimização do método de determinação de nitrato e nitrito em alimentos à base de carne permitiram confirmar as condições de trabalho e melhorar os cromatogramas.

O comprimento de onda de deteção (205nm), a composição e o fluxo da fase móvel, a temperatura e o processo de extração foram confirmados como os mais adequados e conforme a norma propunha. A introdução de fase móvel na preparação dos padrões melhorou muito os cromatogramas obtidos.

Referências

11. J. Davies, R. S. Kay, T. Pipworth, M. Palmer, R. C. Haseley (1985) The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC, *Food Additives and Contaminants*, 7, 455-461
12. Sarmento, D. T. Nunes, L. Castro (2012) Endogenous levels of nitrate and nitrite in urine: comparison of results of five years of clinical controls and monitoring, *Food Chemistry*, 140, 763-771
- European Committee for Standardization, Norma Europeia EN 12014-4, "Foodstuffs – Determination of nitrate and nitrite content – Part 4: Ion exchange chromatographic (IC) method for the determination of nitrate and nitrite content of meat products, 2006