

Patrícia Barros Reis

**Validação de método espectrofotométrico para determinação de
nitrato em patê de presunto**

Dissertação apresentada à UFMG como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Tecnologia e inspeção
de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Silvana de Vasconcelos
Cançado

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2006

Reis, Patrícia Barros, 1979-

Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitrato em patê de presunto / Patrícia Barros Reis. - 2006.
45 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Alimentos de origem animal – Análise – Teses. 2. Carne enlatada – Análise – Teses.
3. Espectrofotometria – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 664.92

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade.

Agradeço a minha mãe pela ajuda e apoio, permitindo a realização do meu mestrado. Agradeço ao Lucas por entender os momentos de ausência e pelo apoio incondicional, principalmente nos momentos de ansiedade e nervosismo.

Agradeço à Silvana pela orientação, amizade e por acreditar em mim mesmo quando eu mesma tinha dúvidas.

Agradeço à Paula, Denise, Ana Cláudia, Débora e Gisele pelo coleguismo e por fazermos do mestrado dias super agradáveis.

Agradeço ao Dr. Ricardo Aurélio Nascimento pela realização deste trabalho no LANAGRO/PL.

Agradeço ao Rodrigo e ao Leonardo pela aprendizagem, experiência e convivência. Ao Caio, Mônica e Dani pela ajuda nas muitas análises e repetições. Agradeço aos funcionários do setor de lavagem de material pela ajuda com o material de trabalho, aos funcionários do setor de Físico-Química de Produtos de Origem Animal e Cromatografia pelos dias passados juntos. Sinto falta de vocês até hoje!

Agradeço ao FRIBOI LTDA pela doação de amostras de patê de presunto, ao Frigorífico Alvorada pela doação das matrizes brancas e aos respectivos funcionários do Serviço de Inspeção Federal.

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
2. Revisão de literatura	12
2.1. O uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos.....	12
2.1.1. Metabolismo e efeitos do nitrato e nitrito no organismo.....	15
2.2. Validação de método de ensaio.....	15
2.2.1. Características de desempenho.....	17
2.2.1.1. Linearidade e faixa linear de trabalho.....	17
2.2.1.2. Seletividade.....	18
2.2.1.3. Limite de detecção do equipamento (LDE), limite de detecção do método (LDM) e limite de quantificação (LQ):.....	18
2.2.1.4. Precisão.....	19
2.2.1.5. Exatidão.....	19
2.2.1.6. Robustez.....	19
2.2.1.7. Estabilidade da amostra.....	19
2.3. Análise por espectrofotometria UV/visível.....	20
3. Material e métodos	21
3.1. Material.....	21
3.1.1. Equipamentos.....	21
3.1.2. Vidraria.....	21
3.1.3. Reagentes.....	21
3.1.3.1. Preparo das soluções reagentes.....	22
3.2. Procedimento de extração da amostra.....	23
3.3. Definição das condições analíticas.....	23
3.4. Características de desempenho.....	24
3.4.1. Linearidade.....	24
3.4.2. Efeito de matriz.....	24
3.4.3. Seletividade.....	24
3.4.3.1. Teste do ácido ascórbico como interferente.....	24
3.4.3.2. Teste do eritorbato de sódio como interferente.....	25
3.4.4. Limites de detecção e quantificação.....	25
3.4.5. Precisão.....	25
3.4.5.1. Precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial.....	25
3.4.5.2. Repetitividade.....	26
3.4.6. Exatidão.....	26
3.4.7. Robustez.....	26
4. Resultados e discussão	27
4.1. Definição das condições analíticas.....	27
4.2. Linearidade.....	31
4.3. Seletividade.....	32
4.3.1. Teste do ácido ascórbico como interferente.....	32
4.3.2. Teste do eritorbato de sódio como interferente.....	33
4.4. Efeito de matriz.....	33
4.5. Limite de detecção e quantificação.....	33
4.6. Precisão.....	34
4.6.1. Repetitividade.....	35
4.6.2. Precisão.....	35

	intermediária.....	
4.7.	Exatidão.....	36
4.8.	Robustez.....	38
5.	Conclusões.....	39
6.	Referências bibliográficas.....	39
7.	Apêndice.....	42

Lista de tabelas

Tabela 1	Concentrações de nitrito utilizadas nos seis pontos da curva padrão e quantidades da solução estoque empregadas no preparo.....	22
Tabela 2	Soluções padrões de nitrito utilizadas na determinação das condições analíticas. Concentrações das soluções usadas, quantidade da solução estoque utilizada e volume completado em balão volumétrico.....	23
Tabela 3	Parâmetros variados na robustez, mostrando as três concentrações de nitrito utilizadas nesta característica de desempenho e número de repetições empregadas.....	27
Tabela 4	Efeito da adição de ácido ascórbico na quantificação de nitrito. Em todas as amostras foi adicionado 200 mg de nitrito/kg de patê.....	33
Tabela 5	Efeito da adição de eritorbato de sódio na quantificação de nitrito. Em todas as amostras foram adicionados 200 mg de nitrito/kg de patê.....	33
Tabela 6	Valores de concentração obtidos na repetitividade em seis repetições das seis concentrações de nitrito analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação.....	35
Tabela 7	Valores de concentração obtidos na reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermediária em seis repetições das seis concentrações de nitrito analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação.....	35
Tabela 8	Valores de desvio padrão e coeficientes de variação obtidos na reprodutibilidade intralaboratorial.....	36
Tabela 9	Valores de recuperação obtidos na exatidão, respectivos intervalo de variação aceitável na faixa de concentração de nitrito estudada e coeficientes de variação.....	36
Tabela 10	Valores de concentração obtidas nas análises de robustez nas variações analisadas e nas três concentrações de nitrito estudadas.....	38
Tabela 11	Concentrações de nitrito analisadas na robustez pesando-se 5 e 10g de amostra e resultados obtidos nas análises estatísticas.....	38
Tabela 12	Concentrações de nitrito analisadas na robustez, utilizando-se os dois métodos de extração propostos e resultados obtidos nas análises estatísticas.....	39

Lista de figuras

Figura 1	Reações óxido-redutoras envolvendo o nitrito (FARIA <i>et al.</i> , 2001).....	Pág. 14
Figura 2	Alterações químicas da mioglobina durante o desenvolvimento da cor de produtos cárneos curados (FARIA <i>et al.</i> , 2001).....	15
Figura 3	Reação de diazotação de nitrito com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de α -naftilamina em meio ácido (VOGEL, 1981).....	21

Lista de gráficos

Gráfico 1	Relação entre os comprimentos de onda e as respectivas absorvâncias do complexo formado a partir da reação do nitrito na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$	28
Gráfico 2	Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorvância na concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$	29
Gráfico 3	Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorvância na concentração de 0,4 $\mu\text{g/mL}$	29
Gráfico 4	Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorvância na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$	30
Gráfico 5	Representação gráfica da curva de calibração dos padrões de nitrito, com a equação da reta e valor do coeficiente de determinação (r^2).....	31
Gráfico 6	Valores de resíduo x concentrações analisadas.....	32
Gráfico 7	Dispersão dos valores de recuperação no limite de detecção e quantificação.....	34
Gráfico 8	Gráfico de dispersão dos valores de recuperação nas seis repetições das concentrações de nitrito analisadas.....	37

Resumo

A validação de um método de ensaio consiste na aplicação das características de desempenho previstas para avaliação da eficiência das análises de rotina do laboratório. Neste trabalho foi validado o método espectrofotométrico para determinação de nitrito usando como matriz patê de presunto. As condições analíticas validadas foram comprimento de onda de 540 nm e leitura das amostras entre 40 e 70 minutos após a adição dos reagentes complexantes. As características de desempenho obtidas foram: linearidade na faixa de trabalho estudada (0,125 a 3 µg de nitrito/mL), efeito de matriz não observado, não possui interferência do ácido ascórbico e possui interferência do eritorbato de sódio nas concentrações acima de 2,5 mg/100g. O limite de detecção foi definido em 12,5 mg de nitrito/kg de patê e o limite de quantificação em 25 mg de nitrito/kg de patê. O método apresentou repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial nas condições testadas. A exatidão foi avaliada através dos valores de recuperação que variaram entre 84 e 110%. Na avaliação da robustez, as variações realizadas no procedimento de extração foram dependentes do nível de concentração existente na amostra.

Palavras-chave: validação de metodologia analítica; nitrito; espectrofotometria, patê de presunto.

Abstract

The validation of an assay method consists of applying the performance characteristics foreseen to evaluate the efficiency of routine analysis in laboratory. In this work, the spectrophotometric method was validated as a method to detect and quantify nitrite using as source ham paté. In the methodology used, it was defined the wave of length of 540 nm and the reading of samples between 40 to 70 minutes after addition of color reagents. According to the results obtained, the method has linearity in the studied zone (0,125 to 3 $\mu\text{g/mL}$), matrix effect was not observed, there wasn't any interference of ascorbic acid and there was interference of sodium eritorbate in concentrations over 2,5 mg/100g. The detection limit was defined in 12,5 mg of nitrite/Kg of paté and the quantification limit in 25 mg of nitrite/Kg of paté. The method had repeatability and reproductibility. The accuracy was evaluated through recovery values that vary from 84 to 110%. In robustness, it was observed that the variations applied to the extracting procedure depended on the concentration of nitrite in the paté sample.

Keyword: validation of analytical method; nitrite; spectrophotometric method; ham paté.

1- Introdução

Os nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-) são aditivos amplamente utilizados nas indústrias de carnes, além de serem encontrados também nas verduras e na água, principalmente em áreas rurais. Muitos autores têm relatado o alto nível de nitrato e nitrito encontrados na água de consumo da população e nas plantas, dentre elas as verduras e legumes (HARDISSON *et al.*, 1996; OKAFOR & OGBONNA, 2003).

Os nitratos e nitritos são utilizados nas indústrias como sal de cura, eles atuam na prevenção do crescimento do *Clostridium botulinum*, e proporcionam a cor rósea dos produtos cárneos, o sabor típico de carnes curadas, além de possuírem efeito antioxidante (DESROSIER & DESROSIER, 1977; KILIC, 2000). Dentre os produtos freqüentemente adicionados de nitrato e nitrito estão os patês, o presunto, apesuntado e presuntado, os salames, a mortadela, a salsicha além de outros embutidos, principalmente aqueles que possuem prazo de validade mais longo e que são curados e defumados.

O nitrato quando adicionado às carnes é reduzido a nitrito, pela ação de enzimas bacterianas, este é transformado em óxido nitroso (NO) e ácido nitroso (HNO_2). O óxido nitroso se combina com o íon Fe^{2+} da mioglobina formando a nitrosomioglobina, que após o aquecimento é transformada em nitrosohemocromo, pigmento mais estável e que dá a cor rósea aos produtos cárneos curados. Porém, o uso de nitrato e nitrito pode causar sérios danos à saúde humana, pois o nitrito combina-se com as aminas secundárias e terciárias presentes na carne e formam as nitrosaminas que são potentes substâncias carcinogênicas. O NO pode também se combinar com a hemoglobina formando a metahemoglobina que prejudica o transporte de oxigênio no sangue (PARDI *et al.*, 2001). Por este motivo, o uso destes aditivos nos produtos cárneos são normatizados pela legislação vigente (Brasil, 1997) e suas presenças e quantificações nos produtos finais devem ser analisadas em

2- Revisão de literatura

2.1-O uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos

laboratório.

Várias técnicas são utilizadas na detecção e quantificação de nitrito em produtos cárneos. Dentre elas, estão as análises por cromatografia líquida, cromatografia gasosa e espectrofotometria uv/visível. As vantagens das cromatografias são a detecção simultânea de nitrato e nitrito e a rapidez das análises, porém é um processo analítico de alto custo de equipamentos e reagentes.

A análise por espectrofotometria tem sido amplamente utilizada para detecção e quantificação de nitrato e nitrito em produtos cárneos, legumes, vegetais e na água, sua vantagem é ser um método de baixo custo e atender às características de desempenho do analito. Entretanto, segundo OZTEKIN (2002), a espectrofotometria é um método trabalhoso, que demanda muito tempo e material por parte do analista. Já segundo PRINGUEZ *et al.* (1995), a análise por espectrofotometria é simples, barata e de fácil implementação no laboratório, porém esta deve ser bem estabelecida, padronizando o processo de extração e leitura para que haja uma boa repetitividade das análises.

A validação de uma metodologia analítica é um dos elementos básicos em sistemas de qualidade e integra os programas de boas práticas de laboratório, visando assegurar que o método utilizado seja adequado ao que se propõe identificar ou quantificar (CHASIN *et al.*, 1998). Segundo BRASIL (2003b), uma metodologia analítica deve ter praticabilidade, ou seja, o método deve ser capaz de analisar um número significativo de amostras, num curto espaço de tempo e a custo reduzido.

Com base nestes aspectos e visando atender a necessidade de padronizar o método de ensaio para nitrato e nitrito nos laboratórios, o objetivo deste trabalho foi validar o método espectrofotométrico para determinação de nitrito em patê de presunto.

A segurança de produtos cárneos comercialmente processados contra o *C. botulinum*, tem sido atribuída à ação do nitrito. O ácido nitroso é uma molécula ativa na inibição dos esporos do *C. botulinum* e a quantidade

necessária para o controle desse microrganismo é de 156 mg de nitrito/kg de produto, porém, quando dissociado este ácido perde sua atividade. A inibição do crescimento desse patógeno em produtos cárneos curados é consequência de diversos fatores que agem em combinação, como: a concentração da salmoura; o pH do produto; o nitrito adicionado ou residual; a severidade do tratamento pelo calor; o número de esporos existentes; a temperatura de estocagem; a natureza da flora competitiva; a disponibilidade de ferro e outros aditivos (SOFOS *et al.*, 1979; PARDI *et al.*, 2001).

Os nitratos e nitritos podem ser usados nas formas de nitrato de sódio (NaNO_3), nitrato de potássio (KNO_3), nitrito de sódio (NaNO_2), nitrito de potássio (KNO_2) e suas combinações. Quando é usado o nitrato são necessárias ações de bactérias redutoras para sua transformação em nitrito, porém essa conversão é lenta e de difícil controle. Portanto, a adição direta de uma quantidade conhecida de nitrito facilita o processo de cura e reduz a variação de cor e sabor nos produtos curados. Aditivos como: ácido ascórbico, isoascórbico ou ácido eritórbico, ascorbato de sódio, eritorbato de sódio, ácido fumárico, glucona delta lactona, ácido sódio-fosfato, ácido cítrico ou citrato de sódio podem ser usados em combinação com nitrato e nitrito como agentes redutores na cura (FÚRIA, 1972; MAGA & TU, 1994).

Os nitritos, mais efetivos em pH de 5,0 a 5,5, do que em pH elevados, formam na carne o óxido nítrico, que reage com o Fe^{2+} do grupo heme da mioglobina formando o nitrosohemocromo, pigmento responsável pela cor rósea das carnes curadas (FENNEMA, 1996).

Os sais de nitrato e nitrito podem ser adicionados na carne por diferentes métodos. Uma mistura seca dos agentes de cura pode ser espalhada na superfície de pedaços de carne dando um tempo para a difusão destes para o seu interior, a adição pode ocorrer por imersão do pedaço de carne em uma solução de cura e também por injeção destes agentes na carne. Se a carne é triturada, os agentes de cura podem ser misturados a ela (CASSENS *et al.*, 1979).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) normatiza o uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos e, segundo

os artigos 365, 372 e 373 do RIISPOA, BRASIL (1997), tolera-se a presença, nos produtos cárneos prontos, de até 200 mg de nitrito/kg de produto e de até 1 parte por mil de nitrato separadamente. Quando os nitratos e nitritos de sódio ou de potássio são usados em qualquer combinação, o teor de nitrito no produto final não pode ultrapassar 200 mg/kg. Quando usados o nitrito de sódio ou de potássio, juntos ou isolados, as proporções máximas permitidas são de 240 gramas para cada 100 litros de salmoura, 60 gramas para cada 100 quilos de carne na cura a seco, misturado com o sal, ou 15 gramas para cada 100 quilos de carne picada ou triturada, misturado com o sal.

Segundo o decreto 1004 da ANVISA, BRASIL (1998), permite-se a quantidade de 150 mg de nitrito/kg de produto e 30 mg de nitrato residual/kg de produto expressa em nitrito de sódio em carnes e produtos cárneos.

As carnes curadas contribuem com 15% do nitrito médio contido na dieta. Muitos vegetais contêm altos níveis de nitrato, que podem ser convertidos a nitrito pela microbiota oral. Muitas vezes, a água também contém níveis significantes de nitrato, principalmente nas áreas rurais, nas quais altos níveis de nitrogênio fertilizante são aplicados no solo (MILLER, 1980; SIMÃO, 1985).

Grande parte do nitrato e do nitrito desaparece durante a fabricação e as doses de emprego devem levar em conta essas perdas. Quando o nitrito de sódio é adicionado em carnes para cura, este reage com vários constituintes, como as proteínas, gorduras e em certas condições com aminas secundárias. Após o processo de industrialização da carne ter se completado, apenas 10 a 20% do nitrito inicialmente adicionado ainda está presente no produto final. Os maiores fatores que influenciam o teor de nitrito residual são tempo, temperatura de processamento, pH e tempo e temperatura de estocagem. Assim, estima-se que acima de 50% do nitrito adicionado seja perdido em 24 horas e menos de 10% permaneça depois de sete dias de fabricação. Desse modo a quantidade de nitrito consumida por uma pessoa em carnes curadas é muito menor que a quantidade adicionada (KILIC, 2000; PARDI *et al.*, 2001).

Usando nitrato em produtos cárneos, este é

inicialmente reduzido a nitrito por nitrato-redutases bacterianas. As bactérias necessárias para que essa redução se processe (*Achromobacter dendriticum*, *Micrococcus epidermidis*, e *M. auranticu*), estão comumente presentes na carne e sobre os equipamentos na

indústria. Na presença de condições redutoras apropriadas o nitrito é transformado em ácido nitroso (HNO_2) e em óxido nitroso (NO), que estão em equilíbrio, como observado na figura 1 (FARIA *et al.*, 2001; PARDI *et al.*, 2001).

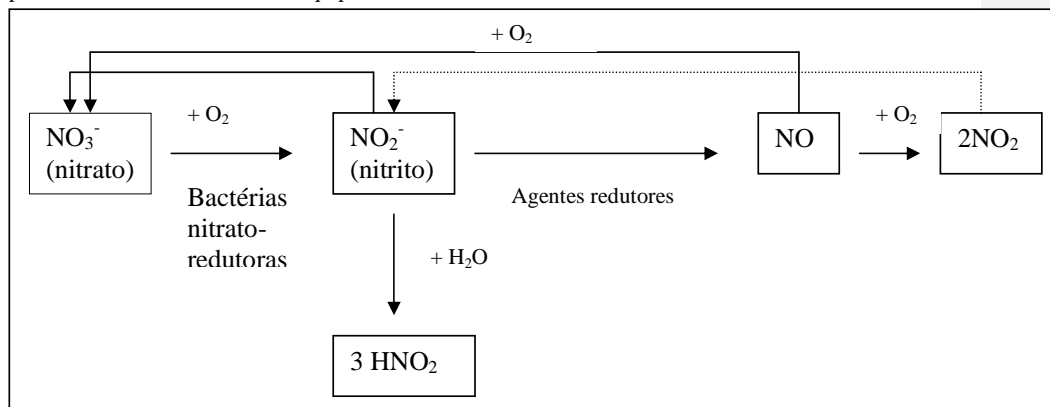
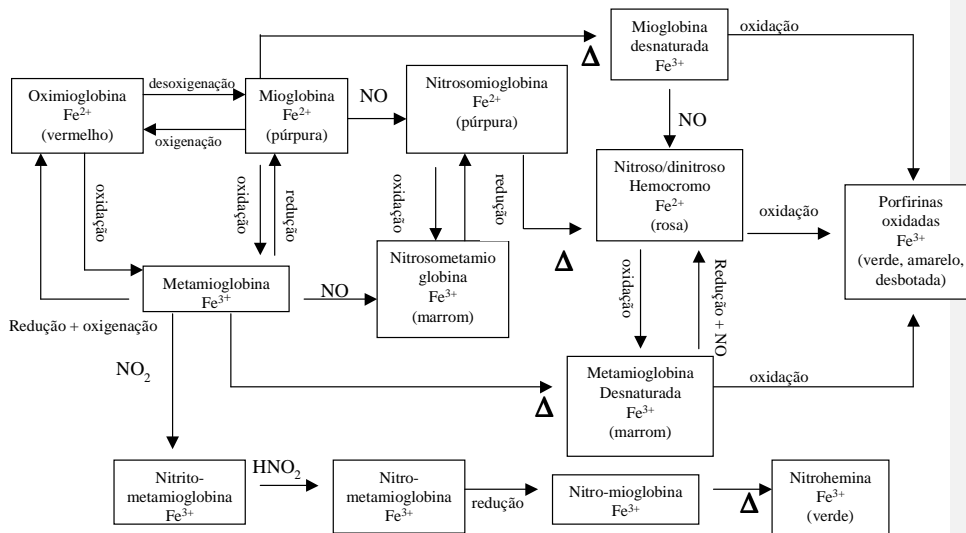


Figura 1 - Reações óxido-redutoras envolvendo o nitrito (Adaptado de FARIA *et al.*, 2001).

Para se efetivar a fixação da cor, quantidades suficientes de óxido nitroso devem permanecer reagindo com o pigmento ferroso ou com o férrico, sobretudo da mioglobina, formando tanto nitrosomioglobina, de cor vermelha brilhante, como nitrosometamioglobina, de cor pardacenta. Quando a carne assim tratada pelo nitrito é submetida ao calor, sua cor se estabiliza pela desnaturação da porção protéica da mioglobina, resultando no pigmento nitrosomiohemocromógeno, de cor rósea brilhante, característica da carne curada cozida, mais estável que o pigmento nitrosomioglobina. Por estas razões um pedaço de carne curada

permanece do róseo ao vermelho, enquanto que a carne fresca quando cozida torna-se cinza a marrom (PARDI *et al.*, 2001).

A figura 2 ilustra os compostos formados pela ligação do óxido nitroso com a mioglobina e metamioglobina e suas reações de oxi-redução. As reações do óxido nitroso com a mioglobina são desejáveis para o desenvolvimento da cor vermelha da carne, já a reação do óxido nitroso com a metamioglobina não é desejável por formar a cor marrom na carne (FARIA *et al.*, 2001).



LEGENDA:
 Δ Aquecimento 50 a 60°C

Figura 2 – Alterações químicas da mioglobina durante o desenvolvimento da cor de produtos cárneos curados (FARIA *et al.*, 2001).

2.1.1- Metabolismo e efeitos do nitrato e nitrito no organismo

O nitrato ingerido é absorvido rapidamente no trato gastrointestinal superior e a maioria dele é eliminado junto com a urina, a média do tempo de eliminação é 5 horas. Uma vez ingerido, o nitrito pode reagir com outras substâncias do trato gastrointestinal e se absorvido pelo sistema circulatório é rapidamente oxidado a nitrato. O nitrito no sangue pode oxidar a hemoglobina em metahemoglobina, reduzindo ou destruindo a sua capacidade de transportar oxigênio (CASSENS, 1997).

A ingestão prolongada de nitrito pode causar metahemoglobinemia principalmente em crianças e a intoxicação por nitrito provoca vasodilatação, relaxamento dos músculos lisos, rubores na face, desconforto gastrointestinal, cefaléia, cianose e vômito. Além disso, uma alta incidência de câncer de estômago e esôfago têm sido relacionados com as altas taxas de exposição ao nitrito. Os compostos n-nitrosos,

como as nitrosaminas, formados a partir da reação do nitrito com as amins são mutagênicos e teratogênicos (HARADA & SILVA, 2002).

2.2-Validação de método de ensaio

Um método de ensaio deve ser validado para verificar se as características de desempenho estão adequadas ao propósito da análise. A validação deve ser feita quando uma nova metodologia analítica é desenvolvida, quando uma metodologia já empregada é revisada e ajustada a novos analitos, quando esta sofre mudanças nos seus resultados com o passar do tempo, quando a metodologia analítica já utilizada vai ser realizada por um novo analista ou um novo equipamento e para demonstrar a igualdade entre dois métodos (The fitness, 1998; ORIENTAÇÕES, 2003). Um método oficial não precisa ser revalidado quando será usado exatamente como descrito, mas recomenda-se avaliar alguns parâmetros como calibração do equipamento e recuperação do analito antes que seja usado rotineiramente (BRUCE, *et al.*, 1998).

A validação visa diminuir ou controlar os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado gerado, como a variabilidade das amostras, as contaminações, o uso de reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além de calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise (CHASIN *et al.*, 1998). Os estudos de validação devem ser representativos, ou seja, devem ser conduzidos em condições próximas às de uso normal do método, cobrir as faixas de concentração e os tipos de amostras rotineiras (THOMPSON *et al.*, 2002).

Os sistemas de qualidade, entre eles as Boas Práticas de Laboratório (BPL) e as normas ISO, dentre elas a NBR ISO/IEC 17025:2005, enfatizam a importância da capacitação do analista, da adequação dos equipamentos e condições laboratoriais, de protocolos de trabalho definidos e bem elaborados, de procedimentos operacionais padronizados, de cuidados na documentação desses procedimentos e dos dados obtidos na validação de uma metodologia analítica (CHASIN, *et al.*, 1998).

Para a validação de um método analítico é necessário que os equipamentos e vidraria estejam calibrados. A calibração estabelece a relação entre os valores indicados por um equipamento ou vidraria e os valores realmente contidos ali (LEITE, 1996).

Para realizar um processo de validação são necessárias algumas ferramentas, como a amostra, que é o termo geral que abrange controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas; solução-padrão, que é a substância de teor e pureza conhecidos e certificados a serem utilizados como referência nas análises, esta deve possuir estabilidade e natureza confiável e é de fundamental importância nas análises por propiciar a comparação entre as espécies analisadas, sendo o principal parâmetro de exatidão; o branco de reagentes, que é a mensuração de todos os reagentes usados num procedimento analítico para descobrir possíveis interferências que esses podem causar na metodologia; a amostra branca, que é a matriz na qual o analito em questão não foi adicionado; a matriz fortificada, que é a

matriz adicionada de analito em concentrações conhecidas e; o analito, que é o composto químico específico a ser mensurado (LEITE, 1996; The fitness, 1998; Comunidade, 2002; BRASIL, 2003a).

A validação de um método de ensaio deve compreender quatro diferentes etapas: o planejamento das análises, a realização das análises, a interpretação dos resultados e a documentação dos dados obtidos (BRUCE *et al.*; 1998).

A primeira etapa de um processo de validação é o planejamento, nesta etapa deve-se definir quais as características de desempenho se aplicam a este procedimento, e quais as reais necessidades e disponibilidade de dinheiro a ser gasto no processo. O planejamento de uma validação pode reduzir o número de análises e aumentar a qualidade dos resultados. A validação de uma metodologia analítica deve ser adequada ao uso que se pretende, devendo ser estabelecidos pelo laboratório quais as características de desempenho adequadas a tal validação (BRUCE *et al.*, 1998; The fitness, 1998; ORIENTAÇÕES, 2003).

No planejamento da validação devem ser definidos a aplicação e o objetivo do método, as características de desempenho, os parâmetros de aceitação e os procedimentos operacionais para a validação. Deve ser verificado se as características de desempenho do equipamento estão compatíveis com o exigido pelo método e se os materiais, reagentes e padrões são qualificados. Experimentos preliminares de validação e experimentos completos devem ser executados e então definidos os critérios de revalidação e tipos e frequência de verificações de controle de qualidade analítica para a rotina. (ORIENTAÇÕES, 2003).

Para definir as características de desempenho de uma validação podem ser usados materiais de referência certificados, que são padrões comprados de laboratórios já com uma concentração pré-definida e garantida do analito, ou usar matrizes brancas adicionadas de analito em concentrações definidas. Os materiais de referência certificados são muito caros, possuem um valor de concentração e uma incerteza associada, porém, nem sempre estão disponíveis, quando utilizados, devem ser adquiridos de

órgãos reconhecidos e confiáveis (The fitness, 1998; ORIENTAÇÕES, 2003).

Os métodos analíticos podem não medir exatamente a concentração de analito presente na amostra, sendo então necessário avaliar a eficiência da extração do analito da matriz. Para isso, são analisadas matrizes adicionadas de quantidades conhecidas de analito (The fitness, 1998).

É necessário que o analista seja treinado no método em questão, que saiba os princípios da metodologia analítica a ser validada, conheça o equipamento a ser usado e saiba preparar todos os reagentes a serem utilizados nas análises, além de conhecer a estabilidade desses. Antes de se iniciar um ensaio analítico todo o material a ser utilizado deve estar separado e ao alcance do analista (The fitness, 1998; BRASIL, 2003a).

A validação deve ser toda documentada claramente e sem ambigüidades, pois a metodologia depois de validada deve ser procedida da mesma forma sempre, sem nenhuma mudança de conduta, de forma a minimizar a introdução de variação acidental no método. Caso contrário, o desempenho real do método não irá corresponder àquele previsto nos dados de validação. Também é necessária a documentação nos casos de auditorias e como arquivo do laboratório. A metodologia analítica deve ser descrita de forma cronológica, pois o analista deve ler aquilo que espera fazer (BRUCE *et al.*, 1998; The fitness, 1998, ORIENTAÇÕES, 2003).

Uma boa maneira de confirmar se a metodologia foi bem documentada é pedir a vários analistas que façam as análises descritas na documentação, se realizada de maneira correta é sinal de que a metodologia analítica foi bem entendida. Existem também alguns formatos padronizados de documentação, como é o caso da ISO 78/2, a ABNT ISO/IEC Directiva-Parte 3, além das prescrições da NBR ISO/IEC 17025 (The fitness, 1998, ORIENTAÇÕES, 2003).

Após a validação da metodologia analítica é necessário que amostras de concentrações conhecidas e padrões sejam analisados freqüentemente como controle de qualidade, pois as análises de rotina contêm concentrações desconhecidas que não permitem avaliar a

eficiência e precisão do método (The fitness, 1998).

2.2.1- Características de desempenho

As características de desempenho comumente usadas na validação de uma metodologia analítica são: Linearidade; Seletividade; Limites de detecção e quantificação; Precisão; Exatidão e Robustez (The fitness, 1998; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003).

2.2.1.1-Linearidade e faixa linear de trabalho:

A linearidade é a habilidade do método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito existente nas amostras, numa determinada faixa de trabalho. Esta característica mede a proporcionalidade entre a concentração do analito ou concentração verdadeira com o resultado obtido nas análises. Não basta que a concentração realmente existente na amostra seja proporcional ao valor encontrado na análise, mas que a curva-padrão tenha repetitividade todos os dias. A linearidade pode variar com o uso de diferentes matrizes com o mesmo analito de acordo com o efeito interferente de cada matriz (The fitness, 1998; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003).

Para a determinação da linearidade recomenda-se o uso de pelo menos 5 níveis de concentração do analito diferentes segundo BRASIL, (2003a) ou 6 pontos segundo ORIENTAÇÕES, (2003). A linearidade é formulada pela expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinada na amostra real. A equação de reta é a seguinte:

$$y = ax + b, \text{ na qual:}$$

y = Resposta medida;
x = Concentração do analito;
a = Coeficiente angular = sensibilidade
b = Coeficiente linear (ORIENTAÇÕES, 2003)

A sensibilidade demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva de regressão linear de calibração. O coeficiente de correlação linear (r) e o coeficiente de determinação (r²) são usados para indicar o quanto a reta pode ser adequada como modelo

matemático e o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação varia entre os guias de validação de 0,90 a 0,99 (CHASIN *et al.*, 1998; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003).

Em todo método quantitativo existe uma faixa de concentração do analito no qual o método pode ser aplicado, no limite inferior deve ser usado o limite de quantificação ou de detecção do método e o limite superior depende da resposta do sistema e/ou equipamento de medição. A faixa linear de trabalho é o intervalo entre os limites inferior e superior de concentração do analito no qual é possível a determinação com precisão, exatidão e linearidades exigidas e onde a sensibilidade pode ser considerada constante sob as condições especificadas para o ensaio (ORIENTAÇÕES, 2003).

A concentração mais esperada no ensaio deve ser estabelecida no centro da faixa de trabalho e esta deve cobrir toda a faixa de aplicação do ensaio analítico. Os valores obtidos nos resultados analíticos devem ser linearmente correlacionados à concentração do analito existente na amostra (ORIENTAÇÕES, 2003).

2.2.1.2- Seletividade:

Um método é específico quando produz resposta para apenas um analito e é chamado seletivo quando produz resposta para vários analitos, podendo distinguir a resposta de um analito da resposta de outros. Muitas vezes os termos especificidade e seletividade são usados indistintamente ou com diferentes interpretações (ORIENTAÇÕES, 2003).

A seletividade é a capacidade de um método em distinguir o analito de outras substâncias, e prova que o resultado da análise provém apenas do analito em questão e não de outros compostos quimicamente ou fisicamente semelhantes ou de apenas uma coincidência, ou seja, essa característica de desempenho confirma a identidade do analito. Um interferente pode diferir seu comportamento, interferindo mais ou menos, dependendo da concentração do analito, provocando alterações na linearidade da curva-padrão. Para testar esta característica devem ser utilizadas substâncias homólogas, análogas, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz e metabólitos do analito para confirmação de que não há interferentes.

Para tal, devem ser selecionadas substâncias potencialmente interferentes e analisadas amostras brancas para estimar o efeito destes. Para um método específico devem ser analisados o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco (LEITE, 1996; The fitness, 1998; Comunidade, 2002; ORIENTAÇÕES, 2003).

Recomenda-se que sejam comparados os resultados de amostras contaminadas pelos possíveis interferentes com amostras não contaminadas para demonstrar que os resultados das análises não sofrem interferências. Se o método de ensaio em questão não possui seletividade adequada, este requisito deverá ser obtido pela combinação de vários métodos (BRASIL, 2003a; BRASIL 2003b).

2.2.1.3-Limite de detecção do equipamento (LDE), limite de detecção do método (LDM) e limite de quantificação (LQ):

Na validação de um método analítico, normalmente é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar crítica pelo valor do limite de detecção do equipamento, para tal são necessárias análises de no mínimo sete amostras de branco ou branco com adição de analito. Após as análises são usadas as fórmulas “branco + 3s” ou “0 + 3s”, onde “s” é o desvio padrão das amostras brancas analisadas e o valor do branco corresponde à média da concentração de analito obtida nas amostras analisadas (ORIENTAÇÕES, 2003).

O limite de detecção deve considerar as interferências relacionadas com a matriz, na qual a razão do sinal instrumental para perturbação sinal/ruído (S/R) seja superior a 5/1 (BRASIL, 2003b).

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, este deverá ser inferior ao limite máximo do analito permitido pela legislação vigente. O limite de quantificação pode ser considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média das amostras brancas analisadas mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão destas amostras, representado

pela fórmula “branco + 5, 6 ou 10s” (The fitness, 1998; BRASIL, 2003b; ORIENTAÇÕES, 2003).

2.2.1.4-Precisão:

A precisão avalia a proximidade de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, de amostras semelhantes ou padrões obtidos em condições pré-estabelecidas e específicas. A precisão é usualmente expressa pelo desvio padrão, onde uma menor precisão é dada através de um maior desvio-padrão (Comunidade, 2002; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003;).

Os dois níveis mais comuns de avaliar a precisão de um método de ensaio são através da “repetitividade” e da “reprodutibilidade”. A repetitividade avalia a variabilidade de resposta esperada quando um método é executado por um só analista, com um só procedimento, em um só equipamento e local, em um curto período de tempo. Já a reprodutibilidade é usada em validações intra e interlaboratoriais, quando um método vai ser executado por diferentes analistas, por mais de um equipamento e/ou em diferentes laboratórios (CHASIN *et al.*, 1998; The fitness, 1998).

A precisão pode ser avaliada também através da “precisão intermediária”, na qual resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, mesmo laboratório, variando operadores ou equipamentos. As condições a variar devem ser definidas previamente (The fitness, 1998; ORIENTAÇÕES, 2003).

2.2.1.5-Exatidão:

A exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e a quantidade do analito realmente existente na amostra. Quando a exatidão é aplicada a uma série de resultados de ensaios ela pode ser expressa como recuperação analítica (The fitness, 1998; ORIENTAÇÕES, 2003).

A recuperação é a porcentagem da concentração real de um analito recuperado durante o processo analítico e é usado quando não se encontra um material de referência certificado disponível (Comunidade, 2002). A recuperação pode ser estimada por análise de amostras com quantidades conhecidas de adição do analito, devem ser escolhidos pelo menos três níveis de

adição, são eles um valor próximo ao limite de detecção, um valor próximo à concentração máxima permitida e uma concentração próxima a faixa média de uso do método (ORIENTAÇÕES, 2003). A recuperação é calculada pela fórmula abaixo:

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

Na qual:

C_1 = Concentração determinada na amostra adicionada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não adicionada e

C_3 = Concentração adicionada (ORIENTAÇÕES, 2003)

2.2.1.6-Robustez:

A robustez avalia a susceptibilidade de um método analítico a alterações nas condições experimentais quando variados, por exemplo, as condições de armazenamento, as condições ambientais e/ou preparação da amostra ou a pequenas alterações específicas. Nesta característica de desempenho faz-se variações no método de ensaio, avaliando-se o efeito destas no resultado da análise (The fitness, 1998; Comunidade, 2002; ORIENTAÇÕES, 2003).

Nessa avaliação é possível identificar variações no método que possuem efeito significativo nos resultados analíticos. Devem ser realizados estudos prévios para a seleção dos fatores susceptíveis de influenciarem os resultados da medição a serem modificados nas análises. Um método é robusto quando se apresenta praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando de sua execução, quanto maior a robustez de um método maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (The fitness, 1998; Comunidade, 2002; ORIENTAÇÕES, 2003).

2.2.1.7-Estabilidade da amostra

Deve-se conhecer a estabilidade da amostra a ser analisada, pois usando-se analitos instáveis perde-se parte da concentração da amostra durante o preparo ou estocagem, não apresentando a análise um valor real de concentração do analito. As condições de armazenamento de uma amostra devem ser

monitoradas para determinar sua estabilidade (Comunidade, 2002).

2.3-Análise por espectrofotometria UV/Visível

A espectrofotometria tem sido amplamente utilizada para detecção e quantificação de nitrato e nitrito em produtos cárneos, vegetais, legumes, água e sucos (PRINGUEZ *et al.*, 1995; HARDISSON, *et al.*, 1996; OKAFOR & OGBONNA, 2003).

O princípio fundamental da maior parte dos métodos de absorção quantitativos reside na comparação entre a quantidade de energia radiante de determinado comprimento de onda que é absorvida por uma solução do produto em análise e a que é absorvida por uma série de soluções padrões (WILLARD *et al.*, 1979).

As leis de Lambert e Beer são essenciais para o entendimento da espectrofotometria. Segundo a lei de Lambert, a intensidade da luz emitida diminui exponencialmente quando a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente, ou seja, qualquer camada de uma dada espessura absorve a mesma fração de luz que incide sobre ela. Segundo a lei de Beer, a intensidade de um feixe de luz monocromático diminui exponencialmente quando a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente. É vantajoso que as soluções obedeçam a lei de Beer, pois, neste caso, a absorvância é diretamente proporcional a concentração, e basta determinar um número reduzido de pontos para estabelecer a curva de calibração. Na espectrofotometria são usados instrumentos destinados à medida da energia radiante emitida ou absorvida por dada substância pesquisada. A amostra analisada absorve certa fração da luz incidente e transmite a restante, a luz transmitida vai sensibilizar um detector, que a transformará em um sinal elétrico; este é então enviado a um amplificador, que vai intensificar o sinal proveniente do detector. Através do sinal elétrico é expressa a concentração da substância pesquisada (WILLARD *et al.*, 1979; SKOOG *et al.*, 2002).

A espectrofotometria é um processo que utiliza a luz para medir as concentrações químicas. Em relação à energia, é mais conveniente pensar na luz como partículas chamadas fótons, quando uma molécula absorve um fóton, a energia da

molécula aumenta e dizemos que a molécula é promovida para um estado excitado. A luz visível e a radiação ultravioleta provocam a promoção dos elétrons para orbitais de maior energia, a luz oriunda de uma fonte contínua passa por um monocromador, que seleciona uma estreita faixa de comprimento de onda do feixe incidente. Essa luz monocromática passa pela amostra e a energia radiante da luz emergente é medida. Na espectrofotometria UV/visível, a amostra é geralmente colocada numa cubeta. O espectrofotômetro pode possuir um feixe simples ou um feixe duplo, nos dois casos é preciso uma amostra de referência contendo o solvente puro. No sistema de feixe simples, para cada amostra colocada no aparelho deve ser colocada novamente a amostra referência, no caso do sistema de feixe duplo, a amostra referência fica no equipamento durante todas as análises necessárias (CHRISTIAN & O'REILLY, 1986; HARRIS, 2001).

Os espectrofotômetros são compostos por uma fonte de radiação contínua, um monocromador para selecionar o comprimento de onda, um detector que converte a energia radiante em sinais elétricos e um dispositivo que faz a leitura do detector. A fonte mais comum empregada para a região visível é a lâmpada incandescente de filamento de tungstênio e para a região do ultravioleta é usado a lâmpada de deutério. Os monocromadores restringem a radiação que irá incidir sobre a amostra e podem ser usados para tal, prismas, grade de difração ou filtros óticos. Os detectores podem ser seletivos ou não seletivos, para região UV/visível do espectro são usados detectores fotoelétricos, que são detectores seletivos, isto é, sua resposta varia com a frequência da radiação incidente (CHRISTIAN, 1994).

No caso das análises de nitrito por espectrofotometria, há a formação da coloração rósea da amostra ou padrão após a adição dos reagentes complexantes para a formação de cor. A formação desta coloração baseia-se na reação de diazotização de nitritos com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de α -naftilamina em meio ácido, formando o ácido α -naftilamino- p -azobenzeno- p -sulfônico, que possui esta coloração e é determinado espectrofotometricamente a 540 nm (BRASIL, 1999).

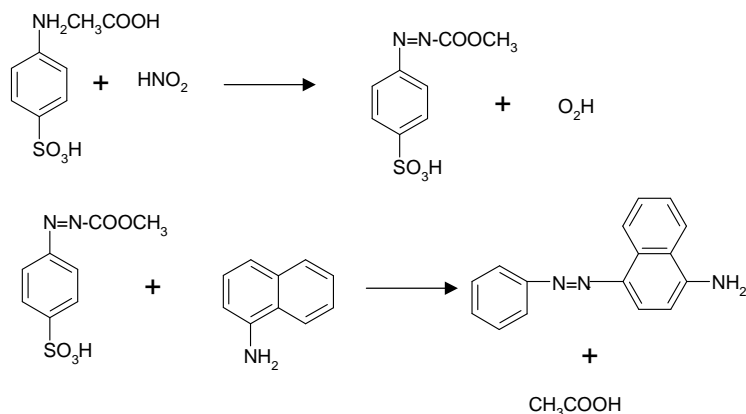


Figura 3 - Reação de diazotação de nitrito com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de α -naftilamina em meio ácido (VOGEL, 1981).

3- Material e métodos

O experimento foi realizado no Setor de Físico-Química de Produtos de Origem Animal do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), em Pedro Leopoldo (MG), no período de agosto de 2004 a julho de 2005.

3.1-Material

3.1.1- Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro UV-VIS ThermoSpectronic Genesys 10 UV (Nova York; EUA);
- Balança analítica Bosch SAE 200 (Jungingen; Alemanha);
- Balança analítica Mettler PK 2000 (Zurich; Suíça);
- Banho de água fervente (São Paulo; Brasil);
- Agitador magnético (Iowa; EUA) e
- Agitador vortex (Iowa; EUA).

3.1.2- Vidraria

Foram necessárias as seguintes vidrarias para o desenvolvimento das análises:

- Balões volumétricos de 50 mL; 100 mL; 200 mL e 1000 mL;
- Erlenmeyers de 300 mL;
- Bastões de vidro;
- Funis de vidro e plástico;
- Béqueres de 15 mL, 300 mL e 2000 mL;
- Pipetas volumétricas de 3 mL, 5 mL e 10 mL;
- Micropipetas automáticas de 500 μ l e 1000 μ l e
- Tubos de centrifuga plásticos de 50 mL.

3.1.3- Reagentes:

Os reagentes utilizados foram:

- Ácido ascórbico – Ecibra (São Paulo; Brasil);
- Ácido clorídrico (HCl) – Biotec (São Paulo; Brasil);
- Cloreto de α -naftilenodiamina ($C_{12}H_8Cl_2N_2$) – Sigma (St. Louis MO; EUA);
- Eritorbato de sódio comercial com 99% de pureza;
- Ferrocianeto de potássio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) – Cinética química LTDA (São Paulo; Brasil);

- Nitrito de sódio (NaNO₂) – Synth (Diadema; Brasil);
- Sulfanilamida (C₆H₈N₂O₂S) – Vetec (Duque de Caxias; Brasil);
- Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄. 7 H₂O) – Cinética Química LTDA (São Paulo; Brasil);
- Tetraborato de sódio decahidratado (Na₂B₄O₇.10H₂O) – Vetec (Duque de Caxias; Brasil) e
- Toda a água usada para as análises foi deionizada e destilada.

3.1.3.1- Preparo das soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram necessárias para os procedimentos analíticos:

☐a) Solução de cloreto de α -naftilenodiamina a 0,5 % (m/v):

Foram dissolvidos 0,5 g de cloreto de α -naftilenodiamina em 100 mL de água destilada e deionizada, homogeneizando sob agitação magnética até completa dissolução. A solução foi colocada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração. No caso de mudança de cor a solução foi descartada.

☐b) Solução de ferrocianeto de potássio trihidratado a 15% (m/v):

Foram dissolvidos 150 g de ferrocianeto de potássio para 1000 mL de solução. O reagente e a água deionizada e destilada foram colocados em béquer de 2000 mL para dissolução sob agitação magnética, logo após foram transferidos para balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado quando necessário.

☐c) Solução de tetraborato de sódio decahidratado a 5% (m/v):

Foram pesados 50 g de tetraborato de sódio para 1000 mL de solução. O reagente e a água deionizada e destilada foram colocados em béquer de 2000 mL para dissolução, sob agitação magnética, e logo após a dissolução foram transferidos para balão volumétrico de 1000 mL. O volume foi completado quando necessário.

☐d) Solução de sulfanilamida a 0,5% (m/v):

Foram dissolvidos 1,25 g de sulfanilamida em 250 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) (1:1). Esta solução permanece estável por um período de um a dois meses.

☐e) Solução de sulfato de zinco heptahidratado a 30%:

Em um béquer de 2000 mL foram pesados 300g de sulfato de zinco e dissolvidos em água deionizada e destilada sob agitação magnética. Após a dissolução a solução foi transferida para balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado.

☐f) Soluções de nitrito de sódio:

Solução estoque de nitrito de sódio:

Foi pesado 0,3866 g de nitrito de sódio, previamente seco em dessecador por 24 horas. O sal foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água deionizada e destilada.

Soluções intermediárias:

As concentrações empregadas para construção da curva-padrão foram de 0,125 μ g/mL; 0,250 μ g/mL; 0,5 μ g/mL; 1 μ g/mL; 2 μ g/mL e 3 μ g/mL. Estas concentrações foram preparadas segundo a tabela 1.

Tabela 1- Concentrações de nitrito utilizadas nos seis pontos da curva padrão e quantidades da solução estoque empregadas no preparo.

Concentração (μ g/mL)	Quantidade da solução estoque (μ l)
0,125	50
0,250	100
0,500	200
1,000	400
2,000	800
3,000	1.200

Formatados: Marcadores e numeração

Formatados: Marcadores e numeração

Formatados: Marcadores e numeração

Formatados: Marcadores e numeração

Formatados: Marcadores e numeração

Formatados: Marcadores e numeração

As quantidades de solução estoque indicadas na tabela 1 foram pipetadas para balão volumétrico de 200 mL e os volumes foram completados.

Preparo da curva-padrão

Foram pipetados separadamente 10 mL de cada uma das soluções intermediárias para balão volumétrico de 50 mL, em cada balão foram adicionados 5 mL de solução de sulfanilamida a 0,5%. Em seguida foram adicionados 3 mL de solução de cloreto de α -naftilenodiamina a 0,5%, logo após, o volume foi completado com água deionizada e destilada.

3.2- Procedimento de extração da amostra

Foi utilizado como matriz branca patê de presunto enlatado, adquirido diretamente da indústria, todas as latas de patê foram abertas, homogeneizadas, fracionadas e em seguida foram congeladas porções contendo 100 g de patê cada.

O método empregado para a extração da amostra, segundo BRASIL (1999), foi o seguinte: Foram dissolvidos em béquer de 300 mL, 10 g de patê de presunto com 100 mL de água deionizada e destilada fervente. Após a dissolução foram adicionados 5 mL de solução de tetraborato de sódio a 5%, que foi homogeneizada com bastão de vidro. O béquer com a solução foi colocado em banho de água fervente por 15 minutos e depois resfriado em temperatura ambiente. Logo após, o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL com a ajuda de funil de plástico e bastão de vidro, lavando bem o béquer. Após a transferência foram adicionados 5 mL de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL de solução de sulfato de zinco a 30%. O volume foi completado com água deionizada e destilada. O balão volumétrico com a solução foi deixado em repouso por 15 minutos e em seguida a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo com a

ajuda de um funil de vidro para um erlenmeyer de 300 mL. Foram pipetados 10 mL do filtrado e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, após a transferência foram adicionados 5 mL de solução de sulfanilamida a 0,5% e 3 mL de solução de cloreto de α -naftilenodiamina a 0,5%. Após a homogeneização o volume foi completado com água deionizada e destilada.

A metodologia para extração da amostra foi desenvolvida conforme BRASIL, (1999) por ser a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e por ser o procedimento realizado no LANAGRO.

3.3- Definição das condições analíticas

O objetivo da definição das condições analíticas foi determinar qual o comprimento de onda ideal para a leitura espectrofotométrica de nitrito e qual o tempo ótimo para a reação de cor após a adição da solução de sulfanilamida e de cloreto de α -naftilenodiamina resultando em valores de absorvância maiores e estáveis.

A solução estoque de nitrito de sódio usada para esse ensaio, em particular, foi a seguinte: Foram pesados 0,5 g de nitrito de sódio, previamente seco em dessecador por 24 horas, transferidos para balão volumétrico de 500 mL e completado o volume. Foi pipetado 1 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e completado o volume. A concentração desta solução foi de 10 μ g/mL de nitrito de sódio (BRASIL, 1999).

Para a definição das condições analíticas foram usadas 3 concentrações diferentes de solução padrão de nitrito de sódio, uma baixa concentração (0,05 μ g/mL), uma concentração intermediária (0,4 μ g/mL) e uma alta concentração (2 μ g/mL), preparadas à partir da solução estoque segundo a tabela 2:

Tabela 2- Soluções padrão de nitrito de sódio utilizadas na determinação das condições analíticas. Concentração das soluções usadas, quantidade da solução estoque utilizada e volume completado em balão volumétrico.

Concentração da solução (μ g/mL)	Quant. da solução estoque empregada (mL)	Volume completado (mL)
0,05	1	200
0,4	4	100
2	20	100

Foram usadas três concentrações distintas para avaliar o comportamento da reação de diazotação em diferentes concentrações de nitrito, mantendo a mesma quantidade de reagentes. Foi utilizado também um branco de reagentes contendo 5 mL de solução de sulfanilamida a 0,5% e 3 mL de solução de cloreto de α -naftilenodiamina a 0,5% e o volume foi completado para 50 mL em balão volumétrico com água deionizada e destilada. As análises foram realizadas contra esse branco de reagentes.

Foram realizadas varreduras de 500 a 600 nanômetros (nm) nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 150 e 210 minutos após a adição dos reagentes complexantes (solução de sulfanilamida e de cloreto de α -naftilenodiamina), para a avaliação do melhor comprimento de onda e o melhor tempo para leitura das soluções. A varredura foi realizada no equipamento fazendo leituras de 2 em 2 nm.

3.4- Características de desempenho

3.4.1 – Linearidade

O objetivo da avaliação da linearidade foi observar se existe proporcionalidade entre a concentração analisada e a resposta observada pelo equipamento.

Para avaliação da linearidade foram analisadas soluções padrão de nitrito, obtendo-se uma curva padrão de seis pontos. As concentrações utilizadas foram 0,125; 0,250; 0,5; 1; 2 e 3 $\mu\text{g/mL}$, analisadas em triplicata. Foram determinados, por regressão linear, a equação da curva e o coeficiente de determinação e plotado o gráfico de resíduos. Foi incluída na curva-padrão a concentração de 200 mg de nitrito/kg de produto (correspondente ao ponto de 2 $\mu\text{g/mL}$), limite máximo permitido para a adição de nitrito em produtos cárneos. A curva-padrão foi elaborada em todos os dias de análise, em todas as características de desempenho avaliadas.

3.4.2- Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado para verificar se a matriz escolhida para validação da metodologia analítica interfere nos resultados das análises.

A curva-padrão foi desenvolvida e foram analisadas amostras adicionadas de nitrito em seis concentrações distintas, em triplicata e simultaneamente. A curva-padrão foi desenvolvida com seis pontos conforme descrito no item 3.1.3.1.. Para as amostras adicionadas de nitrito foram usadas as concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 mg de nitrito/kg de produto.

Como delineamento estatístico, a diferença entre as médias dos coeficientes angulares das curvas-padrão com e sem a matriz foram comparadas pelos testes de t, sendo o grau de confiança de 95% (SAMPALHO, 2002).

3.4.3- Seletividade

O objetivo da seletividade foi avaliar, através da análise de amostras de patê de presunto contaminadas com possíveis interferentes, se há alguma interferência nas análises de nitrito por espectrofotometria por parte de alguns aditivos utilizados na tecnologia de fabricação desse produto.

Os possíveis interferentes usados para avaliar a seletividade foram o ácido ascórbico e o eritorbato de sódio, por serem estas substâncias aceleradoras da cura e reagirem com o nitrito acelerando a sua degradação. Os testes de seletividade foram feitos separadamente para cada possível interferente. Ambos foram adicionados à matriz em três concentrações distintas e a concentração de nitrito foi fixada em 200 mg/kg de patê. O interferente foi adicionado à matriz, assim como o nitrito, sendo a matriz homogeneizada após cada adição. Foram elaboradas também amostras controle com a presença do nitrito, mas sem o interferente. O processo de extração usado foi o mesmo descrito no item 3.2.

3.4.3.1-Teste do ácido ascórbico como interferente.

Três diferentes concentrações de ácido ascórbico (3,25 mg/100 g, 6,5 mg/100g e 13 mg/100g) foram adicionadas à matriz. A escolha destas três concentrações foi baseada na tabela de composição dos alimentos, na qual o maior valor encontrado de ácido ascórbico em produtos cárneos foi de 13 mg/100g (Franco, 1992).

Foi pesado 100 g de patê de presunto e adicionado 13 mg de ácido ascórbico (13 mg/100g). Dessa massa, 50 g foram misturadas a outras 50g livres de ácido ascórbico chegando à concentração de 6,5 mg/100g. Novamente foi retirada 50 g da massa de 6,5 mg/100g e misturada a outras 50 g de patê livre de ácido ascórbico, chegando a concentração de 3,25 mg/100g. As amostras foram homogeneizadas e adicionadas de solução de nitrito de sódio na concentração de 200 mg/kg. Foram analisadas amostras brancas de patê de presunto adicionadas de 200 mg de nitrito/kg de patê em triplicata como padrão, sem a adição de ácido ascórbico.

Para este parâmetro, o delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso e as diferenças entre as médias foram comparadas pelos testes de Tukey, sendo o grau de confiança de 95% (SAMPAIO, 2002).

3.4.3.2- Teste do eritorbato de sódio como interferente.

Foram adicionadas na matriz três diferentes concentrações de eritorbato de sódio (2,5; 5 e 7,5 mg de eritorbato de sódio/100g de patê de presunto). Estas concentrações foram escolhidas com o auxílio de referências de uso de eritorbato e formulações comerciais.

Foram pesadas em três béqueres 60 g de patê de presunto. No primeiro béquer foi adicionado 0,450 g de eritorbato, no segundo béquer foi adicionado 0,300 g de eritorbato e no terceiro béquer foi adicionado 0,150 g de eritorbato.

De cada béquer foram pesados 10 g de patê de presunto em cinco repetições para análise e nestas amostras foram adicionadas à solução de nitrito de sódio na concentração de 200 mg/kg de patê. Foram analisadas 5 amostras de matrizes de patê de presunto independentes, contendo apenas nitrito na concentração de 200 mg/Kg.

Para este parâmetro, o delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo o grau de confiança de 95%, segundo (SAMPAIO, 2002).

3.4.4- Limites de detecção e quantificação.

Para estabelecer o limite de detecção do equipamento foram analisadas dez amostras de matrizes brancas de patê de presunto e utilizada a equação “branco+3s”, na qual branco é a média dos valores de concentração obtido pela análise das amostras brancas e “s” é igual ao desvio-padrão dos valores obtidos (The fitness, 1998; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003).

A determinação do limite de detecção do método foi feita através da observação dos coeficientes de variação obtidos das análises feitas na precisão e exatidão do método. Cada uma destas características de desempenho foram analisadas em seis repetições de seis níveis de concentração.

O limite de quantificação foi definido através dos valores da precisão e exatidão, conforme a definição dada a este limite, “O limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis” (The fitness, 1998; BRASIL, 2003a; ORIENTAÇÕES, 2003). Para isto foram avaliados os valores de recuperação obtidos pela característica de desempenho exatidão e os valores obtidos na precisão pela análise de seis concentrações de nitrito adicionadas à matrizes brancas (12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 mg/kg) em seis repetições para cada uma dessas características de desempenho.

3.4.5 – Precisão:

A precisão das análises dentro do processo de validação foi avaliada por duas diferentes ferramentas, a repetitividade e a reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermediária. A repetitividade foi realizada pelo analista envolvido no processo de validação, que executou todas as outras características de desempenho. A variação escolhida na precisão intermediária em relação à repetitividade foi o analista. As análises foram realizadas nas mesmas condições, no mesmo equipamento, foram utilizados os mesmos reagentes, o mesmo local e com intervalo de oito dias.

3.4.5.1. – Precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial:

Nesta avaliação mediu-se o desempenho da metodologia proposta quando executada por outro analista.

Para o teste de precisão intermediária outro analista preparou seis amostras adicionadas de solução de nitrito com seis concentrações distintas (12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 mg de nitrito/kg de patê de presunto). A solução de nitrito foi preparada conforme descrita no item 3.1.3.1., adicionada em cada amostra de 10 g e homogeneizada antes de iniciar o procedimento de extração. Foram também analisadas amostras de matrizes brancas de patê de presunto em seis repetições.

A partir dos valores de concentração obtidos, foram calculados os coeficientes de variação e comparados ao valor de CV obtido pela equação de Horwitz. A equação é a seguinte:

$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10.

No caso desse experimento foi usado mg/Kg, portanto $C = 10^6$. Calculando-se o CV obtêm-se o valor de 16% assim, o coeficiente de variação entre as repetições analisadas pelos dois analistas deve ser inferior a 16%.

3.4.5.2 – Repetitividade:

O objetivo da avaliação da repetitividade foi o de observar a precisão das análises através da comparação dos valores de mesma concentração das seis repetições analisadas de amostras com concentrações distintas.

Nesta característica de desempenho foram analisadas seis amostras adicionadas de solução de nitrito em seis concentrações distintas (12,5; 25; 50; 100; 200 e 300 mg de nitrito/kg de produto). A solução de nitrito foi preparada conforme descrita no item 3.1.3.1. e foi adicionada em cada amostra de 10 g e homogeneizada antes de iniciar o procedimento de extração. Foram analisadas amostras de matrizes brancas de patê de presunto também em seis repetições.

A partir dos valores de concentração obtidos, foram calculados os coeficientes de variação e comparados ao valor de CV obtido pela equação de Horwitz. A equação é a seguinte:

$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, em que C é a fração mássica expressa sob a forma de uma potência de 10.

No caso desse experimento foi usado mg/Kg, portanto $C = 10^6$. Calculando-se o CV obtêm-se o valor de 16% assim, o coeficiente de variação entre as repetições analisadas deve ser inferior a 16%. Porém, em condições de repetitividade, o CV intralaboratorial deve situar-se entre metade e dois terços dos valores definidos para reprodutibilidade. Usando-se dois terços do CV obtido na equação de Horwitz (16%), obtêm-se um coeficiente de variação de 10,7%, o coeficiente de variação entre as repetições analisadas deve ser inferior a esse valor.

3.4.6 – Exatidão

Foram analisadas matrizes brancas adicionadas de solução de nitrito nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200; 300 mg/kg, em seis repetições. A solução padrão de nitrito foi adicionada à matriz, após a pesagem, antes de ser iniciado o processo de extração segundo o item 3.2. Foram analisadas amostras de matrizes brancas de patê de presunto em seis repetições. Após a análise das amostras foi calculada a recuperação obtida de cada amostra através da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_{\text{obtida}}}{C_{\text{esperada}}} \times 100$$

Na qual:

C_{obtida} = Concentração determinada pela análise na amostra adicionada

C_{esperada} = Concentração real adicionada na matriz branca.

Depois de determinadas as recuperações nas diferentes concentrações estudadas, estas foram comparadas ao intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada (Comunidade, 2002). Os valores de recuperação preconizados são de 80 a 110% quando $c \geq 1,0 \times 10^{-8}$, na qual c = fração de massa. Neste experimento, c foi igual a 10^{-6} , pois foi utilizada mg/kg como unidade para nitrito.

3.4.7- Robustez:

Para avaliar a capacidade da metodologia em resistir a pequenas variações de meio ambiente e/ou alterações na metodologia tradicional, foi realizada a robustez.

Tabela 3- Parâmetros variados na robustez, mostrando as três concentrações de nitrito utilizadas nesta característica de desempenho e número de repetições empregadas.

Concentrações de nitrito (mg/kg)	10 gramas		5 gramas	
	Com banho de água fervente	de Com vortex	Com banho de água fervente	de Com vortex
25	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃
200	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃
300	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃	R ₁ , R ₂ , R ₃

Para avaliação da robustez foram utilizadas três concentrações distintas de nitrito (tabela 3), uma de baixa concentração (25 mg/kg de produto), uma de concentração intermediária (200 mg/kg de produto) e uma de alta concentração (300 mg/kg de produto), estas soluções foram escolhidas para abrangência da maior variação possível das concentrações da curva padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

Foram avaliadas a metodologia original (grupo controle), utilizando banho de água fervente e 10 g de amostra (tabela 3) e o processo de extração modificado utilizando ao invés do banho de água fervente o vortex e ao invés de 10 g de amostra 5 g (tabela 3). Para tal, o período do banho de 15 minutos foi substituído por 2 minutos sob agitação no vortex, para isto foram necessários tubos de centrífuga (50 mL) ao invés de béquer de 300 mL. Nos tubos de centrífuga foram pesados 10 g de amostra de patê de presunto, adicionados 5 mL de solução de tetraborato de

sódio e 50 mL de água fervente ao invés de 100 mL.

O modelo estatístico utilizado para análise destes dados foi o inteiramente ao acaso e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo o grau de confiança de 95%, segundo (SAMPAIO, 2002).

4- Resultados e discussão

4.1- Definição das condições analíticas

Os resultados encontrados para definir o comprimento de onda a ser utilizado para leitura das amostras de patê de presunto no espectrofotômetro para análise de nitrito estão demonstrado no gráfico 1 e o tempo de espera para desenvolvimento da reação de cor estão demonstrados nos gráficos 2, 3 e 4 nas três concentrações analisadas.

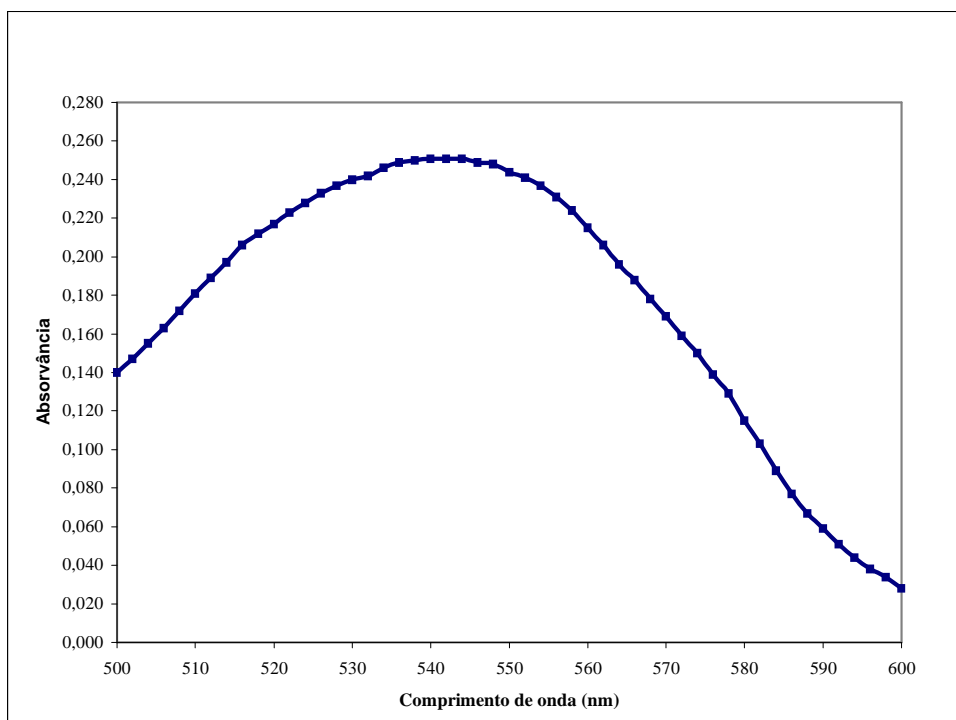


Gráfico 1-Relação entre os comprimentos de onda e as respectivas absorvâncias do complexo formado a partir da reação do nitrito na concentração de 0,4 µg/mL.

Na concentração de 0,05 µg de nitrito/mL foi observado que os maiores valores de absorvância foram expressos nos comprimentos de onda de 538 e 540 nm e a um tempo de espera entre 30 e 90 minutos após a adição dos reagentes complexantes (Gráfico 2). Na concentração de 0,4 µg/mL observou-se que os maiores valores de absorvância foram expressos nos

comprimentos de onda de 538 a 544 e a um período entre 30 e 90 minutos de espera após a adição dos reagentes complexantes (Gráficos 1 e 3). E na concentração de 2 µg/mL os maiores valores de absorvância foram expressos no comprimento de onda de 538 a 540 nm, porém a um tempo de até 20 minutos de espera após a adição dos reagentes complexantes (Gráfico 4).

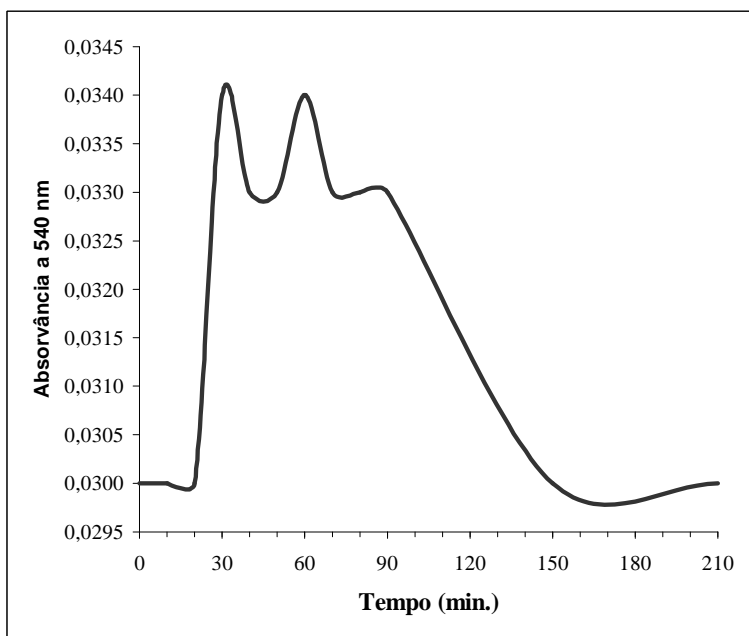


Gráfico 2- Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorbância na concentração de 0,05 µg/mL.

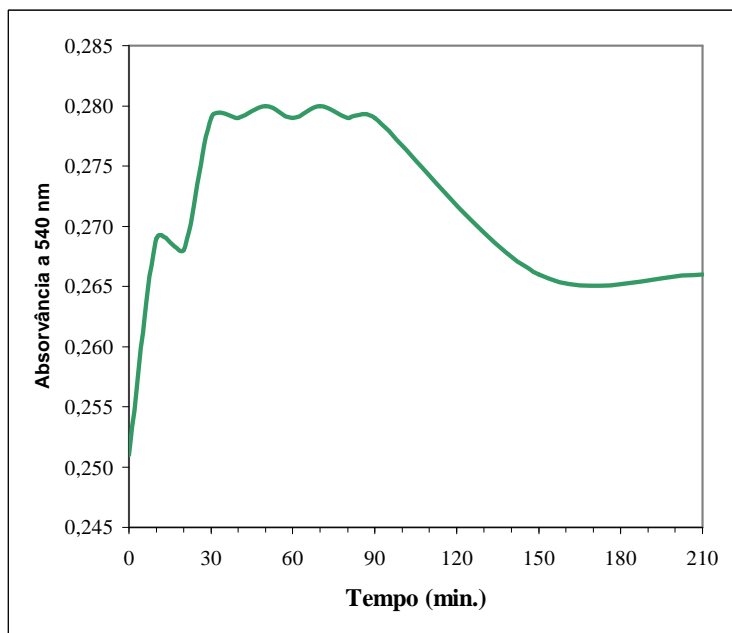


Gráfico 3- Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorbância na concentração de 0,4 µg/mL.

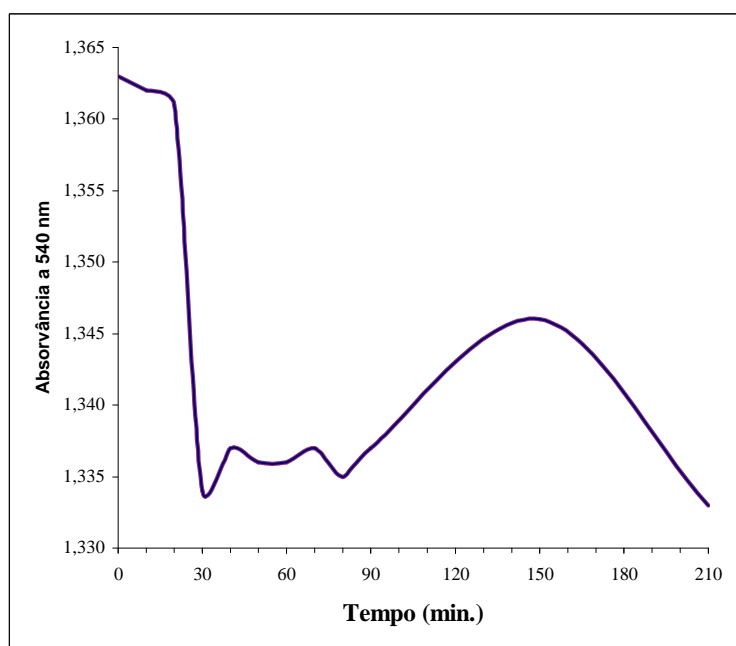


Gráfico 4- Tempo de espera após a adição dos reagentes complexantes, em minutos, por valor de absorvância na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar de os maiores valores de absorvância para a solução de nitrito na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ serem expressos até 20 minutos após a adição dos reagentes complexantes, foi escolhido como melhor tempo de espera entre 40 e 70 minutos, pois é neste período que a reação de cor se estabilizou, período no qual foram obtidos valores constantes de absorvância. No gráfico 4 está demonstrado a variação dos valores de absorvância pelo período de 0 a 210 minutos após a adição dos reagentes complexantes, na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Pode-se observar que até 30 minutos houve queda dos valores de absorvância, o que pode ser explicado pela reação do nitrito com os reagentes complexantes ainda não ter sido estabelecida e após 70 minutos houve uma nova variação dos valores de

absorvância podendo ser explicada pela formação de produtos de degradação. Quanto ao comprimento de onda utilizado, foram definidos os valores de 538 ou 540 nanômetros para a análise espectrofotométrica de nitrito nas três concentrações avaliadas, usando-se nesse experimento o comprimento de onda de 540 nm e o tempo de espera entre 40 e 70 minutos após a adição dos reagentes de cor para a leitura das amostras.

OKAFOR & OGBONNA, 2003 e RINCÓN *et. al.*, 2003 analisaram nitrito e encontraram como melhor comprimento de onda 520 nm, os primeiros autores usaram tempo de espera de 20 minutos após a adição dos reagentes complexantes para fazer a leitura das amostras.

O comprimento de onda preconizado por Official, 1995 para análise espectrofotométrica de nitrito em carnes curadas é de 540 nm e PRINGUEZ *et. al.*, 1995, analisou a presença de nitrito em leite em pó, usando o comprimento de onda de 538 nm, em concordância com os resultados deste experimento.

A metodologia descrita em BRASIL, 1999, base para esta validação, preconiza a utilização de 540 nm de comprimento de onda para leitura e um tempo de espera de 30 minutos após a adição dos reagentes complexantes. Apesar de 30 minutos de tempo de espera ser suficiente para concentrações de nitrito mais baixas, como a concentração de 0,05 µg/mL o ideal é usar o mínimo de 40 minutos de espera, pois abrange

das concentrações de nitrito mais baixas até as mais altas (Gráficos 2, 3 e 4).

Portanto, após a adição dos reagentes complexantes deve-se esperar 40 minutos para fazer a leitura das amostras para otimização da reação de cor, estabilidade da reação e maior expressão da absorvância, porém, este tempo de espera ou o tempo da análise de todas as amostras preparadas não pode ultrapassar 70 minutos, pois após este período inicia-se a formação de produtos de degradação.

4.2- Linearidade

Os resultados encontrados para avaliação da linearidade estão demonstrados no gráfico 5.

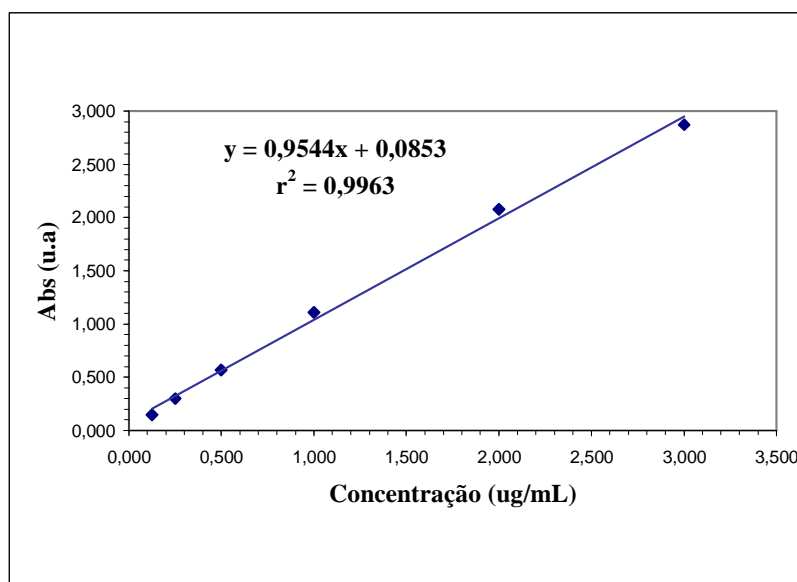


Gráfico 5 – Representação gráfica de uma das curvas de calibração dos padrões de nitrito, com a equação da reta e valor do coeficiente de determinação (r^2).

Os coeficientes de determinação (r^2) variaram de 0,9943 a 0,9976, sendo todos eles superiores ao usualmente requerido, proposto por CHASIN *et*

al. (1998), onde são preconizados como satisfatório os coeficientes de determinação acima de 0,98.

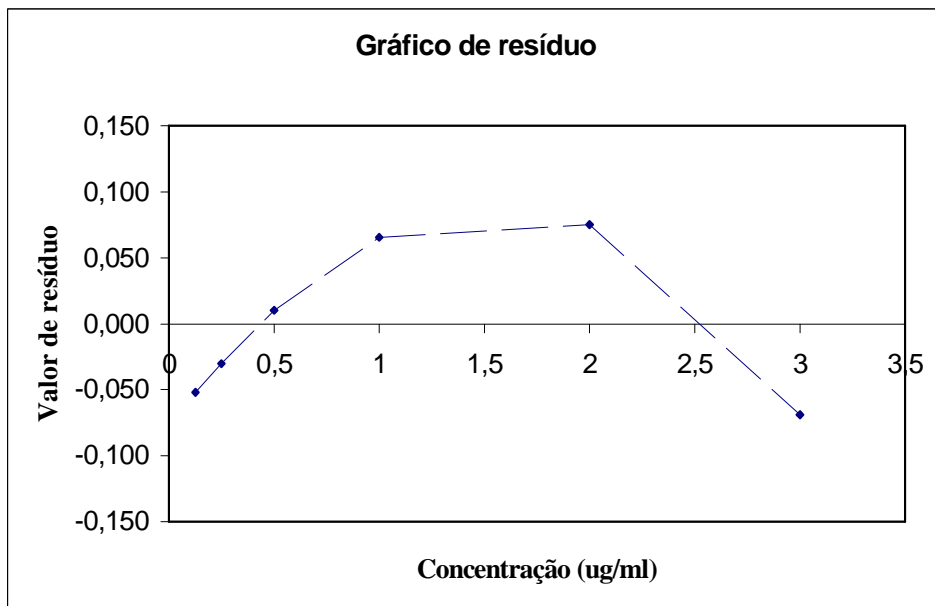


Gráfico 6 – Valores de resíduo x concentrações analisadas.

Os valores de resíduo foram calculados obtendo-se a média dos valores obtidos nas curvas-padrão e fazendo-se a diferença entre y observado e y esperado. Observa-se que todos os pontos estão praticamente equidistantes do ponto zero (-0,5 a + 0,5 u.a.), onde y observado – y esperado seria zero. No gráfico de resíduos, os pontos de maiores dispersão foram os de 2 $\mu\text{g/ml}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$ com os valores de 0,075 e menos (-) 0,069.

4.3- Seletividade

4.3.1.- Teste do ácido ascórbico como interferente

Os resultados de seletividade testando como interferente o ácido ascórbico são mostrados na tabela 4. Foram comparadas as concentrações

das amostras adicionadas de ácido ascórbico nas diferentes concentrações e 200 mg de nitrito/kg de produto com aquelas amostras adicionadas apenas de 200 mg de nitrito/kg de produto. Pode-se observar que a concentração de nitrito obtida na amostra que continha apenas nitrito foi igual estatisticamente às concentrações de nitrito observadas nas amostras que continham nitrito e ácido ascórbico na concentração de 3,25; 6,5 e 13 mg/100g de patê. Isto demonstra que o ácido ascórbico não interfere na quantificação de nitrito, pois, independente da concentração de ácido ascórbico existente na amostra, os valores de nitrito foram mantidos. Os tratamentos analisados (nitrito com ácido ascórbico) obtiveram valores de concentração de nitrito iguais ao grupo controle (apenas nitrito).

Tabela 4- Efeito da adição de ácido ascórbico na quantificação de nitrito. Em todas as amostras foi adicionado 200 mg de nitrito/kg de patê

Adição de ác. Ascórbico (mg/100g)	nitrito (mg/kg)
0	204,53 ^a ± 13,05
3,25	173,07 ^a ±28,03
6,5	197,32 ^a ±13,91
13	193,58 ^a ±13,89

Letras minúsculas distintas na coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.3.2 – Teste do eritorbato de sódio como interferente

Os resultados de seletividade testando como interferente o eritorbato de sódio são demonstrados na tabela 5. Foram comparadas as

concentrações obtidas nas amostras analisadas que continham apenas nitrito àquelas que continham nitrito e eritorbato de sódio nas concentrações de 2,5; 5 e 7,5 mg/100g. Todas as análises foram feitas em cinco repetições.

Tabela 5- Efeito da adição de eritorbato de sódio na quantificação de nitrito. Em todas as amostras foram adicionados 200 mg de nitrito/kg de patê.

Adição de eritorbato de sódio (mg/100g)	nitrito (mg/kg)
0	209,32 ^a ±1,9
2,5	189,08 ^{ab} ±5,3
5	173,05 ^b ±22,1
7,5	134,05 ^c ±20,2

Letras minúsculas distintas na coluna indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (P≤0,05).

Conforme observado, o eritorbato de sódio interferiu nas análises de nitrito por espectrofotometria acima da concentração de 2,5 mg de eritorbato de sódio/100g de patê. A média da concentração de nitrito obtida nas amostras contendo nitrito e 2,5 mg de eritorbato de sódio/100g de patê foi igual estatisticamente ao valor obtido no grupo controle (contendo apenas nitrito). Já a média de nitrito das amostras que continham nitrito e 5 mg de eritorbato/100g e nitrito e 7,5 mg de eritorbato/100g diferiram estatisticamente dos valores obtidos no grupo controle.

Para solucionar o efeito da interferência do eritorbato de sódio nas análises espectrofotométricas de nitrito devem ser tentadas três alternativas: Mudar o comprimento de onda utilizado para análise de nitrito, nesse caso, deve ser tentado a utilização de um comprimento de onda onde haja menor interferência do eritorbato, mesmo sendo um comprimento de onda de menor expressão de nitrito; Associar outra metodologia ao método

espectrofotométrico; ou tentar desativar o eritorbato de sódio durante o processo de extração da amostra. Estas opções podem ser tentada como continuação desse experimento.

4.4- Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado através da comparação dos valores de coeficiente angular (a) das curvas obtidas das amostras com e sem a matriz. Os valores de coeficiente angular foram de 0,9136; 0,9525 e 0,9535 para as equações das curvas padrão com adição de padrão na matriz e de 0,9118; 0,9543 e 0,9648 para as curvas-padrão sem adição na matriz. A média dos valores de coeficientes angular foram comparadas pelo teste de t, no qual o t calculado (0,0982) foi menor que o t tabelado (4,032), sendo o grau de confiança de 95%, não sendo identificado efeito de matriz (Sampaio, 2002).

4.5- Limite de detecção e quantificação

Para definição do limite de detecção do equipamento, foram realizados cálculos pela fórmula “0+3s” (ORIENTAÇÕES, 2003), onde a média dos valores obtidos nas matrizes brancas foi 7,225 mg de nitrito/Kg de produto e o valor do desvio padrão “s” foi igual a 0,78, portanto o valor obtido pela aplicação da fórmula foi de 9,56 mg de nitrito/kg de patê, considerado o limite de detecção do equipamento.

Foi observada experimentalmente a média de recuperação de doze amostras adicionadas de nitrito na concentração de 12,5 mg/kg e foi definido o limite de detecção do método como 12,5 mg de nitrito/kg de patê. Este resultado baseou-se nos valores de recuperação e precisão aceitáveis conforme Comunidade, (2002), na qual os valores de recuperação aceitáveis são de 80 a 110% e os valores de coeficiente de variação aceitáveis são de 10,7 para repetitividade e 16% para condições de reprodutibilidade intralaboratorial (Comunidade, 2002). Os valores de recuperação obtidos nesta concentração variou de 35 a 84%, encontrando-se apenas um valor de recuperação, em 12 amostras, acima de 80%. Para os valores de

precisão, nos dois níveis analisados, a concentração de 12,5 mg de nitrito/Kg de patê foi a única que obteve valores de coeficiente de variação maiores do que os valores aceitáveis pela Directiva 2002/657/CE (Comunidade, 2002).

O limite de quantificação foi de 25 mg de nitrito/kg de produto, esta foi a segunda menor concentração utilizada na curva-padrão. Foram realizadas doze análises de matrizes brancas adicionadas de nitrito nesta concentração e a média de recuperação dessas amostras foi de 81% e o coeficiente de variação foi de 10,3%, atendendo aos critérios descritos como aceitáveis para exatidão e precisão conforme a Directiva 2002/657/CE (Comunidade, 2002).

Estão demonstrados no gráfico 7 os valores de dispersão da recuperação nos limites de detecção e quantificação. Pode-se observar que os valores de recuperação da concentração de 12,5 mg de nitrito/kg de patê ficaram bem abaixo daqueles obtidos na concentração de 25 mg de nitrito/kg de patê.

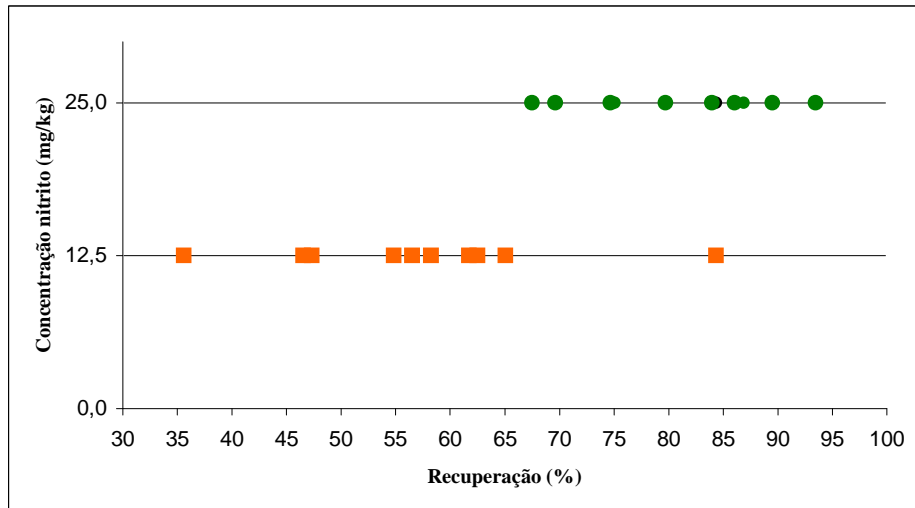


Gráfico 7– Dispersão dos valores de recuperação no limite de detecção e quantificação.

O limite de quantificação obtido (25 mg de nitrito/kg de produto) está bem abaixo do limite máximo permitido pela legislação (200 mg de nitrito/kg de produto) segundo BRASIL (1997),

demonstrando assim a eficiência do método em quantificar nitrito.

4.6- Precisão

4.6.1- Repetitividade

De acordo com a Directiva 2002/657/CE da Comunidade, (2002) o intervalo de variação aceitável para precisão em condições de repetitividade é de 10,7%. Este valor foi calculado a partir da equação de Horwitz ($CV = 2^{(1-0,5 \log c)}$) utilizada para a reprodutibilidade intralaboratorial, no caso de repetitividade o valor de CV deve ser igual a 2/3 do valor

calculado para reprodutibilidade intralaboratorial.

Os resultados encontrados na repetitividade das análises estão demonstrados na tabela 6. Os coeficientes de variação entre as seis repetições independentes do mesmo nível de concentração de nitrito ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela Directiva 2002/657/CE da Comunidade, (2002).

Tabela 6- Valores de concentração obtidos na repetitividade em seis repetições das seis concentrações de nitrito analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação.

Concent. (mg/kg)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	CV (%)
25	23,36	21,51	21,73		20,99	22,38	4,2
50	50,70	50,96	51,06	48,90	49,81	51,73	2,0
100	105,48	110,42	107,21	107,17	110,66	105,35	2,1
200	197,41	201,99	206,93	207,32	206,41	205,65	1,9
300		295,56	293,29	293,18	292,77	294,58	0,4

4.6.2- Precisão intermediária

Conforme pode ser observado nos dados obtidos (tabela 8), o método é reprodutível por outro analista, no mesmo laboratório e equipamento. Os níveis de concentração estudados (25; 50; 100; 200 e 300 mg/kg), em seis repetições totalmente independentes, obtiveram coeficientes de variação dentro dos padrões estabelecidos

pela Directiva 2002/657/CE da Comunidade (2002), que é de 16% conforme demonstrado na equação de Horwitz. Na equação $CV = 2^{(1-0,5 \log c)}$, c é a fração mássica utilizada, no caso deste experimento $c = 10^{-6}$, pois a fração mássica utilizada foi mg/kg. A tabela 7 indica os valores obtidos nas análises executadas pelo analista na reprodutibilidade intralaboratorial.

Tabela 7- Valores de concentração obtidos na reprodutibilidade intralaboratorial ou precisão intermediária em seis repetições das seis concentrações de nitrito analisadas e respectivos valores de coeficiente de variação.

Concent. (mg/kg)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	CV (%)
25	18,77	18,67	16,88	17,40	21,09	19,93	8,3
50	51,42	51,10	50,36	49,63	51,84	51,63	1,7
100	106,39	103,02	106,28	107,33	105,54	106,07	1,4
200	210,64	206,85	202,32	208,01	207,80	208,22	1,3
300	291,20	293,2	290,89	295,52	290,15	293,73	0,7

Para o cálculo dos valores de coeficiente de variação obtidos na reprodutibilidade foram consideradas as tabelas 6 e 7, representando os valores obtidos nas análises pelos dois analistas

participantes dessa característica de desempenho. Os valores de coeficiente de variação obtidos na reprodutibilidade intralaboratorial foram os seguintes (tabela 8):

Tabela 8 – Valores de desvio padrão e coeficientes de variação obtidos na reprodutibilidade intralaboratorial.

Concentração (mg/kg)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
25	2,087	10,3
50	0,921	1,8
100	2,116	2,0
200	3,571	1,7
300	1,785	0,6

Em todas as concentrações estudadas o coeficiente de variação dos valores obtidos na repetitividade e reprodutibilidade foram menores que 16%, conforme equação de Horwitz (Comunidade, 2002).

4.7- Exatidão

Na tabela 9 são encontrados os valores de recuperação obtidos no teste de exatidão.

Tabela 9- Valores de recuperação obtidos na exatidão, respectivos intervalo de variação aceitável na faixa de concentração de nitrito estudada e coeficientes de variação.

Concentração (mg/kg)	Valores de recuperação (%)	Intervalo de variação aceitável (%)	Valores de CV (%)
25	84 a 93	80 a 110	4,1
50	97,8 a 103,5	80 a 110	2,0
100	105,4 a 110,7	80 a 110	2,2
200	98,7 a 103,7	80 a 110	1,9
300	97 a 98	80 a 110	0,4

Nas concentrações de 25; 50; 100; 200 e 300 mg de nitrito/kg de patê os valores de recuperação encontraram-se todos dentro do intervalo de variação aceitável. Foi observado que quanto maior as concentrações analisadas, maiores são os valores de recuperação e menores são os coeficientes de variação observados, pois quanto mais analito, menor é a interferência causada por

perdas (gráfico 8). Pode-se observar que os valores de recuperação ficaram dentro do intervalo aceitável segundo a Directiva 2002/657/CE, em todas as concentrações estudadas (Comunidade, 2002).

O gráfico 8 representa a dispersão dos valores de recuperação em cada concentração estudada.

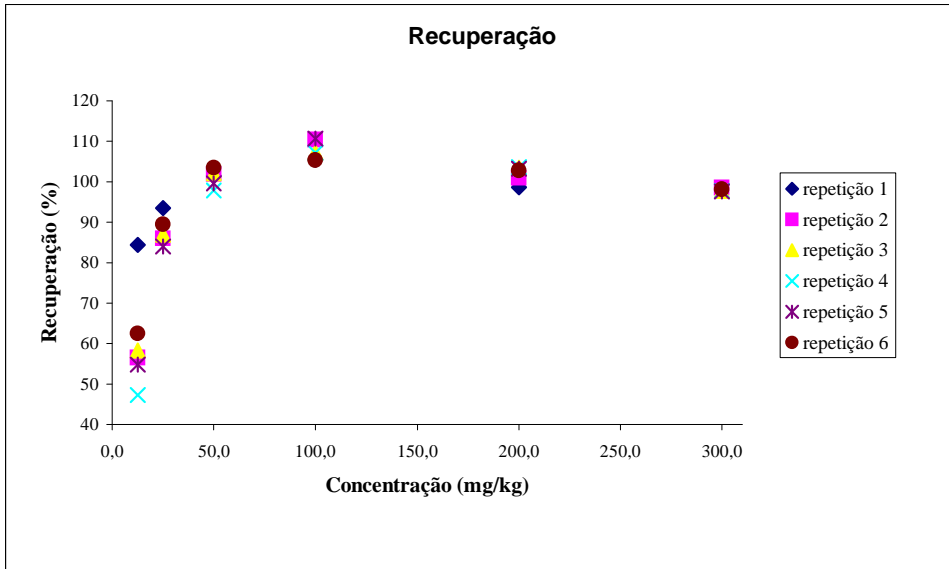


Gráfico 8- Dispersão dos valores de recuperação nas seis repetições das concentrações de nitrato analisadas.

4.8- Robustez

Os resultados encontrados para robustez estão descritos na tabela 10.

Tabela 10- Valores de concentração obtidas nas análises de robustez nas variações analisadas e nas três concentrações de nitrito estudadas.

Concentrações	Massa de Amostra			
	5 g		10 g	
	Banho	Vortex	Banho	Vortex
25 ppm	15,02	16,27	23,45	21,99
	16,90	16,90	23,34	22,82
	17,10	16,90	23,34	22,82
Média	16,34	16,69	23,38	22,54
CV(%)	7,0	2,2	0,3	2,1
Desvio padrão	1,15	0,36	0,06	0,48
200 ppm	215,00	212,09	208,32	199,26
	215,00	212,71	207,80	203,32
	215,00	213,33	208,32	202,39
Média	215,00	212,71	208,15	201,66
CV(%)	0,0	0,3	0,1	1,1
Desvio padrão	3,81E-06	6,25E-01	3,01E-01	2,13E+00
300 ppm	312,07	307,28	291,13	286,34
	309,16	310,20	288,32	284,88
	313,12	308,33	283,94	287,69
Média	311,45	308,60	287,80	286,30
CV(%)	0,7	0,5	1,3	0,5
Desvio padrão	2,052	1,478	3,622	1,406

Pode ser observado na tabela 11, que a quantidade de amostra a ser pesada para análise de nitrito por espectrofotometria é dependente da concentração de nitrito existente na amostra. Portanto, para amostras contendo 25 mg de nitrito / Kg de patê recomenda-se pesar 10 gramas de patê, de acordo com a metodologia tradicional (Brasil, 1999). Já para amostras contendo 200 ou 300 mg de nitrito / Kg de patê

deve-se pesar 5 gramas de amostra para análise espectrofotométrica de nitrito, o que facilitaria o procedimento de extração do analito devido à maior agilidade de se pesar 5 gramas de amostra do que 10 gramas de amostra quando são feitas muitas análises no mesmo dia, considerando que para análise de nitrito, a extração do analito deve ser feita no mesmo dia.

Tabela 11 – Concentrações de nitrito analisadas na robustez pesando-se 5 e 10g de amostra e resultados obtidos nas análises estatísticas.

Concentração (mg/kg)	Volume de amostra pesado	
	5g	10g
25	16,51 ^b	22,96 ^a
200	213,86 ^a	204,90 ^b
300	310,03 ^a	287,05 ^b

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de tukey (P≤0,05).

Conforme pode ser demonstrado (Tabela 12), o método de extração utilizado no procedimento analítico também foi dependente da concentração de nitrito contida na amostra. Em amostras contendo 25 mg de nitrito / Kg de patê ambos os métodos de extração do analito foram eficientes. Porém, para concentrações de 200 ou 300 mg de nitrito / Kg de patê recomenda-se a extração do

analito por 15 minutos em banho de água fervente, pois esse foi estatisticamente superior quando comparado aos resultados obtidos na extração do analito por dois minutos em vortex. Para efeito de padronização recomenda-se a extração do analito por banho de água fervente por 15 minutos por este método abranger, com eficiência, toda a faixa de concentração estudada.

Tabela 12 – Concentrações de nitrito analisadas na robustez, utilizando-se os dois métodos de extração propostos e resultados obtidos nas análises estatísticas.

Concentração (mg/kg)	Volume de amostra pesado	
	vortex	Banho de água fervente
25	19,62 ^a	19,86 ^a
200	207,18 ^b	211,58 ^a
300	297,45 ^b	299,62 ^a

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam médias estatisticamente diferentes pelo teste de tukey (P≤0,05).

5- Conclusões:

Para análise espectrofotométrica de nitrito em patê de presunto deve ser utilizado o comprimento de onda de 538 ou 540 nm para leitura das amostras e deve-se esperar 40 minutos, e não mais que 70 minutos, após a adição dos reagentes complexantes para fazer a leitura das amostras. O método possui linearidade nas concentrações de 0,125 a 3 µg/mL. Os resultados espectrofotométricos para nitrito em patê de presunto não sofrem interferência do ácido ascórbico e ocorre a interferência do eritorbato de sódio nas concentrações acima de 2,5 mg/100 g de produto na análise de nitrito por espectrofotometria. A matriz patê de presunto não interfere nas análises espectrofotométricas de nitrito. O limite de detecção do método estabelecido para análise de nitrito em patê de presunto por espectrofotometria foi de 12,5 mg de nitrito/kg de patê e o limite de quantificação foi de 25 mg de nitrito/kg de patê. O método avaliado possui repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial. O método não é robusto no que diz respeito à utilização de outro método de extração do analito, devendo ser utilizado o banho de água fervente por 15 minutos como preconizado na metodologia tradicional. Quanto ao volume de amostra a ser pesado, devem ser pesados 10 g. de amostra para concentrações de nitrito de 25 mg / Kg e devem ser pesados 5 g. de amostra para concentrações de nitrito mais altas

(200 ou 300 mg de nitrito / Kg de patê). O método possui valores de recuperação dentro dos limites estabelecidos.

6- Referências bibliográficas

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico : “Atribuição de função de aditivos e seus Limites máximos de uso para a categoria 8-carne e produtos cárneos”. Portaria, nº 1004 de 11 de dez. 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dez. 1998. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 31/01/2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Determina a publicação do guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE, nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. 2003 (a). Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 31/01/2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691 de 29 de mar. 1952 e alterações. **Diário Oficial da União**. Brasília, 07 de jul. de 1952. Atualizado em 1997. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 23/08/2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Carnes, Produtos Cárneos e seus Ingredientes, Sal e Salmoura. Instrução Normativa, nº 20 de 9 de set. 1999. **Diário Oficial da União**. Brasília, 27 de jul. de 1999. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 31/08/2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Adota o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre critérios para validação de métodos analíticos. Instrução Normativa, nº46 de 10 de jun. 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 11 de jun. de 2003 (b). Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 05/01/06.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical Method validation: Validation Sufficient for an analysis Method. **Mikrochimica Acta**, v.128, p. 93-106, 1998.

CASSENS, M.L.; GREASER, M.L.; ITO, T. LEE, M. Reactions of nitrite in meat. **Food technology**, p. 46-56, 1979.

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

CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M. J. Cured colour development during sausage processing. **Meat science**, v.44, n.3, p.203-211, 1996

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

CHRISTIAN, G. D. **Analytical chemistry**. 5. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1994. 812p.

CHRISTIAN, G. D.; O'REILLY, J. E. **Instrumental analysis**. 2. ed. Massachusetts: Allyn and Bacon, 1986. 933p.

CODEX alimentarius: resíduos de medicamentos

veterinários nos alimentos. 2. ed. Roma: FAO/OMS, 1993. v. 3.

COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPÉIA. Decisão da comissão de 12 de agosto de 2002 dá execução ao disposto na Directiva 2002/657/CE do conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, 2002, p. L 221/8 – L 221/36

DESROSIER, N.W.; DESROSIER, J. N. **The technology of food preservation**: 4. ed. Wesport-connecticut: Avi Publishing Company, 1977. 558p.

FARIA, J. A. F.; FELÍCIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados: revisão. **Revista TeC Carnes**, v. 3, n. 2, p.16-22, 2001. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/teccarnes/artigos.htm>>. Acesso em: 24/05/05.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed. Wisconsin-Madison: Marcel Dekker, 1996. 1067p.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992.

FURIA, T. E. **Handbook of food additives**: Palo Alto: CRC, 1972. 2v. 998p.

HARADA, M. M.; SILVA, M.L. Nitrito e nitrato x segurança alimentar. **Revista Nacional da Carne**, v.308, p. 105-106, 2002.

HARDISSON, A.; GONZÁLEZ PADRÓN, A.; FRÍAS, I.; REGUERA, J. I. The Evaluation of the Content of Nitrates and Nitrites in Food Products for Infants. **Journal of food composition and analysis**, v.9, p.13-17, 1996.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 862p.

KILIC, B. Residual nitrite: a concern in cured meat products. **Meat processing**, v.39, p.40-41, 2000.

LEITE; F. **Validação em análise química**. Campinas-SP: Átomo, 1996. 124p

- MAGA, J. A.; TU, A. T. **Food additive toxicology**: Fort Collins: Marcel Dekker, 1994. 542p.
- MILLER, S. A. Balancing the risks regarding the use of nitrites in meat. **Food Technology**, 1980.
- NOEL, P.; BRIAND, E.; DUMONT, J. P. Role of nitrite in flavor development in uncooked cured meat products: sensory assesment. **Meat Science**, v.28, p.1-8, 1990
- OFFICIAL Methods of Analysis. 16. ed. Virginia: AOAC, 1995. Vol. II. Method 973.31. Nitrite in cured meat.
- ORIENTAÇÕES SOBRE validação de métodos de ensaios químicos**: revisão 01: INMETRO, 2003. 36p.
- OKAFOR, P. N., OGBONNA, U. I. Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marked in South-Eastern Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 213-218, 2003.
- OZTEKIN, 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**. 2. ed. Goiânia: UFG, 2001. 2v. 519p.
- PRINGUEZ, E.; SAUDE, I.; HULEN, C. Improvement of Standard Method IDF 95A:1984 for Determination of the Nitrate and Nitrite Contents of Dried Milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.8, p.344-350, 1995.
- RINCÓN, F.; MARTÍNEZ, B.; DELGADO, J. M. Detection of factors influencing nitrite determination in meat. **Meat Science**, v. 65, p. 1421-1427, 2003.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**: São Paulo: Nobel, 1985. 274p.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NUMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
- SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F.; ALLEN, C. E. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: a review. **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 9, p. 739-770, 1979.
- THE FITNESS for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics: EURACHEM, 1998. 61p
- THOMPSON; M.; ELLISON, S. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- ÜREN, A.; BABAYIGIT, D. Colour parameters of turkish-type fermented sausage during fermentation and ripening. **Meat Science**, v.45, n.4, p.539-549, 1997
- VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. 5. ed. Mestre Jou: 1981. 81p.
- WILLARD, H; MERRITT, L. JR.; DEAN, J. **Análise instrumental**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979. 986p.

7- APÊNDICE

7.1- Linearidade

Valores de y observado:

Concentração (mg/kg)	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão7	Média
0,125	0,157	0,139	0,149	0,151	0,147	0,149	0,149	0,149
0,25	0,301	0,292	0,281	0,280	0,297	0,288	0,291	0,290
0,5	0,576	0,575	0,567	0,572	0,569	0,536	0,589	0,569
1	1,103	1,087	1,095	1,098	1,109	1,108	1,116	1,102
2	2,072	1,981	2,087	2,077	2,078	2,069	2,110	2,068
3	2,885	2,763	2,927	2,904	2,873	2,882	2,919	2,879
Coefficiente angular	0,9544	0,9118	0,9736	0,9649	0,9544	0,9601	0,9703	0,9556
Coefficiente linear	0,0888	0,0947	0,0688	0,0747	0,0853	0,0719	0,0839	0,0812
r ²	0,9971	0,9960	0,9976	0,9973	0,9963	0,9968	0,9964	0,9969

Valores de y esperado:

Concentração (mg/kg)	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão7	Média
0,125	0,208	0,209	0,190	0,195	0,205	0,192	0,205	0,201
0,25	0,327	0,323	0,312	0,316	0,324	0,312	0,326	0,320
0,5	0,566	0,551	0,556	0,557	0,563	0,552	0,569	0,559
1	1,043	1,007	1,042	1,040	1,040	1,032	1,054	1,037
2	1,998	1,918	2,016	2,005	1,994	1,992	2,024	1,992
3	2,952	2,830	2,990	2,969	2,948	2,952	2,995	2,948

Valores de resíduo (y observado – y esperado):

Concentração (mg/kg)	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6	Padrão7	Média
0,125	-0,051	-0,070	-0,041	-0,044	-0,057	-0,043	-0,056	-0,052
0,25	-0,026	-0,031	-0,031	-0,036	-0,027	-0,024	-0,035	-0,030
0,5	0,010	0,024	0,011	0,015	0,006	-0,016	0,020	0,010
1	0,060	0,080	0,053	0,058	0,069	0,076	0,062	0,065
2	0,074	0,063	0,071	0,072	0,084	0,077	0,086	0,075
3	-0,067	-0,067	-0,063	-0,065	-0,075	-0,070	-0,076	-0,069

7.2- Seletividade

7.2.1- Ácido ascórbico:

Fonte de variação	GL	QM
Tratamento	3	5.462.732
Erro	8	2.945.684

Coefficiente de variação: 8,933

7.2.2- Eritorbato de sódio:

Fonte de variação	GL	QM
Tratamento	3	5.082.573
Erro	16	2.322.721

Coefficiente de variação: 8,641

7.3- Efeito de matriz:

Concentração (mg/kg)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Média matriz	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Média padrão
0,125	0,154	0,163	0,171	0,163	0,157	0,151	0,139	0,149
0,25	0,286	0,267	0,279	0,277	0,301	0,28	0,292	0,291
0,5	0,554	0,575	0,58	0,570	0,576	0,572	0,575	0,574
1	1,067	1,068	1,097	1,077	1,103	1,098	1,087	1,096
2	1,978	2,054	2,067	2,033	2,072	2,077	1,981	2,043
3	2,767	2,874	2,879	2,840	2,885	2,904	2,763	2,851
Coefficiente angular	0,9136	0,9535	0,9526	0,9399	0,9544	0,9649	0,9118	0,9437
Coefficiente linear	0,0875	0,0743	0,0873	0,0830	0,0888	0,0747	0,0947	0,0861
r ²	0,9972	0,9976	0,9971	0,9973	0,9971	0,9973	0,9960	0,9969

Variância matriz: 0,00428

Variância padrão: 0,00448

Cálculo de t:

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\sqrt{\frac{s^2(a_1)}{n} + \frac{s^2(a_2)}{n}}}$$

$$t = \frac{0,9437 - 0,9399}{\sqrt{\frac{0,0045}{6} + \frac{0,0043}{6}}}$$

t = 0,0982

7.4- Limite de detecção:

Limite de Detecção

Curva	Abs
conc. (ug/mL)	Abs
0,125	0,141
0,250	0,289
0,500	0,571
1,000	1,102
2,000	2,095
3,000	2,883
Inclinação	0,9616
Intercepção	0,0783
R-quadrado	0,9961

Matrizes brancas

Repetição	Abs	Conc. NO(□g/mL)	mg/Kg
1	0,012	0,07	6,900
2	0,012	0,07	6,900
3	0,013	0,07	6,796
4	0,012	0,07	6,900
5	0,004	0,08	7,732
6	0,015	0,07	6,588
7	0,015	0,07	6,588
8	0,014	0,07	6,692
9	0,016	0,09	8,630
10	0,017	0,09	8,520
Média	0,0130	0,0722	7,225
Desvio	0,0036	0,0078	0,78
CV (%)	27,9	10,8	10,82

Limite de detecção do equipamento = "branco + 3s", no qual:

Média branco = 7,225 mg/Kg e s = 0,78

Limite de detecção do equipamento = (7,225 + (3 * 0,78)) = 9,5650

7.5- Repetitividade:

Conc. (mg/Kg)	rep.1	rep. 2	rep. 3	rep. 4	rep. 5	rep. 6	Média Mat.	Desv. Pad.	CV (%)
12,5	10,54	7,06	7,28	5,92	6,85	7,82	7,13	1,58	22,2
25,0	23,36	21,51	21,73		20,99	22,38	21,42	0,91	4,3
50,0	50,70	50,96	51,06	48,90	49,81	51,73	50,64	1,01	2,0
100,0	105,48	110,42	107,21	107,17	110,66	105,35	108,60	2,33	2,1
200,0	197,41	201,99	206,93	207,32	206,41	205,65	206,47	3,88	1,9
300,0		295,56	293,29	293,18	292,77	294,58	293,23	1,16	0,4

Valor da repet. = 10,4%

7.6- Precisão intermediária ou reprodutibilidade intralaboratorial:

conc. (mg/Kg)	Reprodutibilidade						Repetibilidade						Média	Desv.	CV (%)
	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 4	rep. 5	rep. 6	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 4	rep. 5	rep. 6			
12,5	9,1	7,7	5,8	8,1	4,4	8,6	10,5	7,1	7,3	5,9	6,9	7,8	7,44	1,61	21,7
25	18,8	18,7	16,9	17,4	21,1	19,9	23,4	21,5	21,7		21,0	22,4	20,25	2,09	10,3
50	51,4	51,1	50,4	49,6	51,8	51,6	50,7	51,0	51,1	48,9	49,8	51,7	50,76	0,92	1,8
100	106,4	103,0	106,3	107,3	105,5	106,1	105,5	110,4	107,2	107,2	110,7	105,4	106,74	2,12	2,0
200	210,6	206,9	202,3	208,0	207,8	208,2	197,4	202,0	206,9	207,3	206,4	205,6	205,80	3,57	1,7
300	291,2	293,2	290,9	295,5	290,1	293,7		295,6	293,3	293,2	292,8	294,6	293,10	1,78	0,6

Valor de CV na reprod = 16%

7.7- Exatidão:

conc. (mg/Kg)	Matriz 1	Matriz 2	Matriz 3	Matriz 4	Matriz 5	Matriz 6	Média Mat.	CV (%)	Varição da rec.
12,5	84,4	56,5	58,2	47,3	54,8	62,5	66,4	19,1	47%-84%
25,0	93,5	86,0	86,9		84,0	89,5	88,8	4,1	84%-93%
50,0	101,4	101,9	102,1	97,8	99,6	103,5	101,8	2,0	97,8%-103,5%
100,0	105,5	110,4	107,2	107,2	110,7	105,4	107,7	2,2	105,4%-110,7%
200,0	98,7	101,0	103,5	103,7	103,2	102,8	101,1	1,9	98,7%-103,7%
300,0		98,5	97,8	97,7	97,6	98,2	98,1	0,4	97%-98%

7.8- Robustez:

FV	GL	QM
Nível (N)	2	243285.5
Método (M)	1	4.630.624
Peso (P)	1	6.494.093
N x M	2	12.93172 ^{ms}
N x P	2	6.498.040
M x P	1	4.054.930
Erro	26	2.613.400

Coefficiente de variação = 0,919