

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E  
ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO  
DA ANÁLISE DE NITRITOS EM PRODUTOS CÁRNEOS**

**Florianópolis  
2006**

**Rafael Burin**

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO E  
ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO  
DA ANÁLISE DE NITRITOS EM PRODUTOS CÁRNEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do Grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Prof. Dra. Marilde T. Bordignon Luiz**

**Florianópolis  
2006**

**BANCA**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre me acompanha em tudo que faço;

A meus pais, Ivo José Burin e Eloides Berlezi Burin, pelo grande amor e incansável apoio;

Aos meus irmãos, João, Vívian e Diogo, que sempre estiveram presentes, mesmo quando distantes, pelo carinho, amizade e alegrias;

A Thais, pelo apoio e principalmente pelo amor dedicado a mim em todos os momentos que passamos juntos;

A minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup> Marilde, agradeço pelos ensinamentos, conselhos e principalmente pela oportunidade e confiança;

A todas as pessoas que trabalharam no laboratório de físico-química, durante o período de minha formação, principalmente, meus amigos César e Luciano;

A todos os colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos e do Mestrado;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos;

Ao meu amigo de todos os momentos, Anderson Prado;

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

BURIN, Rafael. **Validação de um método analítico para determinação de cálcio e estimativa da incerteza de medição da análise de nitritos em produtos cárneos**. 2006. 94p. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – SC.

## RESUMO

O objetivo do trabalho foi validar uma metodologia para determinação de cálcio em produtos cárneos e estimar a incerteza de medição da análise de nitrito de sódio, associar ao resultado da medição e comparar os resultados com os preconizados pela legislação brasileira. Na validação do método a faixa de trabalho pesquisada apresentou linearidade satisfatória ( $R^2 = 0,9999$ ). Os limites de detecção e quantificação foram 11 e 16 mg de cálcio/100 g da amostra. Na precisão do método o coeficiente de variação obtido foi inferior a 3 %. A exatidão foi determinada pela fortificação das amostras com solução padrão de cálcio. A especificidade do método foi confirmada para o cálcio. Na robustez foram realizadas alterações intencionais no método e avaliadas as recuperações do analito. A incerteza expandida para o mensurando ( $\% \text{Ca}^{++}$ ) foi de  $\pm 0,00904$  g com um nível de confiança de 95 % e  $k = 2,87$ . Para a análise de nitrito de sódio as principais fontes de incerteza do método foram: a massa da amostra, o volume da diluição, a absorbância e o volume da alíquota. As incertezas expandidas (com nível de confiança de 95 %) foram de  $\pm 0,0005$  g ( $k = 2,12$ ),  $\pm 0,1032$  mL ( $k = 2$ ),  $\pm 0,0147$  ( $k = 2$ ) e  $\pm 0,008$  mL ( $k = 2$ ) para a massa da amostra, volume da diluição, absorbância e volume da alíquota respectivamente. Os resultados mostraram uma incerteza expandida de  $\pm 0,21$  mg/100 g com  $k = 2$  e um nível de confiança de 95 % e a fonte de incerteza com maior contribuição foi o volume da alíquota com 66 % de influência. Em 10 % das amostras analisadas o valor do teor máximo de nitrito de sódio foi superior ao permitido pela legislação brasileira. O método analítico proposto para quantificação de cálcio, mostrou-se sensível, preciso, exato, robusto e linear na faixa de trabalho sendo adequado para determinar o teor de cálcio em produtos cárneos. Foi possível observar que há uma grande variação nos teores de nitritos entre as amostras dos produtos analisados. A incerteza de medição associada ao resultado é um dos mais importantes elementos do sistema de garantia da qualidade implementada em um laboratório.

Palavras-chaves: determinação de cálcio; determinação de nitrito; produtos cárneos; validação de metodologias, incerteza de medição.

**BURIN, Rafael. Validation of an analytical method for calcium determination and estimation of the uncertainty of measurement in nitrite analysis of meat products.** 2006. 94 p. (Master in Food Science) – Universidade Federal de Santa Catarina - SC.

### **ABSTRACT**

The aim of the present work was to validate a methodology for calcium determination in meat products and estimate the uncertainty of measurement of the analysis of sodium nitrite, correlating it with the result of the measurement and compare the results with Brazilian legislation. Concerning to method validation, the range of work presented satisfactory linearity ( $R^2 = 0,9999$ ). The limits of detection and quantitation were 11 and 16 mg of calcium/100 g of sample. Concerning to the accuracy of the method, the variation coefficient was lower than 3 %. The trueness was determined by the fortification of samples with a calcium standard solution. The specificity of the method was confirmed for calcium. In robustness, intentional alterations were carried out in the method and the trueness of the analyte was evaluated. The expanded uncertainty for the analyte (%  $\text{Ca}^{++}$ ) was of  $\pm 0,00904$  g with a confidence level of 95 % and  $k = 2,87$ . For the analysis of sodium nitrite, the main sources of method uncertainty were the weight of sample, the volume of the dilution, the absorbance and the volume of the aliquot. The expanded uncertainties were of  $\pm 0,0005$  g ( $k = 2,12$  with confidence level of 95 %),  $\pm 0,1032$  mL ( $k = 2$  with confidence level of 95 %),  $\pm 0,0147$  ( $k = 2$  with confidence level of 95 %) e  $\pm 0,008$  mL ( $k = 2$  with confidence level of 95 %), for weight of sample, volume of the dilution, absorbance and volume of the aliquot, respectively. The results showed an uncertainty expanded of  $\pm 0,21$  mg/100 g with  $k = 2$  and a confidence level of 95 % and the source of uncertainty with higher contribution was the volume of the aliquot, with 66 % of influence. The values of the maximum content of sodium nitrite were superior to the content allowed in Brazilian legislation in 10 % of the analyzed samples. The proposed analytical method for calcium quantification revealed sensible, true, accurate, robust and linear in the range of work being suitable to determine the calcium content in meat products. It was observed a great variation in nitrite content among samples of the analyzed products. The uncertainty of measurement associated with the results is one of the most important elements of the quality guarantee system implemented in a laboratory.

Word-keys: calcium determination; nitrite determination; meat products; validation of methodologies, uncertainty of measurement.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
------------	---

### CAPÍTULO 1

1 Revisão Bibliográfica	12
1.1 Cálcio em Alimentos	12
1.2 Nitritos em Alimentos	13
1.3 Qualidade dos Resultados Analíticos	16
1.4 Validação	18
1.4.1 Método Normalizado	20
1.4.2 Método não Normalizado	21
1.4.3 Características de Desempenho do Método	21
1.5 Incerteza	32
1.5.1 Fontes de Incerteza	33
1.5.2 Componentes de Incerteza	33
1.5.3 Processo de Estimativa da Incerteza de Medição	35
1.5.4 Formas de Avaliação da Incerteza	36
1.5.5 Tipos de Incerteza	37
1.6 Erro e Tratamento de Dados Analíticos	40
1.6.1 Erros Sistemáticos	41
1.6.2 Erros Aleatórios	41
1.6.3 Média, Desvio Padrão e Variância	42
Referências Bibliográficas	44

### CAPÍTULO 2

Validação de um Método Analítico para Determinação de Cálcio em Embutidos Cárneos.	50
---	----

### CAPÍTULO 3

Avaliação da Estimativa da Incerteza de Medição Associada ao Resultado da Análise de Nitritos em Produtos Cárneos.	75
---	----



## INTRODUÇÃO

A garantia da qualidade analítica é o conjunto completo das medidas que um laboratório deve assegurar para conseguir dados de alta qualidade. Além do uso da validação e/ou de métodos padronizados, estas medidas são: procedimentos eficazes de controle da qualidade interna (uso de materiais de referência, calibração de equipamentos, controle de documentos, etc.); participação em testes de proficiência; e acreditação a um organismo internacional. Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos.

Quando um método existente é modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método (linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, especificidade, robustez e incerteza de medição) atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas.

A incerteza de um resultado pode provir de muitas fontes possíveis, incluindo exemplos tais como definição incompleta, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIANS, 2000).

O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, lingüiças, mortadelas, hambúrgueres e outros, tornaram-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores.

Uma das análises requeridas para embutidos é a determinação de cálcio, sendo que o método analítico, recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), descrito em Brasil (1999), utiliza em uma das etapas de filtração cadinho de *Gooch* e como elemento filtrante, fibras médias de amianto, material tóxico, que segundo D'Acri (2003), pode causar asbestose pulmonar, câncer de pulmão, mesoteliomas e doenças pleurais. O método foi modificado nesta etapa de

filtração e em substituição ao amianto foi utilizado, como elemento filtrante, papel filtro quantitativo.

Em produtos cárneos, outra análise recomendada pelo MAPA, é a determinação de nitrito de sódio, utilizados para a cura dos produtos, sendo o seu uso limitado pela legislação brasileira.

Sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio, são largamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos. Os sais de nitrito são fixadores de cor e agentes de cura, além de conservarem a carne contra a deterioração bacteriana, inibem o crescimento de *Clostridium botulinum* e produção da toxina em carnes curadas (LEE, CHO e PARK, 2006). Seus efeitos adversos são representados principalmente pela metamioglobina tóxica e pela formação de nitrosaminas, as quais possuem ação carcinogênica, mutagênicas e teratogênicas, segundo Stertz, Penteado e Freitas (2004). Considerando as propriedades químicas dos nitritos, é de fundamental importância o conhecimento da exatidão e precisão do método utilizado, bem como a incerteza de medição associada ao resultado.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) validar a metodologia para determinação de cálcio em embutidos cárneos; 2) estimar a incerteza de medição da análise de nitrito de sódio, em produtos cárneos, associada ao resultado da medição e comparar os resultados com os preconizados pela legislação brasileira.

## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

# **1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1 Cálcio em alimentos**

O cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano. É importante para o metabolismo intracelular, formação e manutenção dos ossos e dos dentes, coagulação sanguínea, condução nervosa, contração muscular e funções cardíacas (BASS e CHAN, 2006). A ligação do cálcio e a mineralização óssea é, durante toda a vida, evidenciada na tentativa de se prevenir à osteoporose. A deficiência de cálcio pode acarretar além da perda da massa óssea, problemas como câibras e irritabilidade, por ser um mineral necessário na transmissão nervosa e na regulação dos batimentos cardíacos (CASÉ et al. 2005).

A biodisponibilidade de um material é a sua capacidade de estar biologicamente disponível para ser absorvido pelo organismo humano. A absorção intestinal do cálcio de todas as fontes varia tipicamente de 23 % a 37 % (SCHRODER et al. 2005). É um processo complexo e ligado a inúmeros outros fatores, que incluem desde a disponibilidade na dieta, a idade, a raça, a presença de vitamina D, até o uso de drogas, como os barbitúricos (DUTRA-DE-OLIVEIA e MARCHINI, 1998), além dos tratamentos térmicos aplicados aos produtos. Segundo Casé et al. (2005), quanto maior a solubilidade de um sal de cálcio maior sua disponibilidade, a solubilidade dos sais orgânicos é muito maior que a dos sais inorgânicos.

Em embutidos cárneos a concentração de cálcio depende do tipo de embutido e da quantidade de carne mecanicamente separada (CMS) utilizada para a sua fabricação. A legislação brasileira limita o uso de CMS em embutidos (SOUSA et al. 2003). A Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada (CMS) de mortadela, lingüiça e salsicha, sendo permitido o uso de até 60 % de CMS em mortadelas e salsichas, e de 20 % em lingüiças tipo calabresa (BRASIL, 2000).

O método analítico recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para determinação de cálcio em produtos cárneos é o descrito em Brasil (1999). Em uma das etapas de filtração desta metodologia é utilizado como

elemento filtrante fibras de amianto, material tóxico, que segundo D'Acri (2003) pode causar asbestose pulmonar, câncer de pulmão, mesoteliomas e doenças pleurais benignas como placas pleurais e limitações crônicas de fluxo aéreo.

Estudo realizado por Crosland et al. (1995) na investigação de um método para detecção de carne mecanicamente separada, em produtos cárneos, foi observado na primeira etapa do estudo, a composição analítica da carne separada do osso manualmente e mecanicamente de diferentes animais: bovino, suíno, cordeiro, frango e peru. As análises realizadas foram: umidade, gordura, nitrogênio, cinzas, colágeno, cálcio, ferro e purinas totais, sendo que a determinação do cálcio foi realizada pelo método de espectroscopia de absorção atômica e sua concentração variou consideravelmente em uma faixa de concentração de 33 mg/100 g em cordeiros até 206 mg/100 g em CMS de suínos.

Na produção de um extrato hidrossolúvel de soja enriquecido com cálcio, realizado por Casé et al. (2005), foram utilizados diferentes sais de cálcio no enriquecimento do produto, como o lactato e o carbonato de cálcio, fosfato tricálcio e cálcio quelato, sendo o lactato de cálcio o sal que apresentou menor perda durante as etapas do processamento, mas ocorreu separação das fases do produto, o que não ocorreu com o cálcio quelato. A quantificação do cálcio no "leite" de soja foi realizada através da técnica de espectrometria de emissão atômica em plasma indutivamente acoplado e a quantidade de cálcio (mg/100 g) observada no "leite" de soja não fortificado foi de 8,6 e no produto fortificado com cálcio quelato foi de 225,1.

## **1.2 Nitritos em alimentos**

A adição de nitrito e nitrato em alimentos é oficialmente regulamentada, na maioria dos países. A Food and Drugs Administration (FDA, 2005) estabelece atualmente, um limite máximo de 200 ppm para nitrito de sódio e 500 ppm para o nitrato de sódio quando utilizados com a finalidade de fixadores de cor e conservantes em carnes de pescados, aves e produtos cárneos em geral. Contudo, as orientações quanto ao seu emprego têm sofrido alterações nos últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, até dezembro de 1998 era permitido um limite

máximo para nitrito e nitrato de sódio de 200 e 500 ppm, respectivamente, reduzindo, a partir daquela data, para valores de 150 e 300 ppm para produtos cárneos (BRASIL, 1998) valores limites, considerados elevados por alguns autores, uma vez que em outros países, a legislação estabelece valores inferiores (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004).

Os nitritos possuem efeitos benéficos importantes sobre o “flavor” das carnes curadas por impedir a oxidação devido a atividade antioxidativa da óxido nítrico mioglobina e da S-nitrosocisteína, um composto formado durante o processo da cura (HULTIN, 1993). A fixação da cor nas carnes ocorre quando o óxido nítrico reage com o ferro da mioglobina, formando a nitrosomioglobina, de cor vermelha brilhante, que quando submetida ao calor sua coloração se estabiliza pela desnaturação da porção protéica da mioglobina, resultando no pigmento nitrosomiohemocromógeno, de cor rósea brilhante, característico da carne curada cozida, mais estável que o pigmento nitrosomioglobina (PARDI et al. 1996). Os resultados, da cura nas carnes, são bem caracterizados pela coloração rosa, flavor e textura do produto (CASSENS, 1997).

O nitrato é inicialmente reduzido a nitrito por enzimas bacterianas (nitrato redutases), dentre as bactérias redutoras encontram-se: *Achromobacter dentriticum*, *Micrococcus epidermidis* e *M. auranticus*. Na presença de condições redutoras apropriadas, o nitrato é posteriormente desdobrado em ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e em óxido nítrico (NO) (PARDI et al. 1996) e quando entra na corrente sanguínea, oxida o ferro ( $\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ ) da hemoglobina, produzindo a metahemoglobina. Essa forma de hemoglobina é inativa e incapaz de transportar o oxigênio para a respiração normal das células nos tecidos, causando a chamada metahemoglobinemia (STERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004). Esse risco é maior em crianças, devido a baixa acidez do estômago, que também promovem a redução do nitrato a nitrito, favorecendo igualmente a metahemoglobinemia (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004; CHERIAN e NARAYANA, 2006).

O seu uso é discutível devido a possibilidade de originar compostos nitrosos de ação carcinogênica (OLIVEIRA, ARAÚJO e BORGIO, 2005), mutagênicas e teratogênicas (STERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004). As nitrosaminas (N-nitroso) se formam quando um grupo nitroso ( $-\text{N}=\text{O}$ ), geralmente proveniente do ácido nitroso

(HNO<sub>2</sub>), se incorpora a um átomo de nitrogênio de certos compostos nitrogenados (PRICE e SCHWEIGERT, 1994) como as aminas secundárias e terciárias em condições semelhantes às vigentes em estômagos de mamíferos (SERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004; CHERIAN e NARAYANA, 2006). Em humanos a dose letal de nitrito é de aproximadamente 1 g (CASSENS, 1997).

O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, lingüiças, mortadelas, hambúrgueres e outros, tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004).

Outras fontes potenciais de nitritos são as águas, os vegetais e alimentos processados. Devido a toxicidade do nitrito sua concentração em águas é bem regulamentada nos Estados Unidos e a concentração máxima admitida é de 0,1 ppm (BUTT, RIAZ e IQBAL, 2001). No Brasil, a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, sendo o limite máximo permitido de 1 e 10 ppm para nitrito e nitrato, respectivamente (STERZ, PENTEADO e FREITAS, 2004).

O nitrito residual em produtos cárneos é extremamente reduzido sob aquecimento e continua a diminuir sua concentração durante o armazenamento principalmente em produtos de carne curados. Segundo Pardi et al. (1996) 50 % do nitrito adicionado degrada nas primeiras 24 horas e aproximadamente 10 % permanece depois de sete dias.

A determinação simultânea de nitrito e nitrato em produtos cárneos e vegetais realizadas por Öztekin, Nutku e Erim (2002), através do método de eletroforese capilar revestido de polietilenoimina, que segundo os autores, tem a vantagem de menor tempo para preparação da amostra e realização da análise. Os resultados observados para nitritos (mg/100 g) foram de 2,43 para salame e 3,12 para salsicha.

Butt, Raiz e Iqbal (2001) utilizaram o método da cromatografia líquida de alta eficiência de par-iônica para determinação simultânea de nitritos e nitratos em vegetais (espinafre e alface) onde foi possível separar os íons e quantificá-los, e compará-los os

resultados com a análise da cromatografia iônica, que não detectou nitritos nos vegetais. O método de fluorescência é sensível, mas na presença de alguma matéria orgânica, como o formaldeído, pode ocorrer diminuição da fluorescência. O método enzimático requer muito tempo e tem pouca precisão podendo apresentar um desvio padrão relativo de 20 a 30 %.

Outro método para determinação de nitrito residual e nitrito ligado a proteína (grupo NO-nitrosotiol) é a análise de fluxo de injeção (FIA). Ruiz-Capillas, Aller-Guio e Jimenez-Colmenero (2006), utilizaram esta metodologia em salsichas cozidas e secas, sendo a quantidade de nitrito residual encontrada de 7,06 mg/100 g.

A análise de nitritos recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) está descrita em Brasil, (1999). Baseia-se na reação de diazotização de nitritos com ácido sulfanílico e acoplamento com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado espectrofotometricamente a 540 nm.

### **1.3 Qualidade dos resultados analíticos**

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve se assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2003b).

Os termos validação e garantia da qualidade são extensamente usados. Entretanto, muitos analistas e laboratórios desconhecem o sentido exato, a diferença e o relacionamento entre os dois termos. Validar um método é investigar se a finalidade analítica está sendo atingida, se está obtendo resultados analíticos com um nível aceitável da incerteza. Validação de métodos analíticos é o primeiro passo para a garantia da qualidade em um laboratório. A garantia da qualidade analítica é o conjunto

completo das medidas que um laboratório deve obter para conseguir dados de alta qualidade. Além do uso da validação e/ou de métodos padronizados, outras medidas são importantes, tais como: procedimentos eficazes de controle da qualidade interna (uso de materiais de referência, controle de documentos, etc.); participação em testes de proficiência; e acreditação a um organismo internacional, geralmente NBR ISO/IEC 17025 (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

Do ponto de vista prático, um método, uma vez desenvolvido deve ser submetido a algum procedimento experimental para estimar seu desempenho. O método será validado se estes desempenhos estiverem conforme aos pré-requisitos estabelecidos. Assim, propôs-se fazer uma distinção entre o procedimento da avaliação, que deve consistir em coletar os dados experimentais, e a própria validação que deve ser verificada se os resultados forem satisfatórios (FEINBERG e RAGUÈNÈS, 1998).

Com o desenvolvimento rápido de metodologias analíticas, a grande importância da validação hoje em dia está na qualidade das medições feitas. A qualidade na medição de dados analíticos abrange dois critérios essenciais - utilidade e confiabilidade. Um aspecto chave da confiabilidade ou a validade dos resultados é que eles são comparáveis, desde sua origem. Comparabilidade entre resultados no sentido estrito é fornecida pela rastreabilidade de padrões apropriados (TAVERNIERS, BOCKSTAELE e LOOSE 2004).

A rastreabilidade vem ganhando mais importância em medições analíticas, pode ser atribuída para diferentes aspectos relatados para a medição, rastreabilidade de um resultado, de um método, de um procedimento, de um produto, de um material e de um equipamento (TAVERNIERS, BOCKSTAELE e LOOSE 2004). A rastreabilidade, diz respeito ao requisito para relacionar os resultados das medições aos valores de padrões ou referências. É importante porque assegura que medições feitas em laboratórios diferentes ou em diferentes ocasiões sejam comparáveis (ANVISA, 2004).

A rastreabilidade do resultado de um procedimento analítico completo deve ser estabelecida pela combinação dos seguintes procedimentos: 1) uso de padrões rastreáveis para calibrar os equipamentos de medição; 2) pelo uso, ou comparação dos resultados de um método primário; 3) pelo uso de um material de referência (MR) de substância pura; 4) pelo uso de um material de referência certificado (MRC) com uma

matriz apropriada e; 5) pelo uso de um procedimento aceito e rigorosamente definido (ELLISON et al. 2000).

#### **1.4 Validação**

A validação é a comprovação, através do fornecimento de evidencia objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003b).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional.

Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento ("accreditation") de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional (RIBANI, 2004). A "acreditação" é concedida a um laboratório para um conjunto específico de atividades (ensaios ou calibrações) após avaliações que irão incluir tipicamente um exame dos procedimentos analíticos em uso, o sistema da qualidade e a documentação da qualidade. Os procedimentos analíticos são examinados para garantir que eles sejam tecnicamente apropriados ao fim pretendido. O desempenho do laboratório em esquema de ensaio de proficiência externo pode ser também examinado. A avaliação pode incluir adicionalmente ensaios de proficiência, onde é necessário que o laboratório analise amostras fornecidas pela entidade "acreditadora" e atinja níveis de precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2004).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) são órgãos credenciadores para verificar a competência de laboratórios de ensaios. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003, respectivamente (RIBANI, 2004).

Representantes das indústrias (farmacêuticas) e agências reguladoras dos Estados Unidos, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns

casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos através da International Conference on Harmonization (ICH), numa tentativa de harmonizar as definições (RIBANI, 2004).

A International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) também redigiu um documento técnico, um guia para validação de métodos analíticos que é utilizado pela International Organization for Standardization (ISO) (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A norma internacional ISO/IEC 17025, que é específica para laboratórios de ensaio e de calibração, no item 5.4.5, apresenta a "validação de métodos" como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O United States Food and Drug Administration (US-FDA) também tem proposto um guia (documento nº ORA-LAB.5.4.5 "Methods, Method Verification and Validation") sobre verificação da performance de métodos padronizados e validação de métodos não padronizados (RIBANI, 2004).

Órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO exigem o item "validação de métodos analíticos" como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. O que se pode observar é que não há um procedimento normalizado. Como estes organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI, 2004).

As similaridades e diferenças quanto aos parâmetros de validação da ANVISA, INMETRO e ICH podem ser visualizadas na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de validação do INMETRO, ANVISA e ICH

INMETRO*	ANVISA**	ICH***
Especificidade e seletividade	Especificidade e seletividade	Especificidade
Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho	Intervalo da curva de calibração	Escala linear
Linearidade	Linearidade	Linearidade
Limite de detecção	Limite de detecção	Limite de detecção
Limite de quantificação	Limite de quantificação	Limite de quantificação
Sensibilidade		
Exatidão e tendência	Exatidão	Exatidão
Precisão	Precisão	Precisão
- repetitividade	- repetitividade	- repetitividade
- reprodutibilidade	- reprodutibilidade	- reprodutibilidade
- precisão intermediária	- precisão intermediária	- precisão intermediária
Robustez	Robustez	Robustez
Incerteza de medição		

\* Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

\*\* Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

\*\*\* International Conference on Harmonization.

#### 1.4.1 Método normalizado

“É aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão” (INMETRO, 2003b).

#### **1.4.2 Método não normalizado**

“É aquele desenvolvido pelo próprio laboratório ou outras partes, ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados. Por exemplo, método publicado em revista técnica, método de fabricante de equipamentos, método utilizando “kits” de ensaio e instrumentos portáteis” (INMETRO, 2003b).

#### **1.4.3 Características de desempenho do método**

As características de desempenho do método (ou parâmetros de validação) devem estar claramente declaradas no procedimento documentado e incluir, quando necessário:

##### **a) Especificidade e Seletividade**

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz resposta para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito a de outro, é chamado seletivo. Entretanto os termos especificidade e seletividade são freqüentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (INMETRO, 2003b).

A maior parte das definições recomendadas pela International Conference on Harmonization (ICH) concordam com aquelas de outras organizações como a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Laboratory Accreditation Conference (ILAC) e Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC). Este entendimento não ocorre para a seletividade e especificidade (VESSMAN, 1996).

Segundo Feinberg e Raguènès, (1998) para um processo de validação em laboratório de química de alimentos a especificidade é verificada com adições dos

padrões em  $n$  amostras. O valor mínimo para  $n$  deve ser 10 amostras e a adição do padrão é feita em cada uma das amostras. A especificidade é verificada ajustando uma linha reta entre as concentrações adicionadas e recuperadas.

O teste de especificidade também foi realizado por García et al. (2005), para validação e desenvolvimento de métodos cromatográficos e espectrofotométricos para determinação de hidroquinona em gel e creme contendo este composto.

No desenvolvimento e validação de um método espectrofluorimétrico para a determinação de drogas psicoativas, Mohamed et al. (2005), realizaram os testes de seletividade do método através de estudos de preparações farmacêuticas contendo quantidades fixas da substância ativa (clomipramina ou clorpromazida) com a variação das quantidades de excipientes adicionados (lactose, glicose, sacarose, goma acácia, ácido cítrico), sendo determinada a recuperação dos princípios ativos.

#### **b) Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho**

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações de valores do analito ou valores da propriedade na qual o método pode ser aplicado.

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003b).

Na validação do método para determinação simultânea de íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano, realizado por

Gonçalves et al. (2004), foi estabelecido, após varias tentativas, o intervalo de trabalho para os íons brometo e bromato como 50 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 10 a 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente, sendo que esta faixa de trabalho para os íons satisfaz a zona de concentração que deve ser monitorada.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser aplicado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados as concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve, portanto, ser igual ou maior que o limite de detecção do método (INMETRO, 2003b).

### **c) Linearidade**

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Para a avaliação das linearidades de um método analítico, os cálculos da regressão linear não são suficientes, e os valores residuais devem ser calculados (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

O coeficiente de correlação linear é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerado adequado à reta como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO, 2003b).

A maioria dos equipamentos de detecção existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta. Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação (INMETRO, 2003b).

Na validação de métodos analíticos a linearidade é um parâmetro de validação utilizado por vários autores como García et al. (2005), no desenvolvimento e validação de métodos cromatográfico (HPLC) e espectrofotométrico (UV) para determinação de hidroquinona em géis, onde obteve uma curva de calibração com cinco concentrações diferentes de hidroquinona, sendo a linearidade avaliada pelo método de regressão dos mínimos quadrados, com determinações em triplicata para cada nível de concentração.

Garda, Macedo e Furlong (2004), realizaram a determinação de tricotecenos em cerveja e avaliaram a incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul (9,7 % das amostras coletadas estavam contaminadas com as toxinas pesquisadas), o método utilizado foi validado e os parâmetros de validação testados foram a exatidão, precisão, limite de quantificação e a linearidade do método. Para avaliar a linearidade foram adicionadas concentrações conhecidas de duas toxinas (DON e T-2) no cromatógrafo, considerando as concentrações e áreas relativas dos padrões, foi obtido uma curva padrão.

Nevado et al. (2005), determinaram a linearidade do método para validação e estudos de robustez na determinação de enantiômeros do composto racêmico citalopram em formulações farmacêuticas, usando a técnica de eletroforese. A linearidade foi determinada por injeções em triplicatas para oito diferentes níveis de concentrações para cada componente, obtendo o mesmo resultado para os dois compostos ( $R^2 = 0,9995$ ).

#### **d) Sensibilidade**

A sensibilidade de um método é o gradiente de resposta da curva. A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração. É determinada simultaneamente aos testes de linearidade, e é usada freqüentemente junto com os limites de detecção e limite de quantificação (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

Feinberg e Raguènès (1998), desenvolveram um procedimento padronizado para validação de métodos em laboratórios de química de alimentos, realizando a validação

de um método espectrofotométrico para análise de glicose em produtos cárneos, e na avaliação dos parâmetros de validação a sensibilidade do método foi observada junto com o modelo utilizado para a determinação da linearidade e dos limites de detecção e quantificação.

#### **e) Limite de detecção**

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de trações, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (SABLAYROLLES et al. 2005).

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limite é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos (INMETRO, 2003b). Muitas controvérsias são originadas pelo fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo "limite de detecção" não é aceito por todos. O limite de detecção ou detecção limite é a terminologia mais usada, e aceita pelo Eurachem. A ISO usa "mínimo detectável nesta concentração", já a IUPAC prefere "valor (verdadeiro) mínimo detectável". Entretanto, todas as organizações preferem mesmo a definição: "a quantidade mais baixa de um analito em uma amostra que possa ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato" (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

O limite de detecção não pode ser confundido com a sensibilidade do método. O último é "a potencialidade do método para discriminar diferenças pequenas na concentração ou na massa do analito" e é igual ao slope (ângulo de inclinação) da curva de calibração (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração

do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito (INMETRO, 2003b).

Sablaylorles et al. (2005), desenvolveram um método cromatográfico para determinação de ftalatos (ésteres de ácido ftálico) no solo e em vegetais, pois são compostos pouco degradáveis e tóxicos. Na validação do método os parâmetros avaliados foram a linearidade, a reprodutibilidade, repetitividade e os limites de quantificação e detecção, sendo este último avaliado como três vezes o desvio padrão da análise de dez repetições do branco.

#### **f) Limite de quantificação**

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (SABLAYROLLES et al. 2005). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguidas são satisfatórias. A diferença entre limite de detecção e de quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2003b).

Mohamed et al. (2005), desenvolveram um método espectrofluorométrico para determinação de algumas drogas psicoativas como a clorpromazina, thioridazina, clomipramina, imipramina e desipramina, sendo que na validação do método proposto foram analisados os seguintes parâmetros: linearidade, limites de detecção e quantificação, seletividade, precisão e robustez. O limite de quantificação foi avaliado como dez vezes o desvio padrão do coeficiente linear da curva de calibração dividido pelo coeficiente angular (slope), sendo que os limites de quantificação para as drogas pesquisadas foram de 0,035 a 0,038 µg/ml.

A validação de uma metodologia analítica para dosagem de soluções de lapachol (naftoquinona encontrada em plantas com atividade antimicrobiana) por cromatografia líquida, realizada por Fonseca et al. (2004) foi determinada segundo os

critérios da International Conference on Harmonization (ICH) e o limite de quantificação foi determinado matematicamente através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação.

#### **g) Exatidão e tendência**

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de uma medição e o valor verdadeiro do mensurando (INMETRO, 2003a). Exatidão é um termo qualitativo. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência). A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível. (INMETRO, 2003b).

Bilbao et al. (2006), determinaram flavonóides em frutas cítricas através de uma nova técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com um detector ultravioleta sendo os compostos identificados através da cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa. A validação da metodologia foi realizada através da avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade. A exatidão foi avaliada adicionando três quantidades conhecidas (80, 100 e 120 % do valor esperado) de cada flavonóide na amostra e os resultados encontrados na recuperação foram de 69,28% para isoquercetina, 92,51% para naringina, 93,96 % para rutina, 95,46 % para naringenina e 96,93 % para quercetina.

Feinberg e Raguènès (1998), no desenvolvimento e aplicação de um procedimento padrão de validação para laboratórios de química de alimentos, determinaram a exatidão do método alternativo para determinação de açúcares solúveis totais em carnes e produtos cárneos em comparação com aquele de referência que é uma técnica de absorção molecular espectrofotométrica, sendo que o método alternativo consiste na modificação de um reagente de cor e na automatização do

procedimento, a exatidão dos resultados dos dois métodos não teve diferenças significativa.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: o uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

#### g.1) Materiais de Referência Certificados (MRC)

Segundo o vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia um material de referência é definido como um material ou substância que tem um ou mais valores de propriedades que são suficientemente homogêneos e bem estabelecidos para ser usado na calibração de um aparelho, na avaliação de um método de medição ou atribuições de valores a materiais. MRC é um material de referência acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, e certificados por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata na unidade na qual os valores da propriedade são expressos, e cada valor certificado é acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido (QUEVAUVILLER, 2004; INMETRO, 2003a).

É muito importante que o fornecimento desses MRC sejam realizados por organismos reconhecidos e confiáveis. O uso correto do MRC consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. Quando o valor obtido não estiver dentro do intervalo da incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las, dependendo do rigor definido para os resultados (INMETRO, 2003b).

#### g.2) Comparações interlaboratoriais

A ABNT ISO/IEC Guia 43 faz distinção entre o uso de comparações interlaboratoriais para ensaios de proficiência, para a determinação do desempenho do método, e para outros propósitos tais como: estabelecer a eficácia e a comparabilidade de novos métodos de ensaio ou de medição, monitorar métodos estabelecidos e determinar as características de desempenho de um método, geralmente conhecido como processos colaborativos que é uma forma especial de ensaio para avaliar o

desempenho de um método nas condições normais de trabalho em vários laboratórios, através de ensaio de amostras homogêneas preparadas cuidadosamente (INMETRO, 2003b).

#### g.3) Comparação de métodos

Consiste na comparação dos resultados obtidos utilizando um método interno com os resultados conseguido através de um método de referência. O objetivo é de estudar o grau de proximidade e dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, de avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência. As análises são realizadas em replicatas utilizando os dois métodos de ensaio, em separados, sobre a mesma amostra, numa faixa restrita de concentração ou em toda faixa de concentração em que se pretende validar o método (INMETRO, 2003b).

#### g.4) Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo. As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração à média da faixa de uso do método. A limitação deste procedimento é o de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003b).

Para Rodríguez et al. (2005), recuperação é definida como a quantidade de analito, presente ou adicionado na porção analisada do material teste, que é recuperada por medição. E define como fator de recuperação a razão entre a concentração experimental observada e a concentração de referência, obtendo este valor experimental para o processo analítico usando uma curva de calibração.

Os métodos analíticos apontam estimar o valor verdadeiro da concentração do analito com uma incerteza que seja aceita para a finalidade. EURACHEM, IUPAC, ISO e AOAC recomendam que a recuperação seja estabelecida sempre como uma parte da

validação do método. A recuperação deve ser executada para diferentes tipos de matrizes, em níveis diferentes da concentração do analito (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

## **h) Precisão**

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, e as duas formas mais comuns de expressá-las são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa como desvio padrão (LEITE, 1996; NEVADO et al. 2005; JAROSZYNSKA e LIGOR, 2005; GARCIA et al. 2005; SABLAYROLLES et al. 2005).

Estudos da precisão e tendência, que fazem parte da estimativa da incerteza da medição, são os critérios mais importantes na validação de métodos (TAVERNIERS, BOCKSTAELE e LOOSE 2004).

### **h.1) Repetitividade**

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (INMETRO, 2003a), a seguir: mesmo procedimento de medição, mesmo observados, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sob condições de repetitividade é aconselhável calcular o limite de repetitividade ( $r$ ), que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra, determinadas sob condições de repetitividade é significativa (INMETRO, 2003b).

### **h.2) Reprodutibilidade**

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições de variadas medições (INMETRO, 2003a).

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial (INMETRO, 2003b).

A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade "R", o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE 2004).

### h.3) Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e/ou diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável a usar (INMETRO, 2003b).

Blanco e Alcalá (2006), desenvolveram e validaram um método de espectroscopia infra-vermelho para quantificação simultânea de cinco princípios ativos em preparações farmacêuticas avaliando os parâmetros da seletividade, linearidade, exatidão, robustez e a precisão na forma de repetitividade e precisão intermediária sendo determinada através de dois analistas em três dias e os resultados foram analisados através do teste F de Snedecor.

### **i) Robustez**

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um procedimento analítico diz-se robusto quando a precisão e a exatidão do método são praticamente insensíveis a pequenas variações que possam ocorrer no ambiente, no laboratório e pessoal (GARCIA et al. 2003). Recomenda-se introduzir variações intencionais no método, como diferentes dias,

analistas, instrumentos, pH, solventes, reagentes, variação na preparação da amostra ou material usado (TAVERNIERS LOOSE e BOCKSTAELE 2004; NEVADO et al. 2005).

Para avaliar as variações introduzidas no método deve ser utilizado o modelo do experimento de Youden e Steiner's que estuda sete variáveis em dois níveis diferentes (TAN, XU e ZHENG, 1995).

Na determinação da robustez a IUPAC utiliza o termo "robustness", mas na bibliografia podem ser encontrados dois conceitos diferentes: "ruggedness" avalia o comportamento do método com mudanças nas condições experimentais externas (semelhantes e diferentes laboratórios, analistas, equipamentos...) e "robustness" que estuda os efeitos dos fatores experimentais intrínsecos do método como variações de temperatura, pH, concentração de solventes, mudanças na composição da fase móvel, tempo de retenção, etc. (GARCIA et al. 2003).

Nevado et al. (2005), determinaram estudos de validação e robustez em formulações farmacêuticas e definem o teste de robustez como uma etapa da validação do método, relatada na precisão, com o objetivo de identificar possíveis fontes de erro que possam ocorrer em métodos específicos nas condições internas de análise.

#### **j) Incerteza da medição**

Informações sobre incerteza da medição estão detalhadas a partir do item 1.5.

### **1.5 Incerteza**

A definição do termo incerteza da medição, segundo o vocabulário internacional de termos básicos e genéricos em metrologia é: "um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando" (INMETRO, 2003a).

A incerteza da medição está diretamente ligada com o controle de qualidade e a garantia da qualidade, aspectos envolvidos na validação de métodos (BURNS, 2004).

### **1.5.1 Fontes de Incerteza**

Na prática, a incerteza de um resultado pode provir de muitas fontes possíveis, incluindo exemplos tais como definição incompleta, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (CAMÕES, 2001).

A descrição do Guide Uncertainty Measurement (GUM) envolve a identificação de todas as possíveis fontes de incerteza para o método; a estimação de sua magnitude para os dados experimentais e a combinação destas incertezas individuais para apresentar uma incerteza expandida (BARWICK et al. 1999).

A avaliação da incerteza é baseada na identificação e quantificação dos efeitos dos parâmetros de influência sobre a incerteza global. Além disso, requer a compreensão do procedimento de medição e das incertezas associadas a cada um dos fatores que influenciam o resultado. A medição de uma grandeza é sempre iniciada através da identificação do mensurando, associado aos respectivos métodos de medição e procedimento de medição (BUCHMANN e SARKIS, 2002).

Com o objetivo de identificar e analisar as possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas avaliadas, os procedimentos adotados em cada etapa devem ser detalhados e estruturados de forma a garantir a máxima abrangência, evitando a duplicidade de fontes de incerteza. Normalmente, este objetivo pode ser alcançado e melhor visualizado através da utilização de diagramas de causa e efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou de espinha de peixe (BARWICK et al. 1999).

### **1.5.2 Componentes de incerteza**

Na estimativa da incerteza total, pode ser necessário tratar cada fonte de incerteza separadamente para se obter a contribuição de cada fonte. Cada uma das distintas contribuições à incerteza é denominada como um componente de incerteza. Quando expressada como um desvio padrão, um componente de incerteza é conhecido como incerteza padronizada. Entretanto, geralmente é possível avaliar o efeito

combinado de diversos componentes. Isso pode reduzir o total do esforço envolvido e, quando os componentes cujas contribuições avaliadas conjuntamente são correlacionadas, pode não haver necessidade adicional de se levar em conta a correlação (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIAMS, 2000).

Buchmann e Sarkis (2002) estimaram a incerteza de medição para o preparo de uma solução de referência para calibração e identificaram as fontes de incerteza através de um diagrama causa e efeito. Nos ramos principais foram descritas as grandezas de entrada da equação que representa o mensurando. Nos ramos secundários foram especificadas as fontes de incerteza associadas direta ou indiretamente a essas grandezas. As duas componentes de incerteza da medição da massa, a repetitividade e a linearidade foram combinadas para fornecer uma incerteza padrão combinada.

A estimativa da incerteza na análise de espectrometria para a determinação de níquel em água foi realizada por Barwich et al. (1999) as fontes de incerteza foram identificadas pela construção de um diagrama de causa efeito. O efeito principal é representado por uma linha horizontal no diagrama (concentração de níquel ng/g). As principais causas foram representadas por ramos principais em torno do resultado foram a concentração da solução da amostra, o fator de diluição da amostra e o fator de recuperação. As incertezas associadas a estes parâmetros contribuíram para a incerteza total no resultado final.

Para o resultado de uma medição, a incerteza total, denominada incerteza padronizada combinada ( $u_c$ ), é um desvio padrão estimado igual à raiz quadrada positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza, independentemente de como foram avaliados (ELLISON et al. 2000).

Em química analítica, para a maioria das aplicações, deve ser utilizada uma incerteza expandida (U). A incerteza expandida fornece um intervalo dentro do qual se acredita, com um alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. A incerteza expandida é obtida pela multiplicação da incerteza combinada, por um fator de abrangência ( $k$ ). A escolha do fator  $k$  é baseada no nível de confiança desejado (CAMÕES, 2001).

### 1.5.3 Processo de estimativa da incerteza de medição

A estimativa da incerteza é simples em seu princípio. As tarefas que precisam ser executadas para se obter uma estimativa da incerteza associada ao resultado de uma medição serão resumidas a seguir em quatro etapas segundo o Guia EURACHEM/CITAC Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2º edição, 2000 (ELLISON et al. 2000).

#### Etapa 1. Especificação do mensurando

O objetivo desta etapa é descrever o procedimento de medição. Consiste em enumerar as etapas de medição e uma expressão matemática do mensurando e os parâmetros dos quais ele depende (ELLISON et al. 2000).

Declarar claramente o que está sendo medido, incluindo a relação entre o mensurando e as grandezas de entrada (i.e. grandezas medidas, constantes, valores do padrão de calibração, etc.), das quais ele depende.

O mensurando é o objeto da medição. Grandeza específica submetida à medição (ELLISON, 2000).

#### Etapa 2. Identificação das fontes de incerteza

Esta etapa é uma das mais difíceis na avaliação da incerteza de medições analíticas, porque há um risco de negligenciar as fontes de incerteza, por um lado, e contá-las duas vezes, por outro. A utilização de um diagrama de causa e efeito, é um modo possível de ajudar a evitar que isso ocorra (ELLISON et al. 2000).

Listar as possíveis fontes de incerteza. Isso incluirá as fontes que contribuem para a incerteza dos parâmetros da relação estabelecida na etapa 1, mas podendo também incluir outras fontes e não deixando de incluir fontes decorrentes de pressuposições químicas. É sugerido um procedimento genérico para formação de uma lista estruturada das possíveis fontes de incerteza. Na prática, a análise estruturada necessária é efetuada por meio de um diagrama de causa e efeito (também conhecido como diagrama Ishikawa ou “espinha de peixe”).

#### Etapa 3. Quantificação dos componentes de incerteza

Medir ou estimar a dimensão do componente de incerteza associado a cada fonte potencial de incerteza identificada. Geralmente é possível estimar ou determinar uma única contribuição à incerteza associada a diversas fontes distintas. É também importante considerar se os dados disponíveis abrangem suficientemente as fontes de incerteza, e programar cuidadosamente experimentos e estudos adicionais para assegurar que todas as fontes sejam adequadamente consideradas (ELLISON et al. 2000).

#### Etapa 4. Calcular a incerteza combinada

As informações obtidas na etapa 3 consistirão de diferentes contribuições quantificadas para a incerteza total, sejam associadas a fontes individuais ou aos efeitos combinados de diversas fontes. As contribuições devem ser expressas como desvios padrão, e combinadas conforme as regras apropriadas para se ter uma incerteza combinada. O fator de abrangência apropriado deve ser aplicado para se chegar a uma incerteza expandida (ELLISON et al. 2000).

### 1.5.4 Formas de avaliação da incerteza

#### a) Avaliação do tipo A

Método de avaliação da incerteza pela análise estatística de uma série de observações. Quando um conjunto de muitas medições repetidas é realizado, a média e o desvio padrão estimado ( $s$ ) podem ser calculados do conjunto (BUCHMANN, 2002). A incerteza padrão,  $u$ , é calculada segundo equação (1)

$$u = s / \sqrt{n} \quad (1)$$

Sendo:

$n$  = número de medições realizadas;

$s$  = desvio padrão.

#### b) Avaliação do tipo B

São incertezas estimadas usando qualquer outra informação. Pode ser informação de medições em experiências passadas, de certificados de calibração, especificações do fabricante, de informações publicadas, e do bom senso (ELLISON et al. 2000; INMETRO, 2003b).

Buchmann e Sarkis (2002), avaliaram a incerteza da concentração da solução estoque como do tipo B, pois não existiam informações específicas sobre a distribuição dos valores de concentração medidos dentro do intervalo específico, considerou-se uma distribuição retangular.

### 1.5.5 Tipos de incerteza

#### a) Incerteza padrão ( $u$ )

Incerteza do resultado de uma medição expressa como equivalente a um desvio padrão. Sempre estará em um nível de confiança de 68%. Todas as incertezas contribuintes devem ser expressas no mesmo nível de confiança, convertendo-se então em incerteza padrão. A incerteza padrão é a margem cujo tamanho pode ser pensada como “mais ou menos um desvio padrão” (ELLISON et al. 2000).

#### b) Incerteza padrão combinada ( $u_c$ )

Incerteza padronizada de um resultado de medição quando este resultado é obtido por meio dos valores de várias outras grandezas, sendo igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, sendo estes as variâncias ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com quanto o resultado das medições variam com mudanças nestas grandezas (ELLISON et al. 2000).

A determinação da incerteza padrão combinada, equação 2 é obtida com a combinação das diferentes incertezas padrão ( $u_i$ ), não correlacionadas, envolvidas no processo de medição. Sempre terá um nível de confiança de 68 % (SOUZA et al. 2006; FIDÉLIS, 2004).

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 \dots u_n^2} \quad (2)$$

Sendo:

$u_c$  = incerteza padrão combinada;

$u_i$  = incerteza padrão de um componente.

No desenvolvimento de um material de referência certificado para uma solução de etanol em água, realizado por Souza et al. (2006), foram selecionadas as seguintes fontes de incerteza padrão ( $u$ ): massa de etanol ( $m_{ETOH}$ ), massa de água ( $m_{água}$ ), pureza do etanol ( $p$ ) e fator de evaporação do etanol ( $eva$ ) e colocadas em um diagrama de causa e efeito. Para o cálculo da incerteza padrão combinada, as fontes selecionadas foram expressas como na equação 3.

$$u_c([ETOH]) = \sqrt{(u(m_{ETOH}))^2 + (u(m_{água}))^2 + (u(p))^2 + (u(eva))^2} \quad (3)$$

#### c) Incerteza expandida ( $U$ )

Grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição que pode ser esperado em englobar uma grande fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. A incerteza expandida é expressa com um nível de confiança de aproximadamente 95 % ou 99 % (ELLISON et al. 2000).

A incerteza expandida é obtida pela multiplicação do fator de abrangência ( $k$ ) pela incerteza padrão combinada ( $u_c$ ) (SOUZA et al. 2006) como mostra a equação 4.

$$U_p = k \cdot u_c \quad (4)$$

Sendo:

$U_p$  = incerteza expandida;

$k$  = fator de abrangência;

$u_c$  = incerteza padrão combinada.

A distribuição de probabilidade da incerteza expandida é aproximadamente a curva normal. O fator de abrangência (k) (mínimo) é: k = 2 para nível de confiança de aproximadamente 95 % e k = 3 para nível de confiança de aproximadamente 99 %.

Para estimar o valor de um fator de abrangência k, correspondente a uma probabilidade de abrangência especificada, é necessária que seja levada em conta a confiabilidade da incerteza padrão combinada (BUCHMANN e SARKIS, 2002; INMETRO, 2003b).

Para a estimativa do desvio padrão de uma distribuição normal, os graus de liberdade desta estimativa dependem do tamanho da amostra na qual ela está baseada. Analogamente uma medida adequada da confiabilidade da incerteza padrão associada a uma estimativa de saída é seu grau de liberdade efetivo ( $v_{\text{eff}}$ ) que é aproximado por uma combinação apropriada dos graus de liberdade das diferentes contribuições da incerteza padrão. (INMETRO, 2003b).

O procedimento para o cálculo de um fator de abrangência apropriado k, é obtido a partir da equação (5) de Welch Satterthwaite, que determina os graus de liberdade efetivos associados a incerteza combinada (INMETRO, 2003b).

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (5)$$

Sendo:

$v_{\text{eff}}$  = graus de liberdade efetivos;

$u_c$  = incerteza padrão combinada;

$u_i$  = incerteza padrão;

$v_i$  = graus de liberdade de uma incerteza padrão.

Para incerteza padrão do tipo A, os graus de liberdade são dados por  $v_i = n - 1$  ( $n$  é o número de observações). Para a incerteza padrão do tipo B, os graus de liberdade podem ser tornados como sendo infinitos (INMETRO, 2003b).

Com o  $v_{\text{eff}}$  calculado da tabela de Coeficientes de Student ( $t$ ), selecionar o coeficiente correspondente ao nível de confiança de desejado. Interpolar o valor de  $v_{\text{eff}}$  ou usar o valor inteiro imediatamente abaixo de  $v_{\text{eff}}$  para obter “ $t$ ”, que será adotado como fator de abrangência (FIDÉLIS, 2004).

## 1.6 Erro e tratamento de dados analíticos

Qualquer resultado de medição analítica está sujeito a desvios do valor verdadeiro devido a diversas razões; por exemplo, variações da temperatura em equipamentos volumétricos, reflexões e luz dispersa em instrumentos espectroscópicos, interpretações individuais de analistas técnicos de métodos específicos e recuperação incompleta de extração são fontes de erros em potencial. Na medida do possível, tais erros devem ser minimizados por controle externo ou corrigidos explicitamente, por exemplo, pela aplicação de um fator de correção. Entretanto, o valor exato do desvio deva se estimado (BACCAN, et al. 2003). Sempre que qualquer tipo de item for medido por algum método, o erro resultante é a combinação de muitos efeitos do instrumento, da calibração, do operador, do ambiente e do item a ser medido. Felizmente em muitos casos os efeitos dominantes podem ser identificados, e outros efeitos podem ser ignorados (BURR e HEMPHILL, 2006).

Erro é o resultado de uma medição menos o valor verdadeiro do mensurando. Uma vez que o valor verdadeiro não pode ser determinado, utiliza-se, na prática, um valor verdadeiro convencional. O erro é um valor único, o valor de um erro conhecido pode ser aplicado como uma correção ao resultado (CAMÕES, 2000).

Os erros que acompanham uma medida podem ser classificados em duas categorias. Erros determinados ou sistemáticos possuem um valor definido e pelo menos em princípio, podem ser medidos e computados no resultado final. Erros indeterminados (aleatórios) possuem valor indefinido, não são mensuráveis e flutuam de um modo aleatório (BACCAN, et al. 2003). As duas categorias de erros são

importantes, pelo fato de suas fontes serem diferentes, tendo conseqüência para a interpretação dos dados (THOMPSON e WOOD, 1995).

### **1.6.1 Erros sistemáticos**

Erro sistemático é definido como um componente de erro que, no decorrer de um número de análises do mesmo mensurando, permanece constante ou varia de uma forma previsível. Ele é independente do número de medições feitas e não pode, portanto, ser reduzido pelo aumento do número de análises sob condições de medições constantes (BACCAN, et al. 2003). Erros sistemáticos compreendem o deslocamento de medidas de muitas determinações para o valor verdadeiro (THOMPSON e WOOD, 1995).

### **1.6.2 Erros aleatórios**

Mesmo na ausência de erros determinados, se uma mesma pessoa faz uma mesma análise, haverá pequenas variações nos resultados. Isto é conseqüência dos chamados erros aleatórios, os quais não podem ser classificados e corrigidos (BACCAN, et al. 2003). No entanto, estes erros podem ser submetidos a um tratamento estatístico que permite saber qual o valor mais provável e também a precisão de uma série de medidas (THOMPSON e WOOD 1995).

O erro aleatório é normalmente gerado por variações imprevisíveis de grandezas que influem no resultado da medição. Esses efeitos aleatórios dão origem a variações em observações repetidas do mensurando. O erro aleatório de um resultado analítico não pode ser compensado, mas pode geralmente ser reduzido, pelo aumento do número de observações (ELLISON et al. 2000).

Erros aleatórios determinam a precisão da medição. O fato de ser aleatória causa desvios positivos e negativos no resultado subjacente a média dos valores (THOMPSON e WOOD, 1995).

O desvio padrão experimental da média aritmética ou média de uma série de observações não é o erro aleatório do valor médio, embora seja referido como tal em

algumas publicações sobre incerteza. É ao invés, uma medida de incerteza da média em decorrência de alguns efeitos aleatórios. O valor exato do erro aleatório do valor da média gerado por esses efeitos não pode ser conhecido (ELLISON et al. 2000).

### 1.6.3 Média, desvio padrão e variância.

A média nos fornece uma estimativa do “verdadeiro” valor. Considerando uma variável aleatória da qual  $n$  observações independentes  $x_i$  foram obtidas sob as mesmas condições de medição, podemos dizer que o valor esperado é a média aritmética. De uma forma geral a média aritmética pode ser definida como o total das observações dividido pelo número de observações, como na equação (6) (LEITE, 1996).

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (6)$$

Sendo:

$\bar{X}$  = média aritmética das observações;

$n$  = número de medidas;

$X_i$  = medidas individuais.

Quanto maior o número de medições, melhor a estimativa do valor verdadeiro. O ideal seria obter a média de um conjunto infinito de valores. Quanto mais resultados usar, mais próximo da estimativa ideal da média. Quando medições repetidas fornecem resultados diferentes, nós queremos saber quão dispersas estão estas medições. Com o conhecimento da amplitude da dispersão, nós podemos iniciar o julgamento da qualidade das medições ou do conjunto de medições. O modo usual de quantificar a dispersão é o desvio padrão. O desvio padrão de um conjunto de números mostra o quanto as medições individuais são diferentes da média do conjunto (THOMPSON e WOOD, 1995).

De um número pequeno de medições, somente pode ser obtido um valor estimado do desvio padrão, equação 7 (LEITE, 1996). O símbolo  $s$  é geralmente utilizado para o desvio padrão estimado.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_{i,j} - \bar{X}_i)^2} \quad (7)$$

A variância é simbolizada por  $s^2$  que representa o desvio padrão elevado ao quadrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica: uma assistência a acreditação**. 2º ed. Brasília: editora ANVS, 2004. 76 p.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J.S. **Química analítica quantitativa elementar**. 3º ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2003. 324 p.

BARWICK, V. J.; ELLISON, S. L. R.; FAIRMAN, B. Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology. **Analytica Chimica Acta**. v. 394, p. 281-291, 1999.

BASS, J. K.; CHAN, G. M. Calcium nutrition e metabolism during infancy. **Nutrition**. 2006 in press.

BILBAO, M. L. M.; LACUEVA, C. A.; JÁUREGUI, M.; RAVENTÓS, R. M. L. Determinations of flavonoids in a citrus fruit extract by LC-DAD an LC-MS. **Food Chemistry**. 2006 in press.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M. Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: development and validation of a near infrared spectroscopic method. **Pharmaceutical Sciences**. v. 27, n 2-3, p. 280-286, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial da União de 14/12/1998**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. **Diário Oficial da União de 27/07/1999**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, lingüiça e de salsicha. **Diário Oficial da União de 05/04/2000**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União de 26/03/2004**, Brasília, DF.

BUCHMANN, J. H.; SARKIS, J. E. S. Conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 111-116, 2002.

BURNS, M. Current practice in the assessment and control of measurement uncertainty in bio-analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 5, p. 393-398, 2004.

BURR, T. L.; HEMPHILL, G. S. Multiple-component radiation-measurement error models. **Applied Radiation and Isotopes**. v. 64, p. 379-385, 2006.

BUTT, S. B.; RIAZ, M.; IQBAL, M. Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair chromatography. **Talanta**. v. 55, p. 789-797, 2001.

CAMÕES, M. F. G. F. C. **Quantificação da incerteza nas medições analíticas**. [s.l.] 2001. 30 p.

CASÉ, F.; DELIZA, R.; ROSENTHAL, A.; MONTOVANI, D.; FELBERG, I. Produção de "leite" se soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25 (1), p. 86-91, 2005.

CASSENS, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**. v. 59, n. 4, p. 561-566, 1997.

CHERIAN, T.; NARAYANA, B. A new system for the spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite in environmental samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 17, n. 3, p. 577-581, 2006.

CROSLAND, A. R.; PETERSON, R. L. S.; HIGMAN, R. C.; STEWART, C. A., HARGIN, K. D. Investigations of methods to detect mechanically recovered meat in meat products – I: chemical composition. **Meat Science**. v. 40, p. 289-302, 1995.

D'ACRI, V. Trabalho e saúde na indústria têxtil de amianto. **São Paulo em Perspectiva**. v. 17, n. 2, 2003.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: editora SARVIER, 1998. 403 p.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Eds.). **EURACHEM/CITAC Guide**. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2<sup>o</sup> ed.[s.l.] 2000.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **ICH topic Q2B validation of analytical procedures: methodology**. Londres, 1996. Disponível em: <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em: 10 de agosto de 2005.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**. n. 391, p. 239-252, 1998.

FIDÉLIS, G. **Incerteza de medição**. Florianópolis UFSC, CCA, 2004.

FONSECA, S. G. C.; SILVA, L. B. L.; CASTRO, R. F.; SANTANA, D. P. Validação de metodologia analítica para doseamento de solução de lapachol por CLAE. **Química Nova**. v. 27, n. 1, p. 157-159, 2004.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption**. Rockville, 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/search/databases.html>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2005.

GARCÍA, P. L.; SANTORO, M. I. R. M.; HACKMAN, E. R. M. K.; SINGH, A. K. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel cream preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 39, p. 764-768, 2005.

GARCIA, I.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L.; VILCHES, C.; GREDILLA, E. Advances in methodology for the validation of methods according to the international organization for standardization application to the determination of benzoic and sorbic acids in soft drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography A**. v. 992, p. 11-27, 2003.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FURLONG, E. B. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.

GONÇALVES, M. E. P.; CAMÕES, M. F.; PAIVA, J. M.; BENOLIEL, M. J.; CARNEIRO, R. N. Validação do método de determinação simultânea de íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano. **Química Nova**. v. 27, n. 3, p. 503-507, 2004.

HULTIN, H. O. Características del tejido muscular. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993.

INMETRO a. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 3 ed. Rio de Janeiro, 2003. 75p.

INMETRO b. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2003.

JAROSZYNSKA, J.; LIGOR, T. The identification of phenolic compounds by a gas chromatographic method on three capillary columns with the same non-polar stationary phase. **Analytica Chimica Acta**. v. 539, p. 11-15, 2005.

- LEE, C. H.; CHO, Y. H.; PARK, K. H. Assessment of estimated daily intake of nitrite by average consumption of processed foods in Korea. **Food Control**. v. 17, p. 950-956, 2006.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Editora Átomo, 1996.
- MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, p. 390-394, 2004.
- MOHAMED, F. A.; MOHAMED, H. A.; HUSSEIN, S. A.; AHMED, S. A. A validated spectrofluorimetric method for determination of some psychoactive drugs. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 139-146, 2005.
- NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; ROBLEDO, V. R. Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 1072, p. 249-257, 2005.
- OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. B. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.
- ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. v. 76, p. 103-106, 2002.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. v. 2, 1 ed. Goiânia: UFG, 1996. p. 588-1110.
- PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 579 p.
- QUEVAUVILLER, P. Traceability of environmental chemical measurements. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 3, 2004.
- RIBANI, M.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RODRIGUEZ, L. C.; LOPEZ, E. M. A.; CAMPAÑA, A. M. G.; CASADO, A. G.; GONZÁLEZ, F. J. E.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Setting up of recovery profiles: a tool to perform the compliance with recovery requirements for residue analysis. **Talanta**. v. 66, n. 4, p. 1063-1072, 2005.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; ALLER-GUIOTE, P.; GIMENEZ-COLMENERO, F. Application of flow injection analysis to determine protein-bound nitrite in meat products. **Food Chemistry**. 2006 in press.

SABLAYROLLES, C.; VIGNOLES, M. M.; BENANOU, D.; PATRIA, L.; TREILHOU, M. Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v. 1072, p. 233-242, 2005.

SCHRODER, B. G.; GRIFFIN, I. J.; SPECKER, B. L.; ABRAMS, S. A. Absorption of calcium from the carbonated dairy soft drink is greater than that from fat-free milk and calcium-fortified orange juice in women. **Nutrition Research**. v. 25, p. 737-742, 2005.

SOUSA, E. A.; TEIXEIRA, L. C. V.; MELLO, M. R. P. A.; TORRES, E. A. F. S.; MOITA NETO, J. M. Aplicação de redes neurais para avaliação do teor de carne mecanicamente separada em salsicha de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 3, p. 307-311, 2003.

SOUZA, V.; CAIXEIRO, J. M. R.; SILVA, R. A. L.; PEDRO, L. R.; BORGES, R. M. H.; COUTO, P. R. G. Development of a certified reference material: ethanol in water – a practical case. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, p. 107-114, 2006.

STERTZ, S. C.; PENTEADO, P. T. P. S.; FREITAS, R. J. S. Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na região metropolitana de Curitiba. **Revista do Instituto Adolf Lutz**. v. 63, p. 200-207, 2004.

TAN, H. S. I.; XU, J.; ZHENG, Y. Cation-exchange high-performance liquid chromatographic assay of piperazine in some pharmaceutical formulations. **Journal of chromatography A**. n. 693, p. 307-314, 1995.

TAVERNIERS, I.; BOCKSTAELE, E. V.; LOSSE, M. D. Trends in quality in the analytical laboratory, I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 7, p. 480-490, 2004.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory, II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 8, p. 535-550, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure appl. Chem**. V. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M.; WOOD, R. harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem**. v. 67, n. 4, p.649-666, 1995.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 14, p. 867-869, 1996.

## **CAPÍTULO 2**

### **VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM EMBUTIDOS CÁRNEOS**

## VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO EM EMBUTIDOS CÁRNEOS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia para determinação de cálcio em embutidos cárneos, através de testes alusivos à faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, especificidade, robustez e incerteza da medição. O método original foi modificado. Em uma das etapas de filtração utilizava-se como elemento filtrante fibras médias de amianto, as quais foram substituídas por papel filtro quantitativo. A faixa de trabalho foi determinada através da curva de regressão, e a linearidade foi confirmada pelo coeficiente de correlação linear  $R^2 = 0,9999$ . Os limites de detecção e quantificação obtidos foram 11 e 16 mg de cálcio/100 g da amostra, respectivamente. A precisão do método, avaliada pela repetitividade, obteve coeficientes de variação menores que 3 %. A exatidão, determinada pela fortificação das amostras, apresentou recuperações do analito maiores que 99 %. A especificidade do método foi confirmada para a determinação de cálcio. Na estimativa da incerteza de medição, o resultado da incerteza expandida para o mensurando (%  $\text{Ca}^{++}$ ) foi de  $\pm 0,00904$  g com um nível de confiança de 95 % e  $k = 2,87$ . O resultado corrigido da análise de cálcio em salsichas foi de  $0,108 \pm 0,009$  g de cálcio/100 g da amostra. Um método adequado e validado para análise de alimentos é fundamental para obter resultados analíticos confiáveis. O método proposto mostrou-se linear na faixa de trabalho, sensível, preciso, exato, específico e robusto, sendo adequado para determinar a concentração de cálcio em produtos cárneos.

Palavras-chaves: determinação de cálcio; produtos cárneos; validação de métodos.

## 1 INTRODUÇÃO

O cálcio é associado, de maneira geral aos ossos, aos dentes e ao leite. O que reflete em sua importância na alimentação. A ligação do cálcio com a mineralização óssea é, durante toda a vida, evidenciada na tentativa de se prevenir à osteoporose. No entanto, além desse papel importante na formação e manutenção dos ossos e dos dentes, o cálcio desempenha inúmeras outras funções reguladoras no processo bioquímico corpóreo (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). A absorção intestinal do cálcio de todas as fontes varia tipicamente de 23 % a 37 % (SCHRODER et al. 2005). A absorção é, por outro lado, um processo complexo e ligado a inúmeros outros fatores, que incluem desde a disponibilidade na dieta, a idade, a raça, a presença de vitamina D, até o uso de drogas, como os barbitúricos (DUTRA-DE-OLIVEIRA e MARCHINI, 1998).

Em embutidos cárneos a concentração de cálcio depende do tipo de embutido e da quantidade de carne mecanicamente separada (CMS) utilizada para a sua fabricação. A legislação brasileira limita o uso de CMS em embutidos (SOUSA et al. 2003).

No método analítico para determinação de cálcio em produtos cárneos, recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) descrito em Brasil, (1999) utiliza-se em uma das etapas de filtração cadinho de *Gooch* e como elemento filtrante fibras médias de amianto, material tóxico, que segundo D'Acri, (2003) pode causar asbestose pulmonar, câncer de pulmão, mesoteliomas e doenças pleurais benignas como placas pleurais e limitações crônicas de fluxo aéreo.

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método existente for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar de que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2003).

Os termos validação e garantia da qualidade são extensamente usados. Segundo a NBR ISO/IEC 17025 validar um método é confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Validação de métodos analíticos é o primeiro passo para a garantia da qualidade em um laboratório. A garantia da qualidade analítica é o conjunto completo das medidas que um laboratório deve garantir-se em assegurar que pode sempre conseguir os dados de alta qualidade. Além do uso da validação e/ou de métodos padronizados, estas medidas são: procedimentos eficazes de controle da qualidade interna (uso de materiais de referência, calibração de equipamentos, controle de documentos, etc.); participação em testes de proficiência; e acreditação a um organismo internacional, normalmente NBR ISO/IEC 17025 (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE, 2004).

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento ("accreditation") de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional (RIBANI, 2004).

No Brasil, duas agências são credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, a Resolução ANVISA nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 respectivamente (RIBANI, 2004).

As definições são diferentes para as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da International Conference on Harmonization (EUROPEAN AGENCY FOR..., 1996), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos.

A International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) redigiu um documento técnico (Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis) que é um guia para validação de métodos analíticos utilizado pela ISO (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002). A norma internacional ISO/IEC 17025, que é específica para laboratórios de ensaio e de calibração, no item 5.4.5, apresenta a "validação de métodos" como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O United States Food and Drug Administration (US-FDA) também tem proposto um guia (documento ORA-LAB.5.4.5 "Methods, Method Verification and Validation") sobre verificação da performance de métodos padronizados e validação de métodos não padronizados (RIBANI, 2004).

Órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO exigem o item "validação de métodos analíticos" como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica. O que se pode observar é que não há um procedimento normalizado. Como estes organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI, 2004).

Os parâmetros de validação avaliados são: linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão, especificidade, robustez e incerteza da medição. Os critérios de seleção para o procedimento apropriado de validação dependerão das condições do laboratório, do método utilizado, do tipo de amostra, dos componentes do mensurando, da calibração dos equipamentos e da disponibilidade de materiais de referência certificados.

O objetivo do trabalho foi validar uma metodologia para determinação de cálcio em embutidos cárneos, através de análises dos seguintes parâmetros: faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e tendências, especificidade, robustez e incerteza da medição.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Para a determinação de cálcio foi utilizada uma amostra de salsicha, adquirida em mercado local. O padrão utilizado foi, material de referência certificado (MRC), carbonato de cálcio (FLUKA) pureza de 99,70 % e incerteza expandida de  $\pm 0,13$  % com nível de confiança de 95 %. A concentração da solução padrão foi de 1,0013 mg de cálcio/mL. Os demais reagentes utilizados foram de qualidade p.a. Os equipamentos e vidrarias foram calibrados segundo a rede brasileira de calibração (RBC).

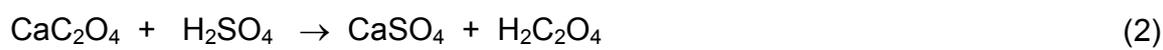
### **2.2 Métodos**

#### **Procedimento para análise**

A determinação de cálcio para embutidos cárneos foi realizada em amostra de salsicha, segundo metodologia proposta por Brasil, (1999) com modificações. Uma das etapas de filtração do método original é utilizada cadinho de Gooch e como elemento filtrante, fibras médias de amianto, que foram substituídas por papel filtro quantitativo. Foram pesados (Balança analítica Shimadzu AY-220, Japão), 5 g da amostra em cadinho. Carbonizada em placa aquecedora (Tecnal, Brasil) e incinerada em forno mufla (Quimis, Brasil) temperatura  $550 \pm 5$  °C até obtenção das cinzas. Esfriado até temperatura ambiente. Adicionado 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado, evaporado o ácido em chapa aquecedora (100 °C), adicionado 2,0 mL do mesmo ácido. O cadinho foi coberto com vidro relógio e aquecido em placa (100 °C) durante 5 minutos. Esfriado, lavado o vidro relógio com água deionizada. Filtrado em papel filtro qualitativo. O filtrado foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL. Esse material foi denominado como “solução estoque”.

Foram pipetados 50,0 mL da solução estoque para erlenmeyer de 250 mL. Adicionado 3 gotas de solução alcoólica de vermelho de metila a 0,1 % m/v e 50 mL de água deionizada. A solução foi neutralizada utilizando hidróxido de amônio (1+1) v/v. O pH foi ajustado para 5,5 utilizando HCl (1+9) v/v. O erlenmeyer foi aquecido em placa

aquecedora até ebulição e mantido durante 1 min. Foi adicionado 10,0 mL de oxalato de amônio 4,2 % m/v e deixado em repouso por 12 horas para formação do precipitado de oxalato de cálcio (equação 1). Após este período, foi filtrado em papel filtro quantitativo (Vetec), etapa de substituição ao amianto. Lavado o papel filtro com 50 mL de hidróxido de amônio 2 % v/v. Os filtrados foram descartados. O papel filtro contendo o precipitado de oxalato de cálcio foi transferido para um outro funil de vidro e lavado, cuidadosamente, com 130 mL de solução de ácido sulfúrico (5+125) v/v (equação 2). O ácido oxálico formado foi titulado a 75 °C (banho termostatizado (Tecnal, Brasil)), com solução padronizada de permanganato de potássio 0,01 M (equação 3). O teor de cálcio foi calculado, sendo que cada mililitro da solução padronizada de permanganato de potássio gasto na titulação corresponde a 1,0 mg de cálcio.



## 2.2.1 Validação do método proposto

### Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho e a linearidade foram determinadas de acordo com INMETRO, (2003).

Para o cálculo da faixa de trabalho foi construída uma curva utilizando solução padrão de cálcio com 6 níveis de calibração (1, 3, 5, 10, 15, 20 mg de cálcio). O número de replicatas para cada nível foi de 7.

A linearidade do método foi determinada a partir da curva da faixa de trabalho e calculada a partir da equação da regressão linear (equação 4), (EUROPEAN AGENCY FOR..., 1996).

$$y = ax + b \quad (4)$$

Sendo:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = inclinação da curva de calibração (sensibilidade);

b = interseção com o eixo y.

### **Sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

A sensibilidade foi determinada a partir da inclinação da curva na faixa de trabalho (TAVERNIERS, LOOSE e BOCKSTAELE, 2004) e calculada de acordo com a equação 5.

$$S = \frac{dx}{dy} \quad (5)$$

Sendo:

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dy = variação da concentração.

O LD foi determinado pela análise do branco (todos os reagentes utilizados na análise sem a adição do analito) com 10 repetições, sendo calculado a média e o desvio padrão. O LD foi calculado pela soma das médias dos brancos mais três vezes o desvio padrão dividido pela sensibilidade do método (equação 6) (FEINBERG e RAGUÈNÈS 1998).

$$LD = \frac{\bar{x} + 3.s}{S} \quad (6)$$

Senso:

X = média dos valores dos brancos da amostra;

s = desvio padrão dos brancos da amostra;

S = sensibilidade.

Para a determinação do limite de quantificação (LQ), foram analisados 10 brancos e calculada a média e o desvio padrão. O cálculo foi realizado de acordo com a equação 7 (FEINBERG e RAGUÈNÈS, 1998).

$$LQ = \frac{\bar{x} + 10.s}{S} \quad (7)$$

Sendo:

x = média dos valores dos brancos;

s = desvio padrão dos brancos;

S = sensibilidade do método.

## **Precisão**

A precisão foi avaliada a partir da repetitividade dos resultados utilizando a curva da faixa de trabalho (MOHAMED et al. 2005).

A precisão do método proposto foi expressa em termos de desvio padrão relativo (NEVADO et al. 2005) que é também chamado de coeficiente de variação (CV) sendo muito utilizado para expressar a relação percentual do desvio padrão com a média dos valores obtidos (LEITE, 1996).

## **Exatidão e tendências**

Para a avaliação da exatidão do método foi calculado o erro relativo de acordo com a equação 8. O índice Z foi calculado de acordo com a equação 9,. A avaliação dos resultados do índice Z foi realizada, de acordo com a seguinte escala de pontuação:  $|Z| \leq 2$  = satisfatório;  $2 < |Z| \leq 3$  = questionável;  $|Z| > 3$  = insatisfatório (INMETRO, 2003).

A recuperação do analito também foi avaliada em amostras fortificadas. Amostras de salsichas adicionadas de material de referência certificado em 3 diferentes

concentrações (2, 5 e 10 mg cálcio). As análises foram realizadas em triplicata (GABERLOTTI, MARSIGLIA e TORRES, 2003).

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \cdot 100 \quad (8)$$

Sendo:

$X_{lab}$  = média dos valores obtidos na análise da solução padrão;

$X_v$  = valor teórico aceito como verdadeiro (MRC).

$$Z = \frac{|X_{lab} - X_v|}{s} \quad (9)$$

Sendo:

$X_{lab}$  = média dos valores obtidos experimentalmente;

$X_v$  = valor teórico aceito como verdadeiro (MRC);

s = unidade de desvio (incerteza do MRC).

## Especificidade

A análise da especificidade do método foi realizada com solução padrão de cálcio (MRC) adicionado de impurezas (PLATZER e WHITE, 2006). Foi pipetada alíquota de 5,0 mL do padrão de cálcio em 10 cadinhos de porcelana, sendo que 5 cadinhos foram contaminados com 2,0 mL de uma solução de magnésio (6mg de  $Mg^{++}/mL$ ) e nos outros 5 cadinhos foram adicionados 0,5 mL de solução de sulfato de sódio (33,5 mg de  $SO_4^{-2}/mL$ ) e realizado todo o procedimento analítico.

## Robustez

Para avaliar a robustez do método foi utilizado o teste proposto por Youden e Steiner (TAN, XU, e ZHENG, 1994) de acordo com a Tabela 1, que permite avaliar a robustez e também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma. Para determinar a variação de

um fator, foram encontrados os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e minúsculas, comparando as médias dos dois grupos. Exemplificando, para calcular as variações de A para a, foi usada a equação 10.

$$\frac{A}{a} = \frac{(s+t+u+v)}{4} - \frac{(x+y+w+z)}{4} \quad (10)$$

A Tabela 2 mostra quais os fatores que foram modificados para a determinação da robustez. Foram denominados os fatores nominais por letras maiúsculas, de A a G e as variações por letras minúsculas correspondentes. Estes fatores e suas variações são escolhidos pelo analista, e dependem do tipo de método.

Tabela 1. Modelo experimental para teste de robustez

Variáveis*	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
V1	A	A	A	A	a	a	a	a
V2	B	B	b	B	B	B	b	b
V3	C	c	C	C	C	c	C	c
V4	D	D	d	D	d	d	D	D
V5	E	e	E	E	e	E	e	E
V6	F	f	f	F	F	f	f	F
V7	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	V	x	y	w	z

\*As variações intencionais no método foram: V1= temperatura de titulação; V2 = volume da solução de ácido sulfúrico (5+125) v/v; V3 = concentração da solução de hidróxido de amônio; V4 = tempo de precipitação; V5 = tempo de adição da solução de oxalato de amônio 4,2% m/v; V6 = pH de precipitação; V7 = agitação durante a titulação.

Tabela 2. Variação nos fatores para determinação da robustez.

Variáveis*	Efeito	Nominal	Variação
V1	A/a	75 °C	90 °C
V2	B/b	130 mL	100 ml
V3	C/c	2 % v/v	4% v/v
V4	D/d	12 horas	2 horas
V5	E/e	Após 1 min. da ebulição	Início da ebulição
V6	F/f	5,5	4,0
V7	G/g	Leve agitação	Forte agitação

\*As variações intencionais no método foram: V1= temperatura de titulação; V2 = volume da solução de ácido sulfúrico (5+125) v/v; V3 = concentração da solução de hidróxido de amônio; V4 = tempo de precipitação; V5 = tempo de adição da solução de oxalato de amônio 4,2% m/v; V6 = pH de precipitação; V7 = agitação durante a titulação.

### Incerteza de medição

A incerteza da medição foi avaliada de acordo com Ellison et al. (2000), em quatro etapas. Primeira etapa foi a especificação do mensurando, segunda a identificação das fontes de incerteza, terceira a quantificação dos componentes de incerteza e a quarta etapa foi o cálculo da incerteza combinada.

### 2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA® versão 6.0 (2001) com a aplicação do teste ANOVA. Para realização da curva de regressão linear na faixa de trabalho, média, desvio padrão e variância foram utilizados o programa Excel 2000 for Windows.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Faixa de trabalho e linearidade

Os resultados da faixa de trabalho estão indicados na Tabela 3 e Figura 1.

Através do gráfico da faixa de trabalho (Figura 1) o método demonstrou uma boa linearidade  $R^2 = 0,9999$ , segundo a FDA o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação linear deve ser maior ou igual a 0,995. A equação da reta obtida foi  $y = 1,0106x - 0,0527$ .

No desenvolvimento e validação de métodos para determinar traços de ftalatos (ésteres de ácido ftálico) em vegetais, Sablayrolles et al. (2005) utilizaram o método da cromatografia gasosa com espectroscopia de massa para determinar 8 compostos de ftalatos, e construíram duas curvas de calibração uma com baixas concentrações (1 a 10 $\mu$ g/mL) e outra para concentrações altas (20 a 300 $\mu$ g/mL) para cada composto, obtendo coeficientes de correlação linear na faixa de 0,7247 a 0,9742 para baixas concentrações e 0,8840 a 0,9852 para concentrações altas. Gaberlotti, Marsiglia e Torres (2003), validaram o método enzimático gravimétrico para determinação de fibras dietéticas em alimentos, sendo o coeficiente de correlação linear igual a 0,9999 indicando uma boa linearidade do método, a pesar de o gráfico da escala linear ser construído com apenas três níveis de concentração. Na quantificação de antioxidantes sintéticos, com estrutura fenólica, em patês de fígado de diferentes origens do mercado Português, Pinho et al. (1999) utilizaram análise cromatográfica com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a curva de calibração foi construída com 5 níveis de concentração e a linearidade das curvas de regressão para os 7 antioxidantes pesquisados foram superiores a 0,99.

A linearidade do método na faixa de trabalho não depende apenas do equipamento utilizado, como podemos observar nos resultados apresentados acima, onde um método gravimétrico obteve uma linearidade melhor que um método utilizando cromatografia gasosa com espectroscopia de massa, deve ser levado em consideração toda a complexidade do método, desde os reagentes utilizados, extração do analito, condições do equipamento e do meio ambiente, além da habilidade do analista.

Tabela 3. Resultados corrigidos da faixa de trabalho, com o desvio padrão e coeficiente de variação (CV)

Aliquota (mL) solução padrão	Valor teórico* (mg cálcio)	Valor obtido (mg cálcio)	Repetitividade** (desvio padrão)	CV %
1,0	0,9928	1,0006	± 0,0275	2,75
3,0	2,9969	2,8914	± 0,0463	1,60
5,0	4,9949	4,8631	± 0,0275	0,56
10,0	9,9896	10,1602	± 0,0389	0,38
15,0	14,9905	15,1410	± 0,0420	0,28
20,0	19,9791	20,0877	± 0,0912	0,45

\* o valor teórico é o valor corrigido da quantidade de cálcio na alíquota.

\*\* para cada nível de concentração n = 7

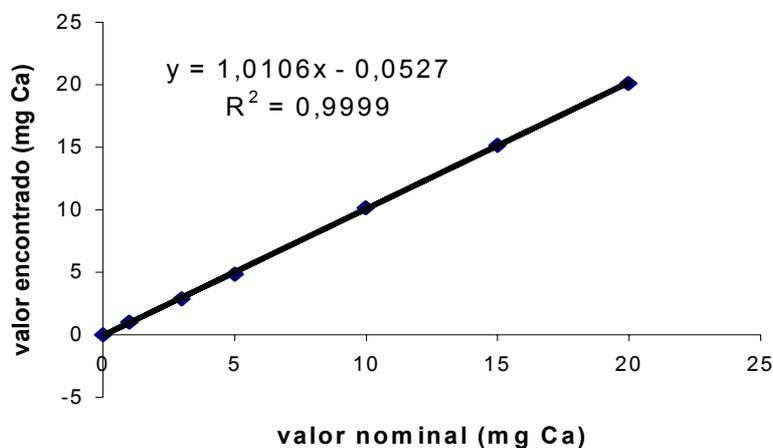


Figura 1. Linearidade e faixa de trabalho para o método de determinação de cálcio.

### Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

A sensibilidade do método calculada utilizando a curva de regressão linear foi de 1,0057 mg de cálcio.

A média (n = 10) dos valores do branco (reagentes utilizados na análise sem a adição do analito) foi de 0,40 mL de solução de permanganato de potássio, apresentando um desvio padrão de  $\pm 0,04$ .

O limite de detecção observado para o método foi de 0,52 mg de cálcio para a amostra (5 g) utilizada no método ou 11 mg de cálcio/100 g de amostra. O limite de quantificação observado foi de 0,80 mg de cálcio para a amostra (5 g) de ou 16 mg de cálcio/100 g de amostra.

No desenvolvimento e validação de um método para determinar hidroquinona em preparações de géis e cremes, Garcia et al. (2005) comparam dois métodos, em um utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e em outro utilizaram espectroscopia ultravioleta (UV), sendo que foram construídas duas curvas de calibração com cinco níveis de concentração (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e os limites de detecção e quantificação foram de 0,08 e 0,26  $\mu\text{g/mL}$  para o CLAE e de 0,14 e 0,46  $\mu\text{g/mL}$  para o método UV respectivamente. Na determinação de acrilamida em batatas e alimentos a base de cereais, Senyuva e Gokmen, (2005) desenvolveram e validaram um método utilizando cromatografia líquida acoplada ao espectro de massa, sendo que a resposta para acrilamida foi linear numa escala de concentração de 1,0 a 2000 ng/mL com coeficiente de correlação de 0,999, e os limites de detecção e quantificação foram de 6 e 18 ng/g respectivamente.

Podemos observar que os limites de detecção e quantificação dos analitos pesquisados dependem do equipamento utilizado, o qual vai determinar a sensibilidade do método. Na análise de cálcio pelo método titulométrico os limites estão no nível de miligramas, na quantificação de hidroquinona utilizando CLAE os limites da determinação estão em micrograma e no caso da acrilamida utilizando cromatografia líquida com espectroscopia de massa a detecção foi em nanogramas.

## **Precisão**

A precisão na faixa de trabalho é apresentada na forma de repetitividade (Tabela 3) sendo avaliado o desvio padrão dos resultados obtidos.

Os resultados dos coeficientes de variação (%CV) são aceitáveis (Tabela 3), pois não foi observado valor superior a 5 %, que é o limite máximo admitido por Brasil (2003). Segundo a FDA (2003), o critério de aceitação do coeficiente de variação é menor ou igual a 2 %, sendo que somente o primeiro nível de concentração (1,00 mL) da curva de calibração ficou acima do limite.

Na análise de trans-resveratrol em amendoins e pasta de amendoins consumidos na Coreia, Lee et al. (2004), utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação e obtiveram resultados elevados para o coeficiente de variação sendo de 10,0 % para a repetitividade em amostras de amendoins, e segundo os autores este resultado foi devido a baixas concentrações do analito, para a pasta de amendoins o CV foi de 2,56 %.

Na validação do método enzimático gravimétrico para determinação de fibras dietéticas em alimentos, os coeficientes de variação encontrados por Gaberlotti et al. (2003) foram de 0,44, 1,44 e 0,73 % para a análise de recuperação das fibras do padrão de referência secundário.

## **Exatidão**

Os resultados da recuperação do analito em amostras fortificadas com solução padrão de cálcio estão apresentados na Tabela 4 e apresentaram uma boa recuperação, pois de acordo com a FDA (2003) os limites para recuperação do analito são de 80 a 120 %.

A média dos resultados do índice z e erro relativo do método estão na Tabela 5. O erro relativo do método teve uma variação menor que 5 % para todos os níveis de concentrações. O índice Z apresentou resultados satisfatórios (menor que 2) para todas as concentrações da solução padrão de cálcio.

A forma mais utilizada, pelos pesquisadores, para avaliar a exatidão de método é através da porcentagem de recuperação do analito. Garda, Macedo e Furlong (2004) determinaram tricotecenos em cerveja através da análise de duas toxinas (DON e T-2) utilizando cromatografia gasosa, a recuperação da toxina DON foi de 81,5 a 84,6 % e a toxina T-2 a recuperação foi de 101,0 a 105,0 %.

De acordo com Gaberlotti et al. (2003), na validação do método enzimático gravimétrico para determinação de fibras dietéticas em alimentos, os percentuais de recuperação do padrão foram de 101, 108 e 110 % admitindo uma escala de tolerância de 70 a 120 %.

Tabela 4. Médias (n =7 ) dos resultados de recuperação do analito em amostras fortificadas

Amostra (g)	mg de cálcio teórico	mg de cálcio detectado	% Recuperação do analito
6,0376	0,0	6,5317	0,0
6,0506	2,9969	9,6351	101,01
6,0459	4,9948	11,5457	100,17
6,0400	9,9896	16,4915	99,80

Cálcio teórico = cálcio adicionado

Tabela 5. Exatidão do método avaliada pelo erro relativo (%) e índice Z (z score) a partir dos resultados obtidos na faixa de trabalho

Aliquota (mL) solução padrão	Índice  Z	Erro relativo %
1,0	0,06	0,78
3,0	0,81	-3,52
5,0	1,01	-2,64
10,0	1,31	1,71
15,0	1,16	1,00
20,0	0,83	0,54

## Especificidade

Os resultados da contaminação com solução de magnésio e solução de sulfato estão descritos na Tabela 6. As contaminações da solução padrão não interferiram na recuperação do analito ( $\text{Ca}^{++}$ ), isso indica que o oxalato tem preferência pelo cálcio no pH utilizado para precipitação.

Tabela 6. Médias (n = 5) de recuperação do cálcio com interferência de íons  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{SO}_4^{-2}$

Padrão de cálcio* (mL)	Padrão de magnésio** (mL)	Padrão de sulfato*** (mL)	$\text{Ca}^{++}$ detectado (mg)	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
5,0	2,0	0,0	5,0183	100,50	0,47
5,0	0,0	0,5	4,9676	99,45	0,54

\*5,0 mL de padrão de cálcio = 4,9948 mg de cálcio; \*\*Padrão de magnésio = 6 mg/mL ;  
\*\*\*Padrão de sulfato = 67 mg/mL.

Na validação de um método espectrofluorimétrico para determinação de drogas psicoativas, Mohamed et al. (2005) utilizaram Ce(IV) em ácido sulfúrico para oxidar os compostos clorpromazina, tioridazina, desipramina, imipramina e clomipramina e formar fluorescência, sendo que, para avaliar a seletividade do método foram usadas preparações farmacêuticas onde a concentração do princípio ativo é fixa e a concentração dos excipiente sacarose, glicose, lactose, goma acácia, ácido cítrico e propileno glicol variou, sendo o percentual de recuperação do princípios ativos entre 102,51 e 103,54 e o erro relativo não foi maior que 4 %.

## Robustez

Os resultados dos ensaios das combinações das variações estão descritos na Tabela 7, onde podem se observar os resultados das recuperações.

Tabela 7. Resultados das recuperações dos fatores nominais e das variações

Variáveis*	Níveis	Recuperação (%)
V1	75 °C (A)	100,67
	90 °C (a)	99,31
V2	130 mL (B)	100,67
	100 mL (b)	99,51
V3	2 % v/v (C)	100,67
	4 % v/v (c)	95,31
V4	12h (D)	100,67
	2 h (d)	98,74
V5	Após 1' de ebulição (E)	100,67
	No início da ebulição(e)	99,90
V6	5,5 (F)	100,67
	4,0 (f)	99,76
V7	Leve (G)	100,67
	Forte (g)	100,34

\*As variações intencionais no método foram: V1= temperatura de titulação; V2 = volume da solução de ácido sulfúrico (5+125) v/v; V3 = concentração da solução de hidróxido de amônio; V4 = tempo de precipitação; V5 = tempo de adição da solução de oxalato de amônio 4,2% m/v; V6 = pH de precipitação; V7 = agitação durante a titulação.

A Figura 2 apresenta graficamente as influências das variações no método, sendo que a variação na concentração da solução de hidróxido de amônio foi a que apresentou a menor porcentagem de recuperação do analito com 95,31 %. Talvez, porque a concentração utilizada foi o dobro da recomendada pelo método proposto. Esta solução foi utilizada para retirar o excesso de oxalato do papel filtro, pois apenas o oxalato que estiver ligado com o cálcio deve ficar no filtro. Como a concentração de hidróxido de amônio utilizada foi o dobro da indicada pelo método ela pode ter interferido na ligação do oxalato com o cálcio, diminuindo a sua porcentagem na recuperação.

O resultado da avaliação de cada uma das variáveis foi observado pelos efeitos  $A/a = 0,0188$ ;  $B/b = 0,0033$ ;  $C/c = 0,0633$ ;  $D/d = 0,0280$ ;  $E/e = 0,0086$ ;  $F/f = 0,0132$  e

G/g = 0,0045. Sendo o maior efeito o C/c = 0,0633, que teve a maior influência no resultado como podemos observar na figura 2.

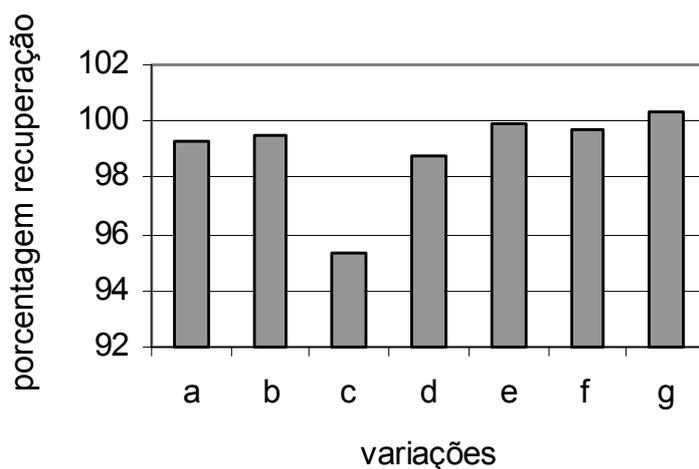


Figura 2. Porcentagem de recuperação do analito para cada variação, a = temperatura de titulação; b = volume solução de ácido sulfúrico; c = concentração da solução de hidróxido de amônio; d = tempo de precipitação; e = adição da solução de oxalato de amônio; f = pH de precipitação; g = agitação durante a titulação.

Na análise de piperazina (anti-helmíntico) em formulações farmacêuticas, Tan, Xu e Zheng (1995) desenvolveram e validaram um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e na análise da robustez os fatores alterados foram em relação à fase móvel da cromatografia, estes fatores variaram em dois níveis (um acima e outro abaixo), sendo a análise realizada para duas concentrações do analito 1,42 e 2.84 mg/g, as porcentagens de recuperação foram de 99,5 a 101,3 %.

Na quantificação do ácido benzóico e sórbico em refrigerantes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Garcia et al. (2003) validaram o método de acordo com a ISO e no teste de robustez os fatores que variaram foram da fase móvel da cromatografia, sendo realizada a análise dos fatores em níveis nominal e extremo, sendo o método mais robusto para o ácido sórbico.

## **Incerteza da Medição**

Na primeira etapa o mensurando especificado foi a concentração de cálcio (%).

A segunda etapa foi a identificação das principais fontes de incerteza utilizando um diagrama de causa efeito, sendo que para massa da amostra as componentes de incerteza foram a repetitividade na pesagem, a incerteza na calibração da balança, a estabilidade com o tempo, o efeito da temperatura, a linearidade e a resolução da balança. Para o volume gasto na titulação da amostra as componentes de incerteza foram: a repetitividade na titulação, a incerteza da calibração da bureta, o efeito do menisco, o efeito da temperatura e a resolução da bureta. No volume da diluição as componentes de incerteza foram: a repetitividade, a incerteza na calibração do balão volumétrico, o efeito do menisco e o efeito da temperatura. As componentes relacionadas com o volume da alíquota são: a repetitividade na transferência do volume da pipeta, a incerteza na calibração da pipeta, o efeito temperatura e o efeito do menisco. As componentes relacionadas com a concentração da solução de permanganato de potássio são: as incertezas da massa de permanganato de potássio, as incertezas da massa molar do permanganato de potássio e o volume da diluição.

Na terceira etapa foi realizada a quantificação dos componentes de incerteza. Os resultados das incertezas expandidas em um nível de confiança de 95 % são:  $\pm 0,0005$  g com  $k = 2,20$  para massa da amostra;  $\pm 0,1884$  mL com  $k = 2,52$  para o volume gasto na titulação da amostra;  $\pm 0,0474$  mL com  $k = 2,00$  para a diluição da solução estoque;  $\pm 0,0131$  mL com  $k = 2,00$  para a alíquota e  $\pm 0,0041$  mol.L<sup>-1</sup> com  $k = 2,37$  para a concentração da solução de permanganato de potássio.

O resultado final da incerteza de medição para o mensurando (% Ca<sup>++</sup>) foi de  $\pm 0,00904$  g com um nível de confiança de aproximadamente 95 % e  $k = 2,87$ .

O resultado corrigido da análise de cálcio em salsichas foi de  $0,108 \pm 0,009$  g de cálcio/100 g da amostra.

#### **4 CONCLUSÃO**

O método analítico proposto para quantificação de cálcio, utilizando papel filtro quantitativo para a recuperação do precipitado de oxalato de cálcio mostrou-se sensível, específico, preciso, exato, robusto e linear na faixa de trabalho sendo adequado para determinar a concentração de cálcio em produtos cárneos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001. 20 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. **Diário Oficial da União de 27/07/1999**, Brasília, DF.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União de 02/06/2003**, Brasília, DF.

D'ACRI, V. Trabalho e saúde na indústria têxtil de amianto. **São Paulo em Perspectiva**. v. 17 n. 2, 2003.

DUTRA-DE-OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403 p.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Eds.). **Guia eurachem/citac**: determinando a incerteza na medição analítica. 2 ed. [s.l.]: Sociedade brasileira de metrologia, 2002.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **ICH topic Q2B validation of analytical procedures: methodology**. Londres, 1996. Disponível em: <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em: 10 de agosto de 2005.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**. n. 391, p. 239-252, 1998.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Ora Laboratory Procedure. **Methods, method verification**. Rockville, 2003. Disponível em: <<http://web.ora.fda.gov/dfs/policies/manuals/default.html>>. Acesso em: 09 de novembro de 2005.

GARBELOTTI, M. L.; MARSIGLIA, D. A. P.; TORRES, E. A. F. S. Determination and validation of dietary fiber in food by the enzymatic method. **Food Chemistry**. n. 83, p. 469-473, 2003.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FURLONG, E. B. Determinação de tricotecnos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 24, n. 4, p. 657-663, 2004.

GARCÍA, P. L.; SANTORO, M. I. R. M.; HACKMAN, E. R. M. K.; SINGH, A. K. Development and validation of a HPLC and a UV derivative spectrophotometric methods for determination of hydroquinone in gel cream preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. V. 39, p. 764-768, 2005.

GARCIA, I.; ORTIZ, M. C.; SARABIA, L.; VILCHES, C.; GREDILLA, E. Advances in methodology for the validation of methods according to the international organization for standardization application to the determination of benzoic and sorbic acids in soft drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography A**. v. 992, p. 11-27, 2003.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2003.

LEE, S. S.; LEE, S. M.; KIM, M.; CHUM, J.; CHEONG, Y. K.; LEE, J. Analysis of trans-resveratrol in peanuts and peanut butters consumed in Korea. **Food Research International**. v. 37, p. 247-251, 2004.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Editora Átomo, 1996.

MOHAMED, F. A.; MOHAMED, H. A.; HUSSEIN, S. A.; AHMED, S. A. A validated spectrofluorimetric method for determination of some psychoactive drugs. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 39, p. 139-146, 2005.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M. **Introdução à ciência de alimentos**. Florianópolis: editora UFSC, 2002.

NEVADO, J. J. B.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; ROBLEDO, V. R. Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**. v. 1072, p. 249-257, 2005.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, M. A. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pâtés. **Food Chemistry**. v. 68, p. 353-357, 2000.

PLATZER, D. J.; WHITE, B. A. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. **Journal of Pharmaceutic and Biomedical Analysis**. v. 41, n. 1, p. 84-88, 2006.

RIBANI, M.; **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SABLAYROLLES, C.; VIGNOLES, M. M.; BENANOU, D.; PATRIA, L.; TREILHOU, M. Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v. 1072, p. 233-242, 2005.

SENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V. Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method. **Food Chemistry**. v. 97, p. 539-545, 2006.

SCHRODER, B. G.; GRIFFIN, I. J.; SPECKER, B. L.; ABRAMS, S. A. Absorption of calcium from the carbonated dairy soft drink is greater than that from fat-free milk and calcium-fortified orange juice in women. **Nutrition Research**. v. 25, p. 737-742, 2005.

SOUSA, E. A.; TEIXEIRA, L. C. V.; MELLO, M. R. P. A.; TORRES, E. A. F. S.; MOITA NETO, J. M. Aplicação de redes neurais para avaliação do teor de carne mecanicamente separada em salsicha de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 3, p. 307-311, 2003.

TAN, H. S. I.; XU, J.; ZHENG, Y. Cation-exchange high-performance liquid chromatographic assay of piperazine in some pharmaceutical formulations. **Journal of chromatography A**. n. 693, p. 307-314, 1995.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V.; Trends in quality in the analytical laboratory, II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 8, p. 535-550, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem**. v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

## **CAPÍTULO 3**

### **AVALIAÇÃO DA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA AO RESULTADO DA ANÁLISE DE NITRITOS EM PRODUTOS CÁRNEOS**

## **AVALIAÇÃO DA ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO ASSOCIADA AO RESULTADO DA ANÁLISE DE NITRITOS EM PRODUTOS CÁRNEOS**

### **RESUMO**

Nitritos de sódio e de potássio são amplamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos, são fixadores de cor, agentes de cura, conservantes e flavorizantes, mas podem formar compostos nitrosos de ação carcinogênica. Sua utilização é regulamentada pela legislação brasileira, sendo que o limite máximo permitido, em produtos cárneos, é de 15,0 mg/100 g. O objetivo do presente trabalho foi estimar a incerteza de medição do método analítico para a determinação de nitrito de sódio, em produtos cárneos (salsicha, mortadela, presunto cozido, apresuntado e lingüiça tipo calabresa). As principais fontes de incerteza do método foram a massa da amostra, o volume da diluição, a absorbância e o volume da alíquota. As incertezas expandidas e as fontes de incerteza de maior contribuição foram:  $\pm 0,0005$  g ( $k = 2,12$  com nível de confiança de 95 %) e repetitividade na pesagem (32,1 % de influência);  $\pm 0,1032$  mL ( $k = 2$  com nível de confiança de 95 %) e efeito da temperatura (47 % de influência);  $\pm 0,0147$  ( $k = 2$  com nível de confiança de 95 %) e calibração do equipamento (70 % de influência);  $\pm 0,008$  mL ( $k = 2$  com nível de confiança de 95 %) e calibração da pipeta (46 % de influência), para as fontes de incerteza massa da amostra, volume da diluição, absorbância e volume da alíquota respectivamente. Os resultados mostraram uma incerteza expandida de  $\pm 0,21$  mg/100 g com  $k = 2$  e um nível de confiança de 95 %. Em 10 % das amostras analisadas os teores de nitrito de sódio foram superiores aos limites estabelecidos pela legislação. A incerteza de medição associada ao resultado é um dos mais importantes elementos do sistema de garantia da qualidade implementada em um laboratório, especialmente quando o valor médio obtido é muito próximo do limite estabelecido pela legislação.

Palavras-chaves: nitrito de sódio, legislação, incerteza de medição.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade na última década, uma vez que o consumo de produtos cárneos como salsichas, lingüiças, mortadelas, hambúrgueres e outros, tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004).

Os sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio, são fixadores de cor e agentes de cura, além de conservarem a carne contra a deterioração bacteriana, inibem o crescimento de *Clostridium botulinum* e produção da toxina em carnes curadas (LEE, CHO e PARK, 2006).

O nitrito possui efeitos benéficos importantes sobre o “flavor” das carnes curadas por impedir a oxidação devido a atividade antioxidativa da óxido nítrico mioglobina e da S-nitrosocisteína, composto formado durante o processo da cura (HULTIN, 1993). A fixação da cor nas carnes ocorre quando o óxido nítrico reage com o pigmento ferroso ou férrico da mioglobina, formando a nitrosomioglobina, de cor vermelha brilhante, que quando submetida ao calor sua coloração se estabiliza pela desnaturação da porção protéica da mioglobina, resultando no pigmento nitrosomiohemocromógeno, de cor rósea brilhante, característico da carne curada cozida, mais estável que o pigmento nitrosomioglobina (PARDI et al. 1996).

O nitrato é inicialmente reduzido a nitrito por enzimas bacterianas (nitrato redutases), dentre as bactérias redutoras encontram-se: *Achromobacter dentriticum*, *Micrococcus epidermidis* e *M. auranticus*. Na presença de condições redutoras apropriadas o nitrato é posteriormente desdobrado em ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e em óxido nítrico (NO) (PARDI et al. 1996) e quando entra na corrente sanguínea, oxida o ferro ( $\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ ) da hemoglobina, produzindo a metahemoglobina. Essa forma de hemoglobina é inativa e incapaz de transportar o oxigênio para a respiração normal das células nos tecidos, causando a chamada metahemoglobinemia (STERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004). Esse risco é maior em crianças, devido a baixa acidez do estômago que também promove a redução do nitrato a nitrito, favorecendo igualmente a

metahemoglobinemia (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004; CHERIAN e NARAYANA, 2006).

Seus efeitos adversos são representados principalmente pela metamioglobina tóxica e pela formação de nitrosaminas. Seu uso é discutível, dada a possibilidade de originar compostos nitrosos de ação carcinogênica (OLIVEIRA, ARAÚJO e BORGIO, 2005), mutagênicas e teratogênicas, segundo Stertz, Penteado e Freitas (2004). As N-nitrosaminas podem ser formadas pela reação com as aminas e amidas secundárias em condições semelhantes às encontradas em estômagos de mamíferos (STERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004; CHERIAN e NARAYANA, 2006). Outras fontes potenciais de contaminação de nitritos são as águas, os vegetais e alimentos processados. Devido a toxicidade do nitrito sua concentração em águas é bem regulamentada nos Estados Unidos e a concentração máxima admitida é de 0,1 ppm (BUTT, RIAZ e IQBAL, 2001). No Brasil, as águas de abastecimento, tem um limite máximo permitido de 1 e 10 ppm para nitrito e nitrato respectivamente (STERTZ, PENTEADO e FREITAS, 2004).

A adição de nitrito e nitrato em alimentos é oficialmente regulamentada, na maioria dos países. A Food and Drug Administration (FDA, 2005) estabelece, atualmente, um limite máximo de 200 ppm para nitrito de sódio e 500 ppm para o nitrato de sódio quando utilizados com a finalidade de fixadores de cor e conservantes em carnes de pescados, aves e produtos cárneos em geral. Contudo, as orientações quanto ao seu emprego têm sofrido alterações nos últimos anos, principalmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, o limite máximo para nitrito e nitrato de sódio é de 150 e 300 ppm respectivamente (BRASIL, 1998), valores limites considerados elevados por alguns autores, uma vez que em outros países, a legislação estabelece valores inferiores (MELO FILHO, BISCONTINI e ANDRADE, 2004).

O nitrito residual em produtos cárneos é reduzido sob aquecimento e continua a diminuir sua concentração durante o armazenamento principalmente em produtos de carne curados. Segundo Pardi et al. (1995), após 24 horas, apenas 50 % do nitrito adicionado é detectado e aproximadamente 10 % permanece depois de sete dias.

Várias metodologias para quantificação de nitritos em alimentos podem ser utilizadas, como eletroforese de capilar, método enzimático, cromatografia iônica e

método colorimétrico (CHERIAN e NARAYANA, 2006). A determinação de nitritos através do método colorimétrico apresenta vantagens como seletividade, linearidade, rapidez e baixo custo.

Considerando as propriedades químicas dos nitritos, é de fundamental importância o conhecimento da exatidão e precisão do método utilizado, bem como a incerteza da medição associada ao resultado.

A definição para o termo incerteza de medição é: “um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando” (INMETRO, 2003).

Na prática, a incerteza de um resultado pode provir de muitas fontes possíveis, incluindo exemplos tais como definição incompleta, amostragem, efeitos da matriz e interferências, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição, e a variação aleatória (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIANS, 2000).

A avaliação da incerteza pode ser de dois tipos. Tipo A quando o método de avaliação da incerteza é através da análise estatística de uma série de observações, quando de um conjunto de medições repetidas podem ser calculados a média e o desvio padrão estimado do conjunto (BUCHMANN e SARKIS, 2002). Tipo B são incertezas estimadas usando qualquer outra informação. Pode ser informação de medições em experiências passadas, de certificados de calibração, especificações do fabricante, informações publicadas, e do bom senso (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIANS, 2000).

A descrição do Guide Uncertainty Measurement (GUM) e, subseqüentemente pelo guia EURACHEM envolvem a identificação de todas as possíveis fontes de incerteza para o método; a estimação de sua magnitude para os dados experimentais e a combinação destas incertezas individuais para apresentar uma incerteza expandida (BARWICK et al. 1999).

Para identificar e avaliar as possíveis fontes de incerteza na medição das grandezas avaliadas, os procedimentos adotados em cada etapa devem ser detalhados e estruturados de forma a garantir a máxima abrangência, evitando a duplicidade de

fontes de incerteza. Normalmente este objetivo pode ser alcançado e melhor visualizado através da utilização de diagrama de causa e efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa. (BUCHMANN e SARKIS, 2002).

Os objetivos deste trabalho foram estimar a incerteza de medição da análise de nitrito de sódio, em produtos cárneos, associada ao resultado da medição e comparar os resultados com os preconizados pela legislação brasileira.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Os reagentes utilizados para a realização da análise foram de qualidade p.a., o padrão nitrito de sódio (SIGMA-ALDRICH) é material de referência certificado (MRC).

Os equipamentos volumétricos (vidrarias), balança (SHIMADZU AY-220, Kyoto, Japão), espectrofotômetro (HITACHI U-2010, Kyoto, Japão) e pipetador de volume variável 1-5 mL (HTL Labmat, Brasil) foram calibrados pela Rede Brasileira de Calibração (RBC).

Os produtos analisados foram embutidos cárneos: salsicha, presunto cozido, apresuntado, mortadela e lingüiça tipo calabresa, sendo 10 amostras de cada produto adquiridos no mercado local, de forma aleatória e em diferentes períodos.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Análise de nitritos**

A análise de nitritos foi realizada de acordo com Brasil (1999). A análise baseia-se na reação de diazotização de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-p-azobenzeno-p-sulfônico de coloração rósea. O produto resultante é determinado

espectrofotometricamente a 540 nm. O esquema da análise pode ser visualizado através do fluxograma na Figura 1.

A solução padrão de nitrito de sódio, utilizada para determinar a faixa de trabalho, foi feita de acordo com Brasil (1999), e cada mililitro desta solução contém aproximadamente 10 µg do analito. Para o cálculo da faixa de trabalho foi construída uma curva de calibração com 7 níveis de concentração (2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg de nitrito de sódio), a análise foi realizada em triplicata para cada nível.

A linearidade do método foi determinada a partir da faixa de trabalho e calculada através da equação de regressão linear, utilizando o do programa Microsoft Excel 2000.

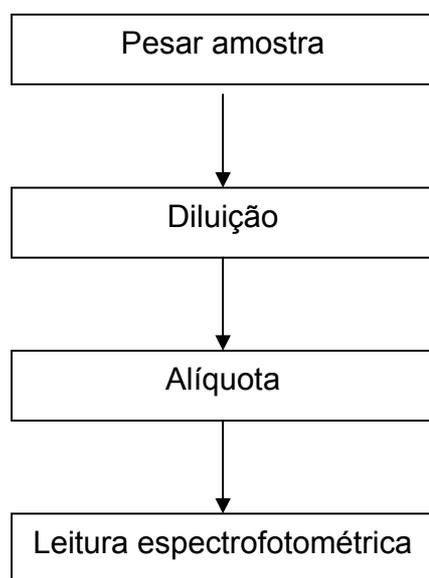


Figura 1. Fluxograma das etapas para realizar análise de nitritos.

### 2.2.2 Estimativa da Incerteza da Medição

As incertezas padrão e combinada (nível de confiança 68 %), e expandida (nível de confiança de 95,45 %) foram calculadas de acordo com as equações 1, 2, 3 (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIANS, 2000).

$$u = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

Sendo:

$u$  = incerteza padrão;

$n$  = número de medições realizadas;

$s$  = desvio padrão.

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + \dots u_n^2} \quad (2)$$

Sendo:

$u_c$  = incerteza padrão combinada;

$u_1$  = incerteza padrão.

$$U_p = k.u_c \quad (3)$$

Sendo:

$U_p$  = incerteza expandida;

$k$  = fator de abrangência.

Os graus de liberdade efetivos ( $v_{eff}$ ) foram calculados a partir da equação 4, de Welch Satterthwaite, sendo utilizado para determinar um fator de abrangência apropriado

$$v_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (4)$$

Sendo:

$v_{eff}$  = graus de liberdade efetivos;

$v_i$  = graus de liberdade da incerteza padrão.

Para o cálculo da incerteza padrão do tipo A, os graus de liberdade foram  $\nu_i = n - 1$ , sendo  $n =$  número de repetições. Para a incerteza padrão do tipo B, os graus de liberdade foram dados como infinitos (FIDÉLIS, 2004).

Para a estimativa da incerteza da medição foi utilizado o método descrito por Ellison et al, 2000. As tarefas que precisam ser executadas para se obter uma estimativa da incerteza associada ao resultado de uma medição são:

Etapa 1. Especificação do mensurando. Nesta etapa foi descrito o procedimento da medição, que consistiu em enumerar as etapas de medição e os parâmetros dos quais o mensurando depende, resultando em uma expressão matemática.

Etapa 2. Identificação das fontes da incerteza. Nesta etapa foram identificadas todas as possíveis fontes de incerteza com a utilização de um diagrama de causa e efeito.

Etapa 3. Quantificação dos componentes de incerteza. Nesta etapa foi estimada a dimensão dos componentes de incerteza associado a cada fonte potencial identificada na etapa 2 e convertida em uma incerteza padrão, sendo que as principais componentes de incerteza são:

a) Repetitividade

Foi calculada a média (equação 6) considerando uma variável aleatória da qual  $n$  observações independentes  $x_i$  foram obtidas sob as mesmas condições de medição, depois foi realizado o cálculo do desvio padrão estimado da média (equação 7), com o resultado do desvio padrão foi calculada a incerteza padrão, como na equação 1.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (6)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (7)$$

b) Incerteza na calibração do equipamento

Esta fonte de incerteza é encontrada no certificado de calibração do equipamento, expressa como uma incerteza expandida, com nível de confiança de aproximadamente 95%, que foi transformada em uma incerteza padrão (equação 8).

$$u = \frac{U}{k} \quad (8)$$

Sendo:

U = incerteza padrão;

U = incerteza expandida;

k = fator de abrangência.

c) Estabilidade com tempo

A estabilidade do equipamento com o tempo gera uma incerteza na qual os valores estarão 100 % dentro do intervalo determinado, é uma distribuição do tipo retangular, e foi transformada em uma incerteza padrão (68 % de confiabilidade) como na equação 9.

$$u = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (9)$$

Sendo:

u = incerteza padrão;

a = incerteza devido a estabilidade.

d) Efeito da temperatura

A estabilidade da indicação do equipamento com a temperatura é informada no manual do fabricante. No certificado de calibração foi indicada a temperatura em que a balança foi calibrada e no dia da análise foi medida a temperatura no ambiente.

e) Linearidade

A incerteza devido ao desvio da linearidade do equipamento é informada no manual de fabricação.

f) Resolução

Segundo Fidélis (2004) a resolução do instrumento de medição é um componente de incerteza, sendo determinada como a metade da resolução (equação 10), como é uma distribuição do tipo retangular, foi transformada em incerteza padrão como na equação 9.

$$U_R = \frac{R}{2} \quad (10)$$

Sendo:

$U_R$  = incerteza da resolução;

R = resolução da balança.

g) Efeito do menisco

A incerteza devido ao efeito do menisco foi determinada segundo a ISO 4787 Laboratory glassware – Volumetric glassware – Methods for use and testing of capacity, Genève, 1984. São incertezas experimentais relacionadas ao analista na medição do volume.

Etapa 4. Cálculo da incerteza combinada. As informações obtidas na etapa 3 consistiram de diferentes contribuições quantificadas para a incerteza total, sejam associadas a fontes individuais ou aos efeitos combinados de diversas fontes. As contribuições foram expressas como desvios padrão, e combinadas conforme as regras apropriadas para se ter uma incerteza combinada. O fator de abrangência apropriado foi aplicado para se chegar a uma incerteza expandida (ELLISON, ROSSLEIN e WILLIANS, 2000).

### **2.3 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se software STATISTICS FOR WINDOWS versão 6.0 com a aplicação do teste ANOVA, para a realização da equação de regressão linear, média e desvio padrão foi utilizado o programa Microsoft EXCEL 2000.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados da média, menor e maior valor encontrado nas análises de nitrito de sódio em produtos cárneos estão descritos na Tabela 1. Em 10 % das amostras os valores de teor máximo de nitrito de sódio foi superior ao permitido pela legislação brasileira (15,0 mg/100 g) (BRASIL, 1998). Sendo uma amostra de salsicha (16,35 mg/100 g) e uma de lingüiça tipo calabresa (17,70 mg/100 g), três amostras de mortadela (16,28, 15,00 e 16,65 mg/100g). As amostras de presunto cozido e o apresuntado apresentaram resultados de acordo com a legislação brasileira.

Os resultados mostraram uma variação nos teores de nitritos entre as amostras de cada produto analisado, estas diferenças sugerem variações quanto à composição e à qualidade da matéria prima e ingredientes adicionados, o tempo de fabricação do produto e a realização da análise também podem interferir nos teores e nitritos encontrados, pois os nitratos são reduzidos a nitritos e a óxido nítrico sendo que esta reação depende da temperatura e do tempo de armazenagem.

Sterz, Penteado e Freitas (2004) pesquisaram os teores de nitritos e nitratos em hortaliças produzidas em diferentes sistemas de cultivo na região de Curitiba-PR e encontraram valores médios de nitritos em cultivares de alface e agrião no sistema hidropônico de 670,94 e 941,20 mg/Kg, em base úmida, respectivamente. No Brasil, atualmente, não existe uma legislação para o controle dos teores de nitritos e nitratos em produtos vegetais, principalmente no sistema de cultivo hidropônico. Assim os teores de nitritos encontradas nos vegetais, principalmente quando são produzidos no sistema de hidroponia, podem ser superiores a aqueles observados em produtos cárneos.

Melo Filho, Biscontini e Andrade (2004), avaliaram níveis de nitritos e nitratos em salsichas comercializadas na região sul do país, na região nordeste e nas indústrias locais (região metropolitana de Recife) obtidas nas feiras livres, sem marcas e inspeção federal. Os valores médios de nitrito encontrado foram de 4,79 mg/100 g na região sul, 8,14 mg/100 g na região nordeste e 14,2 mg/100 g nas indústrias locais. Nas salsichas das feiras livres constatou-se que 67 % das amostras analisadas apresentaram valores acima do limite máximo estabelecido pela legislação.

Zatar, Abu-Eid e Eid (1999), determinaram nitrito e nitrato por um método espectrofotométrico, utilizando um complexo azul de fosfomolibdenio, e compararam os resultados com o método oficial da AOAC (espectrofotométrico), as amostras analisadas foram carne de boi enlatada, água potável, tomate e pepino e os resultados encontrados de nitritos para a carne foram de 2,42 e 2,44 mg/100 g para o método proposto e o oficial respectivamente, sendo que para as demais amostras os teores de nitritos não foram detectados por nenhum dos métodos.

Tabela 1. Menor valor encontrado, média e maior valor encontrado de NaNO<sub>2</sub> mg /100 g em produtos cárneos.

Produto*	Menor valor encontrado (mg/100g)	Média (mg/100g)	Maior valor encontrado (mg/100g)	Desvio padrão
Salsicha	5,86	10,48	16,35	± 2,70
Mortadela	11,09	13,77	16,65	± 1,82
Presunto	4,30	8,07	11,34	± 2,52
Apresentado	4,47	8,90	11,39	± 2,15
Lingüiça calabresa	2,50	8,49	17,70	± 4,77

\* 10 amostras, em triplicata.

A curva do padrão de nitrito está representada na figura 2, onde se observa que o método teve uma boa linearidade, com coeficiente de correlação linear de 0,9997, pois segundo a Food and Drug Administration (FDA, 2003) o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação linear é de 0,995. A equação da reta foi igual a  $y = 65,398x - 0,1493$ .

Na determinação de nitrito e nitrato em vegetais utilizando cromatografia líquida, Butt, Riaz e Iqbal (2001), encontraram coeficientes de correlação linear de 0,9997 e 0,9985 respectivamente em uma faixa linear de 0,03 a 1,0  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o nitrito e 0,01 a 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para o nitrato. Öztekin, Nutuku e Erim (2002) na quantificação de nitrato e nitrito em produtos cárneos e vegetais, utilizaram o método de eletroforese de capilaridade, sendo que na calibração da curva de regressão encontraram um coeficiente de correlação médio de 0,998 na faixa de trabalho e o resultado dos teores de nitritos em salame, salsicha de peru, salsicha tradicional e presunto foram de 2,43, 3,19, 3,12 e <0,4 mg/100 g e nas amostras de espinafre, alho-poró e salsa a concentração de nitrito não foi detectada, aparentemente estava abaixo do limite de detecção.

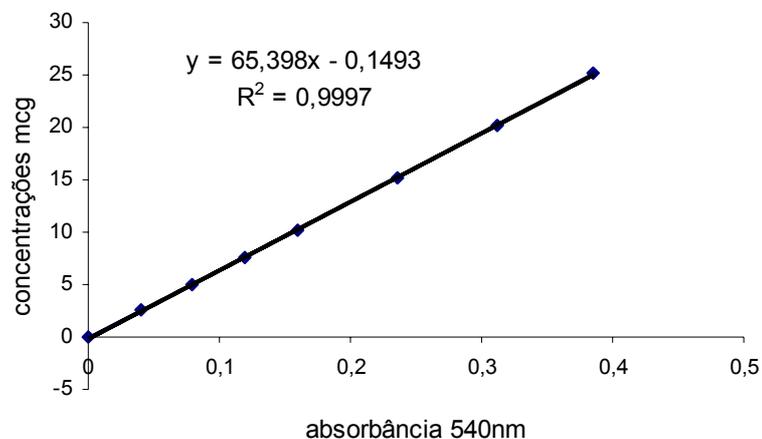


Figura 2. Faixa de trabalho e linearidade da determinação de nitrito de sódio.

Os resultados da estimativa da incerteza da medição estão apresentados nas etapas 1, 2, 3 e 4.

A etapa 1 mensurando especificado foi nitrito de sódio mg/100g, que depende da absorvância da amostra, do volume da diluição, do volume da alíquota e da massa da amostra, como na equação 11.

$$\text{Nitrito de sódio } mg/100g = \frac{Y.V_d}{m.V_a} \cdot 100 \quad (11)$$

Sendo:

Y = concentração de nitrito de sódio na alíquota;

V<sub>d</sub> = volume da diluição;

m = massa da amostra;

V<sub>a</sub> = volume da alíquota.

Na etapa 2, as principais fontes de incerteza observadas para a análise de nitritos estão descritas na Figura 3. As fontes de incerteza para a massa da amostra foram: a repetitividade na pesagem da amostra e da tara do recipiente, a calibração da

balança, a linearidade, resolução, estabilidade com o tempo e efeito da temperatura no momento da pesagem. As fontes de incerteza para o volume da diluição da amostra foram: a repetitividade na transferência do volume, a calibração do balão volumétrico, o efeito do menisco e da temperatura. As fontes de incerteza para o volume da alíquota foram: a repetitividade na transferência do volume da pipeta automática, a calibração e a resolução da pipeta. Para a absorbância as possíveis fontes de incerteza foram: a calibração do espectrofotômetro, a repetitividade na leitura da amostra, a linearidade e a resolução do equipamento.

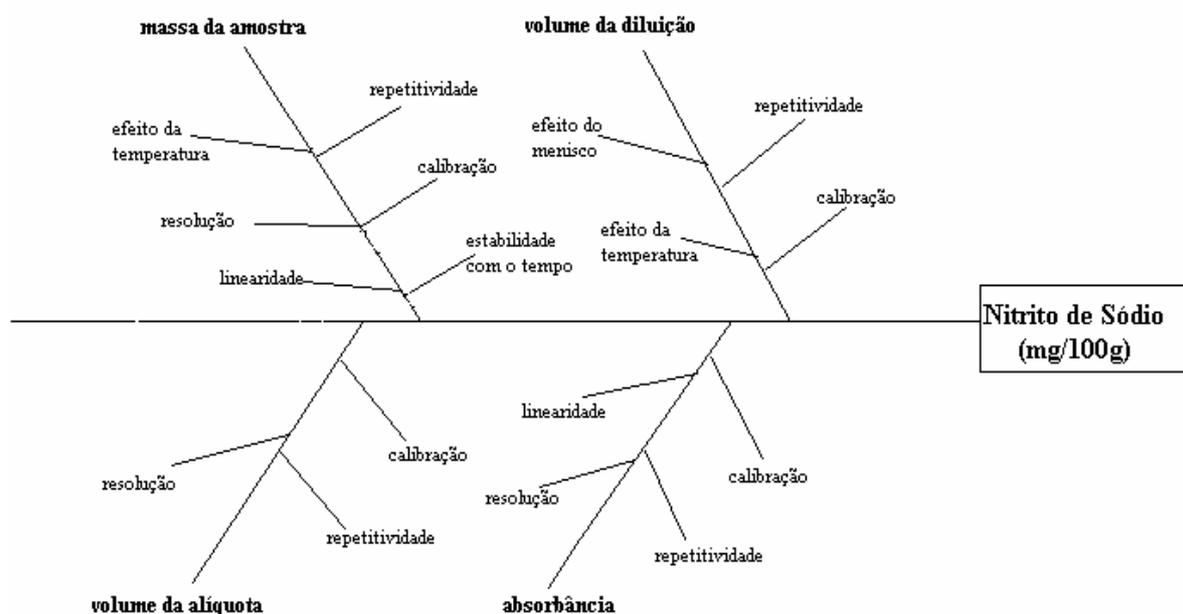


Figura 3. Diagrama de causa efeito para identificar as principais fontes de incerteza.

Na etapa 3, referente a quantificando das fontes de incerteza, foi estimada incerteza expandida para a massa da amostra de  $\pm 0,0005$  g sendo  $k = 2,12$  com nível de confiança de 95 %. A fonte de incerteza com o maior percentual de contribuição foi a repetitividade na pesagem com 32,1 % de influência. A incerteza expandida para o

volume da alíquota foi de  $\pm 0,008$  mL sendo  $k = 2$  com nível de confiança de 95 %. O maior percentual de influência, na incerteza padrão do volume da alíquota, foi a calibração da pipeta com 46 %. A incerteza expandida para a absorção do espectrofotômetro foi de  $\pm 0,0147$  sendo  $k = 2$  com nível de confiança de 95 %. A maior contribuição na incerteza da leitura espectrofotométrica foi a incerteza da calibração do equipamento com 70 % de influência. A incerteza expandida para o volume da diluição foi de  $\pm 0,1032$  mL sendo  $k = 2$  com nível de confiança de aproximadamente 95 %, sendo o efeito da temperatura a maior fonte de contribuição para a incerteza do volume da diluição com 47 %.

O resultado da incerteza combinada, etapa 4, foi uma incerteza expandida de  $\pm 0,21$  mg/100 g com  $k = 2$  e um nível de confiança de 95 %. O maior percentual de contribuição para incerteza final na determinação quantitativa de nitrito de sódio foi a incerteza do volume da alíquota com 66 % de influência.

#### **4 CONCLUSÃO**

Em 10 % das amostras analisadas os valores de teor máximo de nitrito de sódio foram superiores ao permitido pela legislação brasileira (15,0 mg/100 g) (BRASIL, 1998). Todas as amostras de presunto cozido e apesuntado apresentaram resultados de acordo com a legislação. As diferenças nas concentrações de nitritos entre as amostras de cada produto analisado sugerem variações quanto à composição e à qualidade da matéria prima e ingredientes adicionados, como também diferentes períodos entre a fabricação do produto e a realização da análise. Os resultados mostraram uma incerteza expandida de  $\pm 0,21$  mg/100 g com  $k = 2$  e um nível de confiança de 95 % e fonte de incerteza com maior influência foi o volume da alíquota com 66 % de influência. A incerteza da medição associada ao resultado é um dos mais importantes elementos do sistema de garantia da qualidade implementada em um laboratório.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2001. 20 p.

BARWICK, V. J.; ELLISON, S. L. R.; FAIRMAN, B. Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology. **Analytica Chimica Acta**. v. 394, p. 281-291, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carnes e produtos cárneos. **Diário Oficial da União de 14/12/1998**, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura. **Diário Oficial da União de 27/07/1999**, Brasília, DF.

BUCHMANN, J. H.; SARKIS, J. E. S. Conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**. v. 25, n. 1, p. 111-116, 2002.

BUTT, S. B.; RIAZ, M.; IQBAL, M. Z. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair chromatography. **Talanta**. v. 55, p. 789-797, 2001.

CHERIAN, T.; NARAYANA, B. A new system for the spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite in environmental samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 17, n. 3, p. 577-581, 2006.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Eds.). **EURACHEM/CITAC Guide**. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2ª ed. [s.l.] 2000.

FIDÉLIS, G. **Incerteza de medição**. Florianópolis UFSC, CCA, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption**. Rockville, 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/search/databases.html>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Ora Laboratory Procedure. **Methods, method verification**. Rockville, 2003. Disponível em: <<http://web.ora.fda.gov/dfs/policies/manuals/default.html>>. Acesso em: 09 de novembro de 2005.

HULTIN, H. O. Características del tejido muscular. In: FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993.

INMETRO. **Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de metrologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro, 2003. 75p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 4787**: laboratory glassware - volumetric glassware - methods for use and testing of capacity. Geneva, 1984. 13 p.

LEE, C. H.; CHO, Y. H.; PARK, K. H. Assessment of estimated daily intake of nitrite by average consumption of processed foods in Korea. **Food Control**. v. 17, p. 950-956, 2006.

MELO FILHO, A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 24, p. 390-394, 2004.

OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. B. Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M. S.; ERIM, F. B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. v. 76, p. 103-106, 2002.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. v. 2, 1ª ed. Goiânia: UFG, 1996. p. 588-1110.

PEREZ-RODRIGUEZ, M. L. P.; BOSCH-BOSCH, N.; GARCÍA-MATA, M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. **Meat Science**. v. 44, p. 65-73, 1996.

STERTZ, S. C.; PENTEADO, P. T. P. S.; FREITAS, R. J. S. Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na região metropolitana de Curitiba. **Revista do Instituto Adolf Lutz**. v. 63, p. 200-207, 2004.

ZATAR, N. A.; ABU-EID, M. A.; EID, A. F. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. **Talanta**. v. 50, p. 819-826, 1999.

## CONCLUSÃO

O método analítico proposto para quantificação de cálcio, utilizando papel filtro quantitativo para a recuperação do precipitado de oxalato de cálcio mostrou-se sensível, específico, preciso, exato, robusto e linear na faixa de trabalho sendo adequado para determinar a concentração de cálcio em produtos cárneos. Na determinação de nitrito de sódio, 10 % das amostras analisadas apresentaram valores superiores ao permitido pela legislação brasileira (15,0 mg/100 g). As diferenças nas concentrações de nitritos entre as amostras de cada produto analisado sugerem variações quanto à composição e à qualidade da matéria prima e ingredientes adicionados, como também diferente período entre a fabricação do produto e a realização da análise. Os resultados mostraram uma incerteza expandida de  $\pm 0,21$  mg/100 g com  $k = 2$  e um nível de confiança de 95% e fonte de incerteza com maior influência foi o volume da alíquota com 66 % de influência. A incerteza da medição associada ao resultado é um dos mais importantes elementos do sistema de garantia da qualidade implementada em um laboratório.