

Validação do método de determinação de nitrato e nitrito em produtos lácteos por cromatografia iónica

Rayanne Hungara Carneiro Moraes

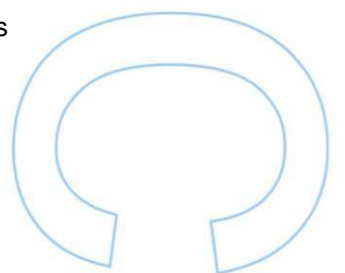
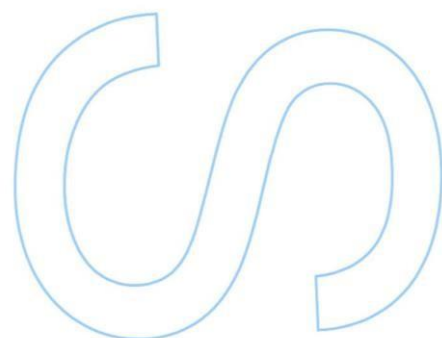
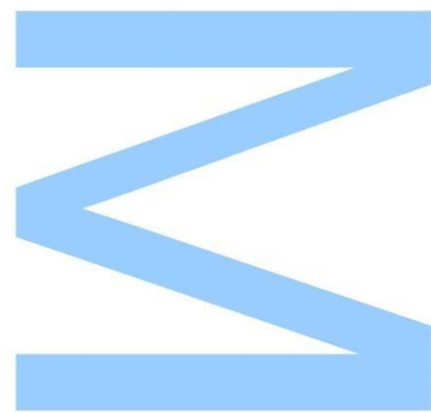
Mestrado em Química

Departamento de Química e Bioquímica

2019

Orientador

Paulo Joaquim Ferreira de Almeida, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

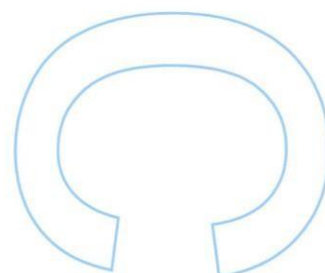
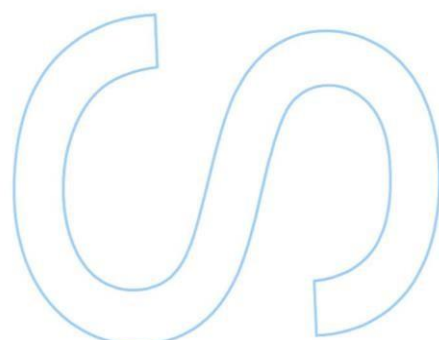
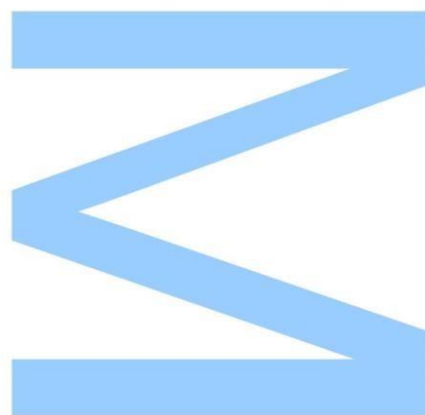




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Deus, por todas as oportunidades e bênçãos proporcionadas em minha vida.

Aos meus pais, Roseli Gonçalves e Jucelio Hungara, pelo apoio oferecido em todas as minhas decisões e por todo amor. Ao meu irmão, João Victor Moraes, pela cumplicidade. E a toda minha família que sempre acreditou em mim.

Ao Professor Paulo Joaquim Almeida por toda atenção e conhecimento disponibilizado para auxiliar na elaboração deste trabalho.

Ao grupo Mérieux NutriScience Portugal pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento deste trabalho, em especial a técnica Ana Martins, pelo acompanhamento diário, e a Engenheira Laura Sousa e a Doutora Alice Santos.

A este país, Portugal, que me proporcionou uma ótima experiência profissional e pessoal. Aos meus amigos da Residência Universitária Alberto Amaral pelo companheirismo, em especial a Carolina Rodelli e Elza Dantas.

A minha turma do mestrado da FCUP que me recebeu de forma acolhedora, em especial a Rita Magalhães, Inês Garrido e José Dinis, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Por fim, a todos que fizeram parte deste ciclo e contribuíram direta ou indiretamente para concretização desta etapa.

Resumo

Para acompanhar o mercado, é imprescindível que os laboratórios estejam adequados com os requisitos da qualidade para garantir a obtenção de resultados confiáveis. Por isso, a validação de um método é muito importante para o desempenho do mesmo. Isto garante que o método está adequado para alcançar o objetivo pretendido. E a maior vantagem é refletida para os clientes, uma vez que os resultados se tornam fiáveis com a validação do método.

Por isso, o objetivo principal foi a elaboração de uma metodologia para validação do método de determinação dos iões nitrito e nitrato nos produtos lácteos, através da cromatografia iónica. O método começou a ser planeado após o aprofundamento na técnica e juntamente com os analistas do laboratório. Este projeto de dissertação foi desenvolvido em parceria com a empresa Mérieux NutriScience Portugal.

De forma a alcançar a validação do método, foram realizados os estudos da curva de calibração, dos limiares analíticos, do coeficiente de correlação linear, da gama de trabalho, da repetibilidade, da precisão intermédia e dos testes de recuperação. Devido ao extenso volume de trabalho nas instalações da empresa e ao tempo limitado para desenvolvimento do tema, a validação do método não foi concluída. Por isso, este trabalho serve como ponto de partida para desenvolver novas abordagens para obtenção de um método válido para a determinação de nitrito e nitrato em produtos lácteos.

Palavras-chave: iões, nitrito, nitrato, lácteos, cromatografia iónica, validação do método.

Abstract

To keep pace with the market, it is indispensable that the laboratories are adequate to the quality requirements to assure the achievement of reliable results. Therefore, validating a method is very important to its own performance. This ensures that the method is adequate to achieve the intended objective. And the biggest benefit is reflected to the clients, once that the results become reliable with the method validation.

Hence, the main goal was elaborating a methodology to validate the nitrate and nitrite ion determination method in lacteal products, through the ion chromatography. The method started being planned after the deepening in the technique and together with the laboratory analysts. This dissertation project was developed in partnership with the enterprise Mérieux NutriScience Portugal.

In order to achieve the method validation, were realized studies of the calibration curve method, the analytical threshold, the linear correlation coefficient, the range of work, the repeatability, the intermediate precision and the recovery tests. Due to the extensive volume of work in the company facilities and the limited time to the topic development, the method validation was not concluded. Therefore, this work serves as a starting point to develop new approaches to obtain a valid method for the determination of nitrate and nitrite in lacteal products.

Keywords: ions, nitrite, nitrate, lacteal, ion chromatography, method validation.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
1. Introdução.....	10
1.1. Indústria Alimentar.....	14
1.1.1. Análises.....	14
1.1.2. Silliker Portugal.....	15
1.2. Nitrato e Nitrito.....	15
1.2.1. Consequências da presença em matrizes alimentares	17
1.3. Cromatografia Iónica	18
2. Validação do Método	22
2.1. Exatidão	22
2.2. Precisão	23
2.2.1. Repetibilidade.....	24
2.2.2. Reprodutibilidade.....	25
2.3. Incerteza.....	25
2.4. Linearidade.....	26
2.5. Seletividade/Especificidade do Método.....	27
2.6. Sensibilidade do Método.....	27
2.7. Limiares Analíticos.....	28
2.7.1. Limite de Detecção (LD).....	28
2.7.2. Limite de Quantificação (LQ)	29
2.8. Robustez	30
3. Experimental.....	31
3.1. Amostras alimentares estudadas.....	31

3.2.	Reagentes e preparação de soluções.....	31
3.3.	Material e equipamento	32
3.4.	Preparação da amostra	33
3.4.1.	Procedimento dos extratos	33
3.5.	Condições cromatográficas	33
4.	Resultados e Discussão	35
4.1.	Calibração para o nitrito e para o nitrato e alguns parâmetros analíticos	35
4.2.	Determinação de nitrito e nitrato nas amostras.....	38
4.3.	Estudo de repetibilidade, precisão intermédia e recuperação de fortificação nas amostras	40
4.4.	Estudo da exatidão.....	44
4.4.1.	Método da curva de calibração.....	44
4.4.2.	Método de adição de padrão	45
5.	Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	50
	Referências Bibliográficas	52

Índice de Figuras

Figura 1: Ilustração das partes principais de um cromatógrafo moderno.	12
Figura 2: Representação esquemática do íon nitrato.	16
Figura 3: Representação esquemática do íon nitrito.	16
Figura 4: Esquematização da ação do antídoto azul de metileno na metahemoglobina.	18
Figura 5: Esquematização da troca iônica na cromatografia iônica.....	19
Figura 6: Ilustração dos componentes da cromatografia iônica.....	19
Figura 7: Esquematização da separação de dois componentes (A e B) através da cromatografia iônica.....	20
Figura 8: Retas de calibração representando a área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrito nas soluções padrão.	35
Figura 9: Retas de calibração representando a área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrato nas soluções padrão.	36
Figura 10: Carta de controle dos declives das curvas de calibração do nitrito.....	37
Figura 11: Carta de controle dos declives das curvas de calibração do nitrato.	38
Figura 12: Gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrito que resulta da adição do padrão.....	47
Figura 13: Gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrato que resulta da adição do padrão.....	47
Figura 14: Gráfico da área do pico cromatográfico em função a concentração que resulta da adição do padrão NO_2^-	48
Figura 15: Gráfico da área do pico cromatográfico em função a concentração que resulta da adição do padrão NO_3^-	49

Índice de Tabelas

Tabela 1: Tipos de Cromatografia.....	10
Tabela 2: Resultados do teor de nitrito e nitrato de sódio para cada análise realizada para uma amostra de leite UHT.	39
Tabela 3: Resultados do teor de nitrito e nitrato de sódio para cada análise realizada para uma amostra de lactosoro.	40
Tabela 4: Parâmetros da repetibilidade para o leite UHT.....	41
Tabela 5: Parâmetros da repetibilidade para o lactosoro.	41
Tabela 6: Parâmetros da precisão intermédia para o leite UHT.	42
Tabela 7: Parâmetros da precisão intermédia para o lactosoro.	42
Tabela 8: Percentagem de recuperação nas análises de nitrito e nitrato no leite UHT.	43
Tabela 9: Percentagem de recuperação nas análises de nitrito e nitrato no lactosoro.	43
Tabela 10: Valores atribuídos e desvios padrão para a proficiência.....	44
Tabela 11: Resultados de nitrito e nitrato de sódio para a amostra FAPAS de acordo com o método da curva de calibração.	45
Tabela 12: Tomas e volumes adicionados às amostras FAPAS.	46
Tabela 13: Concentrações do padrão adicionado com suas respectivas áreas.	46

1. Introdução

A cromatografia é uma técnica analítica utilizada para a separação dos componentes de uma mistura através de um processo físico. O bioquímico russo Tswett criou esta técnica em 1906, depois de realizar um trabalho de separação dos diferentes pigmentos de uma planta utilizando um solvente para lavar a solução de clorofila por um tubo que continha adsorvente. A técnica é baseada no transporte da amostra por uma fase móvel ao longo de uma fase estacionária, sendo a designação da cromatografia dada de acordo com a fase móvel e a fase estacionária utilizadas, conforme exemplifica a Tabela 1 [1].

Tabela 1: Tipos de Cromatografia

Cromatografia	Fase Móvel	Fase Estacionária
LLC	Líquida	Líquida
LSC	Líquida	Sólida
GLC	Gasosa	Líquida
GSC	Gasosa	Sólida

Nesta técnica há a separação das substâncias entre a fase estacionária, que dispõe de uma grande área superficial, e a fase móvel, que arrasta os diferentes compostos da mistura. De acordo com o objetivo final, ou seja, o composto de interesse, podem ser utilizados diferentes processos cromatográficos [2]. O procedimento mais simples é a cromatografia em papel, que não requer muitos instrumentos para sua realização. Este método é aplicado em pequenas quantidades de amostras e tem como principal finalidade identificar compostos polares. Considera-se como uma técnica de partição líquido-líquido, onde a celulose presente no papel absorve uma certa quantidade de água da mistura do solvente, devido à sua afinidade, possibilitando um comportamento como fase estacionária líquida a interagir com a fase móvel. Sendo assim, ocorre a divisão dos componentes da amostra entre as duas fases e aqueles capazes de formar ligações de hidrogénio são arrastados mais lentamente [3].

Um outro tipo de cromatografia é a em camada fina, onde são utilizados sólidos granulados, como por exemplo a sílica, alumina ou poliamida, para agir como a fase estacionária. Neste caso, a amostra é aplicada em pequena quantidade perto da extremidade inferior de uma placa de vidro ou outro material inerte contendo uma camada fina do sólido utilizado como fase estacionária. Após sua secagem, a base da placa é inserida em um recipiente contendo um solvente, escolhido de acordo com a

polaridade da substância a ser separada, para que o mesmo atue como a fase móvel. O deslocamento da fase móvel ocorre por capilaridade e após a placa se encontrar totalmente seca, aplica-se um composto reativo que possibilite visualizar através da cor as substâncias de interesse [2].

Já a cromatografia gasosa caracteriza-se pela realização de análises quantitativas em diferentes tipos de amostras, mesmo com concentrações consideravelmente baixas e com uma rápida determinação dos compostos orgânicos, particularmente os compostos voláteis. Para a quantificação, é necessário que o cromatógrafo esteja ligado a um detetor com capacidade de resposta de uma substância proporcionalmente a concentração da mesma. Partindo de uma calibração externa, a execução deste método é feita através de uma sequência de soluções padrão preparadas próximas da concentração do analito presente na amostra. A partir disto, é gerado um gráfico das alturas ou áreas dos picos cromatográficos em função da concentração, utilizando os cromatogramas oriundos dos padrões. A concentração de analito na solução amostra é calculada pela equação da reta que, idealmente, deve passar pela origem do gráfico. Também é possível realizar as análises quantitativas através de uma padronização interna, na qual mede-se uma quantidade de substância para atuar como padrão interno e a mesma é inserida em cada padrão e na amostra. Neste caso, o parâmetro analítico será a razão da área do pico do analito e do padrão interno, que precisa ter um alto nível de pureza, além de não interagir com as substâncias da amostra e ser, em termos químicos, semelhante ao analito de estudo e não estar presente na amostra [4].

Por outro lado, a cromatografia líquida de alta eficiência classifica-se como um dos métodos analíticos mais requisitados com finalidade qualitativa e quantitativa, devido à sua boa sensibilidade para determinações quantitativas, além de possibilitar a separação de compostos não voláteis e termicamente instáveis [5]. Neste método, a fase móvel é direcionada através de uma bomba de alta pressão à coluna e, durante o percurso, recebe a amostra pela válvula de injeção. Na coluna ocorre a separação e, a partir do efluente gerado na mesma, são detectados os analitos eluídos. Com o auxílio de um software, o cromatograma é gerado possibilitando a leitura do sinal recebido pelo detetor em função do tempo de corrida da análise. A Figura 1 esquematiza as partes principais de um cromatógrafo moderno [6].



Figura 1: Ilustração das partes principais de um cromatógrafo moderno.

Além das classificações de cromatografia gasosa para os processos que utilizam gás na fase móvel e cromatografia líquida para aqueles que utilizam líquido, há também diferenças quanto ao comportamento entre os componentes e as fases móvel e estacionária, sendo a cromatografia classificada como de partição, adsorção e permuta iónica. A cromatografia iónica é uma técnica que detecta e quantifica os iões presentes na solução através da condutividade elétrica. Esta cromatografia utiliza as forças eletrostáticas para atrair os iões de cargas opostas a partir da interação entre a fase móvel, que contém os iões de uma solução, e a fase estacionária [7]. O presente trabalho utilizou esta técnica cromatográfica para as análises de interesse e, por isso, este método será abordado com mais profundidade posteriormente.

Atualmente, a cromatografia é utilizada em diversas áreas e não apenas para separar os compostos químicos, mas também para identificar a presença dos mesmos numa mistura. No ramo alimentício, esta técnica permite a quantificação de substâncias, mesmo em baixas concentrações, e auxilia no controle de contaminantes presentes nos alimentos, de forma que não ocasionem danos à saúde da população e garanta o consumo seguro [8].

Uma das contaminações mais comuns em alimentos são provenientes de agrotóxicos utilizados na agricultura com a finalidade de evitar insetos e pragas durante o cultivo. Estes pesticidas são responsáveis por causar danos ao meio ambiente e graves problemas à saúde humana. Os indivíduos com acumulação de substâncias químicas presentes nos agrotóxicos podem apresentar quadros de hipotireoidismo, cancro de mama, redução na quantidade de sêmen e cancro de testículo, aborto espontâneo, redução do peso no nascimento, entre outras patologias. Na natureza, a excessiva aplicação desses produtos pode acarretar poluição do ar, solo e água. Por essas razões,

em 1977, o Conselho Europeu definiu níveis de vestígios de pesticidas presentes em produtos oriundos de animais e vegetais e a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs limites para esses resíduos em diferentes alimentos [9].

Os consumidores devem também prestar atenção aos corantes artificiais presentes em guloseimas, como doces e gomas, bebidas alcoólicas, cereais matinais, entre outros produtos. É indispensável a adição da cor para dar uma boa aparência e aumentar a venda. Porém, o emprego de corantes em alimentos ocasiona, em algumas situações, reações alérgicas. Sendo assim, internacionalmente, é recomendada a verificação do consumo de cada aditivo e estabelecido um limite de consumo diário para ingestão do mesmo [10].

Também requerem aditivos o processo de produtos cárneos, onde os sais de cura são utilizados para que o alimento atinja características como sabor, cor, aroma e textura suficientes para sua qualidade sensorial. Como exemplos de sais de cura podem ser citados nitrato de sódio e nitrito de potássio, adicionados em escalas industriais para conservação da carne contra a ação bacteriana. Entretanto, o consumo dessas substâncias pode levar à formação de nitrosaminas e ao desenvolvimento de metamioglobina tóxica, patologias que serão aprofundadas, juntamente com a discussão sobre nitritos e nitratos presentes em matrizes alimentares, na seção 1.2. deste trabalho [11].

De forma natural, os íons nitrito e nitrato podem ser encontrados em alimentos vegetais e animais. Como exemplo pode ser mencionado o leite que apresenta contaminação desses íons, mesmo em níveis baixos, uma vez que o nitrato é absorvido pelos animais através da alimentação bovina. Já com o leite cru, as concentrações de nitrito e nitrato variam conforme o lugar e época do ano, de acordo com a alimentação dos animais e a utilização de fertilizantes nitrogenados [12].

A partir disso, observa-se que a característica analítica pode ser um fator determinante para classificar um alimento desde sua produção até como produto já finalizado. São realizados testes físico-químicos, químicos e microbiológicos pelos órgãos ambientais, pelas empresas responsáveis pela produção ou por laboratórios contratados para confirmar que os produtos alimentícios cumprem as especificações necessárias para comercialização. Com isso, é possível controlar e garantir que um alimento seguro chegue ao consumo da população [13].

1.1. Indústria Alimentar

Desde os anos 1990, a indústria alimentar passou por adaptações quanto à sua produção, sendo necessárias alterações para reduzir os impactos no meio ambiente. Também aderiu aos sistemas de controle de pontos críticos a fim de garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, possibilitando a comunicação com o consumidor a nível de informação nos rótulos. Em Portugal, essas mudanças começaram a ocorrer quando o país se tornou membro da União Europeia e passou de um mercado estável e protegido para um setor em constantes alterações e radicais mudanças [14].

O alimento tem por objetivo oferecer energia e suprir as necessidades de formação e manutenção dos tecidos do corpo humano, bem como regular o funcionamento dos órgãos. Ao analisar o valor nutritivo dos alimentos, não se trata apenas da sua composição química, uma vez que, na sua maioria, são formados por carbono, hidrogénio, oxigénio e nitrogénio. Porém também são relacionados os hidratos de carbono, proteínas, gorduras, vitaminas, sais minerais e água. Assim sendo, a tecnologia dos alimentos tem fundamento na química orgânica, inorgânica, analítica e na bioquímica, além da físico-química quando os fatores físicos podem influenciar as estruturas químicas. Isso possibilita o acompanhamento e controle desde a colheita da matéria prima, passando pelo armazenamento até chegar ao processamento e depósito, para que as transformações processadas sejam conhecidas e controladas, mantendo a qualidade dos produtos [15].

1.1.1. Análises

Para que seja possível a caracterização de um alimento é preciso uma análise aprofundada do mesmo, como sua constituição química e seus aspectos físicos e sensoriais [16]. As análises, em geral, baseiam-se numa amostragem representativa do produto inteiro, levando em consideração todo cuidado na recolha e na preparação para que não ocorram alterações externas no resultado final. Mesmo que o maior cuidado possível seja tomado em análises posteriores, não há como corrigir ou compensar erros ocorridos no processo de amostragem, por isso, as amostras parciais devem estar bem homogeneizadas e sua manipulação requer bastante cuidado. Também é sugerido que as mesmas sejam conservadas congeladas, entre -5°C e -10°C , até que suas análises sejam realizadas [17].

As amostras requerem uma preparação para possibilitar uma viável análise, sendo necessária, na maioria delas, a trituração prévia e, caso a amostra apresente elevado teor de matéria seca (acima de 80%), aconselha-se uma moagem final diretamente [17].

As análises mais comuns na indústria alimentar são de determinação do teor de humidade, cinzas, proteínas, carboidratos, fibras, lipídios, vitaminas e minerais. A partir das análises químicas e físico-química são determinados os componentes químicos constituintes de uma amostra e, com o passar dos anos e o avanço tecnológico, essas análises são realizadas de forma mais rápida e em menos etapas [16].

1.1.2. Silliker Portugal

Em 1992, nasce em Vila Nova de Gaia a EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., atendendo a necessidades de mercado do setor agroalimentar, e, de imediato, alcança a posição nacional de líder no setor. Atendendo aos acentuados requisitos da qualidade e segurança alimentar, a empresa ultrapassou a escassez da oferta de serviços de análises e assessoria da época. Já em 1993, a EGI consegue a acreditação do seu laboratório e integra o Sistema Português da Qualidade. Enquanto no ano 2000, o laboratório de Análise Sensorial é criado e em 2005 a empresa amplia suas instalações em consequência do seu crescimento e projetando seu desenvolvimento futuro [18].

Em 2008, a empresa começa a fazer parte de um dos maiores grupos mundiais na área de prestação de serviços em qualidade e segurança alimentar quando a multinacional norte-americana adquire a EGI, originando a Silliker Portugal, S.A. [18].

A partir de 2014, a Silliker passa a designar-se como Mérieux NutriSciences e amplia a sua prestação de serviços a variados setores, como água e ambiente, agroquímicos, bens de consumo, farmacêutico e cosméticos. Presente em 21 países, o grupo possui cerca de 6500 colaboradores e 100 laboratórios acreditados por todo o mundo. Em 50 anos, a Mérieux NutriScience conquistou a confiança da indústria alimentar com sua experiência em segurança e qualidade alimentar e expandiu a sua atuação a diferentes setores industriais [18].

1.2. Nitrato e Nitrito

Inorganicamente, o nitrato é a partícula conjugada do ácido nítrico, enquanto organicamente são ésteres de ácido nítrico. Este ião, de fórmula química NO_3^- , carrega uma carga formal negativa, sendo um anião poliatômico com 62,004 g/mol de massa molecular. Está arranjado com um átomo de nitrogénio no centro cercado por três átomos de oxigénio idênticos, formando uma configuração planar trigonal, como pode

ser visto na Figura 2 (o círculo vermelho representa o oxigênio, o azul, o nitrogênio e os traços indicam o tipo de ligação) [19].

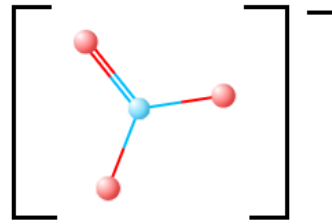


Figura 2: Representação esquemática do íon nitrato.

Já o nitrito é a partícula conjugada do ácido nitroso e não deve ser confundido com o nitrato. Quando se apresentam como nitritos inorgânicos na forma MNO_2 , sendo M um metal, são insolúveis, com exceção dos nitritos alcalinos. Entretanto, como nitritos orgânicos eles podem ser isoméricos, mas não idênticos aos correspondentes compostos nitro, que são grupos funcionais com a mesma fórmula e estrutura do nitrato, porém com substituição do átomo de O_2 por um grupo R. O íon nitrito tem massa molecular de 46,005 g/mol e sua estrutura pode ser visualizada na Figura 3 [20].

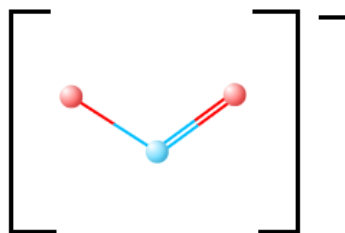


Figura 3: Representação esquemática do íon nitrito.

O nitrito pode se apresentar como uma solução incolor ou sólidos cristalinos. Seu contato com a pele e olhos pode causar irritações, além de ser tóxico se ingerido, assim como o íon nitrato. Este pode causar a toxicose através do metabolismo entero-hepático de nitrato em amoníaco (NH_3), tendo o nitrito como intermediário. Também pode oxidar os átomos de ferro na hemoglobina, transformando o ferro (II) para ferro (III), incapacitando-a de transportar oxigênio – condição denominada como metemoglobinemia [20]. O nitrato em fase líquida pode ser imediatamente inflamável em contato com materiais orgânicos. Apesar de não ser considerado combustível, provoca aceleração dos materiais combustíveis [19].

1.2.1. Consequências da presença em matrizes alimentares

Como mencionado anteriormente, os produtos cárneos passam por uma adição de sais de cura para melhorar suas propriedades sensoriais. Este procedimento inclui a adição de cloreto de sódio e sais de nitrito e/ou nitrato. A ação de fixação de cor nas carnes através do nitrato foi descoberta ocasionalmente por ser impureza presente no sal de cloreto de sódio [21]. Além de agir como intensificador de cor nas carnes, o nitrito também é utilizado na conservação de peixes e na produção de queijo com o objetivo de retardar a oxidação de lipídios, reduzir odores na oxidação da gordura, propiciar melhor textura dos alimentos e atuar com efeito antimicrobiano. Naturalmente, o nitrato pode estar presente em carnes frescas, leite e produtos lácteos, cereais, frutas, bebidas alcoólicas e vegetais. Na maioria desses alimentos a concentração de nitrato é inferior a 10 mg/kg e dificilmente ultrapassa 100 mg/kg. No entanto, em vegetais e salsichas os teores podem se apresentar entre 200 e 2500 mg/kg [22].

Caso a aplicação dos sais de cura ultrapassem os limites recomendados pela legislação vigente, podem existir graves riscos à saúde humana como a toxicidade aguda e crônica. Como visto, o excesso de nitrito ingerido pode ocasionar a metahemoglobinemia, que impede que as hemoglobinas transportem o oxigênio. Além disso, sua reação com aminas e amidas podem originar substâncias com comportamento carcinogênico, mutagênico e teratogênico, como as nitrosaminas e nitrosamidas. O nitrato não é tão tóxico como o nitrito, porém é possível que NO_3^- seja reduzido a NO_2^- através de enzimas oriundas de microrganismos presentes ao manusear e processar inadequadamente os alimentos, além do ambiente ácido no estômago que também favorece a redução [23].

Entretanto, é possível tratar a toxicologia do nitrito quanto a metahemoglobinemia, com o azul de metileno, capaz de atuar como redutor no lugar do NO_2^- através da recepção de um íon H^+ oriundo do NADPH chegando a azul de leucotoleno que possibilita a captação do H^+ pela metahemoglobina que volta a ser uma hemoglobina funcional. O esquema de desintoxicação que transforma o Fe^{3+} em Fe^{2+} está ilustrado na Figura 4 [24].

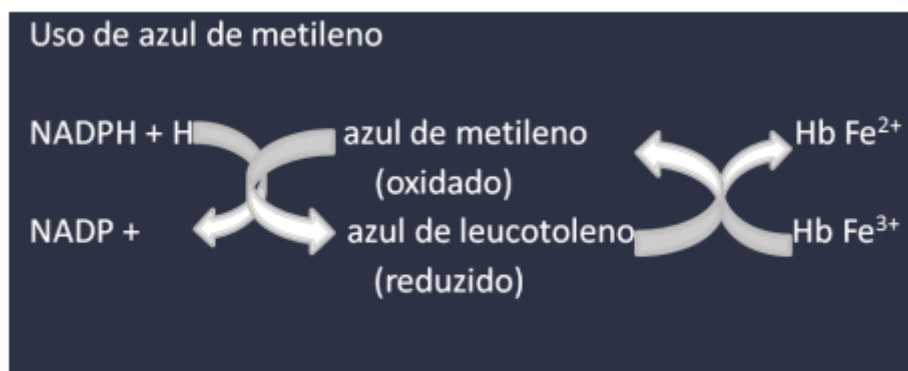


Figura 4: Esquemática da ação do antídoto azul de metileno na metahemoglobina.

É difícil estimar a ingestão diária de nitrato por um indivíduo porque isso está diretamente ligado com a dieta do mesmo. Porém, é previsto uma variação de 50 a 150 mg/pessoa/dia, com exceção de dietas vegetarianas que apresentam em média 200 mg/pessoa/dia. Geralmente, a principal fonte de consumo de nitrato são os vegetais, considerando que a água apresente níveis inferiores a 10 mg/l do ião. O comitê da FAO/OMS recomenda que a ingestão diária aceitável (IDA) de nitrato seja até 3,7 mg/kg do peso corporal de um indivíduo, enquanto a ingestão de nitrito seja inferior a 0,06 mg/kg. Vale ressaltar que nos alimentos infantis destinados a crianças menores de três meses é proibido conter nitrito [22].

1.3. Cromatografia Iônica

Segundo o guia de terminologias de métodos de separação em química analítica recomendadas pelo IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a cromatografia iônica define-se como “cromatografia em que a separação é baseada principalmente em diferenças nas afinidades de troca iônica dos componentes da amostra” [25]. Nesta técnica, os princípios de separação podem ser de troca iônica, formação de pares iônicos ou exclusão iônica, sendo eles definidos de acordo com o método da cromatografia. Atualmente, a cromatografia de pares iônicos (IPC) é classificada como uma aplicação mais específica, bem como a cromatografia de exclusão iônica (IEC), diferente da cromatografia de troca iônica, usualmente nomeada como cromatografia iônica (IC) [26].

A cromatografia iônica baseia-se em reações estequiométricas dos iões presentes de uma solução com, geralmente, uma substância sólida que possui grupos funcionais capazes de, através das forças eletrostáticas, fixar iões, levando o processo de troca iônica a uma condição de equilíbrio. A Figura 5 esquematiza o processo de troca de

catiões e aniões, onde os iões analitos são A e os eluentes que competem pela posição de troca são E [26].

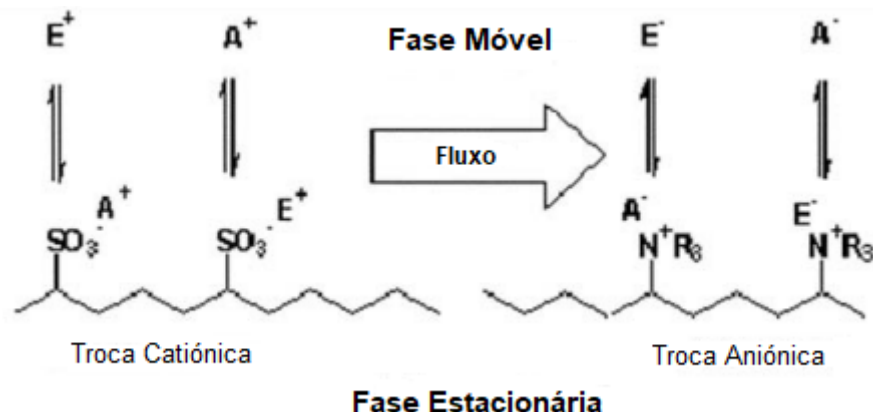


Figura 5: Esquemática da troca iónica na cromatografia iónica.

Esta técnica classifica-se como um método cromatográfico sólido-líquido, sendo constituída pela passagem do eluente (líquido) pela fase estacionária (sólido) que, em geral, se dispõe em forma de uma coluna cilíndrica constituída por uniformes partículas de pequeno diâmetro, como 5 μm . Esta, ainda, tem de 5 a 30 cm de comprimento, diâmetro aproximado de 4-9 mm e seu material deve ser rígido como aço inoxidável ou plástico. Uma bomba de alta pressão é utilizada para direcionar o eluente para a coluna, onde, posteriormente, a amostra será injetada e se juntará ao fluxo da fase móvel, que, por fim, chegará ao detetor, como é possível ver na Figura 6 [27].

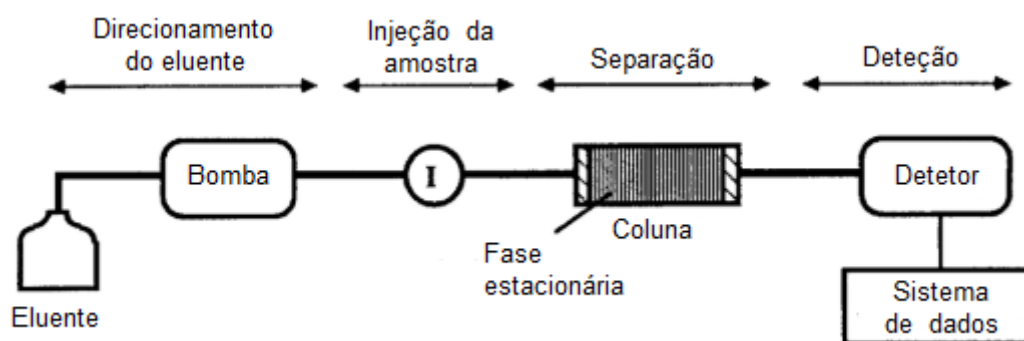


Figura 6: Ilustração dos componentes da cromatografia iónica.

Uma vez que uma quantidade da amostra é injetada no topo ao mesmo tempo em que o eluente passa continuamente pela coluna, pode-se afirmar que o cromatógrafo iónico é operado em modo de eluição. A partir do detetor, um cromatograma é produzido com os componentes da amostra, já que os mesmos progridem com diferentes velocidades na coluna, tendo diferentes momentos de deteção, como exemplifica a Figura 7 [27].

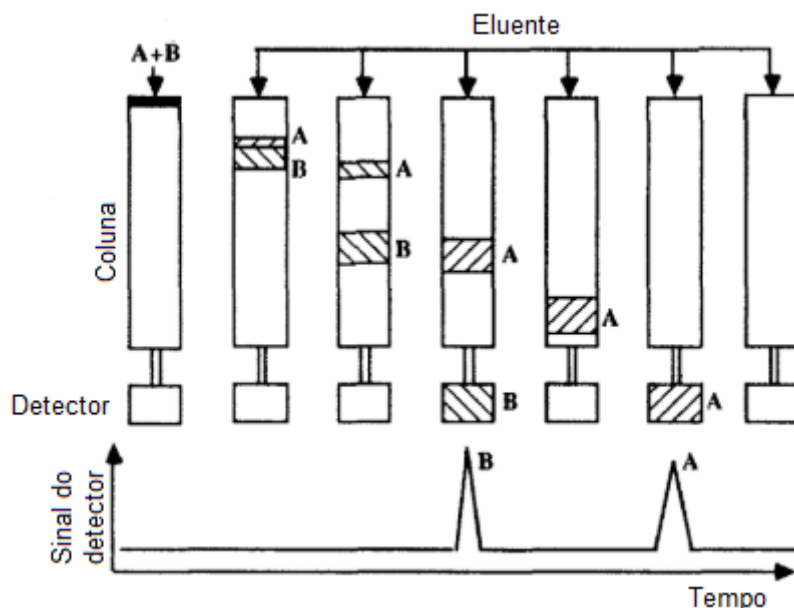
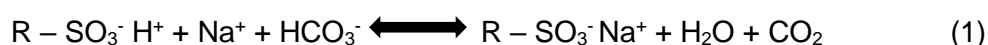
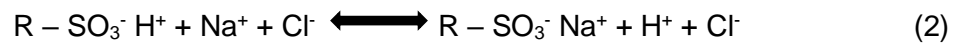


Figura 7: Esquemática da separação de dois componentes (A e B) através da cromatografia iônica.

A qualidade da análise depende da adequada escolha da fase estacionária e das condições cromatográficas que determinam uma eficiência no processo de separação na coluna. Com isso, a capacidade do detector de identificar e quantificar os analitos é medida conforme a sensibilidade, linearidade, resolução (volume da célula do detector) e ruído (limite de detecção). Usa-se, geralmente, o detector de condutividade elétrica, podendo acompanhar um sistema supressor, que reduz quimicamente a alta condutividade de fundo dos eletrólitos no eluente e torna os íons da amostra mais condutores [27].

Na cromatografia iônica, geralmente, a coluna de separação e a detecção são definidas de início, enquanto a fase móvel pode ser facilmente alterada com o objetivo de influenciar na separação. Essa escolha baseia-se em critérios como a compatibilidade com o método de detecção, a natureza química e concentração do íon eluente, o pH e o conteúdo de solvente orgânico (modificadores). Conseqüentemente, o eluente precisa ser adequado para a coluna e a técnica supressora. Nesta técnica, é inserido um supressor entre a coluna de separação e o detector a fim de reduzir a condutividade do eluente e aumentar o nível de detecção do analito, quando possível. Ou seja, neste equipamento ocorre uma modificação química tanto no eluente quanto no analito. Com isto, também se denomina cromatografia de íons com supressão e as equações 1 e 2 exemplificam a supressão química aplicada a uma cromatografia aniônica de um eluente NaHCO_3 e um analito de íon cloreto com um permutador de catiões de forma H^+ [26].





A deteção espectrofotométrica na região do ultravioleta e visível (UV-Vis – *Ultraviolet and Visible Spectrophotometry*) compreende uma vasta aplicação na cromatografia, visto que as moléculas orgânicas possuem conjuntos de átomos responsáveis pela cor que possibilitam a absorção no visível e outras que absorvem na zona do ultravioleta. Já com os iões inorgânicos, sua utilização é mais restrita, uma vez que apenas os analitos como nitrato, brometo ou iodeto são capazes de absorver. Por outro lado, analitos importantes como fluoreto, sulfato e fosfato, podem também ser medidos pela UV-Vis de forma indireta [26].

2. Validação do Método

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025, entende-se por validação a confirmação das condições particulares relacionadas com uma específica utilização, avaliando o cumprimento dos requisitos através de exames e evidência objetiva indicada. Já de acordo com o Guia Relacre 3 – Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, um documento da Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal que é usado como um guia de orientações, para que um resultado seja validado o mesmo “tem que satisfazer os requisitos de qualidade que lhe sejam exigidos”. Para isso, utilizam-se três avaliações para determinar a qualidade deste resultado, sendo elas a exatidão, a precisão e a incerteza.

A validação de um método pode ser realizada através de uma avaliação direta ou indireta dos parâmetros estudados e deve englobar as questões e mudanças nas quais um órgão reconhecido ainda não tenha validado. A maior parte da avaliação utilizada para a validação do método neste trabalho será de forma indireta, que é executada e determinada a partir de evidências dos seus característicos fatores [30].

2.1. Exatidão

A exatidão dos métodos de ensaio é indicada, essencialmente, através da avaliação direta que requer os componentes dos erros aleatórios e sistemáticos associados [30]. Este critério tem o objetivo de analisar o quão próximo o valor obtido pelo método, representado por μ , se encontra do valor de referência, τ , que é aceito como verdadeiro. Com isso, a exatidão, que depende dos erros sistemáticos, pode ser estabelecida através das análises realizadas com o auxílio de materiais de referência certificados (MRC), bem como a partir de atuações em ensaios interlaboratoriais (EIL) e testes de recuperação [31].

Este parâmetro pode ser representado através do erro absoluto (Δ), do erro relativo (%RE), do fator de desempenho (*z-score*), do erro normalizado (E_n) e da percentagem de recuperação (%Rec) [31], expressa pela expressão a seguir.

$$\% Rec = \frac{C_R - C_V}{C_T} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde, C_R é a concentração experimental do analito encontrada na solução amostra após a contaminação; C_V , a concentração verdadeira do analito encontrado na amostra; e C_T a concentração teórica da contaminação, que é expressa pela seguinte equação:

$$C_T = \frac{C_{AD} \cdot V_S}{m} \cdot k \quad (4)$$

Onde, C_{AD} é a concentração adicionada do padrão; V_S , o volume da solução; m , a massa da amostra; e k , o fator de conversão em nitrito e nitrato de sódio (1,500 e 1,371, respectivamente).

2.2. Precisão

A precisão de um processo analítico é examinada através da proximidade dos resultados obtidos de uma mesma amostra e pode ser representada pelo desvio padrão [32], conforme mostra a equação seguinte baseada no Guia RELACRE 13.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Onde, s é o desvio padrão; n , a quantidade de análises; x_i , cada valor; e \bar{x} a média dos valores.

Também é possível a avaliação da precisão através da variância ou do coeficiente de variação (CV) [32], expresso pela seguinte equação do Guia RELACRE 13:

$$\%CV = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (6)$$

Este parâmetro visa a avaliação da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes para a mesma amostra em repetição, padrões ou amostras similares, em determinadas condições. Vale ressaltar que preferivelmente deve ser estudada a precisão relacionada a amostras para que o efeito de matriz seja minimizado. De forma extrema, determina-se essa dispersão pela repetibilidade e reprodutibilidade das amostras, enquanto de maneira intermediária esta análise pode ser realizada através do desvio padrão da precisão intermédia (S_i), que para dois ensaios pode ser calculada diretamente pela equação [30]:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (7)$$

Onde, o t representa o número de amostras ensaiadas, j o número da amostra, y_{j1} o primeiro resultado obtido para a amostra j e y_{j2} o segundo resultado obtido para a amostra j .

E o coeficiente de variação médio (CV_{pi}), expresso [30]:

$$CV_{p_i} = \frac{S_i}{\bar{y}} \cdot 100 \quad (8)$$

Onde, o desvio padrão da precisão intermédia (S_i) é dividido pela média dos resultados das amostras (\bar{y}) multiplicado por 100 para o valor final ser encontrado em percentagem.

2.2.1. Repetibilidade

Este critério tem por objetivo relatar a precisão de um método de ensaio a partir de análises realizadas sobre a mesma amostra respeitando as mesmas condições, se possível, como laboratório, analista, equipamento, reagentes e tempo. Geralmente considera-se uma probabilidade de 95% para calcular o limite de repetibilidade (r), que deve estar situado abaixo da diferença de dois resultados de ensaio, conforme as condições citadas anteriormente, ou seja, $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. Se ocorrer dessa diferença ser maior que o limite de repetibilidade, deve ser realizada uma análise crítica da situação e, caso for necessário, retornar a repetição dos ensaios [30].

A variância associada a repetibilidade de um método de ensaio em um determinado nível i de concentração pode ser encontrada pela equação [30]:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad (9)$$

Onde, S_{ri}^2 é a variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório; S_{wi}^2 , a variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório; $(n_{wi}-1)$, os graus de liberdade da série de análises; e p , número de laboratórios participantes.

Considerando o nível de confiança de 95%, tem-se o limite de repetibilidade (r) com [30]:

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} \quad (10)$$

Onde, S_{ri} é o desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), para um determinado nível de concentração, é expresso, em percentagem [30]:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde, CV_r é numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade (S_{ri}) dividido pela média dos valores considerados (\bar{x}).

2.2.2. Reprodutibilidade

Diferente da repetibilidade, a reprodutibilidade é determinada em distintas condições de ensaio e medições, como laboratórios, operadores, equipamentos e/ou tempo, em cima do mesmo método sobre uma mesma amostra. Assim como o item anterior, o limite de reprodutibilidade (R) deve se encontrado abaixo da amplitude de dois resultados dos ensaios, de acordo com as condições definidas. A variância associada à reprodutibilidade é calculada pela seguinte equação [30]:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (12)$$

Onde, S_{Ri}^2 é a variância da reprodutibilidade; S_{Li}^2 , a variância interlaboratorial (erros sistemáticos); e S_{ri}^2 , a variância da repetibilidade.

Assim como para a repetibilidade, e para um nível de confiança de 95%, o limite de reprodutibilidade (R) é calculado através da equação [30]:

$$R = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{Ri} \quad (13)$$

Onde, t é o valor tabelado de t de Student; S_{Ri}^2 , a variância de reprodutividade associada aos resultados considerados, para cada laboratório; S_{ri} , o desvio padrão de reprodutividade associada aos resultados considerados, para cada laboratório.

Do mesmo modo, o coeficiente de variação de reprodutividade (CV_R) é expresso tal como o de repetibilidade, em percentagem [30]:

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (14)$$

2.3. Incerteza

Segundo o Vocabulário Internacional de Termos Básicos e Genéricos em Metrologia (VIM), define-se como incerteza o “resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurado”, podendo ser expresso na forma de um desvio padrão ou a metade de um intervalo relacionado a um determinado nível de confiança. De forma geral, os componentes que contribuem para a incerteza de uma medição podem ser definidos pelo desvio padrão experimental ou classificados de acordo com uma distribuição de probabilidades atribuídas com base em experiências ou informações [33].

Este parâmetro pode ser obtido através da incerteza combinada da determinação do valor medido com a incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão. Isto é, assumindo que haja propagação de erros, para cada valor de x_0 há um intervalo de

confiança do verdadeiro valor de y_0 , limitados por duas hipérbolas que envolvem a reta de calibração. Assim sendo, para uma determinada concentração x_0 , o desvio padrão estimado pode ser calculado da seguinte forma [30]:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

Onde, $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual; b , o declive; N , o número de padrões de calibração; n , o número de ensaios independentes (replicados) efetuados para a amostra; y_0 , o sinal instrumental; \bar{y} , a média dos valores do sinal instrumental; x_i , os valores individuais da concentração; e \bar{x} , a média dos valores da concentração dos padrões utilizados.

2.4. Linearidade

O fator da linearidade contribui para avaliar a capacidade que um método tem para gerar resultados correspondentes a concentração do analito presente nas amostras, considerando uma dada gama de concentração. A quantificação requer o conhecimento de dependência da resposta medida com a concentração do analito. Para o cálculo deste item, na maioria dos casos, analisa-se o gráfico gerado pelos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou através dos mínimos quadrados calculado pela equação da regressão linear. Com isso, utiliza-se o coeficiente de correlação linear (r) de modo a indicar que a reta está apropriada a ser considerada como modelo matemático [34]. Ou seja, o valor de r deve se aproximar o máximo possível de 1.

Segundo o Guia RELACRE 13, outro método para determinar a linearidade é através do cálculo da função de calibração linear e a função de calibração não linear, através de um conjunto de pares ordenados, juntamente com os desvios-padrão residuais $S_{y/x}$ e S_{y_2} , respectivamente. A diferença das variâncias é calculada com a seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \cdot S_{y/x}^2 - (N - 3) \cdot S_{y_2}^2 \quad (16)$$

Com isto, é calculado o valor teste PG com a equação [30]:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y_2}^2} \quad (17)$$

Comprando PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, conclui-se que quando menor ou igual a F, a função de calibração é linear, caso contrário, a função é não linear.

2.5. Seletividade/Especificidade do Método

A seletividade do método tem por objetivo garantir que o pico detectado seja apenas do composto de interesse, ou seja, avalia a capacidade de identificar as substâncias almeçadas frente a possíveis interferências, como impurezas, produtos de degradação e substâncias semelhantes. Da mesma forma, a especificidade do método também tem por objetivo avaliar o nível de interferência de outras espécies na determinação do composto de interesse. Porém, quando um método instrumental determina a separação de somente uma substância de interesse, o mesmo é classificado como específico, enquanto classifica-o como seletivo ao determinar a presença de várias substâncias químicas. Sendo assim, a IUPAC sugere que o termo seletividade seja o mais adequado para utilização, visto que a maioria dos métodos cromatográficos produz resposta para mais de uma substância química [35].

Uma forma de avaliar a seletividade do método instrumental analítico, isto é, estimar as possíveis interferências presentes, seria a partir de um teste de recuperação realizado em uma sequência de amostras pertencentes a mesma matriz, respeitando as condições de repetibilidade e alterando a concentração do analito. Com isso, o método será qualificado como seletivo ao apresentar resultados de recuperação próximos a 100%, levando em consideração a metodologia praticada, uma vez que alguns métodos permitem intervalos mais amplos de recuperação enquanto outros não aceitam grandes intervalos, e os critérios de cada laboratório que realiza os ensaios de recuperação [30].

2.6. Sensibilidade do Método

A sensibilidade do método tem por definição determinar o quão capaz o mesmo é para diferenciar concentrações pequenas do analito, isto é, associa-se pela magnitude do sinal do analito. O cálculo pode ser feito conforme a derivada de primeira ordem da curva de calibração de um intervalo da concentração. Considerando a curva de calibração um modelo linear, este parâmetro permanecerá constante ao longo do intervalo de trabalho e seu valor poderá ser determinado através do declive da reta de calibração. Este parâmetro pode ser calculado através da equação [30]:

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (18)$$

Onde, ΔL é o acréscimo do valor lido e ΔC , a variação correspondente a este acréscimo.

2.7. Limiares Analíticos

Para calcular os limites analíticos do método de análise utiliza-se como base a bibliografia internacional que se compreende o limite de deteção e limite de quantificação, determinando assim os princípios de qualidade [30].

2.7.1. Limite de Deteção (LD)

O limite de deteção pode ser denominado como o menor teor medido que possibilita a deteção do analito presente, associado a uma certeza analítica razoável. Ou seja, com este limiar analítico é possível detectar numa amostra a menor quantidade de substância a ser analisada, mesmo que não haja a quantificação de um valor exato. Qualitativamente falando, é a mínima concentração possível de distinguir do branco, isto é, uma amostra da mesma matriz, porém sem o analito. De um modo geral, o limite de deteção é obtido através da equação [30]:

$$LD = X_0 + k \cdot \sigma_0 \quad (19)$$

Onde, X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões vestígios (de 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzido o mais possível a situação de rotina; e o σ_0 , o desvio padrão associado a X_0 .

Partindo do princípio que a lei da probabilidade de X_0 é conhecida o suficiente para assumir que é gaussiana, o valor de K é considerado 3,3 para um nível de confiança de 99,7%. Sendo assim, a equação seguinte também se torna válida [30].

$$LD \cong X_0 + 3,3 \cdot \sigma_0 \quad (20)$$

Entretanto, se o método envolver uma calibração linear, o cálculo é feito da seguinte maneira [30]:

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (21)$$

Onde, $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da reta.

Além do desvio padrão residual, também é possível encontrar o limite de deteção através do erro padrão, que é calculado pela equação a seguir [36].

$$EPADYX = \sqrt{\frac{1}{(n-2)} \left[\Sigma(y - \bar{y})^2 - \frac{[\Sigma(x-\bar{x})(y-\bar{y})]^2}{\Sigma(x-\bar{x})^2} \right]} \quad (22)$$

Este erro padrão relaciona o valor-y previsto para cada x da regressão [36].

Assim, a equação 21 pode ser transcrita como:

$$LD = \frac{[3,3 \cdot EPADYX]}{b} \quad (23)$$

2.7.2. Limite de Quantificação (LQ)

Com o limite de quantificação é possível medir a menor concentração quantificável do analito na amostra, associada a uma determinada exatidão e precisão. Isto é, este limiar analítico corresponde ao padrão de calibração de concentração mais baixa, com exceção do branco. Após sua determinação, é recomendado um teste para averiguar se a exatidão e precisão alcançadas são aceitáveis. Para um caso geral, o limite de quantificação é determinado pela equação [30]:

$$LQ = X_0 + 10\sigma_0 \quad (24)$$

Onde, X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos (de 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o máximo possível a situação de rotina; e o σ_0 , o desvio padrão associado a X_0 .

Em casos em que o método envolve a utilização de uma calibração linear, usa-se [30]:

$$LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (25)$$

Onde, $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da reta.

Assim como o limite de deteção, o limite de quantificação também pode ser encontrado através do erro-padrão da seguinte forma:

$$LQ = \frac{[10 \cdot EPADYX]}{b} \quad (26)$$

2.8. Robustez

O parâmetro da validação denominado como robustez tem por finalidade medir o quão sensível é um método de ensaio frente a pequenas variações, isto é, o método pode ser considerado robusto se as pequenas variações possivelmente presentes durante sua execução não exerçam interferência. Sendo assim, constata-se que quanto mais robusto for um método, mais confiável será sua precisão [34].

Uma forma de determinar a robustez de um método é através do teste de *Youden*, o qual realiza a variação de 7 diferentes situações dentro de 8 ensaios realizados, permitindo assim, a ordenação das influências relacionadas a cada variação no resultado e indicação do tipo de influência que cada variação sofre [34].

3. Experimental

3.1. Amostras alimentares estudadas

Para o estudo deste trabalho foram selecionados o leite UHT e o lactosoro como amostras utilizadas para a elaboração da validação dos produtos lácteos. Também fez parte da validação uma amostra de circuito fornecida pela FAPAS, onde foi possível comparar aos resultados alcançados com outros laboratórios que realizam o mesmo ensaio.

3.2. Reagentes e preparação de soluções

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica e a água deve ser desionizada.

- Hidróxido de potássio (KOH) 38% solução aquosa comercial;
- Fase móvel - Solução de hidróxido de potássio, 15 mM;
Pipetar 1,53 ml de hidróxido de potássio 38% solução aquosa (VWR Chemicals) para um balão volumétrico de 1000 ml. Completar o volume com água e homogeneizar. Filtrar.
Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da realização do ensaio.
- Ácido acético glacial (CH_3COOH);
- Solução de ácido acético 3%:
Adicionar 6 ml de ácido acético (VWR Chemicals) em aproximadamente 100 ml de água em um balão volumétrico de 200,0 ml. Perfazer o volume com água desionizada e homogeneizar.
- Solução padrão de nitrito de sódio (NaNO_2):
Dissolver 0,2000 g de nitrito de sódio (Merck, 99,6%) em um balão volumétrico de 250,0 ml com água.
- Solução padrão de nitrato de potássio (KNO_3):
Dissolver 0,2000 g de nitrato de potássio (VWR Chemicals, 100,1%) em um balão volumétrico de 250,0 ml com água.
- Soluções padrão diluídas:
Em balões volumétricos de 100,0 ml, preparar 5 soluções de calibração por diluição da solução padrão de nitrito de sódio e nitrato de potássio com os seguintes volumes: 0,50 ml, 1,00 ml, 1,50 ml, 2,00 ml e 5,00 ml. A partir desta última solução (5 ml), preparar mais 5 soluções de calibração por diluição com os seguintes volumes: 0,50 ml, 1,00ml, 2,00 ml, 3,00 ml, 4,00ml. Adicionar 2 ml

de ácido acético a 3% e perfazer o volume com água. Efetuar os registros da preparação das soluções. Soluções de referência para a construção da reta de calibração.

As soluções de calibração devem ser conservadas no frigorífico.

Estas soluções têm validade de um mês.

- Metanol (CH₃OH) – VWR Chemicals;

3.3. Material e equipamento

O material de laboratório e os equipamentos utilizados neste trabalho foram os seguintes:

- Balança analítica, capaz de pesar com aproximação de 0,1 mg;
- Frascos plásticos PP de capacidade de 250 ml com tampa;
- Placa de agitação;
- Agitadores magnéticos;
- Cafeteira elétrica;
- Sonda termostática;
- Conta-minutos;
- Frigorífico regulável a aproximadamente 4°C;
- Micropipetas, de volume variado, com capacidade adequada;
- Seringas de 5 ml;
- Filtros de seringa de PVDF de 25 mm, com 0,20 µm de porosidade;
- Balões volumétricos de 100 ml;
- Balão volumétrico de 200 ml;
- Balão volumétrico de 250 ml;
- Balão volumétrico de 1000 ml;
- Sistema de filtração adequado para filtros de membrana de polipropileno de 47 mm e tamanho de poro de 0,45 µm;
- Polyvials de 5 ml;
- Filter Caps para polyvials de 5 ml;
- Hypersep Spe 500 mg / 2,8 ml C18;
- Sistema de extração na fase sólida, com bomba de pressão;
- Linha de gás hélio;
- Sistema de HPLC composto por:
 1. Sistema de injeção, automático, com capacidade para diferentes volumes;
 2. Bomba isocrática de HPLC com capacidade de fluxo constante (fluxo 1,0 mL/min);

3. Desgaseificador;
4. Dionex IonPac™ AG20-HC, RFIC™ 4 x 50 mm;
5. Dionex IonPac™ AS20-HC, RFIC™ Analytical 4 x 250 mm;
6. Forno de colunas, regulável a 35°C;
7. Supressor, Dionex, AERS 500 4 mm;
8. Detetor de condutividade elétrica;
9. UV-Vis.

3.4. Preparação da amostra

A preparação da amostra é realizada de acordo com o procedimento interno da empresa, onde são definidas as diferentes preparações de acordo com a natureza da amostra e o objetivo da análise. Neste caso, o leite UHT fica em banho maria por 30 minutos a 39°C antes de ser aberto. Após esta etapa, o conteúdo é agitado bem, de forma a homogeneizar todo o líquido para avançar com a análise. Já o lactosoro é misturado de forma a dar uma melhor homogeneidade às amostras.

3.4.1. Procedimento dos extratos

- Pesar 10,0 g de leite UHT / 2,0 g de lactosoro para o frasco plástico e registrar a massa;
- Adicionar 4,0 ml de ácido acético a 3% e completar com água quente, a uma temperatura média de 60°C, até os 100,0 ml do frasco;
- Colocar o frasco na placa de agitação juntamente com os agitadores magnéticos por 30 minutos a uma agitação de 400 rpm;
- Deixar arrefecer até a temperatura ambiente;
- Perfazer o volume do frasco até 200,0 ml com água desionizada e homogeneizar;
- Deixar descansar por 20 minutos;
- Ativar as colunas C18 com 2,5 ml de metanol e 2,5 ml de água desionizada;
- Filtrar o sobrenadante para o polyvial de modo a que o volume filtrado seja 5 ml;
- Fechar o polyvial com Filter Caps;
- Injetar os extratos no dia da extração.

3.5. Condições cromatográficas

Para esta determinação as condições específicas são:

- Fluxo da fase móvel: 1 ml/min;
- Volume injetado: 50µL
- Temperatura do forno de colunas: 30 - 35°C
- Supressor: 38 mA
- Tempo de análise: 20 minutos
- Condutividade: 2,5 – 4,5 µS

4. Resultados e Discussão

4.1. Calibração para o nitrito e para o nitrato e alguns parâmetros analíticos

Na cromatografia iônica, a curva de calibração é um gráfico que representa a área do pico cromatográfico do analito no eixo dos yy em função da concentração do analito nos padrões utilizados no eixo dos xx. As concentrações dos padrões utilizados para construção das retas de calibração são conhecidas e, a partir disto, é possível determinar através de interpolação a concentração do analito na solução amostra.

Em cada dia de análise realizada foram geradas duas curvas de calibração, sendo uma para o ião nitrito e outra para o ião nitrato. Como exemplo, as figuras 8 e 9 a seguir mostram as duas curvas geradas no dia 22 de abril de 2019.

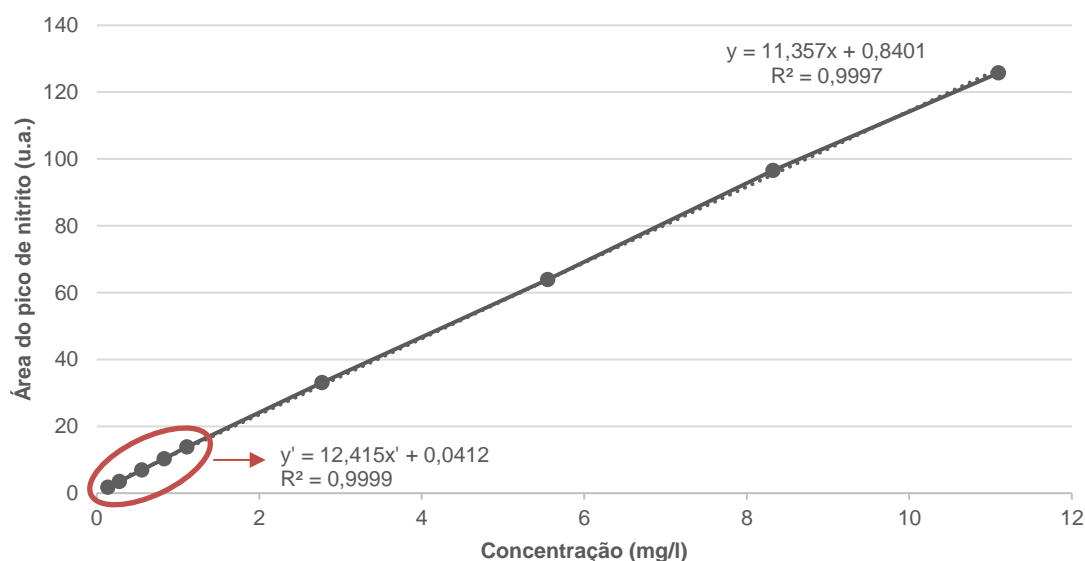


Figura 8: Reta de calibração representando a área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrito nas soluções padrão.

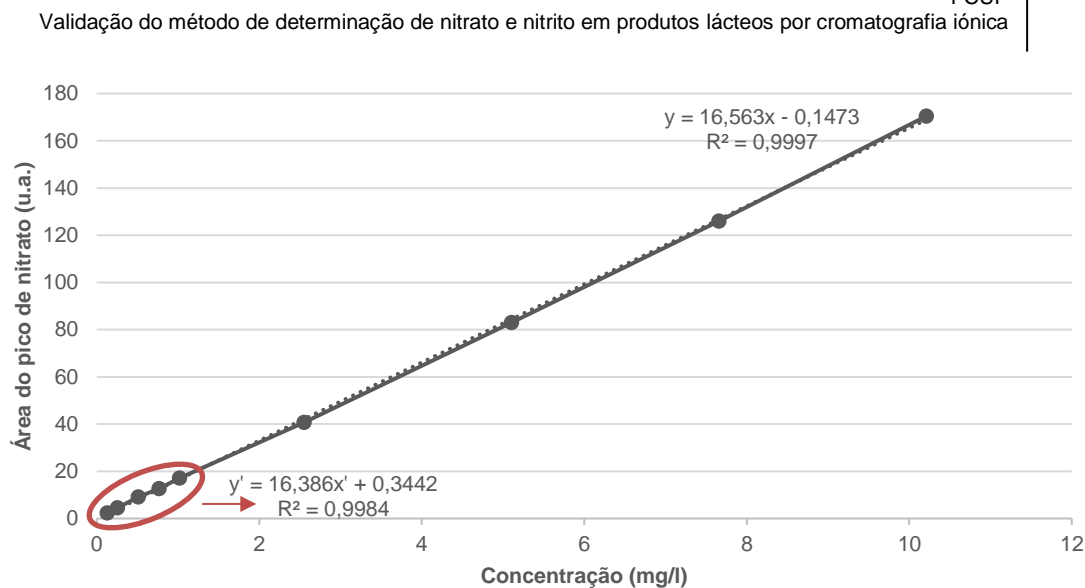


Figura 9: Retas de calibração representando a área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrato nas soluções padrão.

Com isso, é encontrada a melhor curva que se ajusta aos pontos e se torna possível a verificação da linearidade do gráfico, além da determinação do intervalo de concentração estudado, o limite de detecção e o limite de quantificação.

De acordo com as concentrações estudadas com os 9 pontos da curva de calibração, neste dia exemplificado pelos gráficos, 22 de abril de 2019, o intervalo de concentração trabalhado para o nitrito foi de 0,139 mg/l até 11,10 mg/l e para o nitrato, 0,128 mg/l até 10,21 mg/l. Com o período estudado deste trabalho, que começou no dia 7 de março de 2019 e foi até o dia 27 de maio de 2019, observou-se que a menor concentração de nitrito foi 0,135 mg/l e a maior, 11,59 mg/l. Já em relação ao nitrato, este intervalo de concentração esteve entre 0,124 mg/l e 10,52 mg/l.

Com os 5 primeiros pontos da reta, ou seja, na gama das concentrações baixas, o limite de detecção (LD) no dia 22 de abril de 2019 foi calculado utilizando a equação 23, tendo se encontrado um LD 0,014 mg/l para o nitrato e 0,056 mg/l para o nitrito. Com o período estudado do dia 7 de março de 2019 a 27 de maio de 2019, observou-se um limite de detecção médio de 0,014 mg/l para o nitrito e 0,067 mg/l para o nitrato. Neste intervalo de tempo, também foi observado que o menor limite de detecção encontrado durante as análises foi de 0,005 mg/l para o nitrito e 0,007 mg/l para o nitrato.

Já para o limite de quantificação (LQ) usou-se a equação 26 para calcular o LD no dia 22 de abril de 2019, sendo 0,044 mg/l para o nitrito e 0,169 mg/l para o nitrato. Analisando o período estudado, a média da concentração do limite de quantificação foi 0,043 mg/l de nitrito e a menor concentração encontrada foi de 0,015 mg/l. Já para o ião

nitrito, foi encontrada a média de 0,203 mg/l e a menor concentração quantificada foi de 0,021 mg/l.

Ainda com os estudos realizados com a curva de calibração, é possível avaliar a linearidade através do coeficiente de correlação linear (r) determinado com a equação da reta com os 9 pontos. No dia 22 de abril de 2019, o r da curva de calibração do nitrito foi 1,000 e do nitrato, 1,000. No período de estudo, foram encontrados os valores médios de r de 0,999 para o nitrito e 1,000 para o nitrato.

Também foram estudados os declives das curvas de calibração com 9 pontos experimentais durante o período em que as análises para a validação do método foram realizadas – de 7 de março a 27 de maio de 2019. A figura 10 representa o gráfico relacionado ao nitrito e a figura 11, ao nitrato.

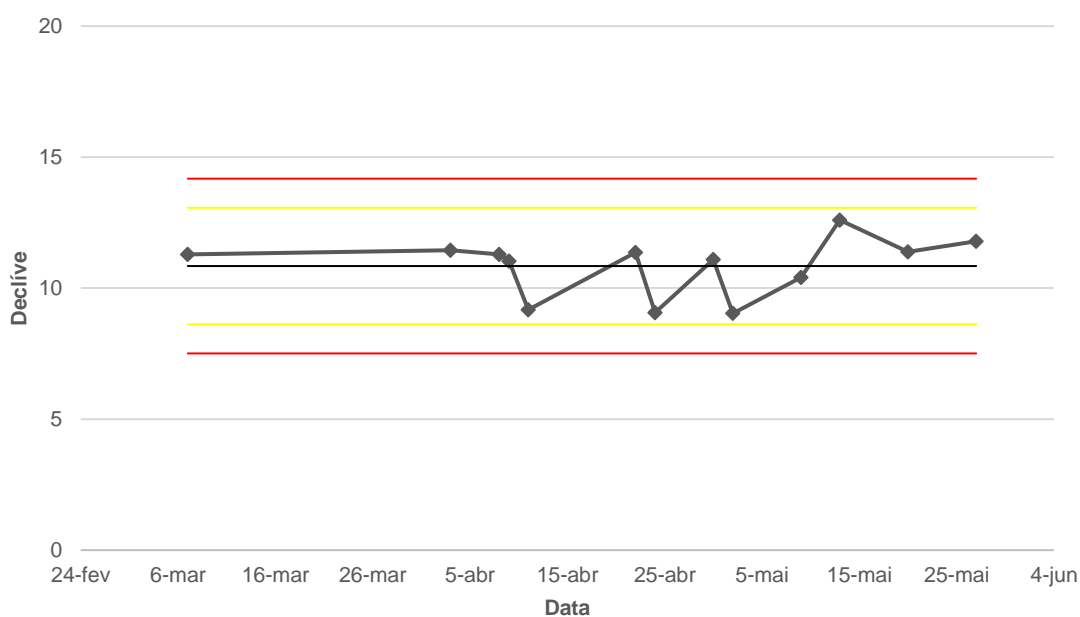


Figura 10: Carta de controle dos declives das curvas de calibração do nitrito.

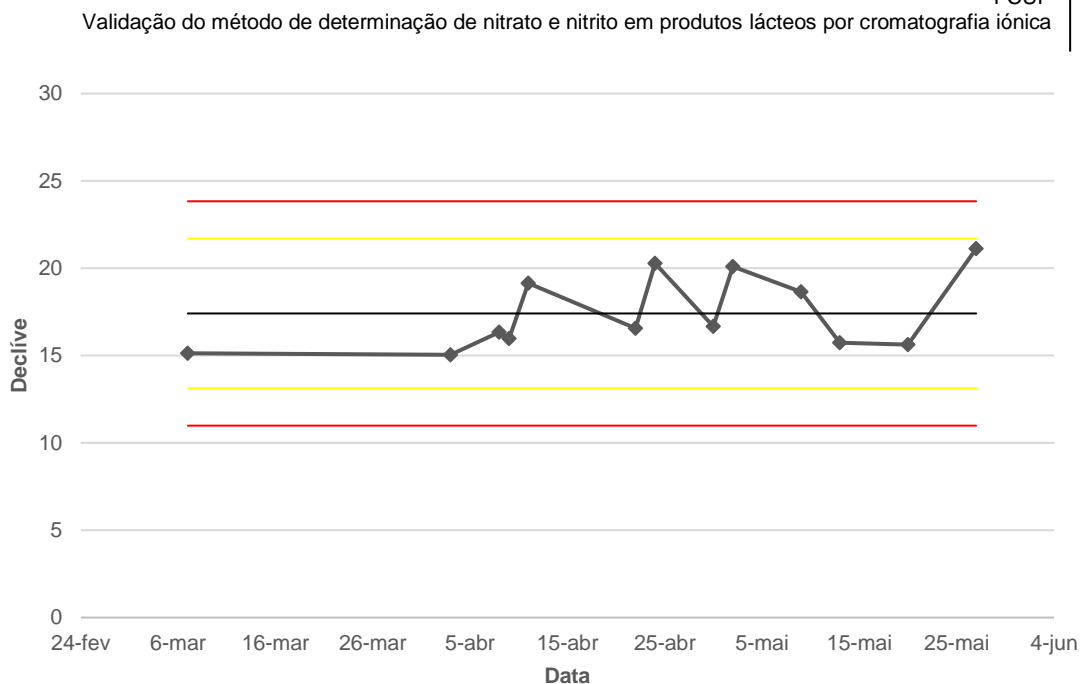


Figura 11: Carta de controle dos declives das curvas de calibração do nitrato.

4.2. Determinação de nitrito e nitrato nas amostras

Os resultados das amostras são expressos em mg de nitrito ou nitrato de sódio por kg de amostra, sendo obtidos através de:

$$C = \frac{C_i \times V \times F}{m} \times k \quad (27)$$

Sendo, C_i a concentração de nitrito/nitrato na amostra determinada pela curva de calibração, expressa em mg/l; V , o volume final da solução de extração, em ml; F , o fator de diluição; m , a massa da toma da amostra, em g; e k , o fator de conversão de massa dos iões para massa dos compostos nitrito e nitrato de sódio, sendo 1,500 e 1,371, respectivamente.

A tabela 2 apresenta os resultados de nitrito e de nitrato de sódio das análises realizadas com o leite UHT. Desta amostra, retiraram-se 22 tomas, sendo 2 delas levadas diretamente para análise e as demais foram contaminadas com nitrito e nitrato antes da análise.

Tabela 2: Resultados do teor de nitrito e nitrato de sódio para cada análise realizada para uma amostra de leite UHT.

Ensaio	Massa (g)	Contaminação (ml)	Resultados (mg/l)	
			NaNO ₂	NaNO ₃
1	10,00	-	1,200	2,200
2	10,00	-	1,100	1,900
3	10,01	2,000	182,3	122,7
4	10,01	2,000	177,7	122,5
5	10,01	2,000	175,8	122,0
6	10,01	2,000	176,4	122,2
7	10,00	2,000	177,7	126,6
8	10,00	2,000	177,5	125,8
9	10,00	2,000	180,0	127,7
10	10,01	2,000	182,3	127,0
11	10,01	2,000	180,4	125,6
12	10,01	2,000	178,3	123,7
13	10,00	2,000	139,8	149,6
14	10,01	2,000	136,1	147,2
15	10,01	1,000	89,70	65,10
16	10,01	1,000	84,00	67,00
17	10,00	0,500	41,90	35,30
18	10,01	0,500	40,80	33,70
19	10,00	0,750	84,90	52,40
20	10,00	0,750	89,70	50,80
21	10,01	1,250	112,1	83,00
22	10,00	1,250	107,0	82,10

Já a tabela 3 apresenta os resultados de nitrito e nitrato de sódio para as análises de lactosoro. Foi observado que a presença de nitrato de sódio nesta amostra é bastante superior ao nitrito de sódio.

Tabela 3: Resultados do teor de nitrito e nitrato de sódio para cada análise realizada para uma amostra de lactosoro.

Ensaio	Massa (g)	Contaminação (ml)	Resultados (mg/l)	
			NaNO ₂	NaNO ₃
1	2,009	-	2,100	123,6
2	2,001	-	2,500	114,9
3	2,001	1,000	276,7	520,6
4	2,002	1,000	289,6	560,8
5	2,007	1,000	267,7	586,1
6	2,008	1,000	280,1	595,9
7	2,007	1,000	289,0	651,0
8	2,004	1,000	284,1	640,2
9	2,004	1,000	270,2	670,1
10	2,006	1,000	271,1	640,5
11	2,001	1,000	286,2	536,4
12	2,005	1,000	279,7	537,7
13	2,003	0,500	166,3	267,0
14	2,003	0,500	173,9	265,1
15	2,002	2,000	841,5	726,6
16	2,002	2,000	882,9	786,5
17	2,009	1,500	773,4	561,9
18	2,001	1,500	845,6	556,2
19	2,007	0,750	296,1	357,2
20	2,008	0,750	302,9	359,0

4.3. Estudo de repetibilidade, precisão intermédia e recuperação de fortificação nas amostras

Para executar o trabalho de validação foram escolhidas duas amostras distintas de lácteos: o leite UHT e o lactosoro. Com isso, iniciou-se os estudos de repetibilidade, precisão intermédia e recuperação da fortificação nas amostras.

Com a repetibilidade, avaliamos aspectos importantes das análises realizadas nas amostras. Foram executados 10 ensaios idênticos de uma mesma amostra num mesmo dia e, partir dos dados relacionados a determinação de nitrito e nitrato, foram calculados

os valores do desvio padrão e da variância. Uma vez que com esses parâmetros se torna possível a avaliação da disposição dos valores relacionados ao valor esperado, que é expresso pela média, eles são importantes para avaliação da precisão do método.

Partindo da média das análises realizadas em um mesmo dia, calculou-se o desvio padrão a partir da equação 5 e a variância como o quadrado do desvio padrão. Com isso, os resultados são apresentados na tabela 4 para o leite UHT e na tabela 5 para o lactosoro.

Tabela 4: Parâmetros da repetibilidade para o leite UHT.

Repetibilidade – Leite UHT		
	NO₂⁻	NO₃⁻
Média (mg/kg)	178,8	124,6
Variância	5,289	4,795
Desvio Padrão	2,300	2,190
Desvio Padrão Relativo	1,286	1,758

Tabela 5: Parâmetros da repetibilidade para o lactosoro.

Repetibilidade – Lactosoro		
	NO₂⁻	NO₃⁻
Média (mg/kg)	279,4	593,9
Variância	62,53	2931
Desvio Padrão	7,908	54,14
Desvio Padrão Relativo	2,830	9,116

Com os ensaios de cada amostra em duplicado realizados em dias diferentes e com adição de diferentes concentrações da solução padrão de nitrito e nitrato, obtém-se a precisão intermédia que possibilita determinar o desvio padrão da precisão intermédia

(S_i), expresso pela equação 7, e o coeficiente de variação médio (CV_{pi}), equação 8. As tabelas 6 e 7 apresentam estes resultados para o nitrito e nitrato, respectivamente.

Tabela 6: Parâmetros da precisão intermédia para o leite UHT.

Precisão Intermédia – Leite UHT		
	NO₂⁻	NO₃⁻
S_i	2,835	1,132
CV_{pi} (%)	3,665	1,764

Tabela 7: Parâmetros da precisão intermédia para o lactosoro.

Precisão Intermédia		
	NO₂⁻	NO₃⁻
S_i	26,52	19,24
CV_{pi} (%)	6,185	4,673

Por outro lado, verificou-se através dos testes de recuperação a aplicabilidade do método quanto a especificidade e seletividade. A faixa de recuperação considerada ótima para este método está entre 80 – 120%. A partir disto, notou-se que o método está adequado para aplicação nas amostras de leite UHT, conforme é possível visualizar com a tabela 8. O cálculo da recuperação foi feito pela equação 3.

Tabela 8: Percentagem de recuperação nas análises de nitrito e nitrato no leite UHT.

Ensaio com contaminação	% Recuperação	
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
1	110,9	85,70
2	108,1	85,52
3	107,0	85,20
4	107,3	85,31
5	108,0	88,41
6	107,9	87,84
7	109,5	89,20
8	110,9	88,72
9	109,7	87,72
10	108,5	86,40

Porém, ao analisar as recuperações das amostras de lactosoro os resultados se distanciaram mais que o previsto como ideal, considerado 100%, como mostra a tabela 9.

Tabela 9: Percentagem de recuperação nas análises de nitrito e nitrato no lactosoro.

Ensaio com contaminação	% Recuperação	
	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
1	63,70	114,8
2	66,84	126,3
3	61,70	133,9
4	64,72	136,7
5	66,85	152,5
6	65,55	149,1
7	62,22	157,7
8	62,49	149,4
9	65,98	119,3
10	64,54	119,9

4.4. Estudo da exatidão

Para realizar o estudo da exatidão foi utilizada uma amostra de leite em pó a nível interlaboratorial fornecida pela FAPAS® - *Food Chemistry*, que fornece teste de proficiência para avaliação do desempenho do método/laboratório ao comparar seus resultados. Neste teste participaram 61 laboratórios e os resultados da amostra de leite em pó foram expressos em nitrito e nitrato de sódio no valor de 36,0 e 24,6 mg/kg, respectivamente.

Este estudo interlaboratorial calcula o resultado da amostra de acordo com a média dos valores encontrados pelos laboratórios, excluindo aqueles mais discrepantes. Seguindo este raciocínio, há um limite inferior e superior para o enquadramento dos resultados baseado no desvio padrão dos resultados. Sendo assim, os resultados de nitrito de sódio devem se situar entre 29,3 e 42,8 mg/kg, enquanto para o nitrato de sódio seria entre 19,7 e 29,5 mg/kg. Estes valores foram calculados a partir do z-score, expresso pela equação 28.

$$z = \frac{(x - x_a)}{S_P} \quad (28)$$

Onde, x é o resultado relatado do participante; x_a , o valor atribuído; e S_P , o desvio padrão para a proficiência.

O desvio padrão para a proficiência foi um conjunto de valores que reflete a melhor prática para as análises em questão. Para todos os analitos, o S_P foi derivado da forma apropriada da equação de Horwitz. Os valores de S_P usados para calcular os z-scores dos resultados relatados do teste estão representados na tabela 10.

Tabela 10: Valores atribuídos e desvios padrão para a proficiência.

Analito	Pontos de dados, n	Valor atribuído, x_a (mg/kg)	Incerteza, u	Desvio padrão para a proficiência
Nitrato como nitrato de sódio (NaNO_3)	55,00	24,60	0,400	2,430
Nitrito como nitrito de sódio (NaNO_2)	57,00	36,00	0,500	3,360

4.4.1. Método da curva de calibração

De início, efetuou-se a determinação de nitrito e de nitrato na amostra FAPAS®, utilizando o método da curva de calibração, método já utilizado pela empresa. Foram utilizadas as soluções padrão para construção do gráfico e os resultados encontram-se na tabela 11.

Tabela 11: Resultados de nitrito e nitrato de sódio para a amostra FAPAS de acordo com o método da curva de calibração.

Amostra FAPAS®	Massa (g)	Resultados (mg/l)	
		NaNO ₂	NaNO ₃
1	2,001	25,20	34,70
2	2,002	19,40	39,70
3	2,009	24,80	46,80
4	2,002	21,10	43,80
5	2,005	23,70	32,30
6	2,003	18,30	31,20
7	2,007	20,60	31,90
8	2,005	20,30	37,60
9	2,003	18,50	36,80
10	2,005	15,80	28,60

Com esses valores encontrou-se uma média de 20,77 mg/kg para o resultado de nitrito de sódio e 36,34 mg/kg para nitrato de sódio. Assim sendo, os resultados não se enquadram nos valores esperados pelo ensaio interlaboratorial e se encontra entre os 34% dos laboratórios que não alcançou o resultado esperado para nitrito de sódio e entre os 45% dos laboratórios que não atingiram o valor almejado para nitrato de sódio.

4.4.2. Método de adição de padrão

O segundo procedimento de determinação de nitrito e nitrato na amostra FAPAS® foi através da adição de padrão e foram utilizadas duas metodologias diferentes. Na primeira, foram pesadas cinco massas diferentes da amostra e adicionou-se quantidades variadas do padrão de nitrito e nitrato em quatro delas, conforme a tabela 12.

Tabela 12: Tomas e volumes adicionados às amostras FAPAS.

Amostra FAPAS®	Massa (g)	Adição de Padrão (ml)
11	2,007	-
12	2,004	0,500
13	2,008	1,000
14	2,004	1,500
15	2,004	2,000

A partir disso, para cada amostra foi calculado o valor de C_P de acordo com o volume de padrão adicionado, a concentração da solução padrão e o volume da solução, conforme mostra a equação a seguir.

$$C_P = \frac{V_{AD} \times C_{SP}}{V_T} \quad (29)$$

Onde, V_{AD} é o volume adicionado da solução padrão, C_{SP} é a concentração da solução padrão e V_T é o volume da solução.

Com isso, foi gerada a tabela 13 com os volumes da solução padrão adicionados e suas respectivas áreas lidas pelo cromatógrafo seguido da concentração de padrão presente em cada amostra, tanto para nitrito quanto para nitrato.

Tabela 13: Concentrações do padrão adicionado com suas respectivas áreas.

V_{AD} (ml)	NO_2^-		NO_3^-	
	Área (u.a.)	C_P (mg/l)	Área (u.a.)	C_P (mg/l)
0,000	3,919	0,000	6,429	0,0000
0,500	20,97	1,346	27,14	1,279
1,000	37,70	2,691	48,88	2,559
1,500	50,55	4,037	70,12	3,838
2,000	64,04	5,382	90,99	5,117

Logo, as figuras 12 e 13 representam os gráficos de nitrito e nitrato, respectivamente, construídos a partir da área com a concentração de padrão presente em cada amostra.

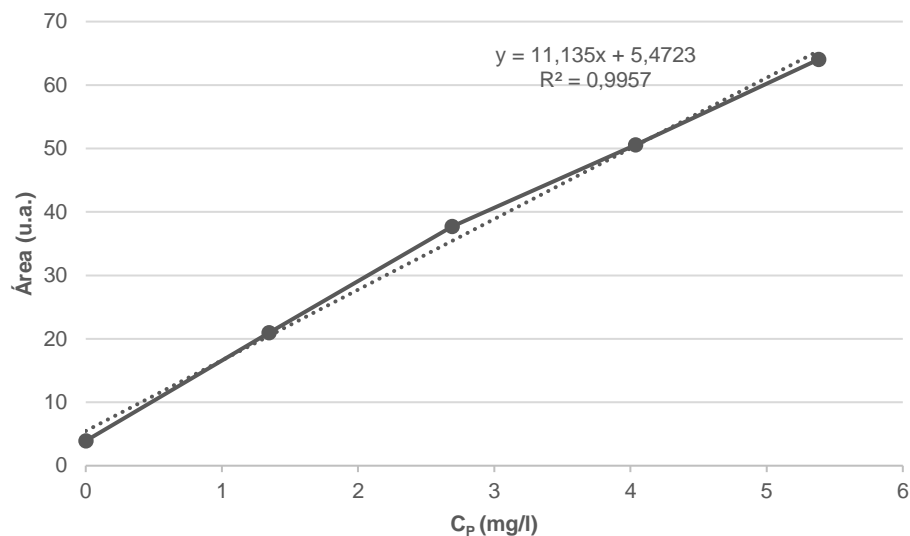


Figura 12: Gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrito que resulta da adição do padrão.

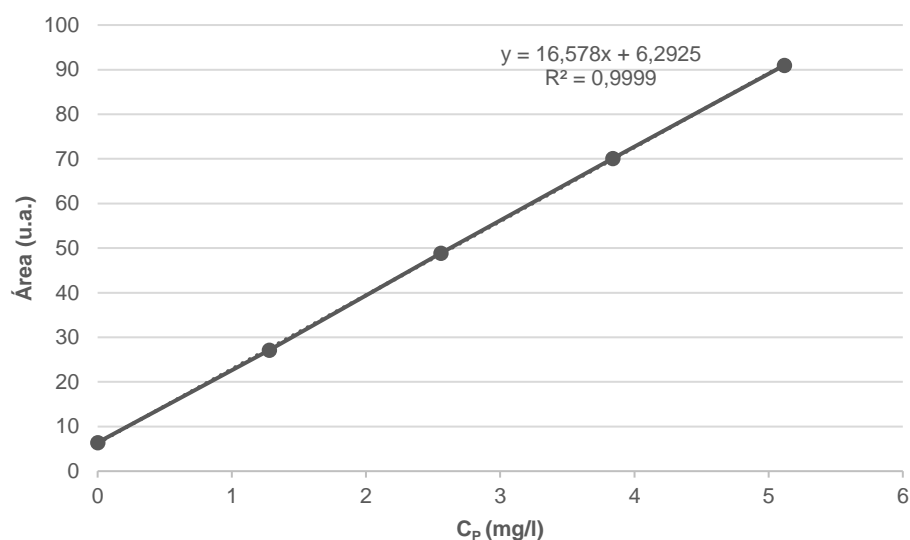


Figura 13: Gráfico da área do pico cromatográfico em função da concentração de nitrato que resulta da adição do padrão.

A partir dos gráficos gerados, encontrou-se os valores da concentração de nitrito e nitrato de sódio com a expressão a seguir:

$$A = k \left(\frac{C_{SA} \times V_{SA} + C_P V_P}{V_T} \right) \quad (30)$$

Onde A é a área; k, constante; C_{SA}, Concentração da solução amostra; V_{SA}, Volume da solução amostra; C_P, Concentração do padrão; V_P, Volume do padrão; V_T, Volume total.

A partir disto, a massa dos iões nitrito e nitrato na solução amostra foi encontrada através da seguinte expressão:

$$\frac{b}{m} = \frac{m_{\text{ião}}}{V_T} \quad (31)$$

Onde o $m_{\text{ião}}$ é a massa de ião presente na solução amostra e V_T o volume total da solução.

Após encontrar que a massa de nitrito na amostra é 98,29 mg e de nitrato, 75,87mg, divide-se cada um desses valores pela média das massas pesadas que foi 2,005 g. Isto resulta em uma concentração de 49,01 mg/kg para o nitrito e 37,84 mg/kg para o nitrato.

Com estas concentrações, divide-se cada uma pela massa molar de seu respectivo ião e multiplica pela massa molas do composto na sua forma de nitrito ou nitrato de sódio. Assim sendo, o valor encontrado para nitrito de sódio é de 73,5 mg/kg e 51,9 mg/kg de nitrato de sódio.

Como os resultados foram diferentes dos valores de nitrito e nitrato de sódio oriundos do teste interlaboratorial, tentou-se uma adequação deste método de adição de padrão e a partir de uma toma de 2,005 g da amostra FAPAS[®] extraída para um volume de 200,0 ml, retirou-se 25,00 ml para um volume de 50,00 ml e foram adicionados diferentes volumes da solução padrão. As figuras 14 e 15 representam os gráficos gerados a partir das áreas com a concentração do padrão em cada amostra.

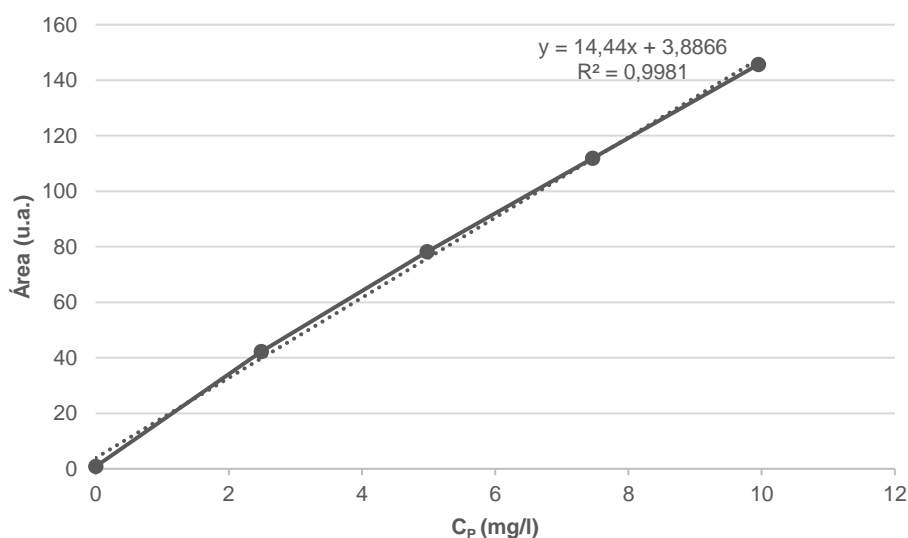


Figura 14: Gráfico da área do pico cromatográfico em função a concentração que resulta da adição do padrão NO_2^- .

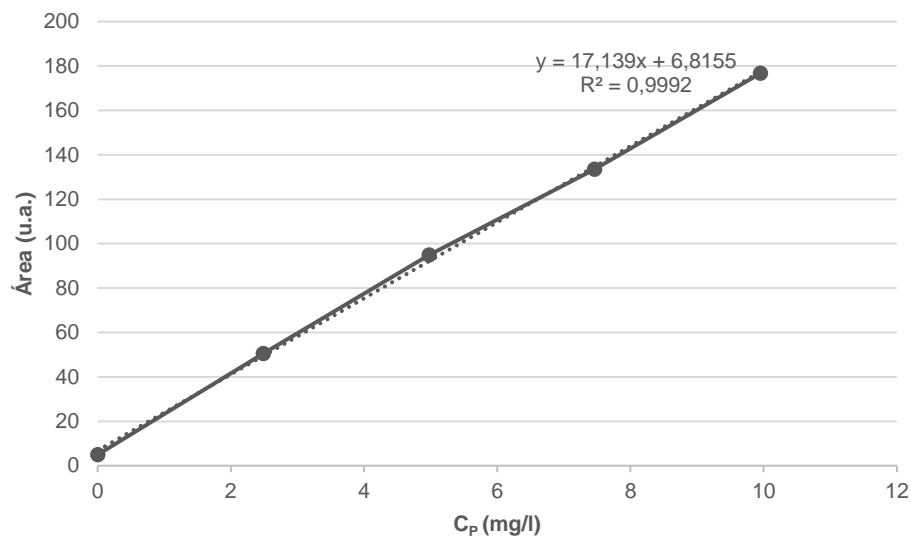


Figura 15: Gráfico da área do pico cromatográfico em função a concentração que resulta da adição do padrão NO_3^- .

Com auxílio do gráfico, utiliza-se a equação a seguir para encontrar a concentração de ião nitrito e nitrato na solução amostra.

$$\frac{b}{m} = \frac{C_{SA} \cdot V_{SA}}{V_T} \quad (32)$$

Onde C_{SA} é a concentração na solução amostra e V_{SA} , o volume.

Assim, encontra-se a concentração de 0,538 mg/L referente ao ião nitrito na solução amostra e 0,795 mg/L de nitrato. Com isso, cada valor da concentração é multiplicado pelo volume da solução original para descobrir a massa do referente ião. Esta massa é usada para encontrar a massa de nitrito e nitrato de sódio, uma vez que esse valor é dividido pela massa molar do respectivo ião e multiplicado pela massa de NaNO_2 ou NaNO_3 . Por fim, esta massa é dividida pela toma pesada para preparação da amostra original e encontra-se as concentrações de nitrito e nitrato de sódio, sendo elas 80,5 mg/kg e 108,8 mg/kg, respectivamente. Mais uma vez, os valores estão afastados dos resultados obtidos com o teste interlaboratorial.

5. Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

Neste trabalho, efetuou-se a calibração dos iões nitrito e nitrato e a partir destas curvas de calibração os parâmetros analíticos foram calculados. Baseando-se no período estudado de 7 de março de 2019 a 27 de maio de 2019, para o ião nitrito, foi encontrado o coeficiente de correlação linear com o valor médio de 0,999. Já os limites médios de deteção e quantificação foram 0,014 mg/l e 0,043 mg/l, respectivamente. Enquanto para o ião nitrato, o coeficiente de correlação linear médio encontrado neste mesmo período foi 1,000. A média do limite de deteção foi 0,067 mg/l e a média de quantificação, 0,203 mg/l. Com isto, conclui-se que a curva de calibração e os limiares analíticos estão de acordo com as concentrações estudadas, uma vez que o intervalo de concentrações para o nitrito foi de 0,135 mg/l até 11,59 mg/l e para o nitrato, 0,124 mg/l a 10,52 mg/l.

Posteriormente, foram utilizadas as amostras de leite UHT e lactosoro para os estudos de repetibilidade, precisão intermédia e recuperação. Quanto ao leite UHT, a média encontrada para o nitrito de sódio foi de 178,8 mg/kg e para o nitrato de sódio, 124,6 mg/kg. A variância para esses dois compostos foi de 5,289 e 4,795, respectivamente. Em relação a precisão intermédia, o desvio padrão encontrado para o nitrito de sódio foi de 2,835 e o coeficiente de variação médio, 3,665. Já para o nitrato de sódio, a precisão intermédia encontrada foi 1,132 e o coeficiente de variação médio, 1,764.

Sobre a amostra do lactosoro, a média encontrada com o estudo da repetibilidade foi de 279,4 mg/kg para o nitrito de sódio e 593,9 mg/kg para o nitrato de sódio, enquanto as variâncias foram 62,53 e 2931, respectivamente, o que reflete a dispersão dos valores. Com o estudo da precisão intermédia, encontraram-se os valores do desvio padrão de 26,52 para o nitrito de sódio e 19,24 para o nitrato de sódio. Enquanto o coeficiente de variação médio foi de 6,185 para o nitrito de sódio e 4,673 para o nitrato de sódio.

Já a recuperação média do leite UHT foi 108,8% de nitrito de sódio e 87,00% de nitrato de sódio. Para o lactosoro, a recuperação referente ao nitrito de sódio foi 64,46% e para o nitrato de sódio, 136,0%. Com isso pode-se concluir que os melhores resultados foram do leite UHT, justificando-se por ser uma amostra líquida, ou seja, mais homogênea que a amostra em pó.

Após estes estudos, foi proposta a participação do laboratório em um teste interlaboratorial, onde foi fornecida uma amostra de circuito com seus valores registrados de 36,00 mg/l (29,3 – 42,8 mg/l) para o nitrito de sódio e 24,60 mg/l (19,7 –

29,5) para o nitrato de sódio. Com a curva de calibração, os valores encontrados para esta amostra foram 20,80 mg/l de nitrito de sódio e 36,3 mg/l de nitrato de sódio. Com esta não conformidade relacionada ao estudo da exatidão do método, foram analisadas as causas e planejada uma tentativa de correção.

Assim sendo, ao invés da leitura dos valores da concentração de nitrito e nitrato na amostra através da reta de calibração, as amostras foram analisadas pelo método da adição de padrão. Com a primeira situação do método de adição de padrão, encontraram-se os valores de 73,5 mg/kg de nitrito de sódio e 51,9 mg/kg de nitrato de sódio. Na segunda situação, os valores encontrados foram 80,5 mg/kg de nitrito de sódio e 108,8 mg/kg de nitrato de sódio. Assim, os valores finais também não estão incluídos no intervalo almejado, ficando afastados dos valores de referência.

Efetivamente, não foi possível atingir o êxito da validação do método, uma vez que o período de tempo inicialmente proposto pelo estágio não foi suficiente para experimentar outras situações que permitam alcançar a exatidão do método. Com isto, é necessário aprofundar os estudos relacionados ao método proposto neste trabalho e, para os próximos projetos, deve-se efetuar uma ação corretiva para a metodologia se adequar aos requisitos de validação.

Referências Bibliográficas

- [1] Ribeiro, M. (1999). *Instrumentação* (8th ed.). Salvador: Tek Treinamento & Consultoria Ltda.
- [2] Peres, T. (2002). *Noções básicas de cromatografia*. Presentation, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental-Instituto Biológico, São Paulo.
- [3] Ribeiro, N., & Nunes, C. (2008). Análise de pigmentos de pimentões por cromatografia em papel. *Química Nova Na Escola*, (29), 34-37.
- [4] Ligiero, C., dos Reis, L., Parrilha, G., Baptista Filho, M., & Canela, M. (2009). Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. *Química Nova*, 32(5), 1338-1341.
- [5] Tonhi, E., Collins, K., Jardim, I., & Collins, C. (2002). Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, 25(4), 616-623.
- [6] Lanças, F. (2009). A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente "compatíveis"? *Scientia Chromatographica*, 1(2), 35-61.
- [7] Embrapa Florestas. (2011). *Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água*. Colombo.
- [8] Chiaradia, M., Collins, C., & Jardim, I. (2008). O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31(3), 623-636. doi: 10.1590/s0100-40422008000300030
- [9] Stoppelli, I., & Magalhães, C. (2005). Saúde e segurança alimentar: a questão dos agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 10(suppl), 91-100. doi: 10.1590/s1413-81232005000500012
- [10] Prado, M., & Godoy, H. (2006). Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, 30(2), 268-273. doi: 10.1590/s0100-40422007000200005
- [11] Oliveira, M., Araújo, W., & Borgo, L. (2005). Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 25(4), 736-742. doi: 10.1590/s0101-20612005000400018
- [12] Santos, J., Beck, L., Walter, M., Sobczak, M., Olivo, C., Costabeber, I., & Emanuelli, T. (2005). Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 25(2), 304-309. doi: 10.1590/s0101-20612005000200021
- [13] Sousa, C. (2006). Segurança alimentar e doenças vinculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *APS*, 9(1), 83-88.

- [14] Jorge, F. (2009). *Inovação, tecnologia e competitividade na indústria alimentar em Portugal* (Mestre). Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Economia e Gestão.
- [15] Gava, A. (1986). *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo (SP): Nobel.
- [16] Park, P., & Antonio, D. (2006). *Análises de materiais biológicos*. Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Agrícola.
- [17] Embrapa Clima Temperado. (2010). *Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos*. Pelotas: Antônio Luiz Oliveira Heberlê.
- [18] Silliker Portugal, S. A. | Mérieux NutriSciences Portugal. (2019). Retrieved from <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/silliker-portugal>
- [19] Nitrate. (2019). Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nitrate#section=Top>
- [20] Nitrite. (2019). Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/946#section=3D-Conformer>
- [21] Roça, R. *Cura de carnes*. Universidade Estadual Paulista: Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial.
- [22] Antón, A., & Lizaso, J. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. *Fundación Ibérica Para La Seguridad Alimentaria*.
- [23] Melo Filho, A., Biscontini, T., & Andrade, S. (2004). Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 24(3), 390-392. doi: 10.1590/s0101-20612004000300015
- [24] Pontalti, G. (2011). *Nitritos e nitratos: venenos ou nutrientes?*. Presentation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [25] Maryutina, T., Savonina, E., Fedotov, P., Smith, R., Siren, H., & Hibbert, D. (2018). Terminology of separation methods (IUPAC Recommendations 2017). *Pure And Applied Chemistry*, 90(1), 181-231. doi: 10.1515/pac-2017-0111
- [26] Eith, C., Kolb, M., & Seubert, A. (2001). *Practical Ion Chromatography – An Introduction*. Herisau: Metrohm Ltd.
- [27] Haddad, P., & Jackson, P. (1990). *Ion chromatography*. Amsterdam: Elsevier.
- [28] NP EN ISO/IEC 17025. 2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*.
- [29] RELACRE. (1996). *Guia RELACRE 3 – Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. ISBN: 972-96727-2-5.
- [30] RELACRE. (2000). *Guia RELACRE 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. ISBN: 972-8574-02-9.
- [31] Martins, A. (2016). *Implementação e validação de métodos analíticos* (Mestre). Universidade de Coimbra.

- [32] Brito, N., de Amarante Junior, O., Polese, L., & Ribeiro, M. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista De Ecotoxicologia E Meio Ambiente*, 13. doi: 10.5380/pes.v13i0.3173
- [33] Ellison, S., Rosslein, M., Williams, A. (2002). *Guia EURACHEM/CITAC – Determinando a incerteza na medição analítica*. Versão brasileira.
- [34] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (2007). *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*.
- [35] Ribani, M., Bottoli, C., Collins, C., Jardim, I., & Melo, L. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780. doi: 10.1590/s0100-40422004000500017
- [36] EPADYX (função EPADYX). (2019). Retrieved from <https://support.office.com/pt-pt/article/epadyx-fun%C3%A7%C3%A3o-epadyx-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab>