

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

**Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação
de nitrito em carnes processadas por espectroscopia molecular
após solubilização alcalina da amostra**

Eliane Freire Anthonisen

Pelotas, 2013

Eliane Freire Anthonisen

Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de
nitrito em carnes processadas por espectroscopia molecular após
solubilização alcalina da amostra

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Química. Área do conhecimento:
Química Analítica e Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A628d Anthonisen, Eliane Freire

Desenvolvimento e validação de metodologia para a determinação de nitrito em carnes processadas por espectroscopia molecular após solubilização alcalina da amostra / Eliane Freire Anthonisen ; orientador Anderson Schwingel Ribeiro; co-orientador Hueder Paulo Moisés de Oliveira.- Pelotas,2013.-73f. : il.
-Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Química. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Nitrito 2.Solubilização alcalina 3.Preparo de amostras
4.Produutos cárneos 5.Espectroscopia de absorção molecular UV-Vis I.Ribeiro, Anderson Schwingel(orientador) II .Título.

CDD 544

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

Prof.^a Dr.^a Adriane Medeiros Nunes

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro, pela oportunidade de realizar este trabalho e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira, pela paciência ao responder alguns questionamentos sobre o trabalho.

A minha colega de Iniciação Científica Mariana, pela paciência, dedicação, coleguismo e amizade, ingredientes essenciais para a realização deste trabalho. E também pelos momentos de descontração, apoio e pensamento positivo, valeu Mari, muito obrigada.

A minha colega e amiga Meibel, pelas palavras de incentivo, por ter me ensinado como fazer pesquisa e principalmente pela sua amizade e carinho durante todo o tempo que estivemos juntas, tanto nas aulas como nas atividades de laboratório. Muito obrigada.

Ao meu colega Eliézer, que nunca deixou de me responder e de me ajudar tanto no trabalho experimental, como nas disciplinas com seu conhecimento e boa vontade. Muito obrigada.

Aos meus colegas, Richard, Camila, Michele, Rodrigo, Marta, Carol, Eliete, pelos bons momentos vividos no laboratório.

Aos professores, que através do conhecimento que foi transmitido, colaboraram para a minha formação.

Ao meu esposo Denilson Anthonisen, pela compreensão, paciência e incentivo durante o tempo do mestrado.

Resumo

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a determinação de nitrito em carnes processadas por espectroscopia de absorção molecular UV-Vis, onde o preparo das amostras foi realizado por solubilização alcalina com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH). Os procedimentos de solubilização com TMAH são bem conhecidos para as técnicas de espectroscopia atômica e vêm se tornando cada vez mais populares, apresentando inúmeras aplicações nas determinações de macro e micro constituintes para diversos tipos de amostras biológicas. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho, foi verificar se este procedimento de preparo de amostras biológicas poderia ser estendido para as técnicas de espectroscopia molecular, mais especificamente na determinação de nitrito em carnes processadas. A solução resultante da solubilização de 500 mg de amostra seca, apresentou uma concentração de 0,45%(m/v) de TMAH para um volume final de 50 mL. O procedimento desenvolvido apresentou uma faixa de calibração de 0,1 a 2,0 mg NO₂⁻ L⁻¹, com R² = 0,999, limite de detecção igual a 0,013 mg NO₂⁻ L⁻¹ e as recuperações ficaram na ordem de 92 a 107 %. Os resultados obtidos demonstraram que a solubilização das amostras de mortadela, patê e salsicha em meio alcalino por TMAH é eficiente também para a determinação espectrofotométrica de nitrito por UV-Vis. O método proposto apresentou algumas vantagens frente aos outros métodos já conhecidos, destacando-se principalmente a possibilidade de uma única etapa de preparo de amostra poder ser utilizada simultaneamente em técnicas de espectroscopia atômica e molecular. Além disso, apresentou exatidão, precisão, rapidez, simplicidade e baixo custo, com uma geração menor de resíduos, contribuindo não só com a Química Verde, mas também por apresentar os parâmetros necessários para ser utilizado nas análises de rotina. Certamente o procedimento poderá ser estendido para outras amostras biológicas, assim como novas aplicações nas técnicas de determinação moleculares.

Palavras-chave: nitrito; solubilização alcalina; preparo de amostras; produtos cárneos; espectroscopia de absorção molecular UV-Vis.

Abstract

In this work a new methodology was developed for the determination of nitrite in processed meat by molecular absorption spectrometry UV-VIS, and the sample preparation was performed by alkaline solubilization with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). The solubilization procedures with TMAH are well known in atomic spectrometric techniques and becoming increasingly popular, with numerous applications in the determination of macro and micro constituents in several biological samples. Thus, the main objective of this work was to verify if this procedure to prepare biological samples could be extended to the techniques of molecular spectroscopy for the determination of nitrite in processed meat. The solution resulting from the solubilization of 500 mg of dry sample showed a concentration of 0.45% m/v TMAH for a final volume of 50 mL. The procedure developed showed a calibration range from 0.1 to 2.0 mg L⁻¹ NO₂⁻, with R² = 0.999, LD = 0.013 mg L⁻¹ and recoveries were in the order of 92 at 107 %. The results showed that the solubilization of the samples of bologna, sausage and pate with TMAH also is effective for the spectrophotometric determination of nitrite by UV-VIS. The proposed method showed some advantages compared to other known methods, especially highlighting the possibility of a single step sample preparation be possible to use simultaneously in atomic and molecular techniques. Additionally, the methodology showed accuracy, precision, speed, simplicity and low cost, with less waste generation, contributing with the green chemistry and also have the necessary parameters to be used in routine analyzes. Certainly the procedure can be extended to other biological samples, as well as new applications in molecular techniques.

Keywords: nitrite; alkaline solubilization; sample preparation; meat products; spectrometry UV-Vis.

Definições, siglas e abreviaturas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

IAL: Instituto Adolfo Lutz;

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

OMS: Organização Mundial de Saúde;

PIB: produto interno bruto;

µg: micrograma (10^{-6} g);

mg: miligrama (10^{-3} g);

g: grama

kg: kilograma (10^3 g);

t: tonelada (10^6 g);

TMAH: hidróxido de tetrametilamônio;

U(V/V)IS: faixas espectrais relativas às radiações ultravioleta e visível;

NED: cloreto de alfa-naftiletilenodiamina;

Lista de figuras

FIGURA 1. Representação da reação de Griess, com dapsona e naftiletenodiamina (FONTE: LUIZ et al., 2009)	23
FIGURA 2. Curvas de absorbância x concentração de soluções padrão de nitrito de sódio ($\text{mg NO}_2 \text{ L}^{-1}$) por espectroscopia molecular UV-Vis de alíquotas diluídas em água e em TMAH a 0,45%(m/v).	41
FIGURA 3. Relação entre a concentração de TMAH e a absorbância em leituras por espectroscopia molecular	42
FIGURA 4. Curva de absorbância x concentração de soluções padrão de nitrito de sódio em concentrações de 0,1 até 10,0 $\text{mg NO}_2 \text{ L}^{-1}$ por espectroscopia molecular UV-Vis.	43

Lista de tabelas e quadros

Quadro 1. Variáveis experimentais envolvidas no estudo sobre a solubilização de amostras com TMAH para a determinação de nitritos em carnes processadas.....	28
Tabela 1. Informações nutricionais de patê fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 10 g).	30
Tabela 2. Informações nutricionais de mortadela fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 40 g).	30
Tabela 3. Informações nutricionais da salsicha tipo Viena fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 50 g).	30
Quadro 2. Resumo dos parâmetros do teste de robustez	37
Tabela 4. Resultados obtido na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de mortadelas, em $\text{mg NO}_2^- 100 \text{ g}^{-1}$	39
Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de patê, em $\text{mg NO}_2^- 100 \text{ g}^{-1}$	40
Tabela 6. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular em amostra de salsicha tipo Viena, em $\text{mg NO}_2^- 100 \text{ g}^{-1}$	40
Quadro 3. Leituras de branco na determinação de nitritos por espectroscopia molecular.....	44
Tabela 7. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de mortadela tipo bologna, de frango e calabresa, mediante adições de padrão de nitrito de sódio.....	45
Tabela 8. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de patê de presunto, de fígado e de frango, mediante adições de padrão de nitrito de sódio	46
Tabela 9. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de salsicha tipo Viena, mediante adições de padrão de nitrito de sódio	47
Tabela 10. Resumo dos coeficientes de variação (%) dos resultados da determinação de nitritos por espectroscopia molecular em amostras de mortadela, patê e salsichas.....	48
Tabela 11. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da interferência do analista, da data da análise e do espectrômetro nos resultados da determinação de nitritos em mortadela de frango para o teste de robustez	49

Tabela 12. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da interferência da técnica de separação da fase líquida nos resultados da determinação de nitritos para o teste de robustez.....50

Tabela 13. Comparação de requisitos técnicos e de aspectos gerais relativos aos métodos de referencia (IAL, 2008) e proposto.51

Tabela 14. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de mortadelas, da salsicha tipo Viena e em patês, em $\text{mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$, solubilizadas em meio alcalino (TMAH)52

Lista de anexos

Anexo 1

Testes t para comparação de métodos

Tabela 1.1. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela bologna

Tabela 1.2. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela bologna

Tabela 1.3. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela de frango

Tabela 1.4. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela de frango

Tabela 1.5. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela calabresa

Tabela 1.6. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela calabresa

Tabela 1.7. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de presunto

Tabela 1.8. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de presunto

Tabela 1.9. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de fígado

Tabela 1.10. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de fígado

Tabela 1.11. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de frango

Tabela 1.12. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de frango

Tabela 1.13. Método proposto com filtração x ILA (2008) para salsicha

Tabela 1.14. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para salsicha

Anexo 2

Testes t para as variáveis avaliadas nos ensaios de robustez

Tabela 2.1. Teste da variável analista

Tabela 2.2. Teste da variável tempo (tempo zero x 21 dias)

Tabela 2.3. Teste da variável tempo (tempo zero x 34 dias)

Tabela 2.4. Teste da variável tempo (21 x 34 dias)

Tabela 2.5. Teste da variável equipamento

Tabela 2.6. Teste da separação de fases para mortadela bologna

Tabela 2.7. Teste da separação de fases para mortadela de frango

Tabela 2.8. Teste da separação de fases para mortadela calabresa

Tabela 2.9. Teste da separação de fases para patê de presunto

Tabela 2.10. Teste da separação de fases para patê de fígado

Tabela 2.11. Teste da separação de fases para patê de frango

Tabela 2.12. Teste da separação de fases para salsicha

Sumário

1	Introdução	14
2	Revisão bibliográfica	17
3	Material e métodos	28
3.1	Delineamento experimental	28
3.2	Materiais	29
3.2.1	Instrumentos e parâmetros instrumentais	29
3.2.2	Vidrarias e utensílios de laboratório	29
3.3	Amostras	29
3.4	Preparo das amostras	31
3.4.1	Método oficial	31
3.4.2	Método proposto	33
3.5	Validação do método	34
3.5.1	Seletividade	34
3.5.2	Linearidade	34
3.5.3	Faixa de trabalho	35
3.5.4	Limite de detecção	35
3.5.5	Limite de quantificação	36
3.5.6	Tendência/recuperação	36
3.5.7	Precisão	37
3.5.8	Robustez	37
3.6	Avaliação de aspectos operacionais	38
3.7	Avaliação de resultados	38

4	Resultados e discussão	39
4.1	Validação do método	39
4.1.1	Seletividade	39
4.1.2	Linearidade	40
4.1.3	Faixa de trabalho	42
4.1.4	Limite de detecção	43
4.1.5	Limite de quantificação	44
4.1.6	Tendência/recuperação	45
4.1.7	Precisão	48
4.1.8	Robustez	49
4.2	Avaliação do teor de nitritos em embutidos obtidos no comércio local	52
5	Conclusões	55
6	Referências	56

1 Introdução

A competitividade das cadeias produtivas agroalimentares está fortemente vinculada à segurança e à qualidade dos alimentos. Especialmente nos produtos cárneos, a inocuidade e a qualidade nutricional tornam-se ainda mais importantes por se tratarem de produtos muito populares no Brasil.

Os produtos cárneos processados são derivados de carnes frescas cujas propriedades originais são modificadas por meio de tratamento físico, químico ou biológico ou de sua combinação. Desde o início deste século, quando os produtos passaram a figurar entre os produtos industriais brasileiros mais importantes, produtos como salame, mortadela, presunto, patê e salsicha vêm sendo objetos de um sensível desenvolvimento tecnológico que, desde tempos remotos, vem agregando ao processo produtivo, um grande número de substâncias químicas, dentre as quais, destacam-se os aditivos.

Amplamente utilizados, os aditivos nos alimentos não tem propósito de nutrir, apenas de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais. Estas substâncias ou seus derivados podem, contudo, converterem-se em um componente do alimento ao se agregar a ele. Em tempos remotos, nitrato de sódio, então conhecido como salitre, era adicionado à carne como uma impureza. No entanto, verificou-se que este sal produzia uma cor atrativa no produto. Desde então, nitritos e nitratos, passaram a ser usualmente aplicados, na forma de sais de potássio ou sódio, em alimentos embutidos para fixar a cor, conferir sabor e aroma, retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento de alguns micro-organismos. Contudo, na mesma medida que a aplicação destes compostos cresceu, os estudos sobre seus efeitos também progrediram e os resultados obtidos indicaram que a adição destes compostos, especialmente o nitrito de sódio, constitui fator de risco toxicológico à saúde humana.

A regulação do uso de aditivos no Brasil está definida na Portaria nº 540 do Ministério da Saúde, e tem por base o princípio de que a segurança do consumidor é primordial. Decorrente da legislação vigente, a determinação quantitativa e qualitativa de aditivos nos alimentos passou a ser compromisso dos fabricantes.

No caso dos nitritos, a determinação qualitativa e quantitativa em carnes é feita pela reação de Griess-Ilosvay, baseando-se na medida da intensidade de cor rosa produzida pelo ácido alfa-naftilamino-pazobenzeno-p-sulfônico, durante o preparo da amostra. Além deste método colorimétrico, são conhecidas inúmeras técnicas para determinação direta de nitritos, entre elas, métodos polarográficos, cromatográficos, quimiluminescência e, até, por eletroforese capilar. Como características marcantes, contudo, trata-se de métodos morosos e complexos, seja na determinação do analito ou no preparo da amostra. Algumas limitações relacionadas à especificidade e à sensibilidade, quer por efeito da matriz ou pelo nível baixo de concentração do analito, estimulam os estudos para viabilizar a aplicação de um método de determinação de nitritos que reúna sensibilidade, seletividade, rapidez e simplicidade.

A literatura que trata do tema indica que o meio alcalino constitui uma alternativa no preparo de amostras de diversos tipos para inúmeros analitos, sendo preferido especialmente quando é necessário manter as formas químicas originais. Dentre os agentes comumente usados destaca-se o hidróxido de tetrametilamônio, ou TMAH, uma base orgânica forte, solúvel em água e solventes orgânicos. Até mesmo amostras biológicas em geral podem ser facilmente solubilizadas com TMAH em temperatura ambiente, dispensando, além do aquecimento, o uso de microondas ou ultrassom. Entre suas limitações figuram o odor e a alta viscosidade da solução resultante do preparo da amostra, que podem produzir interferências na medição, como por exemplo, em técnicas que fazem uso de nebulizadores.

Neste trabalho, o propósito foi desenvolver uma metodologia para determinação de nitrito em carnes por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis, focando principalmente no preparo das amostras biológicas por solubilização alcalina com TMAH. O método proposto constitui uma alternativa mais rápida, simples e de menor custo para a determinação de nitrito quando comparado ao método de referência.

O preparo de amostras foi integralmente modificado, embora a etapa de determinação ou leitura em espectrofotômetro tenha sido mantida conforme preconiza o Instituto Adolfo Lutz. No método proposto, a alíquota de amostra

corresponde a uma massa vinte vezes menor do que a usada no método de referência. A amostra é dissolvida em hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e avolumada com água ultrapura, resultando em uma solução com características de uma suspensão (*slurry*) que é clarificada com sulfato de zinco e filtrada, ou centrifugada, antes de ser submetida ao processo de desenvolvimento de cor e leitura em espectrômetro UV-Vis.

2 Revisão bibliográfica

A segurança e qualidade dos alimentos nos últimos anos têm figurado entre os principais fatores relacionados à competitividade das cadeias produtivas agroalimentares. Com isso, os instrumentos de gestão destas cadeias buscam dar evidência à qualidade de seus produtos, garantindo ao consumidor características desejáveis e procurando incrementar atributos de qualidade que possam ser percebidos. Além disso, o avanço tecnológico e o investimento no processo de produção buscam reduzir custos oriundos de falhas e de perdas. Com a mudança no comportamento do consumidor, mais exigente e melhor informado, é imprescindível para o sucesso deste agronegócio, tomar tais providências a fim de evitar a ocorrência de casos de doenças e, até, mortes decorrentes da ingestão de alimentos contaminados (TOLEDO *et al.*, 2004). A inocuidade e a qualidade nutricional dos produtos cárneos torna-se ainda mais importante pelo fato de tais produtos serem muito populares no Brasil, entre consumidores de todas as faixas etárias e classes sociais (DAGUER *et al.*, 2011).

Os produtos cárneos processados são derivados de carnes frescas cujas propriedades originais são modificadas por meio de tratamento físico, químico ou biológico ou pela combinação de um ou mais tratamentos. Estas modificações promovem o aumento do tempo de vida útil destes produtos, preservando propriedades nutritivas e sensoriais. Frequentemente, condimentos são introduzidos no processo resultando no desenvolvimento de diferentes sabores (SARMENTO, 2006).

Para os embutidos, na última década, o mercado mostrou sinais consistentes de expansão e competitividade. O consumo de salsichas, linguiças, mortadelas, por exemplo, faz parte da alimentação de uma fração significativa de consumidores brasileiros (BISCONTINI, 2004). Ainda, de acordo com Rodrigues *et al.* (2006), a indústria de alimentos, em 2000, respondeu por 10% do produto interno bruto (PIB) brasileiro e 17% das exportações do país. Ano em que, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2000), os produtos de salamiaria (salame, mortadela, presunto, patê e salsicha) figuraram entre os cem mais importantes produtos e serviços industriais brasileiros e a produção naquele ano

atingiu 698 mil toneladas. Dez anos depois, segundo o IBGE (2010), a produção de embutidos atingiu 3 milhões de toneladas, reunindo preparações, integradas ao abate, de carnes de bovinos (7%), de aves ou de pequenos animais (22%) e de suínos (57%) e ainda preparações não integradas ao abate (14%).

Esta conquista do setor pode ser atribuída, entre outros fatores, à incorporação de algumas inovações como a variedade de matérias primas, à inclusão de novos ingredientes, e à implementação de novos processos produtivos, que redundaram na melhoria da qualidade destes produtos (SARMENTO, 2006). Contudo, os embutidos crus brasileiros, ainda carecem da definição de padrões de identidade, que envolvam requisitos relativos à apresentação, à composição centesimal e ao valor nutritivo (OLIVEIRA, 2005). Os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de mortadela e salsicha estão registrados na instrução normativa nº 4 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA (BRASIL, 2000). Neste documento estabelecem-se a definição, a classificação e a designação de cada um destes derivados de carne mecanicamente separada.

Mortadela é um produto cárneo industrializado, obtido por meio de uma emulsão de carnes de diferentes espécies separadas mecanicamente, acrescentando-se toucinho ou não, e miúdos comestíveis como, estômago, coração, língua, fígado e rins, no limite máximo de 60%(m/m). Também podem ser adicionados peles e tendões no limite máximo de 10%(m/m). O envoltório pode ser natural ou artificial sob diferentes formas. O produto é submetido a um tratamento térmico adequado. A mortadela tipo Bologna, apresenta em sua composição, carnes bovina e/ou suína e/ou ovina até o limite máximo de 20%(m/m); miúdos comestíveis como pele e tendões no limite máximo de 10%(m/m), além de porções musculares e toucinho. Neste tipo de mortadela não é permitida a adição de amido. Aditivo proibido, também, na mortadela italiana, cuja composição apresenta tecido muscular de diferentes espécies de carnes e toucinho. Já, a mortadela de carne de ave é composta por até 5%(m/m) de miúdos comestíveis de ave como, fígado, moela e coração e, no máximo, 40%(m/m) de carne de ave e gordura (BRASIL, 2000).

Outro produto cárneo industrializado é a salsicha tipo Viena, composta por uma fração de carnes bovina e/ou suína de, no máximo, 40%(m/m). Também podem

compor este produto, miúdos comestíveis, pele e gorduras, além de porções musculares de carne bovina e/ou suína (BRASIL, 2000)

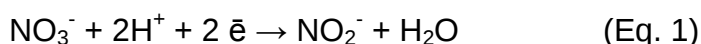
O MAPA também define o regulamento técnico de identidade do patê, por meio da instrução normativa 21. Neste documento, definem-se patês como um produto industrializado, apresentados em forma de pasta, cozido, pasteurizados ou esterilizados, compostos por carnes e miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais (BRASIL, 2000b).

O desenvolvimento tecnológico agregou ao processo de produção de alimentos um grande número de substâncias químicas, dentre as quais, destacam-se os aditivos (IAL, 2008). Os aditivos alimentares são amplamente utilizados com as funções mais diversas e em diversos países. Contudo, seu emprego é regido por legislação específica, fundamentada nas recomendações da Organização Mundial de Saúde, OMS (CUNHA *et al.*, 2003). No Brasil, o Ministério da Saúde publicou, para este fim, a portaria n.º 540/97 (BRASIL, 1997), na qual define que aditivo alimentar é “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento”. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

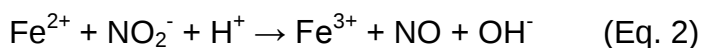
Dentre as diversas funções dos aditivos alimentares, definidas na legislação (BRASIL, 1997), estão: 1) agente de massa, 2) antiespumante, 3) antiumectante, 4) antioxidante, 5) corante, 6) conservador, 7) edulcorante, 8) espessantes, 9) geleificante, 10) estabilizante, 11) aromatizante, 12) umectante, 13) regulador de acidez, 14) acidulante, 15) emulsionante/emulsificante, 16) melhorador de farinha, 17) realçador de sabor, 18) fermento químico, 19) glaceante, 20) agente de firmeza, 21) sequestrante, 22) estabilizante de cor e 23) espumante. O *Códex Alimentarius* (FAO/OMS, 1992) especifica as quantidades de aditivos segundo o tipo de alimento, que variam entre 50 e 500 mg kg⁻¹.

Atualmente, a preservação de produtos cárneos por meio do uso exclusivo de sal comum é um procedimento raro. Em tempos remotos, verificou-se, por exemplo, que o salitre (nitrato de sódio), adicionado à carne como uma impureza do sal produzia uma cor atrativa de tonalidade avermelhada no produto (COULTATE, 2004). Isto porque, na cura, durante os estágios de maturação são completados e uma série complexa de reações aumenta a coloração dos produtos cárneos (McCLURE *et al.*, 2011). O nitrato e o nitrito de sódio passaram, então, a compor a salmoura, tradicionalmente usada para o tratamento de bacon e presunto (COULTATE, 2004).

De acordo com Coultate (2004), primeiramente, parte do nitrato adicionado aos produtos é reduzida a nitrito por microrganismos presentes na salmoura ou por enzimas do tecido muscular (equação 1).



Então, na presença de nitrito, o ferro da mioglobina muscular se oxida, gerando metamioglobina (Equação 2).



O óxido nítrico reage com o íon férrico da metamioglobina produzindo nitrosil-metamioglobina, imediatamente reduzida pelo sistema respiratório do tecido muscular a nitrosil-mioglobina, que confere a pigmentação ao produto cárneo, similar à da oximioglobina (vermelha), devido à distribuição de elétrons ao redor do ferro da nitrosil-mioglobina (COULTATE, 2004).

Sendo assim, nitritos e nitratos, passaram a ser usualmente aplicados na forma de sais de potássio ou sódio, em alimentos embutidos para fixar a cor, conferir sabor e aroma, retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento de alguns microrganismos (SILVA, 2009). Lira, *et al.* (2003) afirmam que a adição destes compostos, especialmente o nitrito de sódio, constitui fator de risco toxicológico à saúde humana. De acordo com a OMS (1995), além da formação de metahemoglobina, indícios de hipertrofia renal e genotoxicidade em ratos confirmam esta hipótese. Semedo (2009) acrescenta que o uso dos aditivos como o cloreto de

sódio, nitratos e nitritos, pode contribuir para o aparecimento de doenças do aparelho circulatório e do aparelho digestivo, quando ingeridos em quantidades superiores aos limites legais ou em doses cumulativas. E, de acordo com Mársico *et al.* (2002), os nitritos podem gerar nitrosaminas, substâncias consideradas cancerígenas.

De acordo com Coultate (2004), isto se explica por que, embora a reação com aminas primárias, como os aminoácidos livres, abundantes na carne, que acarretam a desaminação contribua para a redução do excesso de nitrito na carne, conforme ilustra a equação 3. As aminas secundárias, menos abundantes, surgem como produtos da ação microbiana, sobretudo de organismos anaeróbios e reagem com ácido nitroso para formar o composto estável N-nitroso (Equação 4).



As nitrosaminas vêm sendo frequentemente detectadas em produtos curados de carne, como salame e salsichas, no entanto, elas são mais significativas em carnes curadas cozidas a altas temperaturas (COULTATE, 2004).

Sendo assim, a Portaria nº 540 (BRASIL, 1997), julgando que a segurança do consumidor é primordial, estabelece que a autorização de uso de um aditivo deve passar por uma adequada avaliação toxicológica, por meio da qual se determine qualquer efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso.

Em virtude deste fato, o Ministério da Agricultura estabeleceu o Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal alinhado com as recomendações da OMS e do Ministério da Saúde. Neste documento, definiu-se o limite máximo de nitrito como $200 \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 1952). Além disso, a Resolução nº 360, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, estabeleceu o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional (BRASIL, 2003). Neste contexto, a determinação da quantidade de nitritos presentes em alimentos é justificada como uma medida de proteção à saúde pública e de atendimento a

requisitos legais (CUNHA, 2003). Em vigor, a Portaria 1.004, do Ministério da Saúde, prevê o limite máximo de $0,015 \text{ g NaNO}_2 / 100 \text{ g}^{-1}$ em carne e seus coprodutos (BRASIL, 1999). Este limite é igual ao estabelecido atualmente pelo MAPA (BRASIL, 2007) para “produtos cárneos industrializados frescos embutidos ou não embutidos”.

Portanto, é importante dispor de técnicas analíticas sensíveis que possibilite uma determinação de nitrito nesta faixa de concentração nos mais variados tipos de matrizes de amostras de alimentos, uma vez que os diferentes fabricantes disponibilizam produtos alimentícios com a mesma classificação, embora apresentem uma variação na sua composição, como por exemplo, as mortadelas.

A determinação qualitativa e quantitativa dos nitritos em carnes é feita pela reação de Griess-Ilosvay, por meio da sua diazotação com ácido sulfanílico e copulação com cloridrato de alfa-naftilamina em meio ácido, formando o ácido alfa-naftilamino-pazobenzeno-p-sulfônico, de coloração rósea. As amostras são trituradas e homogeneizadas, misturadas ao tetraborato de sódio e submetidas a aquecimento brando. Depois, ferrocianeto de potássio e acetato ou sulfato de zinco são adicionados para que se possa fazer a filtração e assim o material estará pronto para a determinação espectrofotométrica com leitura na região do visível a 540 nm, usando a sulfanilamina e o cloreto de alfa-naftiletilenodiamina, (NED), para o desenvolvimento de cor (IAL, 2008). De acordo com Duarte (2010), a cor é conferida por um azo-composto, produto da Reação de Griess envolvendo o nitrito e a amina primária aromática em meio ácido. Luiz *et al.* (2009) esclarecem que ao adicionar o ácido sulfanílico, sua reação com o nitrito forma um sal de diazônio que produz uma coloração rósea, tão logo entra em contato com a naftiletilenodiamina, conforme esquema representado na figura 1.

vezes específicos para cada método. Frequentemente, também existem limitações relacionadas à seletividade e à sensibilidade, quer por efeito da matriz ou pelo nível baixo de concentração do analito. Sendo assim, se justificam os estudos para viabilizar a aplicação de um método de determinação de nitritos em amostras de alimentos em geral, que reúna sensibilidade e seletividade, com rapidez, simplicidade e ainda se possível, apresentar baixo custo de análise com geração menor de resíduos e se todos esses parâmetros puderam ser atendidos, certamente o método se credencia para ser utilizados em análises de rotina.

Segundo Nóbrega *et al.* (2006), o meio alcalino constitui uma alternativa no preparo de amostras de diversos tipos, principalmente para matrizes biológicas, envolvendo um conjunto expressivo de analitos nas determinações por técnicas de espectroscopia atômica. Reagentes alcalinos têm sido aplicados com sucesso em procedimentos de especiação, especialmente quando é necessário manter as formas químicas originais, sem riscos de conversão durante a etapa de preparo das amostras. Deve-se estar atento, entretanto, aos seus efeitos sobre a medição por meio de técnicas espectrométricas pelas possíveis interferências espectrais e não espectrais, que afetam a etapa de atomização, excitação e ionização, assim como o efeito no transporte. Muitos casos de interferência só podem ser resolvidos com o emprego de métodos de adição de padrão interno, o que necessita de um profissional bem qualificado, dificultando a sua implementação em laboratórios que fazem análise de rotina. No entanto, é possível observar uma melhoria no desempenho para técnicas como a espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectroscopia de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS), os quais permitem facilmente a introdução das amostras com características de uma suspensão.

Ribeiro *et al.* (2007) relatam que amostras biológicas em geral podem ser facilmente solubilizadas com hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) em temperatura ambiente, dispensando, além do aquecimento, o uso de microondas ou ultrassom. O TMAH é uma base orgânica forte, solúvel em água e solventes orgânicos, capaz de complexar e estabilizar elementos voláteis (DAMIN, 2009). Ao aplicá-lo no tratamento de amostras biológicas obtém-se baixo fator de diluição e suspensões

estáveis durante meses, mesmo estando armazenadas em temperatura ambiente. Entre as limitações figuram o odor e a alta viscosidade da solução resultante do preparo da amostra, que podem produzir interferências nas determinações (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2012) compararam dois métodos de preparo de amostras de carnes para a determinação de Na e K, baseados na solubilização em meio ácido e alcalino, respectivamente, aplicando ácido fórmico sob aquecimento e TMAH à temperatura ambiente. O tratamento alcalino produziu completa solubilização com maior simplicidade e robustez, além de ser utilizada pouca quantidade de reagente. Também no preparo de amostras de produtos cárneos para a determinação de Pb, por meio da espectroscopia de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS), o uso do TMAH demonstrou vantagens como a utilização de pequena quantidade de amostra e evitou perdas do analito por volatilização (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Damini (2009) avaliou o preparo das amostras de produtos cárneos por TMAH, apresentando resultados satisfatórios para a determinação de Cd e Pb em nível de concentrações em $\mu\text{g L}^{-1}$, popularmente conhecido para estas concentrações em nível de elementos traço. A técnica também foi bem sucedida no processo de especiação de As em fígado de frango por geração de hidretos acoplada a espectroscopia de absorção atômica (HG AAS) (MORAES, 2010).

Sabe-se, contudo, que ao empregar qualquer método analítico, a equipe do laboratório necessita demonstrar que o faz de maneira adequada. Na norma brasileira que estabelece os requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e de ensaios, a NBR ISO/IEC 17.025, estão definidos os itens que o laboratório deve atender ao escolher utilizar um método de ensaio, desenvolvê-lo, ou seja, para validá-lo (ABNT, 2005). Isto é, torna-se necessário, de forma objetiva, demonstrar que as metodologias de ensaio que a equipe do laboratório executa conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. E, esta premissa é válida tanto quando um novo método é criado, quanto se uma técnica for modificada, para atender a requisitos específicos. Sendo assim, a equipe do laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para os resultados analíticos que se pretende atingir

(BORDIGNON-LUIZ, 2008). A este processo de “confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendidos são atendidos” por uma técnica analítica denomina-se validação (ABNT, 2005). Assim, durante a validação de um método se estabelece, por meio de estudo, que suas características satisfazem requisitos de qualidade. Nesse processo, atributos são determinados e avaliados a fim de assegurar que o método seja adequado aos fins para os quais foi concebido ou adaptado (VALENTINI, 2007). Em suma, no processo de validação buscam-se evidências objetivas que demonstrem que o método de ensaio usado forneça resultados confiáveis e compatíveis com a qualidade requerida (GONÇALVES *et al.*, 2011).

Trevisan (2003) declara que metodologias alternativas necessitam ser validadas para comparação com aquelas já estabelecidas. Neste caso, o autor afirma que é bastante usual realizar esta comparação por meio da determinação dos parâmetros de mérito das técnicas analíticas, tais como os parâmetros relativos a sensibilidade, seletividade e limite de detecção. No entanto, de acordo com o INMETRO (2010), os parâmetros que necessitam ser calculados podem variar conforme o tipo de ensaio que se pretende validar. De forma geral e sempre que aplicável, devem ser objeto de estudo no laboratório e estar registrados em procedimento documentado: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, tendência/recuperação, precisão e robustez. Durante as últimas décadas, progressos consideráveis foram feitos na construção de uma única base conceitual, para a química analítica e, especialmente, para a qualidade na medição química. No curso desse esforço, conceitos estão sendo esclarecidos e refinados e a terminologia correspondente necessariamente segue o exemplo (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2003). Sendo assim, cabe esclarecer os parâmetros que fazem parte do processo de validação.

Segundo o INMETRO (2010), experimentos para avaliação da seletividade envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, que permitam avaliar a capacidade do método de identificar o analito de interesse, mesmo na presença de interferentes. A quantificação de um analito baseia-se no conhecimento da relação existente entre a resposta medida e sua

concentração na matriz. A linearidade de um método pode ser verificada por meio de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados e precedida pela verificação da ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração do analito. A faixa de trabalho ideal de um método é aquela que cobre a faixa de aplicação para a qual ele vai ser utilizado. Convém observar que a concentração mais esperada da amostra se situe na região central desta faixa. O limite inferior da faixa é o valor do limite de quantificação, algumas vezes denominado limite de determinação. Na prática, o limite de quantificação corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. Sua tendência e a precisão devem ser testadas com amostras independentes.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como na determinação em nível de traços, é importante reconhecer o menor valor de sua concentração que pode ser detectado pelo método. Para a validação de um método analítico, o limite de detecção indica o nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco ou ruído (INMETRO, 2010).

Segundo Burns *et al.* (2002), a tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor de referência). Corrigida ou não a tendência, a incerteza associada a ela é um componente essencial da incerteza global de um ensaio. A precisão é determinada para circunstâncias específicas de medição, por meio da repetitividade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade, usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação, este último também conhecido como desvio padrão relativo (RSD) expresso em percentagem (ANVISA, 2003).

O principal objetivo deste trabalho, é desenvolver uma nova metodologia para determinação de nitrito em carnes em geral por espectroscopia de absorção molecular UV-Vis, focando principalmente no preparo das amostras biológicas por solubilização alcalina com TMAH. Assim, pretende-se obter uma nova metodologia, que possibilite uma única etapa de preparo de amostras, já utilizada em técnicas de espectroscopia atômica, que possa também ser utilizada nas técnicas que realizam determinações moleculares, tornando o método de preparo de amostra mais versátil e com um caráter “universal”.

3 Material e métodos

3.1 Delineamento experimental

Os experimentos relativos à avaliação do desempenho do método de solubilização de amostras de carnes processadas para a determinação de nitritos envolveram três tipos de mortadela, três de patê e um de salsicha. Foram estudados dois métodos de preparo de amostras, o de referência (IAL, 2008) e o proposto neste estudo, com duas variantes nos procedimentos de preparo de amostras, e um método de determinação (espectroscopia molecular UV-Vis) de um analito (nitrito), conforme Quadro 1. Foram estruturados, portanto, 14 tratamentos, onde os sete tipos de carnes processadas foram preparados pelos dois métodos estudados e analisadas por espectroscopia UV-Vis para a determinação de nitritos. Para cada amostra tratada nos dois métodos de preparo, foram realizadas nove replicatas, totalizando um número total de 126 soluções resultantes do tratamento e para cada uma foi realizadas três leituras instrumentais, fornecendo um n total de 378.

Quadro 1. Variáveis experimentais envolvidas no estudo sobre a solubilização de amostras com TMAH para a determinação de nitritos em carnes processadas

Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
Carne processada	Tipo	Método de preparo de amostras	Analito
Mortadela	Frango (C1)	Solubilização alcalina com TMAH (M1/C) Solubilização alcalina com TMAH (M1/F) Solubilização ácida com NED (M2)	Nitrito ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$)
	Calabresa (C2)		
	Bologna (C3)		
Patê	Fígado (C4)		
	Frango (C5)		
	Presunto (C6)		
Salsicha	Viena (C7)		

Onde: M1/C: Variante do método proposto na qual a leitura no espectrômetro é precedida pela separação da fase líquida da amostra por meio de centrifugação; M1/F: Variante do método proposto na qual a leitura no espectrômetro é precedida pela separação da fase líquida da amostra por meio de filtração.

3.2 Materiais

3.2.1 Instrumentos e parâmetros instrumentais

Entre os instrumentos utilizados no estudo estão: balança analítica Ohaus Adventurer (Modelo AR 2140), processador de alimentos de uso doméstico (Walita), destilado de água, deionizador de água, estufa de secagem Odontobrás (Modelo 1.2), banho-maria, chapa de aquecimento, pipetas volumétricas variadas com volumes de 1,0 a 10mL, micropipetas de 25, 50, 100, 250, 500, 1.000 e 5.000 μ L. As determinações de nitrito foram realizadas em um espectrômetro de duplo feixe U(V/V)IS de absorção molecular modelo LAMBDA 25 da Perkin Elmer.

3.2.2 Vidrarias e utensílios de laboratório

Entre vidrarias e utensílios laboratoriais foram usados: béqueres de 250mL, balões volumétricos de 50mL, 200mL e de 1.000mL, proveta de 50mL, bastão de vidro, funil, erlenmeyer de 250mL, papel filtro qualitativo, cubetas com 1,0 cm de caminho ótico, frasco volumétrico de polipropileno de 50mL e 10mL,

3.3 Amostras

Foram analisadas amostras de mortadela, patê e salsicha adquiridas no comércio do município de Pelotas/RS. As marcas dos produtos foram omitidas neste trabalho, tendo em vista que a sua avaliação tem o enfoque exclusivamente científico.

Foram avaliadas mortadelas de frango, calabresa e Bologna, e patês de fígado, presunto e frango, além de salsicha do tipo Viena enlatada, cujas informações nutricionais foram resumidas nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Informações nutricionais de patê fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 10 g).

Item	Composição		
	Patê de presunto	Patê de frango	Patê de fígado
Carboidratos (g)	0,3	0,5	0,4
Proteínas (g)	1	1,2	1,2
Gorduras Totais (g)	2,6	1,4	1,7
Gorduras Saturadas(g)	0,9	0,5	0,6
Fibra Alimentar (g)	Zero	Zero	Zero
Sódio (mg)	103,8	102,4	86,3

Tabela 2. Informações nutricionais de mortadela fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 40 g).

Item	Composição		
	Mortadela Bologna	Mortadela de frango	Mortadela calabresa
Carboidratos (g)	2,8	2,1	2,3
Proteínas (g)	4,5	4,8	4,9
Gorduras Totais (g)	7,9	5,5	5,8
Gorduras Saturadas(g)	2,8	1,6	1,8
Fibra Alimentar (g)	Zero	Zero	zero
Sódio (mg)	557,2	462,6	341,4

Tabela 3. Informações nutricionais da salsicha tipo Viena fornecidas pelo fabricante no rótulo dos produtos (para porção de 50 g).

Item	Composição
Carboidratos (g)	zero
Proteínas (g)	4,8
Gorduras Totais (g)	5,2
Gorduras Saturadas(g)	2,5
Fibra Alimentar (g)	1,6
Sódio (mg)	588

3.4 Preparo das amostras

As amostras de salsicha e mortadela, foram trituradas, homogeneizadas e armazenadas em potes plásticos em refrigerador, sob temperatura de -16 °C. Já, as amostras de patê foram apenas retiradas da embalagem e diretamente armazenadas com as demais amostras. Para triturar as amostras de mortadela e de salsicha foi utilizado um processador de alimentos de 600 W de uso doméstico (Walita, Brasil).

As massas das amostras utilizadas nos experimentos foram pesadas em base seca. Para a determinação de umidade, foram pesadas em triplicatas de 1g de amostra (com precisão de 0,1mg), as quais foram levadas à estufa de secagem onde foram mantidas a 105°C (IAL, 2008) até peso constante. Para cada etapa de pesagem, as amostras foram retiradas da estufa e acondicionadas em um dessecador para retornarem a temperatura ambiente. O teor de sólidos (massa seca) foi determinado multiplicando-se a massa seca da amostra por 100 e dividindo-a pela massa úmida. As pesagens foram realizadas em balança analítica.

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico e foi utilizada a água deionizada, obtida por meio de um destilador de vidro e posterior passagem por uma resina de troca iônica, para as realizações das diluições.

3.4.1 Método oficial

3.4.1.1 Reagentes

Solução de tetraborato de sódio deca-hidratado a 5%(m/v), da marca Synth[®], solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado a 15%(m/v), solução de sulfato de zinco hepta-hidratado a 30%(m/v), da marca Synth[®], solução ácida de sulfanilamida a 0,5%(m/v), marca Sigma-Aldrich[®], ácido clorídrico P.A., da marca Synth[®], solução de NED a 0,5%(m/v), marca Sigma-Aldrich[®], soluções padrão estoque e de trabalho de nitrito de sódio de 1.000 e 8mg L⁻¹, respectivamente, da marca Synth[®].

Como reagente para geração da espécie colorida foi utilizada uma solução de ácido o-fosfórico 8,5%(m/v) (reagente da cor), marca Synth[®], sulfanilamida 1%(m/v) e dicloridrato de N (1- naftil)- etilenodiamina 0,1%(m/v) da marca Sigma-Aldrich[®].

Para a confecção das curvas de calibração foi preparada uma solução padrão estoque de 1.000 mg L⁻¹ de nitrito de sódio de grau analítico.

3.4.1.2 Curva de calibração

Pipetou-se alíquotas de 1 a 6mL da solução padrão de trabalho de 8 mg L⁻¹ de nitrito de sódio em balões volumétricos de 50mL, produzindo soluções com concentrações de 0,160 a 0,960 mg L⁻¹. Adicionou-se, a cada um, 5mL de solução de sulfanilamida, misturou-se por rotação e após 5 minutos, adicionou-se 3mL de solução de NED. Avolumaram-se os recipientes com água deionizada e, depois de homogeneização e repouso de 15 minutos, fizeram-se as leituras da absorbância para cada solução no espectrômetro UV-Vis a 540nm.

3.4.1.3 Procedimentos

Pesou-se aproximadamente 10g (em base seca) de cada amostra, triturada e homogeneizada, seguido da adição de 5mL de uma solução de tetraborato de sódio 5%(m/v) e 50mL de água deionizada à 80°C. Esta temperatura foi mantida por 15 min em banho-maria com agitação. O produto obtido foi quantitativamente transferido para balão volumétrico de 200mL. Foram adicionados 5,0 mL de uma solução de ferrocianeto de potássio a 15%(m/v) e 5mL de solução de sulfato de zinco 30%(m/v). Avolumou-se a mistura com água deionizada. Após agitação vigorosa, o material foi posto por 15 minutos em repouso. A suspensão foi filtrada e uma alíquota de 10mL do filtrado foi pipetada para balões volumétricos de 50mL. Foram adicionados aos recipientes volumétricos 5,0 mL de reagente sulfanilamida 0,5%(m/v). Após 5 minutos de reação, foram acrescentados 3mL de solução de cloreto de alfa-naftiletlenodiamina (NED) 0,5%(m/v) e o volume do recipiente volumétrico foi completo com água deionizada. Depois de repouso de 15 minutos, as soluções foram submetidas à leitura da absorbância em espectrômetro UV-Vis a 540nm.

3.4.2 Método proposto

3.4.2.1 Reagentes

Para a solubilização das amostras, foi usada a solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), marca Sigma-Aldrich®, comercializada na concentração 25% (m/v) em meio aquoso e após todas as etapas de diluição a concentração final resultante foi de 0,45%(m/v). Para clarificar a amostra, adotou-se uma solução de sulfato de zinco pentahidratado, marca Synth®, a 10%(m/v).

3.4.2.2 Curva de calibração

Pipetou-se alíquotas de 25 a 1.000µL da solução padrão de trabalho de 10mg L⁻¹ de nitrito de sódio em frascos volumétricos de polipropileno de 10mL, produzindo soluções com concentrações de 0,025 a 1,0 mg L⁻¹. Adicionou-se, a cada uma, 180 µL de hidróxido de tetrametilamônio a 25%(m/v), 400µL da solução de ácido fosfórico a 8,5%(m/v) com sulfanilamida a 1%(m/v) e NED 0,1%(m/v) como reagente da cor. Avolumaram-se os recipientes com água deionizada e, depois de homogeneização e repouso de 10 minutos, fizeram-se as leituras da absorbância para cada solução no espectrômetro UV-Vis a 539,2nm.

3.4.2.3 Procedimentos

Pesou-se aproximadamente 0,5g, com precisão de 0,1mg, de amostra seca em frasco volumétrico de polipropileno de 50,0mL e adicionou-se 1.600µL de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25%(m/v). Após total solubilização das amostras, avolumou-se a 50mL, com água deionizada e desta solução, retirou-se 8,0 mL e transferiu-se para um novo frasco volumétrico de polipropileno de 10,0mL. Adicionou-se 1mL da solução clarificante de sulfato de zinco a 10,0%(m/v) e avolumou-se a 10mL com água deionizada. Centrifugou-se por 10 minutos para separar o sobrenadante do precipitado. Transferiu-se 7mL do sobrenadante para outro frasco volumétrico de polipropileno de 10mL e adicionou-se 400µL da solução ácido fosfórico a 8,5%(m/v) com sulfanilamida a 1%(m/v) e NED 0,1%(m/v) como reagente da cor. Após as adições o frasco foi avolumado com água deionizada,

aguardou-se 10 minutos para total desenvolvimento da cor rósea, e realizou-se a leitura no espectrômetro UV-Vis no comprimento de onda de 539,2nm.

3.5 Validação do método

Neste estudo foram aplicadas todas as figuras analíticas de mérito previstas pelo INMETRO (2010) para análise de elementos/compostos menores e traços, cujos procedimentos estão descritos a seguir.

3.5.1 Seletividade

De acordo com o INMETRO (2010), para a avaliação da seletividade, é preciso fazer a análise da amostra pelo método em estudo e outro método validado.

Sendo assim, foram realizadas determinações de nitritos pelo método de referência e pelo método proposto com as duas técnicas de separação de fases (filtração e centrifugação) em todas as matrizes avaliadas neste estudo, conforme delineamento experimental. Os resultados foram comparados por meio do teste t de comparação de médias, em um nível de confiança de 95%.

3.5.2 Linearidade

A linearidade foi testada usando como solvente a água, como no método indicado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008) e, também, o TMAH, utilizado na solubilização de amostras no método proposto neste estudo. Para isto, foi preparada uma solução padrão estoque de nitrito de sódio de 1.000mg L^{-1} e a partir desta foram preparadas soluções de trabalho e por meio das diluições necessárias obteve-se as concentrações equivalentes aos pontos das curvas de determinação. As curvas foram construídas com seis níveis de concentração de nitrito, para cada matriz estudada. Três replicatas, em cada nível de concentração, foram avaliadas, seguindo procedimento empregado na rotina do laboratório. A linearidade foi observada pelo coeficiente de correlação linear da curva gerada em função da concentração de nitrito, obtido por meio de regressão linear. A ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração foi verificada previamente pelo teste de Grubbs.

3.5.3 Faixa de trabalho

As curvas de determinação utilizadas neste estudo atendem aos requisitos definidos na Diretiva 657 (COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002), que estabelece que são necessários, pelo menos, cinco níveis de concentração do analito, incluindo o zero, para a sua construção. A faixa de trabalho deve ser definida, a equação da curva de calibração deve ser capaz de descrevê-la e os critérios de aceitação devem ser estabelecidos.

A determinação da faixa de trabalho, segundo orientação do INMETRO (2010), parte da aplicação de uma faixa preliminar. Neste caso, os limites da faixa foram 0,1 e 10mg NO₂⁻ L⁻¹, definidos arbitrariamente. A fim de identificar a faixa linear e os limites superior e inferior da faixa de trabalho, diferentes concentrações de analito foram preparadas de modo independente, ou seja, a partir de diferentes soluções de trabalho, exceto para o branco. Os resultados foram plotados, valores discrepantes verificados e os coeficientes da reta calculados por meio de regressão linear produzindo a equação da reta no formato $y = ax + b$. Foi calculado o coeficiente de determinação (correlação linear - r^2) para atestar o quanto a equação de regressão explicava o ajuste da reta, ou seja, em que proporção a variação da absorbância é explicada pela variação da concentração de nitrito.

O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r), segundo a ANVISA (2003), deve ser = 0,99, equivalente a 0,9801 para o coeficiente de determinação (r^2). Sendo assim, às curvas obtidas foram aplicados estes critérios de aprovação.

3.5.4 Limite de detecção

Partindo do princípio que, para a validação de um método analítico, é suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído, optou-se pela obtenção do LD a partir de medidas do branco. Embora o número mínimo de sete replicatas seja recomendado pelo INMETRO, neste caso, foram realizadas dez, e o LD calculado conforme a equação 5:

$$LD = X + t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot S \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde: X = média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

3.5.5 Limite de quantificação

A definição do limite de quantificação foi obtida pelo valor da média dos brancos acrescido de 10 desvios padrão de suas leituras (equação 6), conforme indicação do INMETRO (2010).

$$LQ = X + 10 \cdot s \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde: X = média dos valores dos brancos da amostra e s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.

3.5.6 Tendência/recuperação

Neste estudo, a tendência/recuperação de nitrito foi estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do íon (spike). Seguindo a orientação do INMETRO (2010) que indica que as amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método, foram adicionadas alíquotas de solução aquosa de nitrito de sódio correspondentes à 0,1398, 0,1678 e 0,2797 mg NO₂⁻ L⁻¹ às amostras de todas as matrizes analisadas. Os resultados foram avaliados por meio da equação 7.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde:

C₁ = concentração do analito na amostra fortificada,

C₂ = concentração do analito na amostra não fortificada,

C₃ = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

3.5.7 Precisão

Para estimar a precisão, em conformidade com os procedimentos estabelecidos pelo INMETRO (2010), o desvio padrão da repetitividade foi calculado (equação 8) mantendo-se inalteradas as variáveis: analista, equipamento, laboratório e tempo. Para tanto, foram realizadas, no mínimo sete repetições das determinações de cada amostra. A condição de aceitação do coeficiente de variação para avaliar a precisão, em condições de repetitividade, foi o valor máximo 10,7% (COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002).

$$\text{RSD ou RSD (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média determinada}} \quad (\text{Eq. 8})$$

3.5.8 Robustez

No teste de robustez implementado neste estudo, foram impostas as seguintes modificações ao método proposto: (1) troca de analista em toda a marcha analítica; (2) determinações do mesmo material em diferentes datas; (3) troca de espectrômetro; (4) modificação da etapa de separação da fase líquida (centrifugação x filtração). Os tratamentos foram definidos mediante sorteio das matrizes para cada variável testada (quadro 2). A influência de cada variável nos resultados da técnica proposta foi medida por comparação de médias por meio do teste t, em nível de confiança de 95%.

Quadro 2. Resumo dos parâmetros do teste de robustez

Varável testada	Níveis
Analista	Analista 1
	Analista 2
Data de análise	18/8/2013
	8/9/2013
	21/9/2013
Espectrômetro	Equipamento 1
	Equipamento 2
Técnica de separação da fase líquida	Centrifugação
	Filtração

3.6 Avaliação de aspectos operacionais

Tendo em vista que o propósito do método proposto foi tornar mais simples e rápida a determinação de nitritos em produtos cárneos, entende-se que é necessário avaliar alguns aspectos que indiquem o sucesso da proposta neste contexto. Para tanto, foram comparados aspectos operacionais como a geração de efluentes, o tamanho da amostra, o tempo de execução dos ensaios, o consumo de energia, o uso e o custo de reagentes.

Para determinar o volume de efluentes, foram medidos os volumes descartados ao executar as marchas analíticas pelos dois métodos (proposto e de referência). O tempo de execução dos ensaios foi contabilizado somando os tempos envolvidos em todos os procedimentos, incluindo períodos de repouso exigidos em cada técnica. O consumo de energia foi estimado pelo produto da potência e do tempo de uso de equipamentos elétricos. Para o uso de reagentes foram levantadas as quantidades envolvidas e o custo relativo destas frações, com base no valor comercial destes produtos.

3.7 Avaliação de resultados

Ao final das determinações de nitrito em cada matriz, foram calculados a média das determinações de cada amostra, a média das médias determinada de cada alíquota, o desvio padrão e o coeficiente de variação (%) destas médias. Com base no teste de Grubbs, eliminaram-se as médias superiores aos valores tabelados para um nível de 95% de significância, ou seja, valores caracterizados como *outliers* (AOAC, 2002). Caso o número restante de resultados fosse inferior ao indicado para estudos de validação (INMETRO, 2010), nova sequência de testes seria realizada.

A comparação dos resultados obtidos entre o método proposto e o método de referência, definido pelo Instituto Adolfo Lutz, foi feita usando o teste t para duas amostras em um nível de significância de 95%. Os cálculos foram feitos utilizando o pacote estatístico do aplicativo excel da Microsoft®, conforme descrito por Albano e Raya-Rodriguez (2009).

4 Resultados e discussão

4.1 Validação do método

4.1.1 Seletividade

De acordo com a recomendação do INMETRO (2010) para avaliar a seletividade deve-se fazer a análise com a amostra pelo método em estudo e outro método validado (método de referência). Ao avaliar a determinação de nitritos (em $\text{mg NO}_2^- 100\text{g}^{-1}$) por espectroscopia molecular em amostras de mortadela dos tipos bologna, de frango e calabresa; patê dos tipos de presunto, de frango e de fígado; e salsicha do tipo Viena, obteve-se os resultados resumidos nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Foi comparado o método de referência descrito pelo IAL (2008) e a técnica proposta usando TMAH no preparo das amostras, aplicando centrifugação e filtração na separação da fase líquida.

No que se refere à precisão, foi satisfatória para todos os resultados, tendo em vista sua conformidade com o valor indicado pela Diretiva 657 das Comunidades Européias (2002), que define como apropriado um coeficiente de variação inferior a 10,7%.

Tabela 4. Resultados obtido na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de mortadelas, em $\text{mg NO}_2^- 100 \text{ g}^{-1}$.

Matriz	Parâmetros	Método IAL	Método proposto com centrifugação	Método proposto com filtração
Mortadela Bologna	Média	4,213	4,090	4,183
	Desvio padrão	0,121	0,187	0,284
	RSD(%)	2,870	4,565	6,790
Mortadela de frango	Média	4,493	4,393	4,474
	Desvio padrão	0,118	0,136	0,294
	RSD(%)	2,619	3,104	6,579
Mortadela calabresa	Média	4,411	4,192	4,678
	Desvio padrão	0,394	0,369	0,388
	RSD(%)	8,931	8,805	8,300

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de patê, em mg NO₂⁻ 100 g⁻¹.

Matriz	Parâmetros	Método IAL	Método proposto com centrifugação	Método proposto com filtração
Patê de presunto	Média	10,930	10,885	10,848
	Desvio padrão	0,546	0,606	0,480
	RSD(%)	4,996	5,571	4,425
Patê de frango	Média	7,915	8,209	8,222
	Desvio padrão	0,555	0,405	0,558
	RSD(%)	7,006	4,935	6,788
Patê de fígado	Média	7,683	7,953	7,930
	Desvio padrão	0,465	0,267	0,601
	RSD(%)	6,047	3,352	7,585

Tabela 6. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular em amostra de salsicha tipo Viena, em mg NO₂⁻ 100 g⁻¹

Parâmetros	Método IAL	Método proposto com centrifugação	Método proposto com filtração
Média	0,663	0,631	0,630
Desvio padrão	0,034	0,058	0,044
RSD(%)	5,166	9,209	7,047

A comparação de médias, por meio do teste t (anexo 1), confirmou a hipótese (H₀) de diferença das médias, indicando que não existe diferença significativa entre os resultados para um nível de confiança de 95 %. Portanto, a determinação de nitritos nas sete amostras avaliadas, usando os três métodos analíticos, gera resultados equivalentes estatisticamente.

4.1.2 Linearidade

A linearidade foi testada usando como solvente a água, como no método indicado pelo IAL (2008) e, também, o TMAH, utilizado na solubilização de amostras no método proposto neste estudo (Figura 2). Foram testadas soluções padrão de nitrito com zero; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 mg de NO₂⁻ L⁻¹.

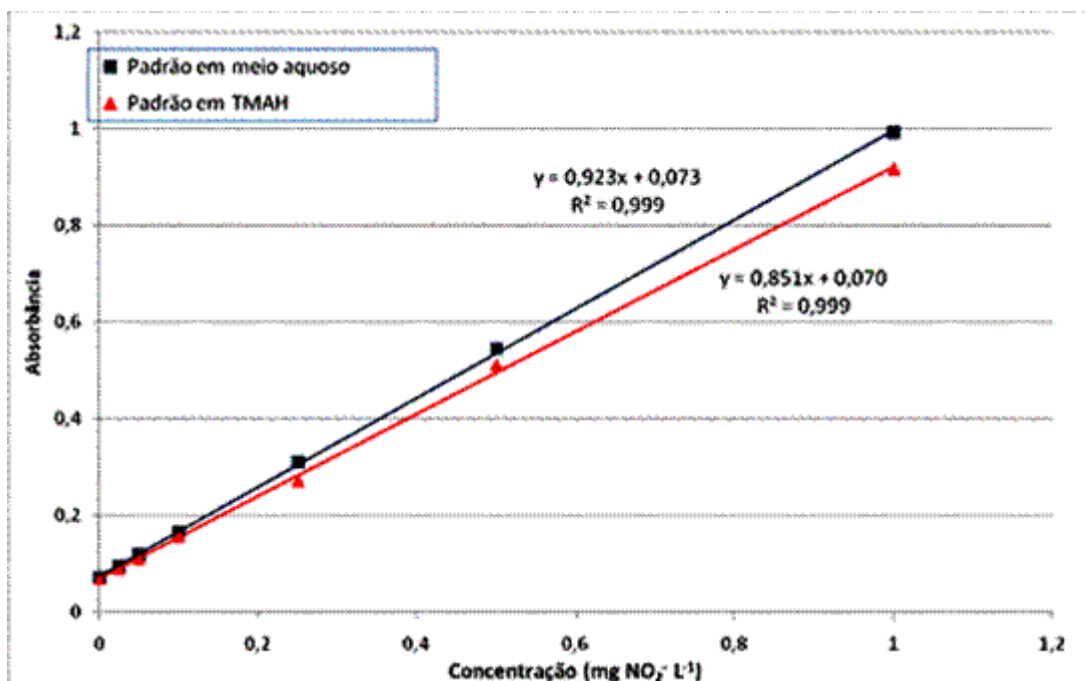


FIGURA 2. Curvas de absorvância x concentração de soluções padrão de nitrito de sódio ($\text{mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) por espectroscopia molecular UV-Vis de alíquotas diluídas em água e em TMAH a 0,45%(m/v).

A medição da concentração da solução padrão de nitrito de sódio demonstrou boa linearidade, em ambos os casos, $R^2 = 0,999$. Cabe ressaltar que, de acordo com a FDA (2003), um coeficiente de correlação linear aceitável é aquele cujo valor é maior ou igual a 0,995 e que, para a ANVISA (2003), o valor mínimo é de 0,9801. A correlação entre as curvas obtidas também foi alta, como indica o coeficiente de correlação igual a 0,9997, referente à relação entre as duas matrizes de dados.

As equações de reta, no entanto, indicam que ocorre redução de sensibilidade da medição quando o TMAH é utilizado. Para tanto, é preciso observar as inclinações das curvas, ou seja, os valores referentes aos seus coeficientes angulares (OLIVEIRA; MENDES, 2010). Enquanto a curva obtida com a solução aquosa apresenta coeficiente igual a 0,923, este valor é reduzido para 0,851 quando o TMAH é aplicado como solvente, uma redução de 8% na sensibilidade. Este fenômeno pode estar associado a reações de complexação do TMAH com o reagente que produz a coloração. Esta é uma informação bastante importante, tendo em vista que o solvente utilizado no método IAL é a água e na técnica proposta foi

aplicada a solução alcalina. Os resultados dos demais ensaios da validação deverão confirmar se esta diferença é significativamente suficiente para gerar resultados estatisticamente distintos entre os métodos.

Estes resultados estimularam a realizar o estudo da relação entre a concentração do TMAH e a absorbância obtida no comprimento de onda utilizado nos ensaios, segundo a técnica proposta. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico (Figura 3) e, com base na análise destas informações, definiu-se, para as futuras leituras, a concentração final da solução alcalina em 0,45%(m/v) de TMAH. Além disso, vale ressaltar que quando a calibração do instrumento é feita no mesmo meio que as amostras são preparadas, nenhuma interferência é evidenciada, pois somente caracteriza uma interferência quando a resposta do instrumento diverge entre a calibração e a leitura das amostras.

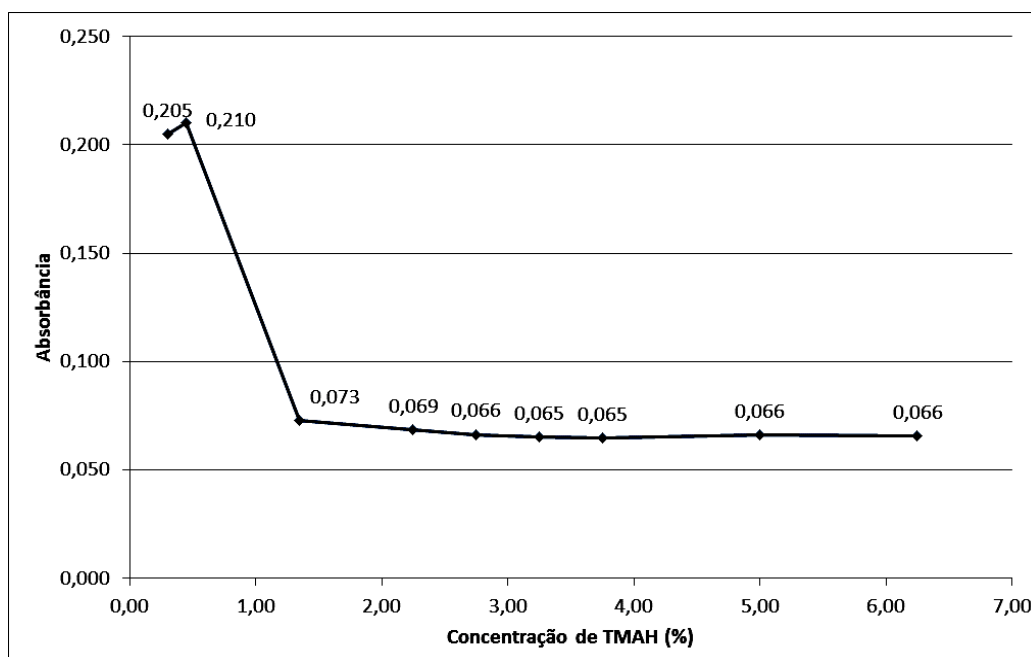


FIGURA 3. Relação entre a concentração de TMAH e a absorbância em leituras por espectroscopia molecular

4.1.3 Faixa de trabalho

Seguindo orientação do INMETRO (2010), a avaliação da faixa de trabalho foi iniciada pela escolha de uma faixa preliminar. Neste estudo, os limites desta faixa foram 0,1 e 10 mg NO₂⁻ L⁻¹, definidos arbitrariamente (Figura 4).

De acordo com o INMETRO (2010), dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta na qual o sinal produzido tem relação linear com a concentração do analito. Ao avaliar a curva produzida no ensaio preliminar (Figura 4), observou-se que a relação linear entre a concentração de nitrito ($\text{mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$) e a absorbância foi mantida até $2,0 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Para a realização das curvas de determinação, com base no estudo da linearidade e da faixa de trabalho variou-se a concentração de $0,025$, $0,050$, $0,10$, $0,25$, $0,50$ e $1,0 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$, a partir de soluções estoque de nitrito de sódio de $1.000 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$.

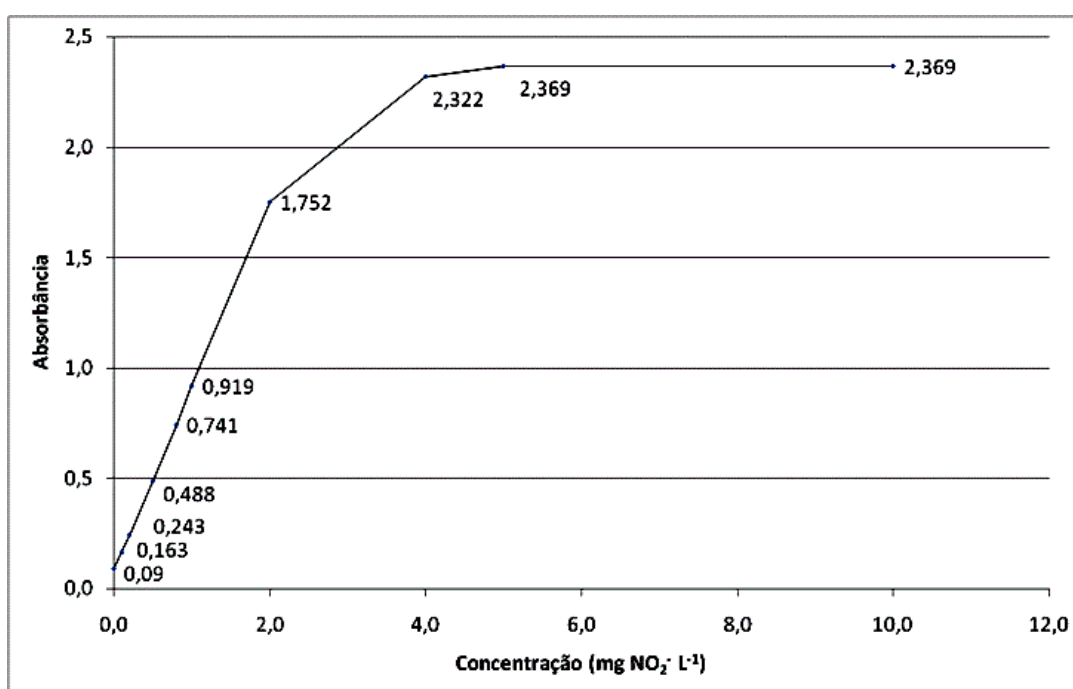


FIGURA 4. Curva de absorbância x concentração de soluções padrão de nitrito de sódio em concentrações de $0,1$ até $10,0 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ por espectroscopia molecular UV-Vis.

Cabe observar, no entanto, que o limite inferior da faixa, considerado neste estudo foi $0,0167 \text{ mg NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ (ver seção 4.2.5), seguindo a orientação do INMETRO (2010) que indica que o valor extremo inferior da faixa de trabalho deve corresponder ao limite de quantificação.

4.1.4 Limite de detecção

O limite de detecção do sinal, para o método proposto, foi calculado a partir da média do desvio padrão das medidas do branco, cujo coeficiente de variação foi

igual a 5,07%(Quadro 3). O valor médio, resultante de sete replicatas, foi igual a 0,013 mg NO₂⁻ L⁻¹ (Eq. 5).

$$LD = 0,0111 + 3,707^* \times 0,0006$$

O limite de detecção para a determinação espectrofotométrica de nitrito obtido neste estudo é inferior ao calculado por meio da razão das absorbâncias de uma amostra a 355 nm e a 302 nm, em caminho ótico de 10 mm, indicado pelo Instituto Adolfo Lutz, cujo valor é de 0,02 mg NO₂⁻ L⁻¹(IAL, 2008).

Quadro 3. Leituras de branco na determinação de nitritos por espectroscopia molecular

Replicatas do branco	Absorbância	[Branco]
1	0,0717	0,0106
2	0,0718	0,0107
3	0,0718	0,0107
4	0,0719	0,0109
5	0,0721	0,0111
6	0,0721	0,0111
7	0,0729	0,0122
Média (mg NO₂⁻ L⁻¹)	0,07238	0,0111
Desvio padrão	0,00195	0,0006
RSD (%)	2,70	5,07

4.1.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação do sinal, para o método proposto, foi calculado a partir da média do desvio padrão das medidas do branco (Quadro 3). O valor médio, resultante de sete replicatas, foi igual a 0,0167 mg NO₂⁻ L⁻¹ (Eq. 6).

$$LD = 0,0111 + 10 \times 0,0006$$

* Valor de t para 6 graus de liberdade e confiança de 99%.

O limite de quantificação observado por Takemoto *et al.* (1999), na determinação espectrofotométrica de nitrito, calculada por meio da razão das absorbâncias de uma amostra a 355 nm e a 302 nm, em caminho ótico de 10 mm, foi de 0,021 mg NO₂⁻ L⁻¹, superior ao obtido neste estudo. No entanto, o desvio relativo nas medições realizadas pelos autores, igual a 3,7% é inferior ao coeficiente de variação obtido nestas avaliações (5,07 %).

4.1.6 Tendência/recuperação

Os resultados obtidos nos testes de recuperação para todas as matrizes analisadas estão sumarizados nas tabelas 7, 8 e 9 e referem-se, respectivamente, às amostras de mortadela, patê e salsicha. Vale destacar que estes resultados referem-se ao preparo de amostras tanto usando filtração quanto centrifugação para a separação de fases.

De acordo com Diretiva 657 das Comunidades Européias (2002), a adição de padrão adequa-se à determinação da concentração de analito em amostras e permite estimar a taxa de recuperação da técnica analítica, cujos valores aceitáveis são de 80 a 110%. A quantidade de padrão adicionado não deve ser superior a cinco vezes a concentração de analito estimada na amostra.

Tabela 7. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de mortadela tipo bologna, de frango e calabresa, mediante adições de padrão de nitrito de sódio

Adições de padrão mg NO ₂ ⁻ L ⁻¹	Bologna		Frango		Calabresa	
	Recuperação mínima	Recuperação máxima	Recuperação mínima	Recuperação máxima	Recuperação mínima	Recuperação máxima
(1) 0,1398	99	105	104	105	98	109
(2) 0,1678	82	91	105	108	83	87
(3) 0,2797	100	103	107	109	94	95
Médias	94	100	105	107	92	97

Ao avaliar os resultados dos testes de recuperação obtidos neste estudo é possível afirmar que estão dentro dos limites indicados pela Comunidade Europeia (2002). Na avaliação de amostras de mortadela, a menor taxa obtida foi de 92% para a do tipo calabresa, e a maior, igual a 107 %, foi gerada na determinação de nitritos da mortadela de frango. Seria natural esperar que a recuperação fosse afetada de maneira mais significativa em níveis de adição mais baixos, supondo que a perda de massa do analito presente na matriz, durante os processos de preparo da amostra e medição, se mantenha em todos os testes. Nas amostras de mortadela esta hipótese não foi confirmada, tendo em vista que as menores taxas de recuperação foram encontradas também no nível 2 de adição nos tipos bologna e calabresa.

Os resultados obtidos quando a matriz foi o patê são similares. A recuperação variou de 90 %, correspondente ao embutido derivado de fígado, enquanto o valor máximo foi gerado ao analisar o patê de frango (108 %). Cabe mencionar, que Pinho *et al.* (1998) obtiveram resultados semelhantes avaliando patês de fígado. A recuperação para a determinação de nitritos obtida pelos autores variou entre 90 e 106 %. Embora se refiram a um estudo com As, os resultados obtidos por Moraes (2010), analisando amostras de fígado de frango tratadas em meio alcalino de TMAH, indicaram taxas de recuperação iguais a $75,0 \pm 1,9\%$ para este analito.

Tabela 8. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de patê de presunto, de fígado e de frango, mediante adições de padrão de nitrito de sódio

Adições de padrão mg NO ₂ ⁻ L ⁻¹	Presunto		Frango		Fígado	
	Recuperação mínima	Recuperação máxima	Recuperação mínima	Recuperação máxima	Recuperação mínima	Recuperação máxima
(1) 0,1398	96	107	95	108	83	94
(2) 0,1678	103	107	104	107	94	100
(3) 0,2797	102	108	106	109	92	99
Médias	101	107	102	108	90	98

Também as taxas de recuperação obtidas ao determinar nitrito em amostras de salsicha estão de acordo com a Diretiva 657 (COMUNIDADE EUROPEIA, 2002), embora nas adições 2 e 3 (Tabela 9), a recuperação máxima seja equivalente ao limite superior indicado no documento de referência.

Tabela 9. Taxas de recuperação (%) obtidas em amostras de salsicha tipo Viena, mediante adições de padrão de nitrito de sódio

Adições de padrão mg NO ₂ ⁻ L ⁻¹	Salsicha	
	Recuperação mínima	Recuperação máxima
(1) 0,1398	101	106
(2) 0,1678	109	110
(3) 0,2797	102	110
Médias	104	109

De acordo com Bruce *et al.* (1998), embora um método oficial não precise ser revalidado, quando utilizado na íntegra, é prudente avaliar a recuperação do analito antes de inseri-lo na rotina de um laboratório. Os valores obtidos, neste caso, para as sete amostras estudadas, variaram de 72 até 107 %, sendo que para os valores mais discrepantes foram obtidos para a mortadela calabresa. A hipótese de que os níveis mais baixos de adição de padrão deveriam sofrer interferência mais significativa das perdas de analito durante o preparo de amostras e a medição foi confirmada nos ensaios de patês e salsicha. As taxas de recuperação obtidas com estas matrizes apresentaram os menores valores no nível de menor adição de padrão.

4.1.7 Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetitividade dos resultados das determinações nas matrizes analisadas e expressa pelo desvio padrão e coeficiente de variação, conforme indicado pelo INMETRO (2010). Estabeleceu-se que, em conformidade com Diretiva 657 das Comunidades Européias (2002), o coeficiente de variação para a precisão em condições de repetitividade deveria ser inferior a 10,7%.

Os resultados apresentados na tabela 10 confirmam a precisão da técnica proposta, quer utilizando a centrifugação ou a filtração para a separação da fase líquida depois do processo de solubilização das amostras.

Tabela 10. Resumo dos coeficientes de variação (%) dos resultados da determinação de nitritos por espectroscopia molecular em amostras de mortadela, patê e salsichas.

Matriz	Método proposto com centrifugação	Método proposto com filtração
Mortadela bologna	4,565	6,790
Mortadela de frango	3,104	6,579
Mortadela calabresa	8,805	8,300
Patê de presunto	5,571	4,425
Patê de frango	4,935	6,788
Patê de fígado	3,352	7,585
Salsicha tipo Viena	9,209	7,047

O coeficiente de variação de menor valor absoluto, 3,104, foi obtido nas determinações do analito em amostras de mortadela de frango usando a centrifugação. Enquanto as amostras de salsicha analisadas do mesmo modo geraram a maior variação nos resultados (RSD= 9,209). Convém observar, contudo, que todos os valores obtidos foram inferiores ao limite de 10,7%, definido na Diretiva 657 (COMUNIDADES EUROPÉIAS, 2002), indicando que a precisão dos métodos é satisfatória.

4.1.8 Robustez

Os resultados obtidos na avaliação das quatro variáveis testadas estão resumidos na Tabela 11 e na Tabela 12.

Tabela 11. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da interferência do analista, da data da análise e do espectrômetro nos resultados da determinação de nitritos em mortadela de frango para o teste de robustez

Variáveis/Níveis	Média	Desvio padrão	RSD
Analista	mg NO ₂ ⁻ 100 g ⁻¹		%
Analista 1	8,463	0,184	2,174
Analista 2	8,587	0,180	2,095
Data			
18/8/2012 (t=0d)	3,455	0,213	6,158
8/9/2012 (t=21d)	3,331	0,104	3,131
21/9/2012 (t=34d)	3,395	0,097	2,856
Espectrômetro			
Equipamento 1	0,631	0,058	9,209
Equipamento 2	0,585	0,052	8,895

A análise estatística dos resultados obtidos (anexo 2) por ambos os analistas, nas três datas e com os dois equipamentos indicou que, em um nível de confiança de 95 %, não há diferença entre os resultados gerados quando cada uma das variáveis foi alterada. De acordo com Reis (2006), constitui-se em um método robusto aquele cujos resultados não sofrem alteração estatisticamente significativa mediante as variações impostas no teste de robustez, ou seja, oferece confiabilidade nos resultados.

Os resultados apresentados na tabela 12 resumem o comportamento do método proposto quando se aplicam técnicas diferentes de separação da fase líquida da mistura gerada no preparo das amostras por meio da solubilização alcalina com TMAH, proposta neste estudo. A comparação de médias, por meio do teste t (anexo 2), em um nível de confiança de 95% indica que não há diferença significativa entre os resultados, quer seja aplicada a centrifugação ou a filtração.

Avaliando a robustez de um método de determinação de nitritos em patê de presunto por espectroscopia UV-Vis, mediante adição de agentes complexantes, Reis (2006) concluiu que o método não era robusto quanto ao processo de extração do analito, indicando para fazê-lo com a metodologia tradicional.

Tabela 12. Resumo dos resultados obtidos na avaliação da interferência da técnica de separação da fase líquida nos resultados da determinação de nitritos para o teste de robustez

Técnica de separação da fase líquida				Filtração		
Amostras	Centrifugação					
	Média (mg NO ₂ ⁻ 100 g ⁻¹)	Desvio padrão	RSD (%)	Média (mg NO ₂ ⁻ 100 g ⁻¹)	Desvio padrão	RSD (%)
Mortadela bologna	4,090	0,187	4,565	4,183	0,284	6,790
Mortadela de frango	4,393	0,136	3,104	4,474	0,294	6,579
Mortadela calabresa	4,192	0,369	8,805	4,678	0,388	8,300
Salsicha tipo Viena	0,631	0,058	9,209	0,630	0,044	7,047
Patê de presunto	10,885	0,606	5,571	10,848	0,480	4,425
Patê de fígado	7,953	0,267	3,352	7,930	0,601	7,585
Patê de frango	8,209	0,405	4,935	8,222	0,558	6,788

Perante os resultados obtidos no teste de robustez, é possível perceber que a confiabilidade do método não é comprometida mediante as variações impostas neste estudo. Sendo assim, o método proposto é robusto.

A tabela 13 resume informações sobre o desempenho dos métodos tratados neste estudo. Os requisitos técnicos são aqueles relativos à validação e foram amplamente discutidos neste trabalho. Ao expô-los de forma resumida e em conjunto pretende-se confirmar que a técnica proposta apresenta desempenho similar ao método considerado referência na determinação de nitritos no Brasil. Os aspectos gerais trazem à discussão informações que justificam a proposição da nova técnica no contexto operacional e referem-se ao volume de efluentes gerado, tempo de execução, consumo de energia e custo de reagentes. Vale destacar que estas informações são estimativas, baseadas na execução de dez marchas analíticas e estão condicionadas à capacidade operacional do laboratório em que o estudo foi conduzido. Ao alterar equipamentos, utensílios e insumos, por exemplo,

os resultados gerados neste contexto podem apresentar alterações. É possível perceber, no entanto, que o método proposto reduz a geração de efluentes, nestas condições, para um volume equivalente a 5%daquele gerado quando utilizado o método de referência. Contribui para isto a redução promovida, na mesma proporção, do tamanho da amostra. Convém destacar que não está inserida nesta estimativa a lavagem de vidraria, considerada comum aos dois métodos. O consumo de energia também é reduzido significativamente. A diferença deve-se, principalmente ao fato de o método proposto dispensar aquecimento. O custo de reagentes reduz-se a um terço quando se aplica o método proposto na rotina.

Tabela 13. Comparação de requisitos técnicos e de aspectos gerais relativos aos métodos de referencia (IAL, 2008) e proposto.

	Item	IAL	Proposto com centrifugação
Parâmetros de mérito	RSD (%)	2,6 a 8,9	3,1 a 9,2
	Recuperação (%)	72 a 107	90 a 109
	Limite de detecção do sinal ($\text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$)	0,02	0,013
	Limite de quantificação do sinal ($\text{NO}_2^- \text{ L}^{-1}$)	0,021	0,017
Aspectos operacionais	Efluente gerado (mL)	2.400	130
	Tamanho da amostra (g)	10	0,5
	Estimativa de tempo total (minutos)	240	215
	Estimativa de consumo total de energia (W)	5.114	136
	Estimativa de custo de reagentes (R\$)	15,52	4,86

4.2 Avaliação do teor de nitritos em embutidos obtidos no comércio local

Depois de validar o método proposto para a determinação de nitritos de sódio em produtos cárneos embutidos por meio da solubilização de amostras em meio alcalino fornecido por TMAH e atestar que a centrifugação foi eficaz na separação da fase líquida, reuniu-se os resultados gerados pela nova técnica proposta na determinação do analito em mortadela dos tipos Bologna, de frango e calabresa, salsicha tipo Viena e patê dos tipos de presunto, de frango e de fígado (Tabela 14).

Tabela 14. Resultados obtidos na determinação de nitritos por espectroscopia molecular UV-Vis em amostras de mortadelas, da salsicha tipo Viena e em patês, em mg NO₂⁻ kg⁻¹, solubilizadas em meio alcalino (TMAH)

Parâmetros	Média	RSD (%)
Mortadela bologna	40,9	4,565
Mortadela de frango	43,9	3,104
Mortadela calabresa	41,9	8,805
Salsicha	63,1	9,209
Patê de presunto	108,8	5,571
Patê de frango	82,1	4,935
Patê de fígado	79,5	3,352

Vários estudos com derivados de carne foram publicados nas últimas décadas. Os dados fornecidos pelos autores indicam que, embora pouco frequentes, existem casos de negligência ao limite máximo estabelecido para concentração de nitrito nestes alimentos.

Silva *et al.* (2009) avaliaram carnes bovinas moídas in natura e resfriadas, comercializadas em mercados varejistas do estado do Rio de Janeiro. Os resultados obtidos demonstraram que de 35 amostras analisadas, 37,14% apresentaram nitrito, cuja maior concentração detectada foi 1,17mg Kg⁻¹ e a menor 0,173mg Kg⁻¹. Em 1998, linguiças do tipo calabresa, comercializadas na região urbana de Bragança Paulista, tiveram avaliada a concentração de nitritos. Os resultados obtidos revelaram que 60% das amostras apresentavam concentração de nitritos superior ao

limite legal (NITRINI *et al.*, 2000). Também no estado de São Paulo, Tavares *et al.* (1987), já haviam avaliado o teor de nitritos em conservas de carne. Para tanto, tomaram amostras de linguiça, carne temperada, salsicha, lombo de porco salgado e defumado, mortadela, charque, pertences para feijoada, apresuntado e toucinho defumado, coletadas na Região Metropolitana de São Paulo, no período de 2 anos. Os resultados da concentração de nitritos nas amostras de salsicha e mortadela analisadas foram inferiores ao limite legal. Resultados equivalentes aos obtidos por Cassens (1997), que encontrou valores de nitrito residual entre 5 e 15mg kg⁻¹ em produtos cárneos curados.

Lira *et al.* (2003) quantificaram o teor de nitrito de sódio em produtos cárneos provenientes de estabelecimentos comerciais de Maceió/AL. Todos os resultados obtidos para mortadela, entre 0,3 a 1,7 mg kg⁻¹, situaram-se abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira. No Paraná, Daguer (2011) avaliou 131 amostras de produtos cárneos. Os valores de nitrito residual detectados nos produtos variaram de 3,7 a 1.398,5mg kg⁻¹, entre os quais, excederam o limite legal, 23 amostras (18,4%) que apresentaram concentração de nitrito superior a 395,91mg kg⁻¹.

Na avaliação dos três tipos de mortadela, realizada neste trabalho, obteve-se valores entre 40,9 a 43,9mg NO₂⁻ kg⁻¹ (Tabela 14). Estes valores são inferiores aos limites estabelecidos pela legislação vigente, como foram, também, os resultados obtidos por Borsato *et al.* (1989) ao avaliar 14 amostras de mortadela adquiridas no comércio da cidade de Londrina (PR) que variaram de 8,23 a 127,54mg NO₂ kg⁻¹.

Na avaliação da salsicha tipo Viena, o resultado obtido de 63,1 mg NO₂⁻ kg⁻¹ (Tabela 14), foi inferior ao limite estabelecido pelo Ministério da Saúde. Também abaixo dos limites estabelecidos foram os resultados obtidos por Maiolla *et al.* (2004) que obtiveram níveis de até 37,0 mg NO₂⁻ kg⁻¹ para nitritos em salsicha, como também indicam os dados publicados por Prieto *et al.* (2012), que obtiveram resultados entre 8 e 79 mg NO₂⁻ kg⁻¹. Borsato *et al.* (1989) obtiveram valores entre 12,48 a 117,47 mg NO₂⁻ kg⁻¹ ao analisar 10 amostras de salsichas oriundas de Londrina/PR, similares aos valores médios encontrados, por Biscontini *et al.* (2004), em estudo realizado na região metropolitana do Recife, que variaram de 47,88 ±

15,26 até $142 \pm 26,91 \text{ mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$ em 54 amostras de salsichas oriundas de indústrias e de feiras livres, nestas, os resultados foram superiores a $150 \text{ mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$.

Os resultados obtidos na avaliação de patês (Tabela 14) indicam que os três tipos avaliados apresentaram concentrações de nitrito inferiores ao limite estipulado pelo Ministério da Saúde. No entanto, é possível perceber que no patê de presunto, o teor de nitrito, $108,8 \text{ mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$, é superior aos valores encontrados no produto de frango ($82,1 \text{ mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$) e de fígado ($79,5 \text{ mg NO}_2^- \text{ kg}^{-1}$). A variação no teor de nitritos também foi encontrada por Borsato *et al.* (1989) em 30 amostras destes três tipos de patês, comercializados em Londrina/PR. Em patês de frango os resultados foram de 24,55 a $202,95 \text{ mg NO}_2 \text{ kg}^{-1}$, nos de presunto, de 128,13 a $174,97 \text{ mg NO}_2 \text{ kg}^{-1}$ e naqueles de fígado, variaram de 12,72 a $164,60 \text{ mg NO}_2 \text{ kg}^{-1}$. Patês de fígado, também foram avaliados por Pinho *et al.* (1998). Em amostras oriundas do continente europeu os resultados foram bastante inferiores aos obtidos neste trabalho, variando de $1,07 \pm 0,43$ até $15,9 \pm 5,2 \text{ mg NaNO}_2 \text{ kg}^{-1}$, equivalentes, respectivamente, a 0,71 e $10,60 \text{ mg NO}_2 \text{ kg}^{-1}$.

De maneira geral, é possível perceber que os teores mais elevados de nitritos entre as matrizes analisadas são encontrados nos patês, em especial no de presunto (tabela 14). A mortadela foi o embutido com as menores concentrações do analito avaliado neste estudo.

5 Conclusões

O uso do meio alcalino de TMAH foi eficiente para o preparo de amostras quando aplicado à determinação espectrométrica de nitritos em mortadela, patê e salsicha por UV-Vis. A concentração final do reagente na solução alcalina deve ser 0,45% (m/v) e a quantidade de amostra de 0,5 g, em massa seca.

O método proposto atende aos requisitos da orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos (INMETRO, 2010) e, portanto, foi validado. Possui linearidade em concentrações até 2,0 mg NO₂⁻ L⁻¹. O limite de detecção do método é de 13 µg NO₂⁻ L⁻¹ e o de quantificação, 17 µg NO₂⁻ L⁻¹. O método avaliado possui repetitividade e reprodutibilidade intralaboratorial e é robusto, apresentando coeficientes de variação de 3,1 a 9,2% e taxas de recuperação de 90 a 109 %.

O método proposto reduz o tamanho da amostra, a geração de efluentes, o consumo de energia, o consumo e o custo com o uso de reagentes, além do tempo de análise.

6 Referências

- 1) ALBANO, F.M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.
- 2) ALMEIDA, M.G. et al. Construção de um bio-eléctrodo específico para determinação de nitritos. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, n.84, p. 68-71, 2011. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_084_068_11.pdf>. Acesso em 7 set 2012.
- 3) ANDREOLI, P. **Perfil bacteriológico e determinação da atividade de água de salame tipo italiano em três formas de comercialização no município de Niterói-RJ**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.
- 4) AOAC. **Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis**. 2002. Disponível em: <http://www.aoac.org/Official_Methods/Collaborative_Study_Validation_Guidelines.pdf>. Acesso em: 7 Set 2012.
- 5) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17.025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005. 31 p.
- 6) BISCONTINI, T. M. B.; et al. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana de Recife. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 390-392, jul.-set. 2004.
- 7) BORDIGNON-LUIZ, M. T. et al. Validação de uma metodologia analítica para determinação de cálcio em produtos cárneos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n.4, p. 973-978, out.-dez. 2008.
- 8) BORSATO, D. et al. Teores de nitratos e nitritos em conservas de carne comercializadas em Londrina (PR). **Semina**, v. 10, n.4, p. 235-238, 1989.
- 9) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 540, de 27 out. 1997. **Diário Oficial da União**. Brasília, 28 out. 1997.
- 10) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 1.004, de 11 dez. 1998. **Diário Oficial da União**. Brasília, 22 mar. 1999.
- 11) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RDC) n.º 360, de 23 dez. 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 26 dez. 2003.
- 12) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução (RE) n.º 899, de 2 jun. 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 jun. 2003.
- 13) BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30691, de 29 mar. 1952. **Diário Oficial da União**. Rio de Janeiro, 29 mar. 1952.

- 14) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 4, de 31 mar. 2000. **Diário Oficial da União**. Brasília, 5 abr. 2000(a), sec. 1 , p 6.
- 15) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 20, de 21 jul. 1999. **Diário Oficial da União**. Brasília, 9 set. 1999. sec. 1, p.30-31.
- 16) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 21, de 31 jul. 2000. **Diário Oficial da União**. Brasília, 3 ago. 2000(b), sec. 1 , p 12.
- 17) BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 29 dez. 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, 4 jan. 2007, sec. 1, p 14.
- 18) BRUCE, P. et al. Practical Method validation: Validation Sufficient for an analysis Method. **Mikrochimica Acta**, v.128, p. 93-106, 1998.
- 19) BURNS, D. T. et al. Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 11, p. 2201–2205, 2002.
- 20) CASSENS, R.G. Residual nitrite in cured meat. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 53-55, 1997.
- 21) COMUNIDADES EUROPÉIAS. Comissão das Comunidades Europeias. Conselho. Directiva 657, 17 ago. de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Européias**. Bruxelas, 17 ago. 2002. L221. p. 8-36.
- 22) COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 249-254.
- 23) CUNHA, F.A. et al. Determinação de nitritos em alimentos cárneos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)**, v.35, n.1, p. 3-4, 2003.
- 24) DAGUER, H. et al. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no estado do paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, 2011.
- 25) DAMIN, I. C. **Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traço em carne in natura e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**. 2009. 112 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- 26) DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguiças do tipo frescal e cozida comercializadas no estado do Rio De Janeiro, Brasil**. 2010. 112 p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

- 27) Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO); Organização Mundial da Saúde (OMS). **Codex Alimentarius**. Roma, FAO/OMS, 1992. 568 p.
- 28) FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **ORA-LAB.5.4.5**: Methods, method verification and validation. 2003. Disponível em: <http://www.crawfordscientific.com/downloads/pdf_new/FDA_Method_Selection.pdf>. Acesso em: 10 de setembro de 2012.
- 29) GONÇALVES, E. B.; et al. **Questões críticas em validação de métodos analíticos**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, 2011. 69p.
- 30) IBGE. **Pesquisa Industrial Anual** - Produto (PIA-Produto). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/industria/pia/produtos/produto_2000/tabela_produtos_2000.shtm>. Acesso em: 31 ago 2012.
- 31) IBGE. Pesquisa Industrial 2010 - Produto. **Pesquisa Industrial**, v. 29, n.2, p. 19-20, 2010.
- 32) INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4 Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.
- 33) INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos. Rev.3. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-Cgcre-8_03.pdf>. Acesso em 31 Ago. 2012.
- 34) LIRA, G. M.; et. al. Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió-AL. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**; v.62, n.3, p.165-170, 2003.
- 35) LUIZ, V. H. M.; MARTINS, A. P.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Desenvolvimento de método analítico para determinação de nitritos por espectroscopia de reflectância difusa. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Anais....** São José do Rio Preto: UNESP, 2009. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/>. Acesso em: 31 Ago. 2012.
- 36) MAIOLLA, V. B. et al. Determinação de nitrato e nitrito por sistema FIA em salsichas. In: CONGRESSO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12., 2004, Campinas. **Anais....** Campinas: UNICAMP, 2004. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xiicongresso/cdrom/html/caderno_resumo.html>. Acesso em: 31 Ago. 2012.
- 37) MÁRSICO, ELIANE TEIXEIRA; et. al. Determinação do teor de umidade e presença de nitrito em amostras de charque. **Hig. aliment**, ed.94, p.45-49, mar. 2002.

- 38)McCLURE, B. N. et al. The effects of lactate on nitrosylmyoglobin formation from nitrite and metmyoglobin in a cured meat system. **Food Chemistry**, n.129, p.1072–1079, 2011.
- 39)MORAES, D. P. **Análise de especiação de arsênio por HG AAS com aprisionamento criogênico e uso de multiatomizador**. 2010. 141 p. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- 40)NARAYANA, B.; SUNIL, K. A. Spectrophotometric Method for the Determination of Nitrite and Nitrate. **Eurasian J. Anal. Chem.** v.4, n.2, p.204-214, 2009.
- 41)NITRINI, S. M. O. O.; et al. Determinação de nitritos e nitratos em lingüiças comercializadas na região de Bragança Paulista. **Lecta-USF**, v.18, n.1, p. 91-96, jan.-jun. 2000.
- 42)NÓBREGA, J.A. et al. Sample preparation in alkaline media, **Spectrochim. Acta Part B**, v.61, p. 465-495, mai. 2006.
- 43)OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. v.1. 1ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010. 144p.
- 44)OLIVEIRA, M. J.; et al. Quantificação de Nitrato e Nitrito em Lingüiças do Tipo Frescal. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.4, p.736-742, out.-dez. 2005.
- 45)OLIVEIRA, R. M. et al. Estudos para a determinação de Pb em carnes por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20., 2011, Pelotas. **Anais....** Pelotas: UFPEL, 2011. 1 CD-ROM.
- 46)OMS. Evaluation of certain food additives and contaminants. **WHO Technical Reports Series**, n.859, Genebra, 1995. 56p.
- 47)PINHO, O. et al. FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. **Food Chemistry**, v.62, n.3, pp.359-362, 1998.
- 48)PRIETO, W. H. et al. Determinação de nitritos e de nitrato em salsicha. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20., 2012. São Paulo. **Anais....** São Paulo: USP, 2012. 1 CD on line. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineMenu?numeroEdicao=20&print=S>>. Acesso em: 2 Nov. 2012.
- 49)REIS, P. B. **Validação de método espectrofotométrico para determinação de nitritos em patê de presunto**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- 50)RIBEIRO, A. S.; GHISI, .; VIEIRA, M. A.; CURTIUS, A. J. Avaliação de diferentes formas de introdução de amostra biológica tratada com hidróxido de

- tetrametilamônio em espectroscopia de absorção atômica com chama. **Revista Analytica**, n. 28, Abril/Maio, 2007.
- 51) RODRIGUES, R. L.; MORETTO, A. C.; SESSO FILHO, U. A.; KURESKI, R. Setores alimentares e relações produtivas no sistema inter-regional Paraná – restante do Brasil. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n.110, p.9-32, jan-jun, 2006.
 - 52) ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Terminology - the key to understanding analytical science. Part 1: Accuracy, precision and uncertainty. **Amc technical brief**. n.13, set. 2003.
 - 53) SARMENTO, C. M. P. **Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico**. 2006. 146 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
 - 54) SEMEDO, J. **Aditivos alimentares em cabo verde**. 2009. 57 p. Monografia (Licenciatura em Química) – Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade de Cabo Verde, Cabo Verde, 2009.
 - 55) SILVA, C.; MONTEIRO, M. L. G.; RIBEIRO, R. O.R.; GUIMARÃES, C. F. M.; MANO, S. B.; PARDI, H. S.; MÁRSICO, E. T. Presença de aditivos conservantes (nitrito e sulfito) em carnes bovinas moídas, comercializadas em mercados varejistas. **R. bras. Ci. Vet.**, v.16, n.1, p. 33-36, jan./abr. 2009.
 - 56) SILVA, C. S. da et al. Evaluation of sample preparation methods based on alkaline and acid solubilization for the determination of Na and K in meat samples by atomic spectrometric techniques. **J. Braz. Chem. Soc**, v.23, n.9, p. 1623-1629, 2012.
 - 57) TAKEMOTO, E.; DELLA TORRE, J. C. de M.; LICHTIG, J. Nitrato em espinafre: validações de métodos colorimétricos. In: III SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS (SLACA), 1999. **Resumos...** Campinas: FEA-UNICAMP, 1999. p. 5.
 - 58) TAVARES, M.; ZANELATTO, A. M.; CARVALHO, J. B.; BACETTI, L. Determinação de nitritos e nitratos em linguiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.47, n.1, p.5-10, dez. 1987.
 - 59) TOLEDO, J. C; BORRÁS, M. A. A.; SCALCO, A. R.; LIMA, L. S. Coordenação da qualidade em cadeias de produção: Estrutura e Método para Cadeias Agroalimentares. **Gestão & Produção**, v.11, n.3, p.355-372, set-dez., 2004.
 - 60) TREVISAN, M. G. **Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

- 61) VALENTINI, S. R., SOMMER, W. WA.; MATIOLI G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. v.11, n.2, p.26-31, 2007.

ANEXOS

Anexo 1

Testes t para comparação de métodos

Tabela 1.1. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela bologna

	Variável 1	Variável 2
Média	4,21296	4,183021398
Variância	0,014619	0,08068002
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	11	
Stat t	0,290946	
P(T<=t) uni-caudal	0,388253	
t crítico uni-caudal	1,795885	
P(T<=t) bi-caudal	0,776505	
t crítico bi-caudal	2,200985	

Tabela 1.2. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela bologna

	Variável 1	Variável 2
Média	4,21296	4,089913
Variância	0,014619	0,034865
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	1,659442	
P(T<=t) uni-caudal	0,059626	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	0,119252	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Tabela 1.3. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela de frango

	Variável 1	Variável 2
Média	4,493032	4,474041
Variância	0,013852	0,086635
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	0,179729	
P(T<=t) uni-caudal	0,430478	
t crítico uni-caudal	1,812461	
P(T<=t) bi-caudal	0,860955	
t crítico bi-caudal	2,228139	

Tabela 1.4. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela de frango

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,493032	4,39318
Variância	0,013852	0,018596
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	1,662976	
P(T<=t) uni-caudal	0,057889	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,115779	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Tabela 1.5. Método proposto com filtração x ILA (2008) para mortadela calabresa

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,41084	4,678114
Variância	0,155188	0,150754
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	-1,44964	
P(T<=t) uni-caudal	0,083239	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,166478	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Tabela 1.6. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para mortadela calabresa

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,41084	4,191994
Variância	0,155188	0,136229
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	1,216193	
P(T<=t) uni-caudal	0,120775	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,24155	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Tabela 1.7. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de presunto

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	10,92956	10,84834
Variância	0,298139	0,161683
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	0,359307	
P(T<=t) uni-caudal	0,362187	
t crítico uni-caudal	1,75305	
P(T<=t) bi-caudal	0,724374	
t crítico bi-caudal	2,13145	

Tabela 1.8. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de presunto

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	10,92956	10,8853
Variância	0,298139	0,367709
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	0,162724	
P(T<=t) uni-caudal	0,436387	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,872773	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Tabela 1.9. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de fígado

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,683023	7,92976
Variância	0,215824	0,361729
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	-0,974	
P(T<=t) uni-caudal	0,172752	
t crítico uni-caudal	1,75305	
P(T<=t) bi-caudal	0,345503	
t crítico bi-caudal	2,13145	

Tabela 1.10. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de fígado

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,683023	7,952887
Variância	0,215824	0,071052
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	-1,51154	
P(T<=t) uni-caudal	0,077287	
t crítico uni-caudal	1,770933	
P(T<=t) bi-caudal	0,154574	
t crítico bi-caudal	2,160369	

Tabela 1.11. Método proposto com filtração x ILA (2008) para patê de frango

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,915346	8,221708
Variância	0,307553	0,311464
Observações	10	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	17	
Stat t	-1,19832	
P(T<=t) uni-caudal	0,123617	
t crítico uni-caudal	1,739607	
P(T<=t) bi-caudal	0,247233	
t crítico bi-caudal	2,109816	

Tabela 1.12. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para patê de frango

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,915346	8,208859
Variância	0,307553	0,16412
Observações	10	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	-1,32608	
P(T<=t) uni-caudal	0,101716	
t crítico uni-caudal	1,745884	
P(T<=t) bi-caudal	0,203433	
t crítico bi-caudal	2,119905	

Tabela 1.13. Método proposto com filtração x ILA (2008) para salsicha

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,662638	0,630197
Variância	0,001172	0,001972
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	1,735766	
P(T<=t) uni-caudal	0,051547	
t crítico uni-caudal	1,75305	
P(T<=t) bi-caudal	0,103095	
t crítico bi-caudal	2,13145	

Tabela 1.14. Método proposto com centrifugação x ILA (2008) para salsicha

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,662638	0,63057
Variância	0,001172	0,003372
Observações	9	9
Hipótese da diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	1,427212	
P(T<=t) uni-caudal	0,088548	
t crítico uni-caudal	1,770933	
P(T<=t) bi-caudal	0,177095	
t crítico bi-caudal	2,160369	

Anexo 2

Testes t para as variáveis avaliadas nos ensaios de robustez

Tabela 2.1. Teste da variável analista

	Variável 1	Variável 2
Média	8,462704	8,587464
Variância	0,033838	0,032358
Observações	5	5
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-1,08429	
P(T<=t) uni-caudal	0,154914	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,309829	
t crítico bi-caudal	2,306004	

Tabela 2.2. Teste da variável tempo (tempo zero x 21 dias)

	Variável 1	Variável 2
Média	3,455364	3,294852
Variância	0,045275	0,004683
Observações	5	5
Hipótese da diferença de média	0	
gl	5	
Stat t	1,605802	
P(T<=t) uni-caudal	0,084613	
t crítico uni-caudal	2,015048	
P(T<=t) bi-caudal	0,169226	
t crítico bi-caudal	2,570582	

Tabela 2.3. Teste da variável tempo (tempo zero x 34 dias)

	Variável 1	Variável 2
Média	3,455364	3,431401
Variância	0,045275	0,006508
Observações	5	5
Hipótese da diferença de média	0	
gl	5	
Stat t	0,235464	
P(T<=t) uni-caudal	0,411594	
t crítico uni-caudal	2,015048	
P(T<=t) bi-caudal	0,823189	
t crítico bi-caudal	2,570582	

Tabela 2.4. Teste da variável tempo (21 x 34 dias)

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	3,331103	3,39515
Variância	0,010878	0,009402
Observações	5	5
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-1,00565	
P(T<=t) uni-caudal	0,172014	
t crítico uni-caudal	1,859548	
P(T<=t) bi-caudal	0,344029	
t crítico bi-caudal	2,306004	

Tabela 2.5. Teste da variável equipamento

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,63057	0,584792
Variância	0,003372	0,002706
Observações	9	7
Hipótese da diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	1,659201	
P(T<=t) uni-caudal	0,059651	
t crítico uni-caudal	1,76131	
P(T<=t) bi-caudal	0,119301	
t crítico bi-caudal	2,144787	

Tabela 2.6. Teste da separação de fases para mortadela bologna

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,0899129	4,183021398
Variância	0,034864944	0,08068002
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,097824422	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-0,861326885	
P(T<=t) uni-caudal	0,207063711	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,414127423	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.7. Teste da separação de fases para mortadela de frango

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,393179604	4,474041184
Variância	0,018596205	0,086634763
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,206481297	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-0,695069358	
P(T<=t) uni-caudal	0,253347333	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,506694666	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.8. Teste da separação de fases para mortadela calabresa

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	4,191993901	4,678114335
Variância	0,136229217	0,150753552
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,350382266	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-2,343047404	
P(T<=t) uni-caudal	0,02359533	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,04719066	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.9. Teste da separação de fases para patê de presunto

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	10,88529669	10,84834191
Variância	0,367709408	0,161682896
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,046218915	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	0,155722286	
P(T<=t) uni-caudal	0,440054777	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,880109554	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.10. Teste da separação de fases para patê de fígado

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	7,952887284	7,929759979
Variância	0,071051971	0,361729282
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,382768496	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	0,093089429	
P(T<=t) uni-caudal	0,464060794	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,928121588	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.11. Teste da separação de fases para patê de frango

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	8,208858994	8,221708247
Variância	0,164120154	0,311464094
Observações	9	9
Correlação de Pearson	-0,500315623	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	-0,046013644	
P(T<=t) uni-caudal	0,48221363	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,964427259	
t crítico bi-caudal	2,306004135	

Tabela 2.12. Teste da separação de fases para salsicha

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	0,630569839	0,630196958
Variância	0,003372009	0,001972052
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,186089151	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	8	
Stat t	0,016894325	
P(T<=t) uni-caudal	0,49346733	
t crítico uni-caudal	1,859548038	
P(T<=t) bi-caudal	0,986934661	
t crítico bi-caudal	2,306004135	